

**UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA**

DIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIMICHE

CORSO DI LAUREA IN CHIMICA INDUSTRIALE

**Sintesi precursori di nanoparticelle per applicazioni
biomediche**

Relatore: Prof. Fabrizio Mancin

***Laureando: Francesco Zilli
1226192***

Anno Accademico 2021/2022

0. INDICE	
1. SCOPO	3
2. INTRODUZIONE	4
2.1. Membrane cellulari	4
2.2. Nanoparticelle cationiche con attività membranolitica/permeabilizzante	7
3. RISULTATI	14
3.1. Strategia sintetica.....	14
3.2. Evidenze sperimentali	15
3.3. Ipotesi di sviluppo	17
3.3.1. Sintesi 8-(trilitio)ottan-1-ammina (composto D)	17
3.3.2. Sintesi 1-ottil-3-(8(trilitio)ottil)tiourea (composto E).	18
3.3.3. Sintesi 1-ottil-3-(8(trilitio)ottil)guanidinio (composto F)	19
3.3.4. Sintesi 1-(8-mercaptottil)-3-ottilguanidinio (composto G).....	19
3.3.5. Sintesi Nanoparticelle.....	20
4. CONCLUSIONI	20
5. PARTE SPERIMENTALE	21
5.1. Procedura Sperimentale	21
5.2. Sintesi (8-bromottil)(tritol)solfuro (composto B)	21
5.3. Sintesi (8-azidottil)(tritol)solfuro (composto C)	22
6. BIBLIOGRAFIA	23
7. ABBREVIAZIONI	24

1. SCOPO

Lo scopo del lavoro di ricerca descritto in questa tesi è quello di sintetizzare delle nanoparticelle di oro funzionalizzate con potenziale attività membranolitica. L'interesse per tale proprietà è giustificato dal fatto che essa conferisce alle nanoparticelle stesse attività antibatterica ad ampio spettro basata su un meccanismo alternativo alle convenzionali sostanze antibatteriche di piccole dimensioni. Uno svantaggio degli agenti terapeutici basati su piccole molecole e su specifici meccanismi molecolari sta infatti nella capacità delle cellule di sviluppare resistenza mediante meccanismi di espulsione del farmaco o mutazioni dei target molecolari dello stesso. Questo problema potrebbe essere evitato utilizzando composti di dimensioni maggiori, quali le nanoparticelle, e basati su meccanismi di azione più generici.¹

Studi precedenti effettuati nel gruppo di ricerca in cui è stato svolto il presente lavoro sperimentale, e altri dati disponibili in letteratura suggeriscono, come si discuterà nei paragrafi successivi, che nanoparticelle funzionalizzate con derivati di tipo guanidinio-alchil-tiolo potrebbero essere in grado di legarsi ai doppi strati lipidici delle cellule con elevata affinità destabilizzandone la struttura.

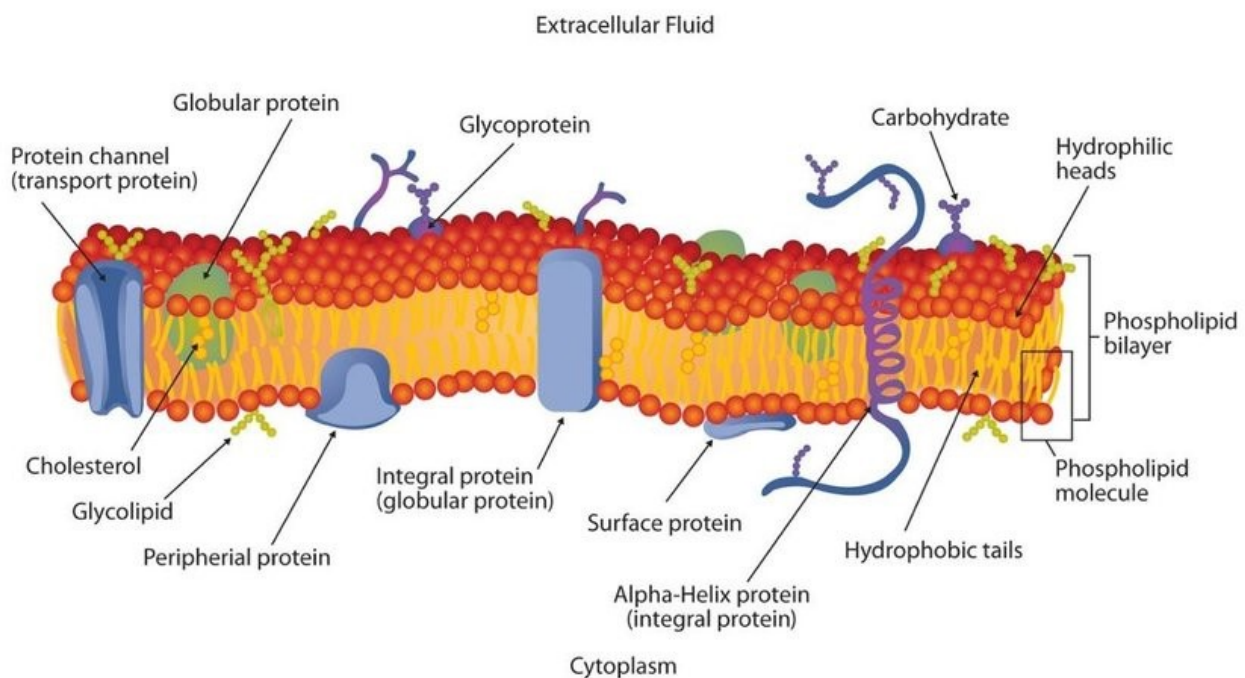
Questa tesi, dopo aver discusso le basi teoriche di questo progetto, descriverà l'approccio sintetico messo a punto ed i risultati ottenuti.

2. INTRODUZIONE

2.1. Membrane cellulari

Nonostante le loro differenti funzioni all'interno dell'organismo, tutte le membrane biologiche hanno in comune la stessa struttura generale, costituita da un doppio strato formato da molecole di natura lipidica. Queste molecole sono tenute insieme fra loro da una serie di interazioni intermolecolari non covalenti, tra le quali l'effetto idrofobico è il più importante, formando una macrostruttura che, nel suo insieme, costituisce un involucro che funge da barriera idrofobica impermeabile alla maggior parte delle molecole idrosolubili e ioniche oltre che alle particelle di grandi dimensioni.

Dal punto di vista chimico i componenti fondamentali delle membrane cellulari sono fosfolipidi, colesterolo e glicolipidi. Si possono inoltre trovare diverse proteine associate alla membrana con funzioni specifiche (vedi *Figura 1*). Le concentrazioni di questi componenti possono variare anche in maniera sensibile in funzione del tipo di cellula a cui appartengono e spesso, tali composizioni, variano anche fra i due strati lipidici all'interno di una stessa membrana.² In generale, gli unici costituenti presenti in quantità considerevoli in tutte le membrane biologiche (e che quindi ne costituiscono lo scheletro in cui gli altri componenti sono dispersi) sono i fosfolipidi.



*Figura 1: Rappresentazione schematica di una membrana cellulare.*³

Dal punto di vista chimico i fosfolipidi sono una classe di molecole composte da una “testa” polare e da due “code” apolari. Le “code” sono formate da acidi grassi di lunghezza variabile (C14-C24) in cui normalmente una catena è satura (quindi lineare) e l'altra contiene una o più insaturazioni in conformazione *cis* che la rendono “piegata”. La “testa” è invece formata da un gruppo fosfato esterificato a un sostituito polare (come colina, etanolamina, serina, etc.) e collegato alle due code mediante una molecola di glicerolo.⁴

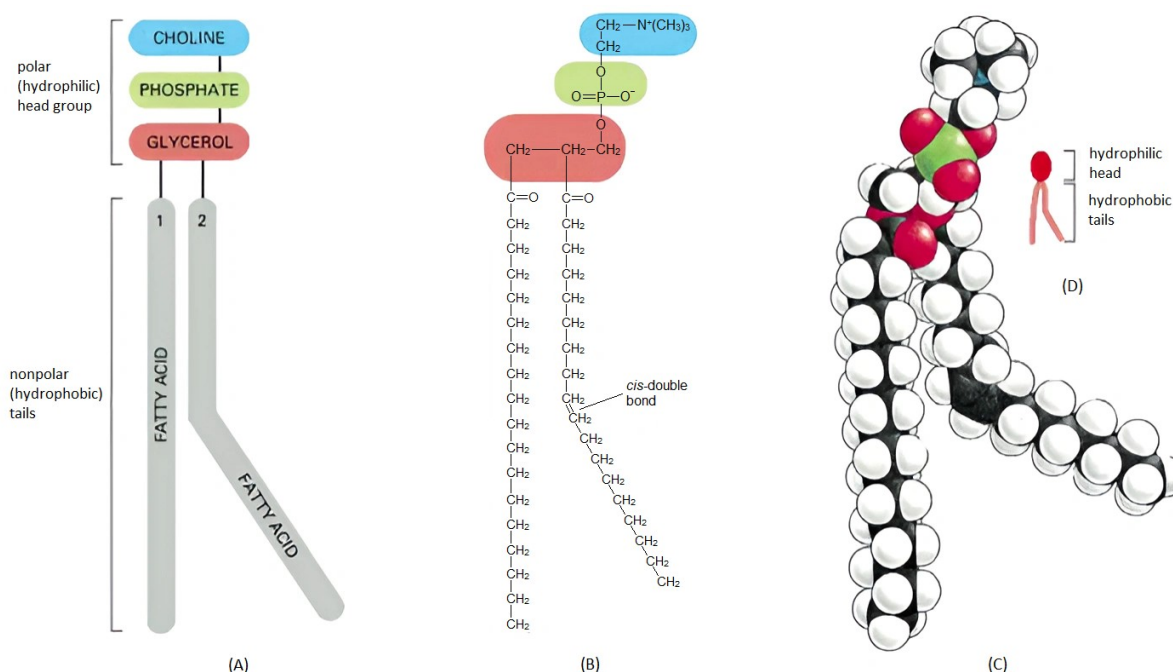


Figura 2: Rappresentazione semplificata (D) schematica (A) accompagnata da struttura chimica (B), e conformazione (C) della fosfatidiletanolamina, un fosfolipide. [Immagine adattata rispetto all'originale²]

