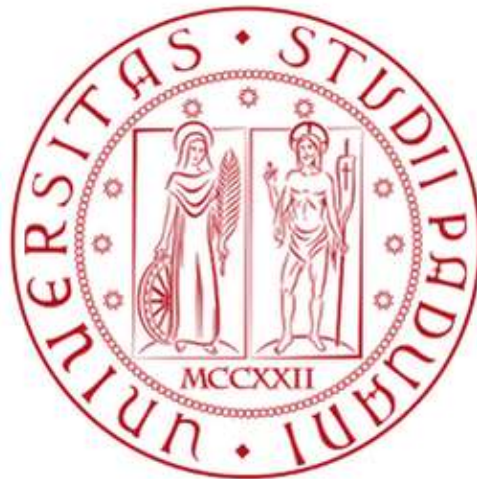


Università degli Studi di Padova  
Dipartimento di Biologia  
Corso di Laurea Magistrale in Biotecnologie Industriali



**Design razionale di nanoparticelle per catalizzare  
reazioni di condensazione aldolica**

Relatore: Prof. Alessandro Moretto  
Dipartimento di Scienze Chimiche

Controrelatore: Prof.ssa Fosca Conti  
Dipartimento di Scienze Chimiche

Laureando: Filippo Busatta

Anno Accademico 2022/2023



# 1 INDICE

---

<b>Abbreviazioni</b> .....	<b>1</b>
<b>Riassunto</b> .....	<b>2</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>3</b>
<b>1. Introduzione</b> .....	<b>1</b>
1.1 Nanotecnologie.....	1
1.2 Nanoparticelle d'oro .....	3
1.2.1 Proprietà ottiche delle nanoparticelle.....	5
1.3 Sintesi nanoparticelle d'oro .....	6
1.3.1 Metodi chimici .....	6
1.3.2 Metodi fisici.....	8
1.4 Catalisi con nanoparticelle di oro .....	9
1.5 Riduzione paranitrofenolo catalizzata da AuNPs.....	10
1.6 Meccanismo di reazione catalizzato .....	11
1.7 Protein corona .....	13
1.8 Albumina Siero Bovina (BSA) .....	15
1.9 Sintesi peptidica e Sintesi peptidica in fase solida (SPPS).....	16
1.10 Reazione Aldolica .....	18
1.10.1 Reazione aldolica catalizzata da prolina .....	19
<b>2 Materiali e Metodi</b> .....	<b>20</b>
2.1 Reagenti e solventi.....	20
2.2 Strumentazione.....	20
2.2.1 Spettroscopia UV-Vis .....	20
2.2.2 High-Performance Liquid Chromatography. ....	20
2.2.3 Dicroismo Circolare.....	20
2.2.4 Risonanza magnetica nucleare (NMR). ....	21
2.2.5 Microscopia a trasmissione elettronica (TEM) .....	21
2.2.6 Spettroscopia di massa .....	21
2.3 Sintesi di nanoparticelle di oro .....	21
2.3.1 Sintesi metodo Turkevich.....	22
2.3.2 Sintesi metodo Martin .....	22
2.4 Sintesi di 4-[N-(tritylsulfenil)benzoyl]-14-amino-3,6,9,12-tetraoxatetradecanoyl]-L-proline .....	23
2.4.1 Sintesi 14-azido-3,6,9,12-tetraoxatetradecanoic acid.....	24

2.4.2	Sintesi di tert-Butyl N-tert-Butoxycarbonyl-4-hydroxy-L-proline .....	25
2.4.3	Sintesi tert-Butyl 4-(14-azido-3,6,9,12-tetraoxa-tetradecanoyl)-N-Boc-L-proline	26
2.4.4	Sintesi linker: acido tritilsulfenimercaptobenzoico.....	26
2.4.5	Sintesi tert-Butyl 4-[N-(11-tritilsulfenyl)mercaptopbenzoyl]-14-amino-3,6,9,12-tetraoxatetradecanoyl]-N-Boc-L-proline .....	26
2.4.6	Sintesi 4-[N-(11-mercaptopundecanoyl)-14-amino-3,6,9,12-tetraoxatetradecanoyl]-L-proline.....	27
2.5	Sintesi in fase solida .....	27
<b>3</b>	<b>Risultati e conclusioni .....</b>	<b>30</b>
3.1	Sintesi delle AuNPs.....	30
3.1.1	Stabilità nanoparticelle .....	33
3.2	Nanoparticelle di oro funzionalizzate con BSA .....	34
3.3	Nanoparticelle di oro funzionalizzate con 4-[N-(11-mercaptopbenzoil)-14-amino-3,6,9,12-tetraoxatetradecanoil]-L-prolina .....	37
3.3.1	Spacer idrofilico: Acido 14-azido-3,6,9,12-tetraossatetradecanoico.....	38
3.3.2	Boc-prolina-(estere tertbutilico) .....	39
3.3.3	Linker: Acido 4-tritilmercaptobenzoico.....	40
3.3.4	Coupling fra spacer e idrossiprolina .....	41
3.3.5	Prodotto finale .....	42
3.4	Stabilità del sistema nanoparticella 4-[N-(11-mercaptopbenzoyl)-14-amino-3,6,9,12-tetraoxatetradecanoyl]-L-proline .....	43
3.5	Nanoparticelle di oro funzionalizzate con dipeptide .....	44
3.6	Catalisi delle reazioni.....	45
3.6.1	Riduzione gruppo fenolo .....	45
3.6.2	Reazione di condensazione aldolica.....	50
<b>4</b>	<b>Conclusioni.....</b>	<b>57</b>
<b>5</b>	<b>Bibliografia .....</b>	<b>59</b>





## ABBREVIAZIONI

---

ABBREVIAAZIONI	RELATIVA CORRISPONDENZA
AA	Amminoacido
ACN	Acetonitrile
AcOEt	Acetato di etile
Boc	Tert-Butilossilcarbonile
CD	Dicroismo circolare
DCM	Diclorometano
EDC	N-(3-dimetilamminopropil) -N'-etilcarbodiimide cloridrato
Fmoc	Fluorenilmetilossicarbonil
AuNPs	Nanoparticelle di oro
HPLC	Cromatografia liquida ad alta prestazione
HOAT	1-Hydroxy-7-azabenzotriazole
MeOH	Metanolo
MW	Peso molecolare
TFA	Acido trifluoroacetico
TLC	Thin layer chromatography
tR	Tempo di ritenzione
TBTU	2-(1H-Benzotriazole-1-yl) -1,1,3,3-tetramethylaminium tetrafluoroborate
UV	Ultra violetto