I fosfolipidi, per la loro struttura, sono molecole anfipatiche ovvero formate da due componenti distinti a diversa polarità (testa polare e code apolari) legati fra loro da un legame covalente.⁵ Ciò causa intrinsecamente una affinità diversa per il solvente (polare o apolare che sia). Nel caso si disperda la molecola in un solvente polare come l'acqua, si avrà che la parte polare della molecola verrà maggiormente stabilizzata poiché avrà interazioni forti con le molecole di acqua. La parte apolare d'altro canto (che interagisce peggio con il solvente) tenderà a disporsi in modo tale da minimizzare il contatto con l'acqua e massimizzare il contatto con qualunque molecola apolare presente in soluzione in modo da diminuirne l'energia di solvatazione. Per questa ragione molecole anfipatiche esposte all'acqua tendono a aggregare spontaneamente (in micelle, monostrati o doppi strati in base alla morfologia della molecola e alle condizioni) in modo da orientare le code idrofobe verso l'interno dell'aggregato esponendo la loro parte

idrofila al solvente. Per composti anfifilici lineari, immersi in un solvente polare, con forma approssimabile a un cono (come per esempio saponi o tensioattivi), cioè in cui il volume occupato dalla testa polare è maggiore di quello occupato dalla coda, l'aggregato più probabile sarà la micella sferica (vedi *Figura 3*). Per composti in cui la coda idrofobica è più ingombrata il che, come accade per i fosfolipidi, conferisce al tensioattivo una forma cilindrica, l'impaccamento più probabile sarà il doppio strato.

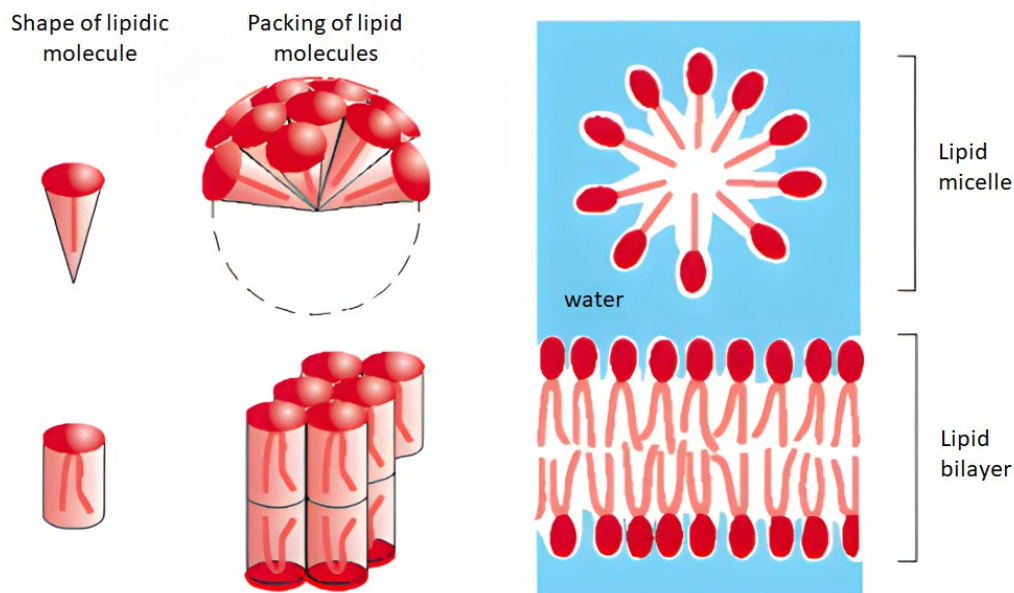


Figura 3: Confronto fra un composto anfifilico con coda idrofobica lineare che si aggrega formando micelle (in alto) e un composto anfifilico dalla coda più ingombrata che forma un doppio strato lipidico (in basso). [Immagine adattata rispetto all'originale²]

All'interno del doppio strato i fosfolipidi interagiscono tra loro mediante forze intermolecolari relativamente deboli. Essi sono quindi liberi di muoversi e scorrere lungo il piano della membrana in modo analogo a come avviene per le molecole nei fluidi.² In genere infatti si potrebbe essere portati a pensare alla membrana cellulare come una parete rigida nella quale proteine, glicolipidi etc. sono fissati; in realtà tali macromolecole sono parzialmente mobili e si trovano in domini immersi in un fluido bidimensionale costituito appunto dal doppio strato fosfolipidico.⁶ La fluidità della membrana dipende sia dalla composizione che dalla temperatura. Nelle cellule animali, per mantenere la fluidità della membrana anche a basse temperature (in modo da garantire il corretto funzionamento della cellula), si interpongono ai fosfolipidi delle molecole di colesterolo (vedi *Figura 1*) in modo da ostacolare la "solidificazione" della membrana alle basse temperature.

Le membrane batteriche invece sono prive di colesterolo; in questo caso la stabilità delle membrane è migliorata da una diversa composizione dei fosfolipidi nel doppio strato lipidico. Infatti, come già detto prima, la composizione dei fosfolipidi varia da organismo

a organismo; di seguito (*Figura 4*) sono riportate le composizioni percentuali dei tre fosfolipidi più rilevanti nel caso di alcune specie di batteri comuni. Di questi componenti uno (fosfatidiletanolamina, PE) (*Figura 4*) è complessivamente neutro mentre gli altri due (fosfatidilglicerolo, PG, cardiolipina, CL) sono complessivamente caricati negativamente impartendo in questo modo una parziale carica negativa anche alla membrana.⁷ Alcuni di questi batteri, chiamati Gram-negativi, oltre a variare la composizione dei fosfolipidi, presentano un ulteriore doppio strato lipidico al precedente per migliorare la stabilità delle membrane.²

L'ultima classe di molecole principali che compongono le membrane cellulari sono i glicolipidi; essi sono strutturalmente simili ai fosfolipidi dove al posto del gruppo fosfato è presente un oligo/poli-saccaride. I glicolipidi si trovano perlopiù nella parte esterna della membrana e hanno un ruolo importante nelle interazioni della cellula con le entità biologiche esterne.²

Bacterial species	% Total lipid		
	CL	PG	PE
<i>Gram negative bacteria</i>			
<i>E. coli</i>	–	15	80
<i>E. cloacae</i>	3	21	74
<i>Y. kristensenii</i>	20	20	60
<i>P. mirabilis</i>	5	10	80
<i>K. pneumoniae</i>	6	5	82
<i>P. aeruginosa</i>	11	21	60
<i>Gram positive bacteria</i>			
<i>Staphylococcus aureus</i>	42	58	0
<i>Streptococcus pneumonia</i>	50	50	0
<i>Bacillus cereus</i>	17	40	43
<i>Bacillus polymyxa</i>	8	3	60

Figura 4: Tabella che riassume la composizione percentuale dei fosfolipidi nelle membrane di alcuni batteri.⁷

2.2. Nanoparticelle cationiche con attività membranolitica/permeabilizzante

Come si accennava nel primo paragrafo, l'obiettivo finale di questo lavoro è quello di creare delle nanoparticelle con proprietà antibatteriche come conseguenza di una permeabilizzazione delle membrane cellulari a seguito di un'interazione molto forte fra le membrane stesse e le nanoparticelle.^{1,8,9} Diversi dati disponibili in letteratura portano a ritenere potenzialmente raggiungibile tale scopo.

Prima di intraprendere una discussione dettagliata, va notato come le particelle oggetto del nostro studio siano nanoparticelle di oro metallico di dimensioni relativamente piccole (diametro < 5 nm) ricoperte da uno strato passivante di molecole organiche dette "leganti". La struttura chimica di tali leganti non è rigidamente definita, ma nella maggior parte dei casi, si tratta di molecole lineari terminanti ad una estremità con un gruppo funzionale dotato di elevata affinità per l'oro, generalmente un tiolo. Il ruolo principale di tali molecole è di prevenire la coalescenza dei nuclei metallici termodinamicamente instabili ma, essendo localizzate sulla superficie della nanoparticella, esse controllano

anche l'interazione con l'ambiente esterno e con altre entità molecolari e macromolecolari circostanti.

Concentrando ora l'attenzione su come il monostrato di ricoprimento possa influenzare l'interazione tra nanoparticelle e membrane lipidiche, un primo dato di interesse è un lavoro recente del gruppo di V. Rotello che ha dimostrato come la presenza di una catena idrocarburica terminale lipofila in molecole di ricoprimento cationiche aumenti l'interazione delle particelle con doppi strati lipidici.¹⁰

Più nel dettaglio, sono stati sintetizzati tioli terminanti con un gruppo funzionale dimetilalchilammonio, in cui il gruppo alchilico R (colorato in rosso in *Figura 5*) era di lunghezza diversa (rispettivamente C_{10} e C_1). Tali tioli sono stati utilizzati per ricoprire particelle di oro dal diametro di circa 2 nm.

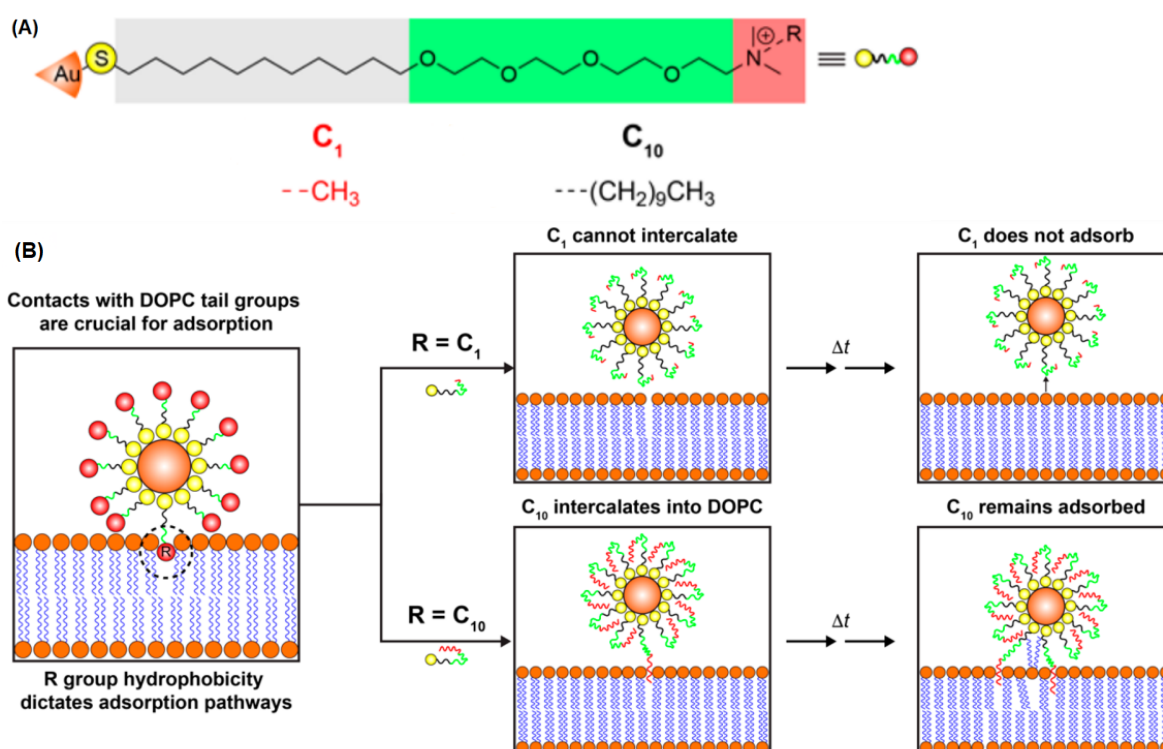


Figura 5: (A) Struttura delle nanoparticelle utilizzate dove vengono rappresentate le due catene terminali di interesse. (B) Meccanismo di interazione di una nanoparticella funzionalizzata con catene terminali C_{10} lunghe (in basso) che si adsorbe su una membrana passando per l'estrazione di una catena fosfolipidica. In alto il confronto con una catena terminale metilica C_1 che invece non si adsorbe.¹⁰

Simulazioni di dinamica molecolare, confermate poi da esperimenti QCM-D, hanno rivelato un possibile meccanismo di adsorbimento su un doppio strato fosfolipidico diviso in due stadi. All'inizio i gruppi terminali, arrivati abbastanza vicini per poter interagire, intercalano all'interno della membrana in modo da entrare in contatto con le

code lipofile dei fosfolipidi. Questa interazione, che avviene in entrambi i casi, è però molto più intensa per le catene terminali C_{10} che riescono a intercalarsi più in profondità nel doppio strato (rispetto alla controparte metilica) portando a una maggiore stabilizzazione della nanoparticella.

Dopodiché sono possibili due casi limite: se l'energia data dalla stabilizzazione è abbastanza elevata da superare una barriera energetica di circa $30\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ avviene l'estrazione di alcune code apolari appartenenti ai fosfolipidi dalla membrana verso la nanoparticella aumentando così ulteriormente la forza delle interazioni e portando ad un adsorbimento irreversibile (come avviene per le catene C_{10} in [Figura 5](#)). Nel caso in cui invece l'energia di stabilizzazione non superi la soglia di attivazione per l'estrazione dei fosfolipidi, oppure anche tale estrazione non crei abbastanza interazioni per mantenere adsorbita la particella sulla superficie del doppio strato, si verifica il desorbimento della nanoparticella che ritorna in soluzione.¹⁰ Questo denota l'importanza della catena idrocarburica terminale del precursore.

Esperimenti successivi svolti dal gruppo di Y. Jeong su nanoparticelle "equipaggiate" con leganti di struttura simile a quelli appena descritti, in cui però le due porzioni alchiliche sono separate da una catena polare carica costituita questa volta da una breve catena di PEG che termina con un trimetilammonio (vedi [Figura 6](#)), hanno dimostrato un'attività citotossica. Gli studi hanno evidenziato come in un ambiente idrofilo il gruppo terminale alchilico fosse ripiegato all'interno della nanoparticella lasciando la parte idrofila verso l'esterno, quindi a contatto con il solvente, ([Figura 6](#)) mantenendo così la nanoparticella solubile in acqua.

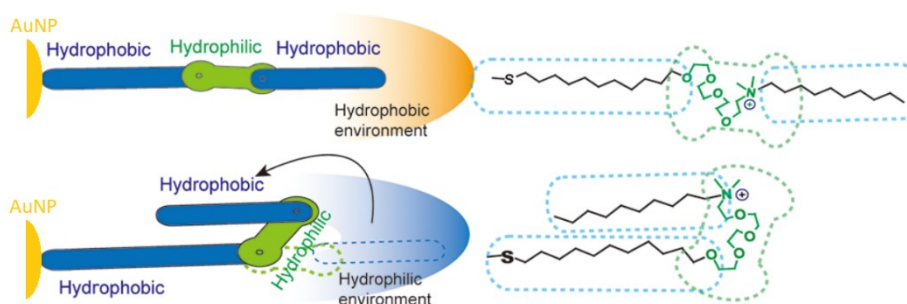


Figura 6: Struttura (a destra) e schema semplificato (a sinistra) del legante in esame, la cui catena rimane ripiegata in ambiente idrofilo (in basso) e si distende in ambiente idrofobico. [Immagine adattata rispetto all'originale¹¹]

D'altro canto, se la nanoparticella è immersa in un ambiente idrofobico, come accade per esempio all'interno di un doppio strato fosfolipidico, il contatto fra la frazione polare del legante e la fase apolare innesca la distensione delle catene idrocarburiche terminali

per dare interazioni idrofobiche più forti con l'interno del doppio strato. Questo movimento meccanico permette alla particella molecolare di permeare facilmente attraverso la membrana arrivando al citosol dove può esplicare la sua azione citotossica.¹¹ Infatti, una volta all'interno della cellula, la nanoparticella può interagire con la membrana biologica dei mitocondri causandone la rottura e inducendo la generazione di specie ossigenate reattive (ROS) che innescano l'apoptosi della cellula.¹