## ***RIASSUNTO***

---

Sebbene grandi successi siano stati raggiunti nel campo della catalisi asimmetrica mediata da metalli, i recenti avvenimenti nel campo dell'organocatalisi hanno reso gli enzimi "man-made" non più un'utopia ma un obiettivo concreto e raggiungibile. Esempio tangibile di questo salto qualitativo sono i miglioramenti fatti nel campo delle reazioni aldoliche: una delle più importanti trasformazioni in chimica organica. Molti processi, per la maggior parte stechiometrici, sono stati affrontati dagli scienziati con lo scopo di superare le barriere regio, chemio, diastereo ed enantioselettive presentate da questa categoria di reazioni. Nei sistemi biologici la trasformazione è svolta da due classi di aldolasi che catalizzano la reazione o mediante meccanismo con passaggio intermedio ad enammina (aldolasi di tipo 1) o a zinco-enolato (tipo 2). Al contrario della catalisi chimica la maggior parte delle reazioni organocatalizzate sono condotte in solventi organici come DMSO, DMF, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, lontani dall'essere considerati solventi green poiché in ambiente acquoso queste danno luogo a bassa resa e stereoselettività. Oltretutto, l'elevata quantità di organocatalizzatore richiesta per il completamento della reazione, causa un serio problema durante la fase di purificazione dal prodotto in quanto i primi e i secondi non hanno una buona efficienza di separazione. È quindi altamente desiderabile ideare quindi un approccio "aldolase-like" in grado di catalizzare la reazione in un ambiente acquoso e permettere una buona purificazione del prodotto. Sebbene spesso si siano ottenuti buoni risultati nella rimozione del catalizzatore dai prodotti, i catalizzatori supportati spesso accusano livelli di attività enzimatica inferiori (effetti di diffusione) e selettività (eterogeneità del sito) rispetto ai loro analoghi non supportati. La comparsa e il progresso delle nanotecnologie hanno portato un gran numero di nanomateriali e nanosistemi innovativi che possono essere utilizzati come supporti catalitici semi-eterogenei combinando i vantaggi di una notevole reattività con la facile separazione. L'elevato rapporto superficie su area conferisce loro migliorata attività, mentre i recenti progressi in nano filtrazione, precipitazione-flocculazione, ne facilitano la separazione dai prodotti. Le nanoparticelle d'oro funzionalizzate e stabilizzate presentando eccellenti dimensioni, solubilità e comportamento qualificandole in modo del tutto naturale per agire come supporti nanometrici per l'immobilizzazione del catalizzatore.

In questo lavoro abbiamo progettato diversi nanosistemi d'oro con differenti tipi di funzionalizzazione per imitare il meccanismo catalitico delle aldolasi di tipo 1 e valutarne la capacità catalitica con l'obiettivo di trovare un set di condizioni che massimizzino l'attività chimica.



## *ABSTRACT*

---

Although great successes have been achieved in the field of metal-mediated asymmetric catalysis, recent events in the field of organocatalysis have made "man-made" enzymes no longer a utopia but a concrete and attainable goal. Tangible examples of this qualitative leap are the improvements made in the field of aldol reactions one of the most important transformations in organic chemistry. Many processes, mostly stoichiometric, have been approached by scientists with the aim of overcoming the regio-, chemo-, diastereo-, and enantioselective barriers presented by this category of reactions. In biological systems, this type of reaction is carried out by two classes of aldolases that catalyze the reaction by mechanism with intermediate step to enamine (type 1 aldolase) or zinc-enolate (type 2). In contrast to enzymatic catalysis most organocatalyzed reactions are conducted in organic solvents such as DMSO, DMF, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, which are far from being considered green solvents since in aqueous environment these give rise to low yield and stereoselectivity. In addition, the high amount of organocatalyst required to complete the reaction causes a serious problem during the purification step from the product since the former and the latter do not have good separation efficiency. Therefore, developing an "aldolase-like" approach that can catalyze the reaction but in an aqueous environment and allow good purification of the product is highly desirable. Although good results have often been obtained in catalyst removal from products, supported catalysts often suffer from lower levels of enzyme activity (diffusion effects) and selectivity (site heterogeneity) than their unsupported analogs. The emergence and advancement of nanotechnology has brought a large number of innovative nanomaterials that can be used as semi-heterogeneous catalytic supports by combining the advantages of high reactivity and easy separation. Their high surface area-to-area ratio gives them improved activity, while recent advances in nanofiltration, precipitation-flocculation, facilitate their separation from products. The functionalized and stabilized gold nanoparticles show excellent size, solubility and agglomeration behavior qualifying them to act as nanometric supports for catalyst immobilization.

In this work, we designed several gold nanosystems with different types of functionalization to mimic the catalytic mechanism of type 1 aldolases to evaluate the catalytic ability with the goal of finding a set of conditions that could maximize chemical activity.



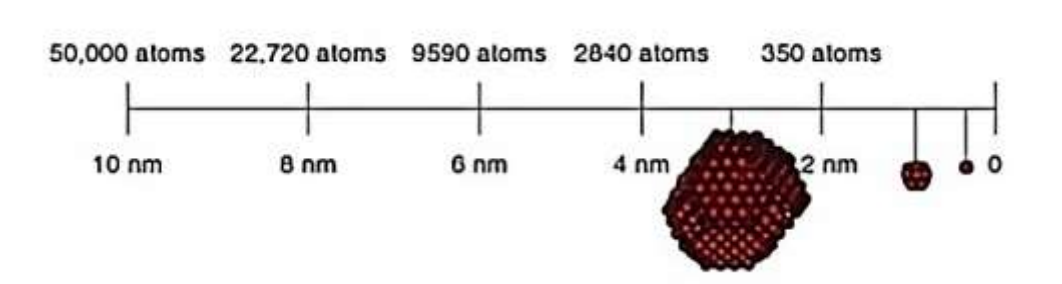
# 1. INTRODUZIONE

---

## 1.1 Nanotecnologie

Le nanotecnologie rappresentano un'area rivoluzionaria per lo sviluppo di tecniche per la manipolazione di materiali a livello nanometrico (mille milioni di volte più piccolo di un metro, Figura 1). Con questo termine si intende quindi una qualsiasi tecnologia, a scala nanometrica, che può avere numerose applicazioni nel mondo reale: da sistemi chimici, fisici e biologici che spaziano tra le dimensioni molecolari e submicroniche all'integrazione di questi ultimi in progetti più grandi<sup>(1)</sup>. Questa scienza ha la potenziale capacità di cambiare la nostra prospettiva su problematiche già parzialmente risolte offrendoci nuove soluzioni, approcci e metodi per affrontare e chiarire problematiche presenti e future. La scoperta e l'uso di nanomateriali di carbonio hanno permesso l'introduzione e lo sviluppo di nuove aree in campo nanomedico ma anche in ambito di biosensori o bioelettronica. Più recentemente le nanotecnologie sono state oggetto di analisi in campi multidisciplinari per le proprietà elettriche, ottiche, magnetiche e meccaniche della nanostruttura che la rende una promettente candidata per la nuova generazione di nanomateriali con ampia applicabilità<sup>(2)</sup>.

Alcune nanostrutture possono inoltre fornire soluzioni a sfide ambientali e tecnologiche in ambito di catalisi, medicina, conversione di energia solare e trattamento delle acque reflue.



**[Figura 1] Scala delle dimensioni all'interno della quale collochiamo le nanotecnologie.**

Con studi nanoscientifici si intendono quelli che lavorano con materiali e sistemi aventi le seguenti caratteristiche:

- almeno una dimensione inferiore di 10 nm.
- utilizzo di metodologie che determinano il pieno controllo delle caratteristiche fisico-chimiche della struttura.
- permettono di produrre strutture più grandi (proprietà “building-block”).