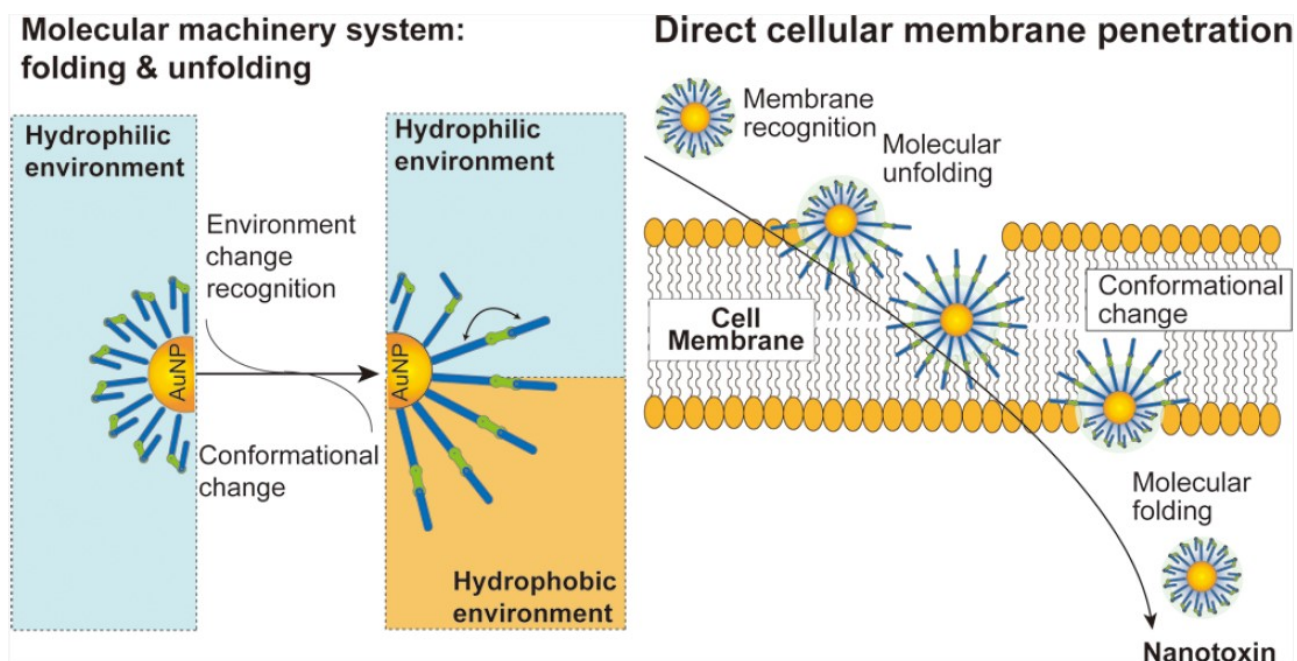


Figura 7: Meccanismo di interazione della nanoparticella con la membrana (a sinistra) e passaggio attraverso il doppio strato fosfolipidico favorito dalla distensione delle catene terminali. [Immagine adattata rispetto all'originale¹¹]

Questi due esempi mostrano come, utilizzando molecole di “coating” di struttura opportuna, sia possibile programmare le particelle come delle piccole macchine molecolari, capaci di mostrare una superficie idrofila e mantenere residui alchilici terminali ripiegati sotto la superficie nel caso si trovino in un solvente acquoso, ma di estroflettere i residui alchilici se in prossimità di ambienti idrofobici. Questo comportamento aumenta l'affinità per le membrane lipidiche e ne favorisce l'attraversamento o la disgregazione.

Il problema che limita l'efficienza di questo tipo di macchine molecolari sta nel fatto che, per funzionare in modo corretto, è necessario che la nanoparticella si avvicini molto al doppio strato lipidico e per un tempo abbastanza lungo da permettere l'estroflessione delle catene alchiliche con conseguente ancoraggio alla membrana. Nel caso precedentemente discusso il contatto è favorito dalla presenza del gruppo ammonio

poiché, essendo di carica positiva, dà interazioni coulombiane con le membrane cellulari se cariche negativamente^{8,12,13}. Non tutte le membrane cellulari sono però cariche negativamente e questo potrebbe limitare i campi di applicazione di questi sistemi.

Uno studio recentemente pubblicato nel gruppo di ricerca dove si è svolto questo lavoro di tesi ha dimostrato come esistano gruppi funzionali carichi in grado di legarsi a doppi strati lipidici neutri. In questo caso il gruppo ammonio terminale di alcuni leganti è stato sostituito con il gruppo guanidinio. Questo gruppo funzionale presenta diverse caratteristiche peculiari. Per prima cosa è un gruppo molto poco acido ($pK_a \approx 13,5$), caratteristica che gli consente di mantenere la carica positiva fino a valori di pH intorno a 13. Oltre a questo presenta una particolare distribuzione di carica, con le superfici sopra e sotto il piano individuato dai tre atomi di azoto prettamente idrofobiche facendo del gruppo guanidinio una specie anfifilica, seppur dotata di carica positiva, a seconda della sua orientazione¹⁴. Un'altra caratteristica di particolare rilevanza sta nel fatto che il gruppo è perfettamente preorganizzato per stabilire due buoni legami a idrogeno con diversi ossoanioni e con i corrispondenti derivati. Queste caratteristiche conferiscono al guanidinio eccellenti proprietà nell'ambito dell'interazione con i doppi strati permettendo quindi non solo un contatto più efficace con le membrane negative, ma soprattutto un'interazione indipendente dalla carica quindi anche con le membrane neutre.⁸ Questa proprietà prende il nome di "Arginine Magic" ovvero l'insolita abilità, comune alle proteine ricche dell'amminoacido arginina (che contiene nella sua struttura il gruppo guanidinio) di penetrare facilmente attraverso le membrane cellulari.¹⁴

Per capire meglio il meccanismo di questa interazione e le caratteristiche che rendono il guanidinio così efficace, oltre che verificare se l'"arginine magic" sia applicabile anche su nanoparticelle sintetiche e non solo su peptidi, sono stati svolti esperimenti e simulazioni di dinamica molecolare per valutare il comportamento con la membrana di nanoparticelle "equipaggiate" con lo ione guanidinio confrontate con quelle aventi lo ione trimetilammonio come gruppo terminale. Gli esperimenti e le simulazioni (come del resto anche quelle sopra citate^{10,11}) sono state fatte sostituendo le membrane cellulari con liposomi (ovvero vescicole di forma sferica composte da un doppio strato fosfolipidico¹⁵). In questo caso, i leganti delle AuNPs consistono in tioli con catene di lunghezza variabile in cui all'altra estremità è legato un gruppo guanidinio (1@AuNPs) o un gruppo trimetilammonio (4/a,b,c@AuNPs). Si può notare dal grafico in *Figura 8* (che rappresenta la distanza doppio strato-AuNP in funzione del tempo della simulazione) come l'unica nanoparticella che rimanga abbastanza vicina alla superficie per un tempo

sufficientemente lungo (sintomo del suo adsorbimento) sia la 1@AuNPs ovvero quella contenente il gruppo guanidinio.

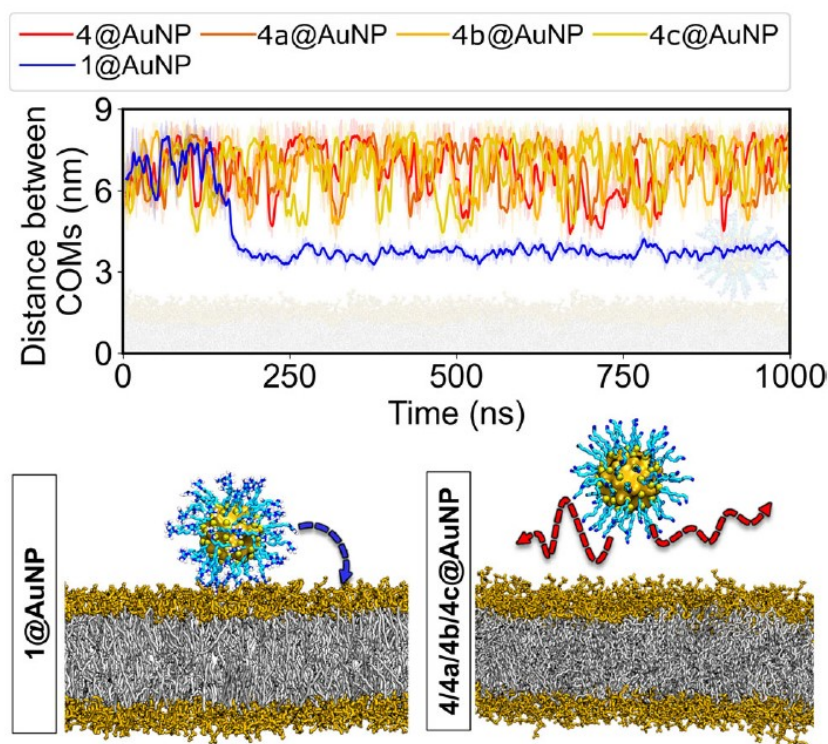


Figura 8: Simulazione di dinamica molecolare che rappresenta (in alto) la distanza doppio strato-AuNP in funzione del tempo della simulazione per nanoparticelle con leganti aventi lo ione guanidinio (1@AuNPs) o lo ione trimetilammonio (4/a,b,c@AuNPs) come gruppo terminale associata dalla rappresentazione grafica (in basso) delle due interazioni.⁸

I test sperimentali effettuati con liposomi di fosfatidilcolina hanno dimostrato che, per i derivati del guanidinio, le forze di attrazione elettrostatica membrana-nanoparticella non sono i fattori determinanti che portano al loro adsorbimento. Infatti, mentre le nanoparticelle dotate del gruppo guanidinio interagiscono in modo simile sia con liposomi neutri che con i negativi, provocandone la permeabilizzazione, quelle dotate del gruppo trimetilammonio interagiscono invece solo con nanoparticelle cariche negativamente. La “driving-force” dell’interazione, nel caso delle particelle con il guanidinio e liposomi neutri, è data dalla formazione di legami a idrogeno particolarmente intensi fra il guanidinio e le teste dei fosfolipidi; l’energia guadagnata da questi legami, infatti, supera l’energia di solvatazione data dai legami a idrogeno con il solvente per i due componenti separati rendendo l’adsorbimento un processo spontaneo. La forza di tali legami è data dal fatto che la geometria di donazione del legame a idrogeno del guanidinio si incastra perfettamente con i due ossigeni del fosfato appartenenti alle teste dei fosfolipidi che sono appunto gli accettori del legame⁸. Inoltre,

il simultaneo stabilirsi di molte interazioni guanidinio-fosfato, consentito dalla flessibilità dei leganti assemblati sulle particelle, produce un effetto “velcro”, cioè un’interazione multivalente in cui la somma di molte interazioni deboli ne origina una molto forte.¹⁴

Queste proprietà insieme sono di notevole importanza poiché favoriscono il contatto con le membrane biologiche anche in assenza di altre forze attrattive rendendo quindi le nanoparticelle “equipaggiate” con guanidinio efficaci anche su membrane cellulari neutre aggirando così il problema della vicinanza.