La caratteristica che rende i nanosistemi così interessanti è il cambiamento delle proprietà del materiale quando questo è in dimensioni nanometriche comparato alla forma aggregata dello stesso. Quando le dimensioni del materiale sono ridotte (al di sotto dei 100 nm) vengono modificate anche le proprietà chimico-fisiche<sup>(3)</sup>. Si cerca quindi di raggiungere queste grandezze con lo scopo di indurre determinate performance o nuove proprietà ad un materiale che precedentemente non le presentava. Struttura principe di queste tecnologie sono le nanoparticelle: un collettivo di atomi legati assieme con un raggio medio tra 1 e 100 nm tipicamente costituita tra i 10 e 105 atomi. Un'applicazione rilevante per queste è l'utilizzo come catalizzatori, sia per reazioni chimiche che enzimatiche, condizione che le identifica come nanocatalizzatori.

Sviluppi consistenti sono stati raggiunti in questo campo contribuendo alla comprensione della natura e funzione delle NP in reazioni chimiche. La ragione di queste performance catalitiche risiede nei numerosi vantaggi che un sistema del genere presenta: l'elevato rapporto superficie/volume, morfologia di superficie e proprietà elettroniche<sup>(4)</sup>. Ci sono numerose ragioni sul perché la nanoscala sia diventata così importante e perché questo campo abbia creato nuove opportunità in scienza e tecnologia. Alcune di queste sono:

- 1) Il migliorato rapporto superficie/volume che si presenta a livello di nanoscala permette nuovi effetti meccanico quantistici (simil-onda). Applicando un design di queste dimensioni è possibile alterare i legami macro/micro-scopici riflettendo modifiche in temperatura di melting, magnetizzazione e capacità di carica senza intaccare la composizione chimica.
- 2) A questa scala le proprietà chimiche risultano vantaggiose per la catalisi a causa della chimica di interfaccia e superficie.

- 3) Un aspetto chiave delle strutture molecolari ed entità biologiche è la loro organizzazione in nanoscala. Lo sviluppo delle nanotecnologie ha permesso di introdurre oggetti man-made all'interno di cellule viventi<sup>(4)</sup>.
- 4) Sistemi macroscopici originati da nanostrutture hanno una serie di proprietà meccaniche come compressione e malleabilità migliorate, molti nanomateriali hanno forza e resistenza aumentata mentre altri nanocomposti sono noti per la loro leggerezza.

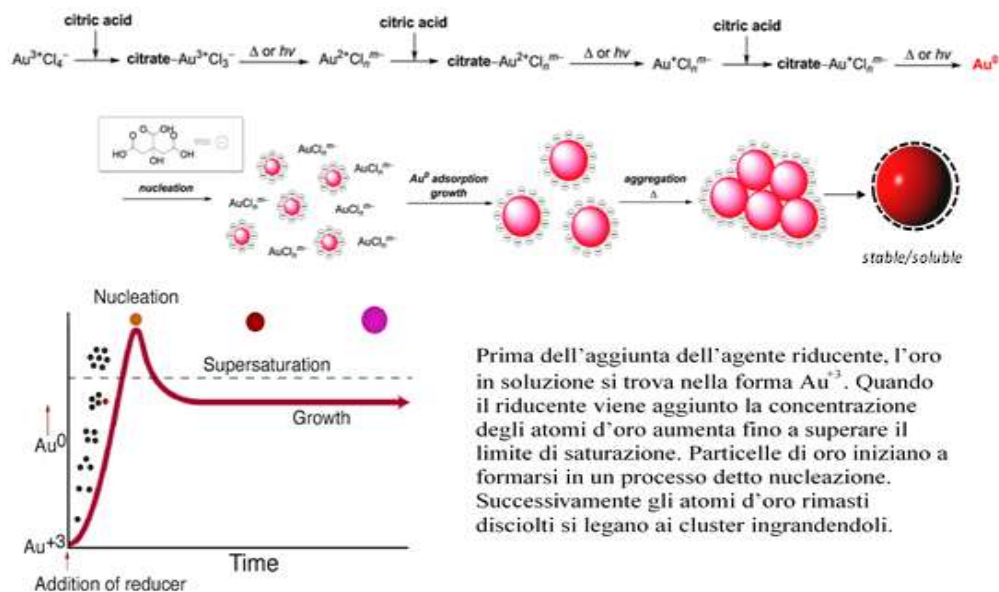
## 1.2 Nanoparticelle d'oro

Le nanoparticelle metalliche sono studiate e impiegate in diversi ambiti: dall'utilizzo come catalizzatori o sensori, terapia contro il cancro, imaging ai raggi X, sistemi per delivery di farmaci e terapia fotodinamica<sup>(5)</sup>.

Durante il processo di produzione delle nanoparticelle, modificando i parametri di reazione, è possibile ottenere diverse strutture (Figura 2) e dimensioni che generano diverse proprietà fisiche e chimiche. In questo lavoro in particolare ci siamo concentrati nell'ottenere particelle sferiche applicabili a catalisi chimica<sup>(6)</sup>.



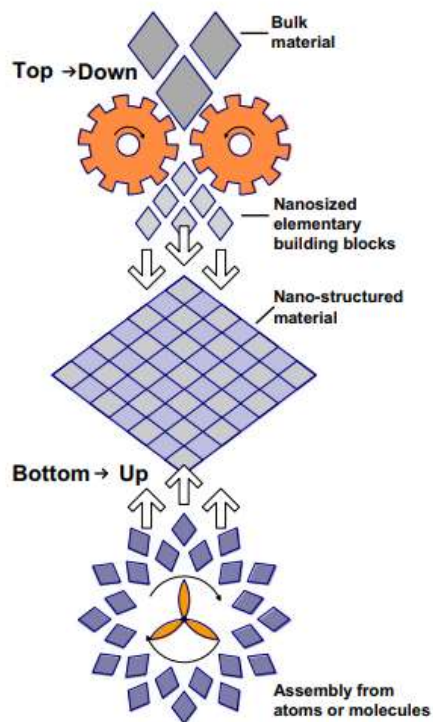
[Figura 2] Nanosistemi d'oro con forme differenti.



[Figura 3] Schema di processo per la produzione di nanoparticelle di oro.

Le nanoparticelle inorganiche, specialmente le nanoparticelle d'oro (AuNP), costituiscono sistemi molto interessanti e per questo motivo sono state oggetto di studi approfonditi negli ultimi 20 anni.