Un ulteriore risultato dello studio precedente, non meno importante, fa notare come il legame fra AuNPs cationiche e liposomi causi effettivamente la permeabilizzazione della membrana nonostante non ne provochi la rottura. Anche se le cause di questo fenomeno rimangono ancora oggetto di investigazione, rimane comunque confermata l’intuizione che piccole particelle d’oro, opportunamente funzionalizzate, possano effettivamente produrre attività membranolitica portando quindi alla morte della cellula.

Prendendo le mosse da questi risultati, si è progettata quindi la struttura del legante riportato in *Figura 9*. Questa molecola unisce le caratteristiche strutturali finora discusse: una catena alchilica funzionalizzata ad un’estremità con un tiolo, la presenza di un gruppo guanidinio all’altra estremità e una catena alchilica legata al gruppo carico.

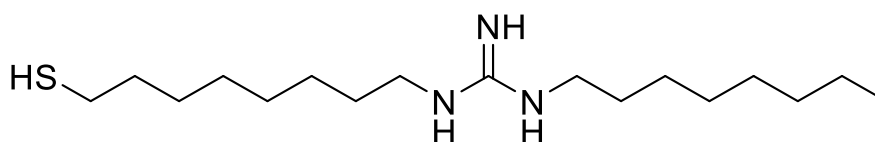


Figura 9: Struttura del legante di interesse: 1-(8-mercaptoottil)-3-ottilguanidinio.

Infatti, sulla base delle informazioni discusse nelle pagine precedenti, abbiamo ipotizzato un possibile meccanismo di interazione della nanoparticella funzionalizzata con il precursore di interesse che prevede tre possibili stadi:

- 1) Attrazione coulombiana
- 2) Formazione di legami a idrogeno multivalenti
- 3) Interazioni idrofobiche con i residui alchilici estroflessi

Più nel dettaglio, l’interazione dovrebbe iniziare con l’avvicinamento della AuNP al doppio strato lipidico, favorito dall’attrazione coulombiana fra la membrana caricata negativamente e la particella ricoperta di cariche positive. Seguirebbe il contatto, mediato dai legami a idrogeno, del gruppo guanidinio con le teste dei fosfolipidi che dovrebbe garantire il contatto prolungato fra le due entità. Questo contatto prolungato

dovrebbe permettere l'interazione idrofobica e la distensione del legante precedentemente ripiegato che intercalerebbe all'interno della membrana con possibilità di estrarre delle code fosfolipidiche ancorando irreversibilmente la particella alla membrana. Questa interazione, che già da sola potrebbe comportare una perturbazione della membrana e la sua permeabilizzazione, potrebbe infine proseguire mediante il passaggio della nanoparticella all'interno della membrana.

Gli studi sperimentali da me intrapresi non avevano l'ambizione di verificare tale meccanismo, ma più semplicemente di esplorare l'accessibilità sintetica del tiolo progettato.

3. RISULTATI

3.1. Strategia sintetica

La strategia inizialmente individuata per la sintesi del legante, riassunta per comodità nella figura seguente (*Figura 10*), consiste nel partire da un dialogenuro (composto A) a cui, a una delle due estremità, un bromo viene sostituito con un gruppo tritile (Ph_3CSH) ovvero un tiolo terziario stericamente impedito. La sostituzione ha il duplice vantaggio di proteggere un'estremità del dialogenuro dalle reazioni negli stadi successivi e di inserire, al contempo, un gruppo che sia idrolizzabile in ambiente acido per formare un tiolo, che è il gruppo funzionale desiderato nella molecola finale. La protezione del gruppo tiolo è infatti necessaria da un lato per evitare che, agendo come nucleofilo, possa interferire con le reazioni successive, e dall'altro, che possa ossidarsi a disolfuro durante le manipolazioni. Il passaggio successivo prevede la conversione dell'alogenuro non ancora sostituito in un'ammina primaria passando prima per una reazione con sodio azide per formare l'azide (composto C) e poi per successiva riduzione. L'ammina così ottenuta (composto D) viene fatta reagire con un alchilisotiocianato in una reazione "click" in modo da formare una dialchiltiurea (composto E). Negli stadi successivi il gruppo tiocarbammidico del composto E viene trasformato in un gruppo guanidinio mediante una reazione in due stadi: nel primo stadio la dialchiltiurea reagisce con ioduro di metile per formare il catione metiltiuronio che poi, nel secondo stadio, viene fatto reagire con ammoniaca per formare un dialchilguanidinio (composto F). Infine nell'ultimo passaggio si rimuove, mediante

trattamento acido, il gruppo protettivo tritile lasciando scoperto il tiolo e arrivando così alla molecola desiderata (composto G).

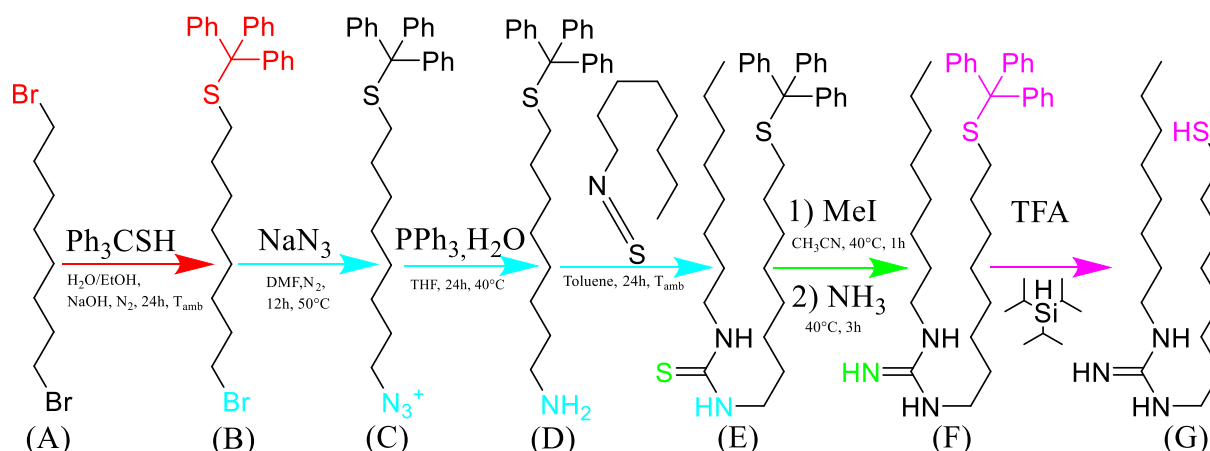


Figura 10: Strategia *inizialmente* proposta per la sintesi del legante (G) completa di reagenti e condizioni di reazione principali.

3.2. Evidenze sperimentali

Dal punto di vista pratico, mentre il primo passaggio procede in poche ore con una ottima conversione, la seconda reazione non avviene nelle condizioni sopra descritte. Si è quindi provata nuovamente la reazione che porta all'azide (composto C) aumentando la temperatura e aumentando anche l'eccesso di reagente; anche in queste condizioni però la formazione di prodotto avviene con bassissima conversione, il che rende la reazione non sfruttabile ai fini pratici.

In risposta a questi esiti non positivi è stato avviato un lavoro di ricerca bibliografica per trovare delle condizioni di sintesi alternative. Più nel dettaglio si è preso ispirazione dal metodo di preparazione utilizzato da C. Menendez et al.¹⁶ in cui il decorso della reazione era garantito dalla presenza di quantità catalitiche di NaI . Si è quindi tentata nuovamente la reazione in condizioni più blande aggiungendo alla miscela di reazione ioduro di tetrabuttilammonio. Quest'ultimo ha il duplice scopo di inserire l'anione I^- nell'ambiente di reazione in modo tale da sostituire nel reagente B il bromo con lo iodio (che è un miglior gruppo uscente) e di favorire il trasferimento dell'azide (polare) attraverso la DMF (solvente polare aprotico) tramite il catione R_4N^+ che funge da trasferitore di fase. Da questa reazione si ottiene finalmente una buona resa in azide (prodotto C).