Esse sono costituite da atomi d'oro che formano il core della particella; successivamente il cluster viene circondato, sulla superficie, da gruppi stabilizzatori. L'utilità che ne deriva sorge dalle particolari caratteristiche ottiche, elettroniche e fisico-chimiche oltre che dalla minima tossicità mostrata<sup>(7)</sup>. Le AuNPs possono essere sintetizzate tramite diversi metodi che si suddividono



[Figura 4] Schema bottom-up e top-down per la sintesi di nanoparticelle.

in due macroclassi: top-down e bottom-up (Figura 4). Di questa seconda categoria fanno parte la sintesi con metodo Turkevich e quella con metodo Martin: utilizzando sostanze chimiche reattive in ambiente acquoso a condizioni di reazione controllate (concentrazione dell'agente riducente, temperatura, pH e tempo di

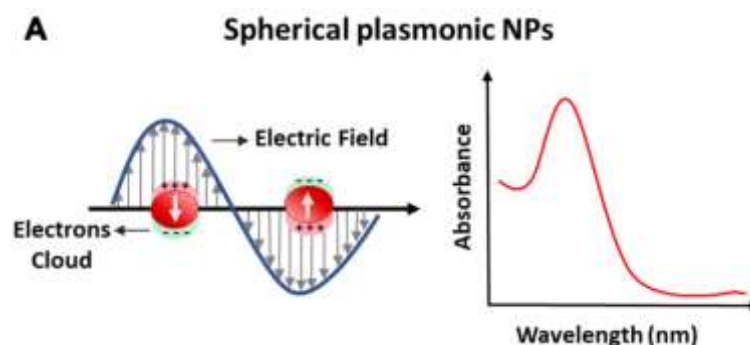
reazione) è possibile ottenere nanoparticelle altamente stabili e di dimensioni uniformi<sup>(8)</sup>.

Inizialmente si prepara una soluzione di sale di oro (acido tetracloroaurico) che funge da precursore delle nanoparticelle al quale viene aggiunta un agente riducente costituito da citrato di sodio o sodioboridruro ( $\text{NaBH}_4$ ). La reazione di riduzione del metallo genera cluster d'oro che andranno ad espandersi fino ad ottenere il prodotto delle dimensioni desiderate.

Le AuNPs e la loro stabilità possono essere saggiate con una prima analisi allo spettrofotometro UV. A causa della struttura nanometrica le nanoparticelle presentano un picco di assorbimento intorno ai 520 nm dovuta alla banda di risonanza plasmonica di superficie (LSPR).

### 1.2.1 Proprietà ottiche delle nanoparticelle

Le proprietà ottiche delle nanoparticelle d'oro sono definite dalla loro banda plasmonica di risonanza che dipende sia dal collettivo stato di eccitazione e conduzione elettronica che da struttura, forma e dimensione delle nanoparticelle. L'elevato coefficiente di assorbimento molare risulta in un'elevata selettività, anche maggiore rispetto ad altri cromofori, delle tecniche di rilevazione ottica. Illuminare una soluzione di nanoparticelle d'oro causa un forte assorbimento e/o scattering a determinate lunghezze d'onda di risonanza che dipendono in larga parte dalla morfologia e costante dielettrica del medium<sup>(9)</sup>.



[Figura 5] Illustrazione schematica della vibrazione collettiva degli elettroni liberi in una particella. Questi elettroni sono responsabili dell'LSPR.

Se esposti a luce visibile gli elettroni di conduzione sono guidati dal campo elettrico a vibrare collettivamente a una frequenza di risonanza relativa agli ioni positivi di matrice: questo fenomeno è chiamato localized surface plasmon resonance (LSPR). Quando la luce colpisce una nanoparticella, gli elettroni liberi del metallo formano un campo elettromagnetico e iniziano collettivamente a oscillare a una frequenza corrispondente quella della luce incidente (Figura 5). Ancora una volta i picchi di risonanza plasmonica sono dipendenti dai parametri delle nanoparticelle quali aspetto, dimensione, forma e aggregazione<sup>(10)</sup>.

## **1.3 Sintesi nanoparticelle d'oro**

### **1.3.1 Metodi chimici**

Generalmente soluzioni colloidali di nanoparticelle di oro possono essere ottenute tramite una riduzione di un sale d'oro sotto agitazione per formare nanoparticelle uniformi in dimensione. Questo porta alla conversione di atomi  $\text{Au}^{3+}$  in  $\text{Au}^0$ . Per ridurre la capacità delle AuNPs di aggregare un medium stabilizzante viene aggiunto alla soluzione.

#### **1.3.1.1 Metodo Turkevich-Frens**

Questo metodo ideato da J. Turkevich nel 1951 e modificato da G.Frens negli anni 70 è utilizzato per sintetizzare NPs d'oro nel range dei 10-20 nm<sup>(11)</sup>. La procedura inizia con l'utilizzo di una soluzione del sale d'oro in presenza di un agente riducente (citrato di sodio) a temperatura, concentrazione e pH controllati<sup>(12)</sup>. Il diametro delle AuNP può essere controllato modificando questi tre parametri o il fattore stabilizzante/riducente. Lo svantaggio più grande di questa tecnica era il piccolo range di dimensione ottenibile. Frens migliorò la tecnica cambiando la quantità di agente riducente e stabilizzante per ottenere NPs tra i 15 e i 150 nanometri<sup>(13)</sup>.



### 1.3.1.2 Metodo Martin

Il gruppo Eah ha sviluppato questo metodo nel 2010 basandosi sulla riduzione di  $\text{HAuCl}_4$  con un forte agente come  $\text{NaBH}_4$ . Il metodo Martin è una tecnica ben nota e ampiamente utilizzata per la sintesi di nanoparticelle d'oro<sup>(14)</sup>. In questo metodo, una soluzione del sale d'oro, tipicamente cloruro d'oro ( $\text{HAuCl}_4$ ), viene preparata e utilizzata come precursore per la formazione delle nanoparticelle. La riduzione degli ioni d'oro in nanoparticelle si ottiene aggiungendo alla soluzione, in condizioni controllate, un agente riducente, come il sodioboroidruro ( $\text{NaBH}_4$ ). La reazione di riduzione porta alla formazione di nanoparticelle d'oro con dimensioni monodisperse e forma appurata.

La stabilizzazione della soluzione comporta:

- una lenta idrolisi di un eccesso di  $\text{NaBH}_4$  a  $\text{NaB(OH)}_4$ , catalizzata solo molto debolmente dalle AuNPs a 25°C.
- la formazione di forti legami covalenti Au-H e/o Au-BH<sub>4</sub> con il nucleo della nanoparticella.
- la presenza di Cl in prossimità del nucleo di oro.

Così dopo pochi istanti, i nuclei di AuNP sono circondati da legami stabilizzanti H e/o BH<sub>4</sub> e da una percentuale minore di Cl. Col passare del tempo i ligandi idridici vengono lentamente ma irreversibilmente idrolizzati a H<sub>2</sub>, OH<sup>-</sup> e  $\text{NaB(OH)}_4$ . Dopo un mese gli unici elementi stabilizzanti ancora presenti sulla superficie sono elettrostatici: Cl e soprattutto B(OH)<sub>4</sub> (che incorpora l'acqua in una debole rete sopramolecolare a legami di idrogeno) con cationi Na<sup>+</sup> in un secondo strato. Il metodo Martin offre diversi vantaggi, tra cui la semplicità, la scalabilità e la capacità di produrre nanoparticelle monodisperse. Controllando attentamente i parametri di reazione, come le concentrazioni del precursore e dell'agente riducente, nonché la temperatura e il tempo di reazione, si possono ottenere nanoparticelle d'oro con le proprietà desiderate per varie applicazioni in campi come la catalisi, il rilevamento di molecole e le scienze biomediche.

### **1.3.2 Metodi fisici**

Altri metodi di produzione includono procedure elettrochimiche, *sonochimiche*, termali e riduzione fotochimica<sup>(15)</sup>. Un metodo appropriato per ottenere soluzione colloidali di nanoparticelle d'oro da una poli-dispersione di nanoparticelle, chiamata via di maturazione digestiva, utilizza un eccesso di agente stabilizzante e capping combinata con alte temperature e alcantioli per controllare il diametro delle NP. In aggiunta altre tecniche come onde ultrasoniche, microonde, ablazione laser sono state esplorate per la produzione di nanoparticelle.

#### **1.3.2.1 Sonolisi**

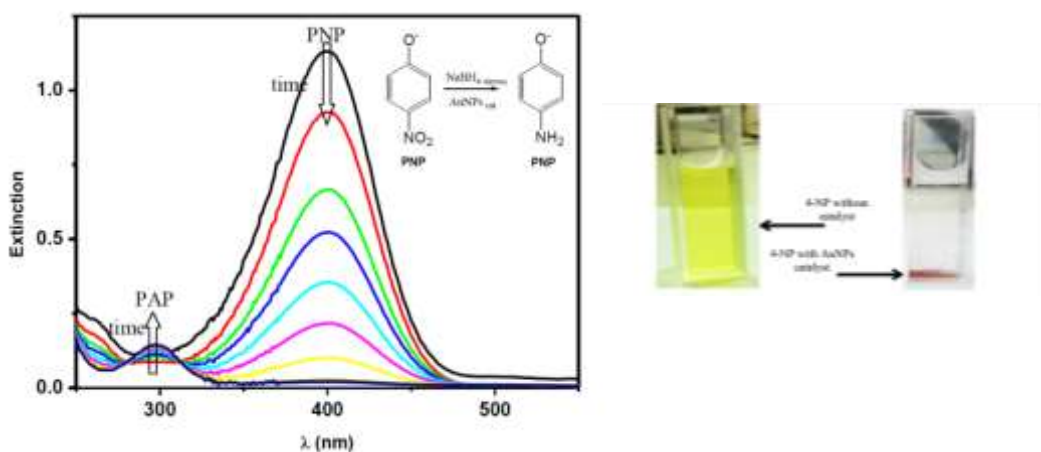
Questo metodo utilizza ultrasuoni come onde ad alta frequenza: il sale di oro reagisce in una soluzione acquosa con radicali idrossilici e zuccheri come agenti riducenti. La morfologia delle nanoparticelle generate è in forma di nastro con uno spessore di 40 nm e una lunghezza di diversi micrometri. In presenza di oligomeri di glucosio come ciclodestrine si possono anche formare nanoparticelle sferiche.

#### **1.3.2.2 Ablazione laser**

Con questo metodo nanoparticelle d'oro vengono generate tramite ablazione laser in un medium acquoso compatibile<sup>(16)</sup>. Il solvente usato serve per cambiare radicalmente la superficie chimica e le proprietà fisiche delle nanoparticelle e conseguentemente le sue caratteristiche biologiche. Con questo setup un target d'oro è immerso in una soluzione acquosa e colpito da un'intensa radiazione laser formando naturalmente una generazione di nanocluster d'oro. Quando vengono rilasciati in un medium acquoso questi nanocluster coalescono e producono nanoparticelle in stato colloidale. Questo esperimento è effettuato in acqua deionizzata senza l'utilizzo di agenti stabilizzanti<sup>(12)</sup>.

## 1.4 Catalisi con nanoparticelle di oro

Nella forma aggregata l'oro metallico presenta scarsa reattività e, per molto tempo, non è stato preso in considerazione come potenziale catalizzatore<sup>(17)</sup>. Più recentemente è stata però scoperta la capacità delle nanoparticelle di catalizzare reazioni di riduzione e ossidazione; in particolare il lavoro condotto dal professor Haruta e dai suoi collaboratori ha drasticamente cambiato l'applicazione delle nanoparticelle d'oro<sup>(14)</sup>. Piccole nanoparticelle supportate sono in grado di dare ossidazione di CO o riduzione di gruppi funzionali già a basse temperature (Figura 6). In questo contesto la sintesi di sistemi solubili di nanoparticelle assume quindi una potenziale forte applicazione come sistema catalitico ad alta selettività in termini di resa, dimensione e forma<sup>(18)</sup>.



[Figura 6] A sinistra spettro UV-Vis dell'assorbimento di una soluzione di 4-NP durante la reazione di riduzione, a destra la variazione del colore di una soluzione di 4-NP in presenza e assenza di un catalizzatore per la reazione.

## 1.5 Riduzione paranitrofenolo catalizzata da AuNPs

A partire dal 2013 grazie al lavoro del professor Haruta le AuNPs sono state prese in considerazione come eccellenti catalizzatori, anche a basse temperature, per diversi tipi di reazioni; il che è in contrasto con l'utilizzo di oro in forma macro e microscopica poiché in questo stato ha la reputazione di essere un metallo inerte<sup>(19)</sup>. Tra le numerose reazioni catalizzate dalle AuNPs, la riduzione dei derivati nitrici rappresenta una sfida importante a causa della natura inquinante di questi composti. La riduzione del 4-nitrofenolo (4-NP) e di altri composti nitroaromatici è particolarmente cruciale poiché antropogenici, tossici e inibitori. Il prodotto di riduzione del 4-NP, il 4-aminofenolo (4-AP), trova invece applicazione come precursore per la produzione di farmaci analgesici e antipiretici, sviluppatore fotografico di pellicole in bianco e nero, inibitore della corrosione, agente essiccante ed in particolare è un importante intermedio nella sintesi del paracetamolo (Figura 7)<sup>(20)</sup>.



**[Figura 7] Conversione chimica del *p*-nitrofenolo in amminofenolo.**

Una reazione di questo tipo dovrebbe essere ben controllata e produrre un singolo prodotto dal reagente di partenza a temperatura ambiente solo in presenza di un catalizzatore. La riduzione del 4-NP avviene a temperatura ambiente in solventi in cui i reagenti siano solubili e dove il catalizzatore, costituito da AuNPs, rimanga stabile durante l'intero processo di reazione. Il metodo comune più efficiente per la riduzione di 4-NP è l'introduzione di NaBH<sub>4</sub> (come agente riducente) e di un catalizzatore metallico (come ad esempio AuNPs, AgNPs, PdNPs,..)<sup>(21)</sup>. Rispetto agli altri catalizzatori metallici, le nanoparticelle di oro presentano due proprietà uniche:

- l'attività catalitica dell'oro è direttamente correlata alla dimensione delle particelle ed è osservabile solo su scala nanometrica ma non a quella micrometrica.
- i catalizzatori di oro sono attivi in condizioni blande, anche a temperatura ambiente o inferiore.