Sono stati testati anche i parametri di sintesi utilizzati da S. Battacharya, J. Biswas et al.,¹⁷ ovvero utilizzando un largo eccesso (5 eq) di sodio azide a alta temperatura, senza ioduro di sodio e trasferitore di fase, ma con una concentrazione molto alta di reagenti.

Anche con questo metodo si è ottenuta l'azide con un'ottima resa (procedura in dettaglio nella [sezione 5.3](#)).

La conversione del prodotto B in C è confermata dall'analisi $^1\text{H-NMR}$, come è possibile vedere in [Figura 11](#).

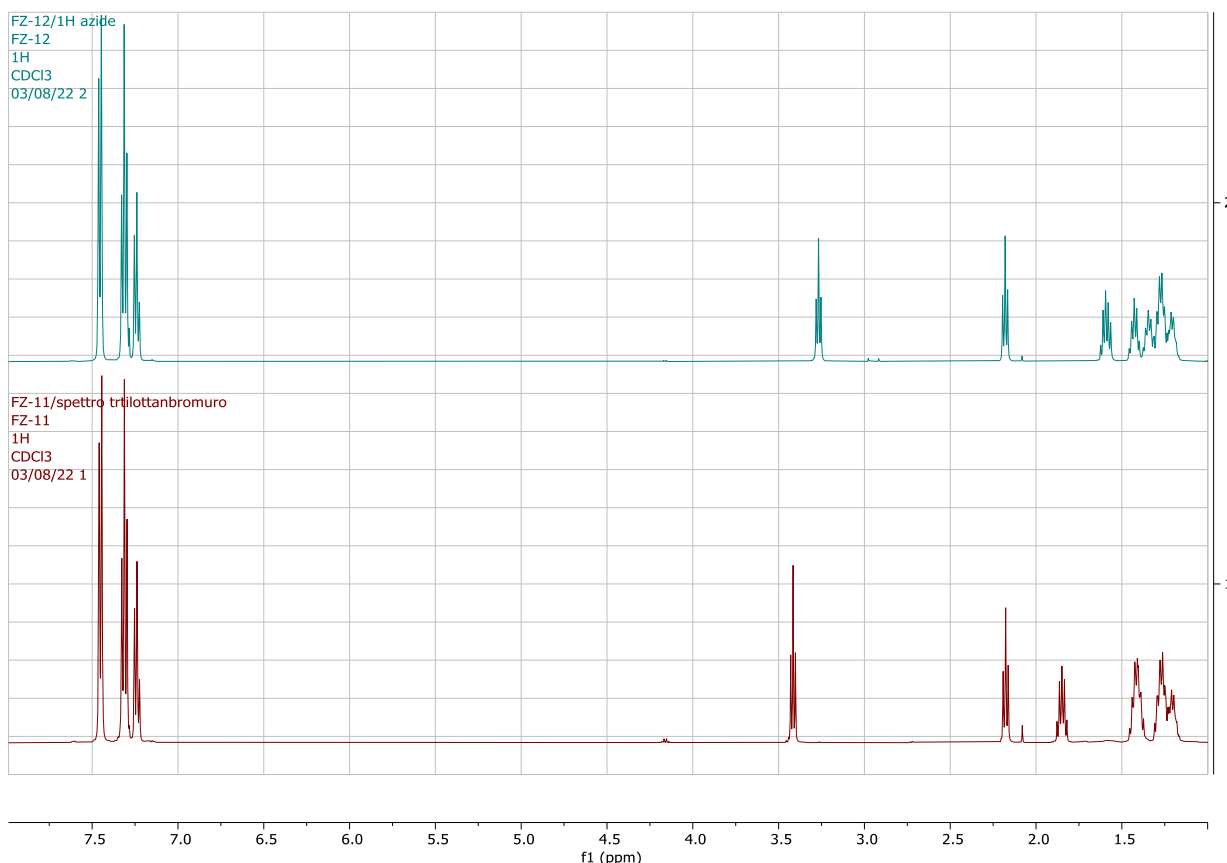


Figura 11: Confronto fra lo spettro $^1\text{H-NMR}$ del prodotto C (in alto) con quello del reagente B (in basso). Spettri presi a 500MHz in CDCl_3 come solvente. L'avvenuta reazione con formazione dell'azide è testimoniata dalla traslazione dei soli picchi adiacenti al gruppo scambiato (ovvero il tripletto che passa da δ 3,42 a 3,27 e il quintetto che passa da δ 1,85 a 1,60). Infatti, i protoni in quelle posizioni risentono di una minore descheratura passando da bromuro (in basso) a azide (in alto) e questo corrisponde a uno spostamento dei picchi verso destra nello spettro.

La reazione di riduzione seguente che porta dall'azide (composto C) alla corrispondente ammina (composto D) non ha portato ad ottenere il composto previsto, anche se sono state provate diverse strategie sintetiche:

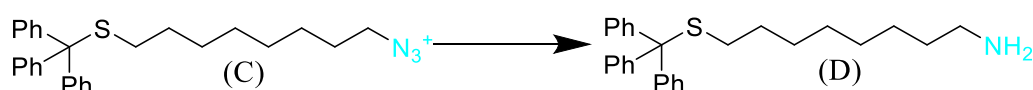
- Nel primo tentativo si è seguita la sintesi di Staudinger, cioè la riduzione con trifenilfosfina/acqua, (con i parametri riassunti nella [Figura 10](#)) senza risultati.
- Si è poi provata (più volte) la reazione di riduzione mediante idrogenazione catalizzata da palladio supportato su carbone ottenendo una conversione minima.

- La azide è risultata inerte anche a una riduzione più spinta acido catalizzata sfruttando come agente riducente trucioli di magnesio in THF.
- Fino a ora l'unica riduzione che sembrerebbe portare a una conversione rilevante è quella effettuata da A. Kamal et al.¹⁸ con ioduro di sodio e FeCl₃, tuttavia il work-up dei grezzi di reazione risulta particolarmente complesso.

L'inefficacia dei metodi di sintesi provati è risultata del tutto sorprendente perché essi sono stati utilizzati con successo nella sintesi di ammine simili contenenti tioli. Normalmente però il gruppo tiolo veniva introdotto come tioacetato, oppure successivamente al gruppo amminico mediante una reazione di tipo tioene. In quest'ultimo caso il composto di partenza non è un dibromuro alchilico, come nella procedura seguita in questo caso, ma un ω-alogenoalchene. Potrebbe essere quindi possibile che le difficoltà incontrate siano dovute da un lato al grande ingombro sterico del gruppo tritile, e dall'altro della capacità dello zolfo di avvelenare molti catalizzatori.

3.3. Ipotesi di sviluppo

3.3.1. Sintesi 8-(trilitio)ottan-1-ammina (composto D)



Nei futuri tentativi di preparazione della molecola desiderata sarà quindi possibile esplorare altre strategie di riduzione dell'azide. Tra le varie alternative trovate, quelle ritenute più rilevanti sono riportate di seguito:

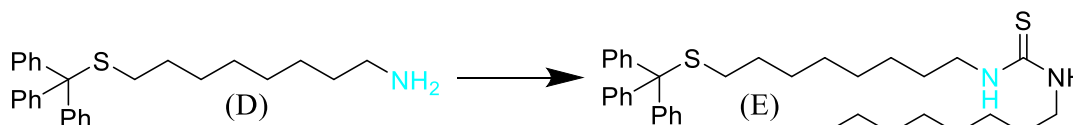
Il primo metodo, utilizzato da Maiti et al., consiste in una riduzione con una sospensione di cloruro stannoso in metanolo eventualmente catalizzata da cloruro di alluminio in caso di azidi poco reattive.¹⁹ Dal punto di vista sperimentale, si aggiunge lentamente 1 eq di composto C (azide) solubilizzato nella minima quantità di MeOH a una sospensione formata da 1,5 eq SnCl₂ e 0,02 eq di AlCl₃ anidro (CAS: 7446-70-0) in 3 mL di MeOH. La reazione, condotta a temperatura ambiente e sotto agitazione per circa 1 h, è esotermica e avviene con sviluppo di N₂. A reazione conclusa si evapora il solvente, si riprende il grezzo ottenuto con etere etilico e si estrae con una soluzione acquosa di NaOH. La fase acquosa viene poi saturata con NaCl e estratta nuovamente in etere etilico. Questa fase organica viene anidrificata con Na₂SO₄ ed evaporata per dare il prodotto D ulteriormente purificabile tramite cromatografia flash.¹⁹

Il secondo metodo per produrre l'ammina, proposto dal gruppo di Li Chunbao²⁰, consiste in una riduzione con zinco e cloruro di bismuto in etanolo acquoso. Secondo

questo metodo si procede aggiungendo lentamente 2 eq di composto C (azide) solubilizzati nella minima quantità di *EtOH*, a una sospensione formata da 2 eq di BiCl_3 (CAS: 7787-60-2) e 2 eq di trucioli di zinco in 2 mL di H_2O . La reazione viene condotta a temperatura ambiente e sotto agitazione per circa 3 h; terminata la reazione si aggiungono 5 mL di soluzione acquosa di *NaOH* al 10% e si lascia sotto agitazione per 5 min. A questo punto si filtra la miscela di reazione e si estrae il filtrato con *AcOEt* (3 × 25 mL); segue estrazione della fase organica con H_2O , Brine e anidificazione. Anche in questo caso è preferibile purificare il prodotto D ottenuto mediante cromatografia flash (eluente: $\text{Et}_2\text{O}/\text{P. Et}$ [1:4]).

Qualora uno dei due metodi proposti risultasse efficace nella sintesi dell'ammina, i passaggi successivi potrebbero essere condotti come segue:

3.3.2. Sintesi 1-ottil-3-(8(tritiltio)ottil)tiourea (composto E)



Si riprende dal quarto stadio che consiste nel fare reagire l'ammina ottenuta con un alchilisotiocianato in modo da formare una dialchiltiourea la quale, negli stadi successivi, potrà essere trasformata in un dialchilguanidinio.

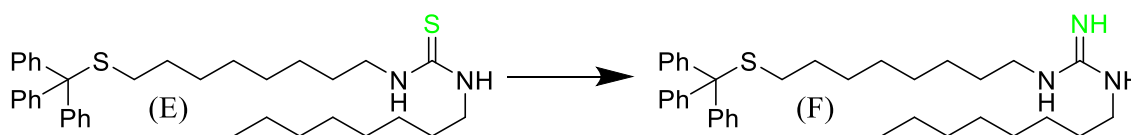
1 eq di 8-(tritiltio)ottan-1-ammina (composto D) insieme a 1,1 eq (o anche 1 eq²¹) di ottilisotiocianato (CAS: 4430-45-9) vanno sciolti in 8 mL di toluene; la reazione viene condotta sotto agitazione a temperatura ambiente per 24 h. Il decorso della reazione è accompagnato dalla formazione di precipitato²².

Alternativamente si può sciogliere all'interno di un pallone 1 eq di composto D in 1 mL di toluene a cui si aggiunge una soluzione formata da 1 eq di ottilisotiocianato (CAS: 4430-45-9) sempre in 1 mL di toluene lasciando la soluzione in agitazione per alcuni minuti a temperatura ambiente. Segue l'evaporazione del solvente.²¹

Un altro metodo degno di nota (utilizzato da Sambrook et al.) consiste nel porre a reagire 1 eq di D insieme a 1,1 eq di alchilisotiocianato in 2,3 mL di *THF* a riflusso per 3 h. Terminata la reazione si concentra la soluzione e si aggiungono 2,3 mL di esano facendo precipitare il prodotto la cui cristallizzazione viene completata in freezer per tutta la notte. Si filtra infine il prodotto che viene lavato con esano freddo.²³

Per tutti e tre i casi, se il prodotto non si presentasse abbastanza puro, si consiglia una purificazione tramite cromatografia flash.

3.3.3. Sintesi 1-ottil-3-(8(tritiltio)ottil)guanidinio (composto F)

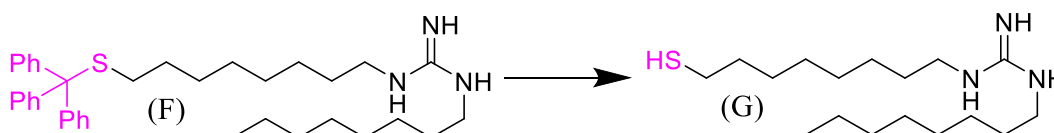


Nel quinto stadio il gruppo tiocarbammidico del composto E viene trasformato in un gruppo guanidinico mediante due step di sintesi. Nel primo step la dialchiltiurea reagisce con ioduro di metile per formare il catione metiltiouronio che poi viene fatto reagire con ammoniaca per portare al prodotto desiderato.

(Sfruttando il metodo utilizzato da Wong et al.²⁴) 1 eq di 1-ottil-3-(8(tritiltio)ottil)tiourea (composto E) e 10 eq di MeI (CAS: 74-88-4) vengono sciolti in 10 mL di acetonitrile (o DCM²²); la reazione viene condotta sotto agitazione a 40°C per 1 h. Per il secondo step si aggiungono al grezzo essiccato 2 mL di soluzione acquosa di NH₃ concentrata lasciando reagire il tutto sotto agitazione a temperatura ambiente per 3 h. Si estrae quindi la miscela di reazione con DCM (2 × 10 mL) e la fase organica, anidrificata con Na₂SO₄, viene portata a secco ottenendo il prodotto F, purificabile mediante cromatografia flash (eluente: esano/acetato di etile 4:1).

Se le condizioni di reazione utilizzate per il secondo step risultassero troppo blande si può in alternativa sciogliere l'intermedio in 20 mL di MeOH all'interno di un tubo chiuso che andrà posto sotto agitazione per tutta la notte a 75°C insieme a 10 mL di soluzione acquosa di NH₃ concentrata. Terminata la reazione si allontana l'ammoniaca lasciando la soluzione per 1 h a 50°C e si porta a secco. Segue purificazione mediante ricristallizzazione in DCM/MeOH.²²

3.3.4. Sintesi 1-(8-mercaptottil)-3-ottilguanidinio (composto G)



L'ultimo stadio della sintesi del precursore consiste nel decomporre il gruppo protettore tritile per trasformarlo in tiolo.

(Prendendo spunto dal lavoro di Majer et al.) Si scioglie 1 eq di 1-ottil-3-(8(tritiltio)ottil)guanidinio (composto F) in 1,5 mL di DCM e si aggiunge 0,5 mL di TFA (acido trifluoroacetico) (CAS: 76-05-1) andando a formare una soluzione

gialla/marrone. Si aggiungono poi lentamente 1,1 *eq* di triisopropilsilano (CAS: 6485-79-6) che causa una lenta chiarificazione della soluzione; la reazione va condotta in atmosfera inerte (N_2) sotto agitazione a temperatura ambiente per 30 *min*. Terminata la reazione si porta a secco e si estrae con una miscela esano/acqua; la fase organica ottenuta viene anidrificata e portata a secco per dare il prodotto grezzo, il quale viene ulteriormente purificato tramite cromatografia flash per dare il prodotto finale.²⁵

3.3.5. Sintesi Nanoparticelle

La sintesi delle nanoparticelle si può effettuare seguendo la procedura utilizzata dal gruppo di F. Manea e prevede la riduzione dell'acido tetracloroaurico prima con diottilammina, per portare a Au(I), e poi con $NaBH_4$ per formare nanoparticelle di Au(0) della dimensione desiderata ricoperte da uno strato di molecole di diottilammina. La funzionalizzazione avviene per scambio della diottilammina con il precursore (in questo caso un tiolo) producendo nanoparticelle ricoperte da uno strato uniforme del legante di interesse.²⁶

4. CONCLUSIONI

Purtroppo, per ragioni di tempo, non è stato possibile completare tutti i 6 step di sintesi del legante e, di conseguenza, non si è potuto neanche funzionalizzare le nanoparticelle e caratterizzarle per verificarne le proprietà membranolitiche. Nonostante ciò, si sono cercate diverse strategie sintetiche al fine di ottenere il composto finale di cui si sono scelte quelle più rilevanti. In tal modo, in futuro, questa intera sintesi potrà essere opportunamente migliorata e poi utilizzata per ottenere una vasta gamma di nanoparticelle in modo da studiarne a fondo l'attività membranolitica. Una volta completamente chiarito il meccanismo di interazione fra le nanoparticelle e le membrane cellulari potrebbe infatti essere possibile sintetizzare dei leganti opportuni per creare antibatterici che sfruttino l'attività membranolitica molto efficiente e esente da problemi di resistenza ai farmaci data da questo tipo di nanoparticelle in modo da renderle anche selettive verso le membrane batteriche.

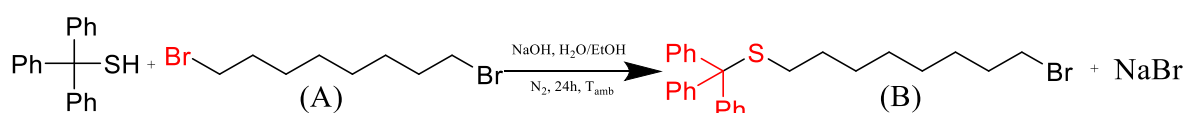
5. PARTE SPERIMENTALE

Sono riportati di seguito, in breve, i vari passaggi sperimentali effettuati completi delle osservazioni pratiche e dei risultati ottenuti.