## 1.6 Meccanismo di reazione catalizzato

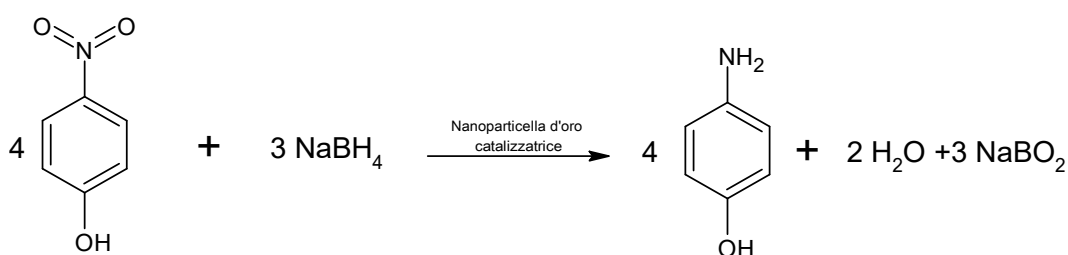
La riduzione del 4-NP con NaBH<sub>4</sub> catalizzata dalle AuNPs in acqua è facilmente monitorabile mediante spettroscopia UV-Vis e la diminuzione del forte assorbimento del 4-NP a 400 nm è trattata in termini di reazione del primo ordine in presenza di un eccesso di NaBH<sub>4</sub>. La variazione dell'assorbimento ha questa lunghezza d'onda è utilizzato per confrontare la costante di reazione per diversi sistemi catalizzatori. La diffusione dei reagenti è veloce rispetto alla fase limitante della velocità sulla superficie delle nanoparticelle. Ciò viene dedotto dal numero di Damköhler (*Dall*), che è il rapporto tra la velocità di reazione e la velocità di diffusione per una reazione del primo ordine, poiché molto più piccolo dell'unità per questa reazione:

$$Dall = k/\beta A$$

dove  $k$  è la costante di velocità di reazione,  $\beta$  è il coefficiente di trasporto di massa e  $A$  è l'area superficiale di AuNP. *Dall* è dell'ordine di  $10^{-3}$  per la riduzione di 4-NP catalizzata da AuNP con NaBH<sub>4</sub>. La variazione di temperatura non provoca un cambiamento nel meccanismo in un intervallo di temperatura adeguato, quindi l'energia di attivazione ( $E_A$ ) può essere facilmente ricavata. Queste proprietà rendono la reazione il più vicino possibile alla definizione di una cosiddetta reazione "modello", sebbene siano state riportate alcune restrizioni o approssimazioni. La stabilità delle AuNPs durante la riduzione catalitica di 4-NP e la conseguente determinazione dell'energia di attivazione ( $E_A$ ) permettono di studiare l'influenza delle dimensioni, forma e della funzionalizzazione della AuNP sulla reazione. Questa reazione può essere trattata in termini di modello Langmuir-Hinshelwood (LH): entrambi i reagenti vengono adsorbiti sulla superficie delle particelle prima della reazione in maniera veloce.

Le specie adsorbite reagiscono e successivamente il prodotto di reazione, appena ottenuto, si dissocia dalla superficie. Questo modello ha fornito una descrizione corretta della cinetica della reazione; in particolare si è notato come la costante di velocità diminuisca all'aumentare della concentrazione di 4-NP e raggiunga un massimo all'aumentare della concentrazione di NaBH<sub>4</sub> indicando, secondo il modello LH, una competizione tra i due reagenti per la superficie della AuNP. In questo caso il BH<sub>4</sub><sup>-</sup> reagisce con la superficie delle nanoparticelle portando alla formazione di legami Au-H. In seguito la reazione di riduzione che converte il 4-NP adsorbito in 4-aminofenolo (4-AP) è la fase limitante (cioè la diffusione e l'adsorbimento dei reattivi e il desorbimento sono rapidi rispetto alla reazione sulla superficie di AuNP)<sup>(22)</sup>. Dalla Figura 9 si nota come, nella prima fase l'NaBH<sub>4</sub> venga decomposto per idrolisi in B(OH)<sub>4</sub><sup>-</sup> e idrogeno attivo. Successivamente, l'idrogeno viene trasferito al nanosistema d'oro e adsorbito in superficie dove reagisce con il 4-NP per dare il prodotto 4-AP.

In sintesi, la reazione di riduzione viene riassunta dalla Figura 8 sottostante.

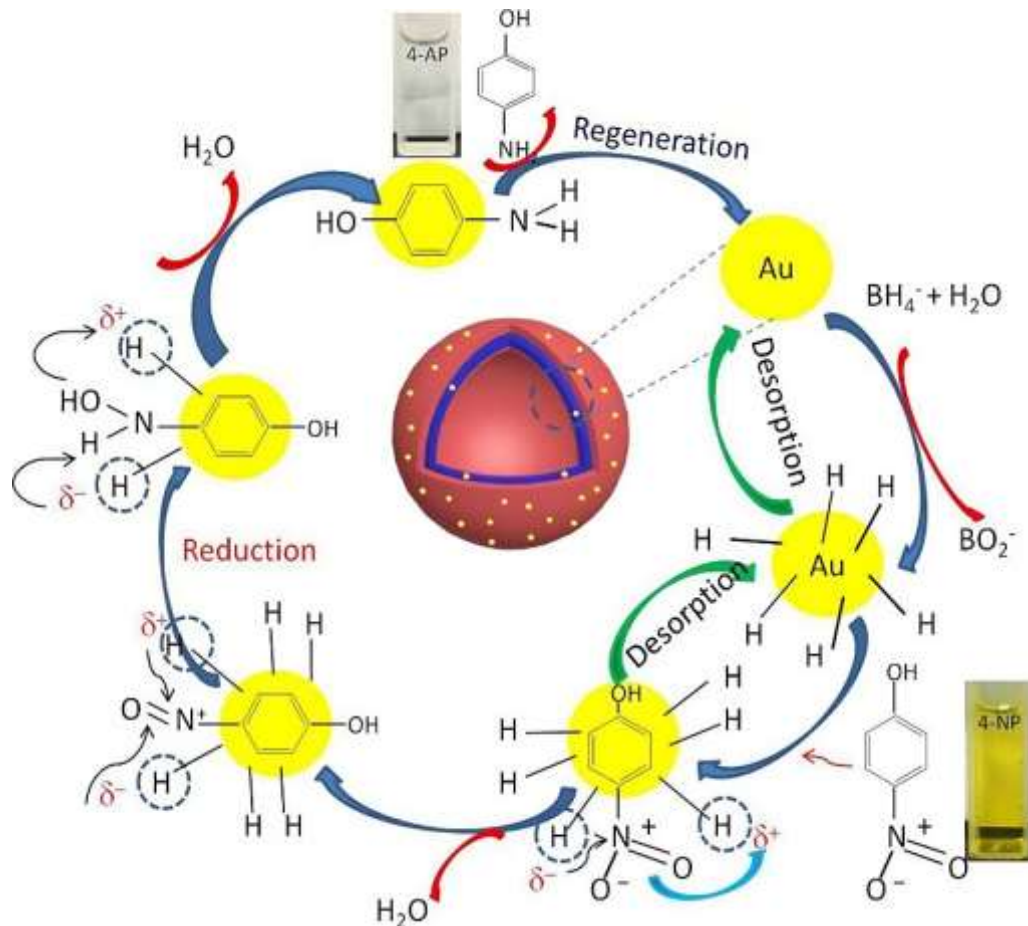


**[Figura 8] Stechiometria della reazione di riduzione del paranitrofenolo.**

Il professor Pal con il suo gruppo ha mostrato come la reazione catalizzata prenda luogo sulla superficie della nanoparticella verificando poi come la costante di reazione fosse inversamente proporzionale alla dimensione della nanoparticella e proporzionale all'area. Il progredire della reazione è monitorabile osservando la diminuzione della forte banda di assorbimento del 4-NP a 400 nm man mano che questo viene consumato e la concomitante comparsa della banda a 300 nm data dall'aumento di concentrazione del prodotto. Per quando questa misurazione sembri abbastanza semplice l'idrogeno presente in soluzione, che forma piccole

bolle di gas, potrebbe rendere complicato la rivelazione dell'assorbanza durante la reazione.