5.1. Procedura Sperimentale

Tutti i reagenti e i solventi utilizzati sono stati acquistati da Sigma Aldrich e sono stati utilizzati senza ulteriori purificazioni. Il decorso delle reazioni è stato seguito mediante cromatografia su strato sottile (TLC) utilizzando come fase fissa lastrine Merck 60 F254 (e come fase mobile diversi eluenti in funzione della polarità dei composti da analizzare) utilizzando come metodo di sviluppo una lampada UV da 254 nm della Spectroline® e, quando necessario, una soluzione basica di permanganato di potassio. Per la rivelazione selettiva delle azidi invece si è immersa la TLC in una soluzione di PPh₃ in AcOEt/Esano [1:4] seguita da rivelazione in una soluzione idroalcolica di Ninidrina (e riscaldamento con pistola termica)²⁷. Le purificazioni tramite cromatografia flash sono state effettuate utilizzando come fase fissa della silice Kiesiegel 60M: 0,4-0,063mm. Gli spettri NMR sono stati registrati utilizzando lo spettrometro Bruker AV III a 500MHz per ¹H e 126MHz per ¹³C. La molteplicità dei picchi degli spettri è riportata come: s = singoletto, d = doppietto, t = tripletto, q = quartetto, qn = quintetto, m = multipletto; si indicano inoltre le costanti di accoppiamento dei multipletti e i protoni a cui sono associati. Le prove sono state svolte durante la stagione estiva quindi nei casi in cui le reazioni esplicitino temperatura ambiente vanno considerati circa 33°C. Si considerano inoltre tutti i volumi di solvente utilizzati durante le reazioni (anche nelle reazioni della sezione 3.3) riferiti a una millimole di reagente a parte nei casi in cui viene specificata la massa di reagente utilizzata.

5.2. Sintesi (8-bromoottil)(tritol)solfuro (composto B)



Il primo stadio consiste nel sostituire un bromo del 1,8-dibromoottano con un gruppo tritolisolfuro (trifenilmetansolfuro).

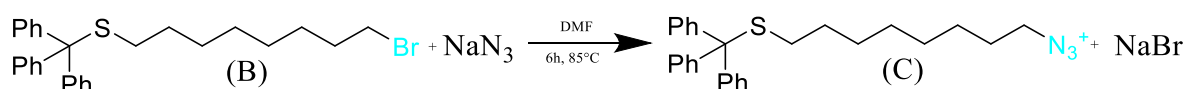
1,824 g (6,6 mmol; 1 eq) di trifenilmetantiolo e 2,68 mL (14,8 mmol; 2,2 eq) di 1,8-dibromoottano sono stati sciolti in 16 mL di Etanolo e 16 mL di H₂O insieme a 0,964 g di NaOH; la reazione è stata condotta in atmosfera inerte (N₂) sotto agitazione a

temperatura ambiente per 6 h. Dopo poco tempo si osserva la precipitazione di un solido bianco.

La miscela ottenuta è stata evaporata ed estratta con diclorometano ($3 \times 30 \text{ mL}$); la fase organica è stata estratta con Brine (20 mL) e successivamente anidrificata con Na_2SO_4 . Si è evaporata la fase organica e il grezzo ottenuto è stato purificato mediante cromatografia flash ($P. Et/AcOEt$ 99:1 in gradiente) ottenendo due frazioni la cui più pura conteneva 1.799 g di prodotto B ($resa = 59\%$)

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz , CDCl_3) δ 7,46-7,22 (m, Ph); 3,42 (t, $J=7\text{Hz}$, 2H, $-\text{CH}_2\text{Br}$); 2,18 (t, $J=7,5\text{Hz}$, 2H, $-\text{SCH}_2-$); 1.85 (qn, $J=7.5\text{Hz}$, 2H, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Br}$); 1,45-1,18 (m, 10H, $(\text{CH}_2)_5$)

5.3. Sintesi (8-azidoottil)(tritol)solfuro (composto C)



Nel secondo stadio si sostituisce l'alogenuro rimanente con un azide creando un prodotto che è poi trasformabile in ammina mediante riduzione.

$0,775 \text{ g}$ ($1,7 \text{ mmol}$; 1 eq) di (8-bromottil)(tritol)solfuro (composto B) sono stati fatti reagire con $0,553 \text{ g}$ ($8,5 \text{ mmol}$; 5 eq) di NaN_3 in 5 mL di DMF ; la reazione è stata condotta sotto atmosfera inerte (N_2) e sotto agitazione a 85°C per 6 h. Dopo aver allontanato il solvente si è ripreso il grezzo con AcOEt e la fase organica è stata estratta con una soluzione acquosa di LiCl al 5%.¹⁷ La fase organica è stata poi anidrificata con Na_2SO_4 ed evaporata ottenendo $0,607 \text{ g}$ di composto C ($resa = 83\%$).

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz , CDCl_3) δ 7,46-7,22 (m, Ph); 3,27 (t, $J=7\text{Hz}$, 2H, $-\text{CH}_2\text{N}_3$); 2,18 (t, $J=7,5 \text{ Hz}$, 2H, $-\text{SCH}_2-$); 1.60 (qn, $J=7\text{Hz}$, 2H, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}_3$); 1,46-1,18 (m, 10H, $(\text{CH}_2)_5$)

$^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz , CDCl_3) δ 145,10; 129,64; 127,82; 126,54; 77,31; 77,06; 76,80; 66,42; 51,47; 31,99; 29,01; 28,93; 28,87; 28,81; 28,56; 26,63.

6. BIBLIOGRAFIA

1. Jana, B. *et al. J. Mater. Chem.* **2021**, *B 9*, 3143–3152.
2. Alberts, B. *Molecular biology of the cell*; Garland Science, New York (2002).
3. Ryan Burke. "Investigating the role of voltage-gated ion channels in pulsed electric field effects in excitable and non-excitable cell lines." (2017).
4. Xie, M. "Phospholipids" In *Encyclopedia of Food Chemistry*; Melton, L.; Shaidi, F.; Varelis P.; Elsevier 2019; pp 214–217.
5. Zhang, J. "Amphiphilic Molecules" In *Encyclopedia of Membranes*; Drioli, E.; Giorno, L.; Springer: Heidelberg, 2016; pp 72–75.
6. Engelman, D. M. *Nature* **2005**, *438*, 578–580.
7. Epand, R. M.; Epand, R. F. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **2009**, *1788*, 289–294.
8. Morillas-Becerril L. *et al. Commun. Chem.* **2021**, *4*, 93.
9. Bailey, C. M. *et al. Biophys. Chem.* **2015**, *203–204*, 51–61.
10. Lochbaum, C. A. *et al. ACS Nano* **2021**, *15*, 6562–6572.
11. Jeong, Y. *et al. J. Am. Chem. Soc.* **2022**, *144*, 5503–5516.
12. Lin, J.; Alexander-Katz, *ACS Nano* **2013**, *7*, 10799–10808.
13. Goodman, C. M.; McCusker, C. D.; Yilmaz, T.; Rotello, V. M. *Bioconjug. Chem.* **2004**, *15*, 897–900.
14. Vazdar, M. *et al. Acc. Chem. Res.* **2018**, *51*, 1455–1464.
15. Akbarzadeh, A. *et al. Nanoscale Res. Lett.* **2013**, *8*, 102.
16. Menendez, C. *et al. Eur. J. Med. Chem.* **2012**, *52*, 275–283.
17. Bhattacharya, S.; Biswas, J. *Langmuir* **2011**, *27*, 1581–1591.
18. Kamal, A.; Ramana, K. V.; Ankati, H. B.; Ramana, A. V. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 6861–6863.
19. Maiti, S. N.; Singh, M. P.; Micetich, R. G. *Tetrahedron Lett.* **1986**, *27*, 1423–1424.
20. Li Chunbao *et al. Chin. Chem. Lett.* **2003**, *14(8)*, 773–775.
21. Hendricks, M. P.; Campos, M. P.; Cleveland, G. T.; Jen-La Plante, I.; Owen, J. S. *Science* **2015**, *348*, 1226–1230.
22. Neal, J. F. *et al. J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141*, 7876–7886.

23. Sambrook, M. R. *et al. J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 2292–2302.
24. Wong, E. C. N. *et al. Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2017**, *27*, 2439–2442.
25. Majer, P. *et al. J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 1989–1996.
26. Manea, F.; Bindoli, C.; Polizzi, S.; Lay, L.; Scrimin, P. *Langmuir* **2008**, *24*, 4120–4124.
27. Punna, S.; Finn, M. G. *Synlett* **2004**, 99–100.

7. ABBREVIAZIONI

AuNPs = Nanoparticelle di oro

PE = fosfatidiletanolamina

PG = fosfatidilglicerolo

CL = Cardiolipina

QCM-D = Quartz Crystal Microbalance with Dissipation monitoring

Brine = Soluzione acquosa satura di *NaCl*

AcOEt = Acetato di etile

P.Et = Etere di Petrolio

DMF = N,N-dimetilformammide

DCM = Diclorometano

MeOH = Metanolo

EtOH = Etanolo

MeI = Ioduro di Metile

TFA = Acido trifluoroacetico

8. RINGRAZIAMENTI

Ringrazio particolarmente il Dr. Pietro Bax per avermi aiutato e seguito con pazienza durante tutto il lavoro sperimentale e il Prof. Fabrizio Mancin per il fondamentale aiuto durante la stesura della tesi.

Ringrazio inoltre Giordano Zanoni, Samuel Pressi, Samuele Neurberg, Andrea Cesari, Silvia Pozzo e tutto il personale del laboratorio per la disponibilità e i preziosi consigli.