Riguardo il pseudo-primo ordine ipotizzato per la stessa alcuni esperimenti rivelano che la reazione di riduzione del paranitrofenolo potrebbe essere di *Nesimo* ordine (dove  $n > 1$ ) e  $N$  è dipendente dalla superficie totale della nanoparticella<sup>(18)</sup>.

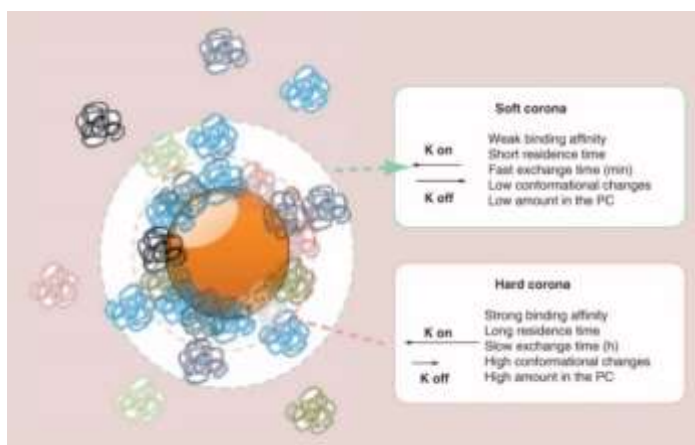


[Figura 9] Schema del meccanismo di reazione.

## 1.7 Protein corona

Le AuNPs sono state universalmente riconosciute come sistemi che, immersi in un medium biologico, sono in grado di accettare e disporre sulla propria superficie proteine per formare una corona. Questa corona che si viene a formare non solo cambia le caratteristiche delle nanoparticelle ma gioca anche un ruolo fondamentale nell'interazione di queste con altri materiali e substrati<sup>(23)</sup>. L'assorbimento delle proteine sulla superficie dipende sia dalle proprietà che dalle modificazioni chimiche della superficie le quali, venendo alterate, possono generare una

variazione delle caratteristiche fisicochimiche della nanoparticella talvolta alterando pattern biologici. La morfologia di questa corona dipende dal tipo, forma, dimensione e carica della nanoparticella, condizioni di reazione e tempo di incubazione. Agendo come prima linea di interazione con cellule e sistemi metabolici la corona determina l'entità e l'effetto dell'interazione della NP con sistemi viventi nei modi di circolazione, emivita, uptake cellulare, segnalazione e tossicità. Il processo di formazione della corona inizia con una prima fase detta "soft corona" composta da proteine non legate saldamente in equilibrio con la forma libera della proteina in soluzione; successivamente la condizione evolve verso la "hard corona" con proteine adese stabilmente che non desorbiscono (Figura 10). Recentemente questo processo è stato preso in considerazione per conferire alle AuNPs mimetismo cellulare quando per esempio esse vengano utilizzate per fare delivery di farmaci<sup>(24)</sup>. La seconda via percorribile che sfrutta questo effetto tipico è quella di promuovere il binding con proteine, non per evitare legami con terze molecole, ma per promuovere l'affinità verso nuovi substrati. In questo caso quindi le AuNPs agirebbero come supporto per la proteina/enzima catalizzatore<sup>(25)</sup>.



**[Figura 10] Formazione della protein corona. Lo spessore della corona dipende da quanta proteina sia possibile assorbire sulla nanoparticella. La stabilità delle nanoparticelle dipende dalla concentrazione della proteina. La presenza di questo strato protettivo può evitare la precipitazione delle nanoparticelle.**



## 1.8 Albumina Siero Bovina (BSA)



[Figura 11] Visualizzazione su software Chimera della BSA.

```
>sp|P02769|ALBU_BOVIN Albumin OS=Bos taurus OX=9913 GN=ALB PE=1
SV=4
MKWVTFISLLLLFSSAYSRGVFRRDTHKSEIAHRFKDLGEEHFKGLVLIAFSQYLQQCPF
DEHVKLVNELTEFAKTCVADESHAGCEKSLHTLFGDELCKVASLRETYGDMADCCCKQEP
ERNECFLSHKDDSPDLPKLKPDNLTLCDEFKADKFKWFKYLYEIAARRHPYFYAPELLYY
ANKYNGVFQECQAEDKGACLLPKIETMREKVLASSARQRLRCASIQKFGERALKAWSVA
RLSQKFPKAEFVEVTKLVTDLTQVHKECCHGDLLECADDRADLAKYICDNQDTISSKLKE
CCDKPLLEKSHCIAEVEKDAIPENLPPLTADFAEDKDVCKNYQEAKDAFLGSFLYEYSRR
HPEYAVSVLLRLAKEYEATLEECCAADDPHACYSTVFDKLVKHLVDEPQNLKQNCDFEK
LGEYGFQNALIVRYTRKVPQVSTPTLVEVSRSLGKVGTRCCTKPESERMPCTEDYLSLIL
NRLCVLHEKTPVSEKVTKCCTESLVNRRPCFSALTPDETYVPKAFDEKLFTHADICTLP
DTEKQIKKQATALVELLKHKPKATEEQKLTVMENFVAFVVDKCCAADDKEACFAVEGPKLVV
STQTALA
```

Le albumine costituiscono la più alta percentuale tra proteine, presenti nel plasma, totalmente solubili in acqua (>50%). Queste biomolecole agiscono da trasportatori per molecole esogene ed endogene come ioni ed acidi grassi. La BSA (Bovine Serum Albumine) è composta da una singola catena amminoacidica di 583 aa stabilizzata da 17 ponti disolfuro e con tre domini omologhi ognuno costituito a sua volta da 2 sottodomini: A e B aventi particolari capacità di binding.

La capacità di legame è estremamente interessante in campo clinico, farmaceutico, biochimico e per la chimica organica. Infatti, l'albumina del siero, in particolare la siero albumina bovina (BSA), non solo riconosce e lega composti organici, ma è anche in grado di discriminare gli enantiomeri di una molecola chirale. Per questo motivo l'albumina è stata utilizzata fin dagli anni ottanta come agente risolutivo su scala industriale in forma immobilizzata. Nel 1978 Sugimoto ha sviluppato la prima riduzione enantioselettiva, di chetoni prochirali in tampone acquoso, promossa dalla BSA<sup>(26)</sup>.

Successivamente è stato scoperto che, almeno in alcuni casi, la quantità di proteina può essere ridotta a livelli catalitici aumentando notevolmente la semplicità di lavorazione e l'efficienza del protocollo senza influenzare la stereoselettività o la resa. In ultimo è stato evidenziato come l'albumina sia in grado di accelerare alcune reazioni organiche, funzionando quindi come un catalizzatore, pur non disponendo di un vero e proprio sito catalitico come gli enzimi. La modalità d'azione di entrambe le albumine è stata attribuita alla natura basica delle loro tasche idrofobiche, in particolare al sito di legame della IIA contenente una lisina: la Lys-222 nella BSA e l'omologa Lys-199 nella HSA<sup>(27)</sup>.

Coniugare quindi la proteina con nanoparticelle d'oro potrebbe rappresentare una valida strategia per generare un sistema in grado di accoppiare alla capacità catalitica della BSA i vantaggi apportati da un sistema a base di nanoparticelle. Questa coniugazione può avvenire tramite diverse strategie: la più semplice ed economica consiste in un adsorbimento passivo che sfrutta le interazioni covalenti ed elettrostatiche fra proteina e superficie della NP. Altri metodi più complicati sono l'adsorbimento attivo, strategie in situ, cross-linking o l'utilizzo di gel<sup>(28)</sup>.

## **1.9 Sintesi peptidica e Sintesi peptidica in fase solida (SPPS)**

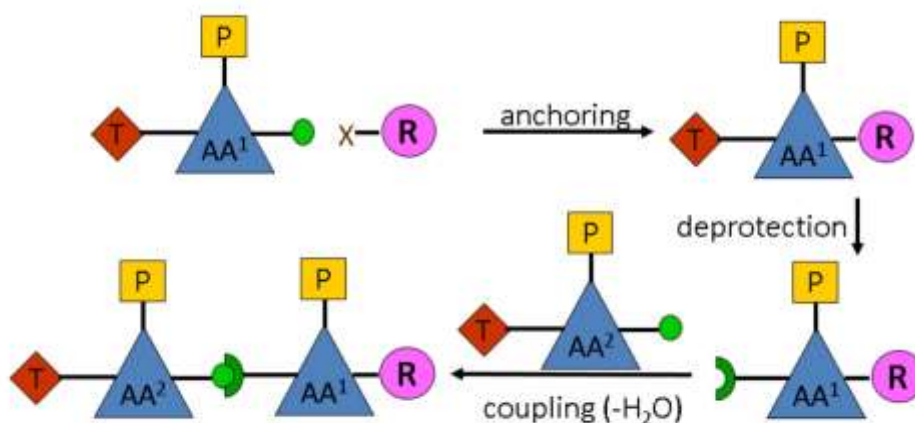
Attualmente la "sintesi di peptidi" comprende un'ampia gamma di tecniche e procedure che consentono la preparazione di materiali che vanno da piccoli peptidi a grandi proteine. Il lavoro pionieristico di Bruce Merrifield, che ha introdotto la sintesi di peptidi in fase solida (SPPS), ha radicalmente cambiato la strategia di sintesi e ha semplificato le complesse ed impegnative fasi di purificazione associate alla produzione in soluzione<sup>(29)</sup>. Inoltre, la SPPS di Merrifield ha permesso lo sviluppo dell'automazione e della vasta gamma di strumenti robotici oggi disponibili. Dopo aver definito una strategia di sintesi e programmato la sequenza amminoacidica dei peptidi, le macchine possono eseguire automaticamente tutte le fasi di sintesi necessarie per la preparazione.

La SPPS è ora diventata il metodo di scelta per la produzione di peptidi, anche se la sintesi in soluzione può rappresentare un'utile alternativa nella produzione su larga scala.

Poiché la sintesi dei peptidi comporta numerosi passaggi ripetitivi l'uso di un supporto solido presenta ovvi vantaggi. I reagenti in eccesso e i prodotti collaterali possono essere separati dal peptide in crescita, semplicemente filtrando e lavando<sup>(30)</sup>. Tutte le fasi della sintesi possono essere eseguite nello stesso recipiente senza alcun trasferimento di materiale. Con questo sistema, un grande eccesso di reagenti ad alta concentrazione può portare le reazioni di accoppiamento fino al completamento.

Il residuo amminoacidico C-terminale N-protetto viene ancorato tramite il suo gruppo carbossilico a una resina idrossilica o amminica per ottenere rispettivamente un peptide legato a un estere o a un'amide. Dopo aver caricato il primo amminoacido, la sequenza peptidica desiderata viene assemblata in modo lineare dal C-terminale all'N-terminale (strategia CN) mediante cicli ripetitivi di N-deprotezione e reazioni di accoppiamento degli amminoacidi. I gruppi funzionali della catena laterale degli amminoacidi devono essere mascherati con gruppi protettori permanenti (P) che siano stabili nelle condizioni di reazione usate durante l'allungamento dei peptidi. Il gruppo  $\alpha$ -ammino è invece protetto da un gruppo protettore temporaneo (t) che solitamente è un derivato dell'uretano (Figura 12)<sup>(31)</sup>. Il gruppo protettivo temporaneo può essere facilmente rimosso in condizioni blande preservando l'integrità del peptide e riducendo il tasso di epimerizzazione, che potrebbe avvenire attraverso la formazione di 5(4H-ossazolone) dell'amminoacido attivato durante la fase di accoppiamento<sup>(32)</sup>.

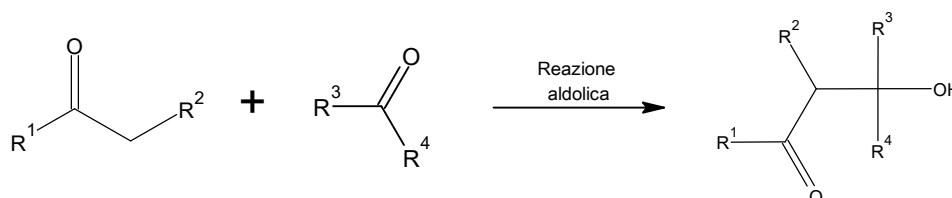
Dopo l'accoppiamento, l'eccesso di reattivi viene rimosso per filtrazioni e lavaggi, il gruppo "t" N-terminale viene rimosso consentendo l'aggiunta del successivo residuo amminoacidico protetto da N-uretano mediante attivazione del suo acido  $\alpha$ -carbossilico. Questo processo (deprotezione/accoppiamento) si ripete fino a ottenere la sequenza desiderata. In una fase finale, il peptide, viene rilasciato dalla resina e i gruppi di protezione delle catene laterali (P), contemporaneamente rimossi.



[Figura 12] Schema di reazione della SPPS.

## 1.10 Reazione Aldolica

La reazione aldolica in Figura 13 è uno dei meccanismi chimici più importanti per indurre la formazione di un legame carbonio-carbonio. La condensazione coinvolge due substrati carbonilici uno dei quali reagisce sotto forma di enolato per dare attacco nucleofilo al carbonio carbonilico (elettrofilico) del secondo reagente generando come prodotto un  $\beta$ -idrossi-carbonile<sup>(33)</sup>.



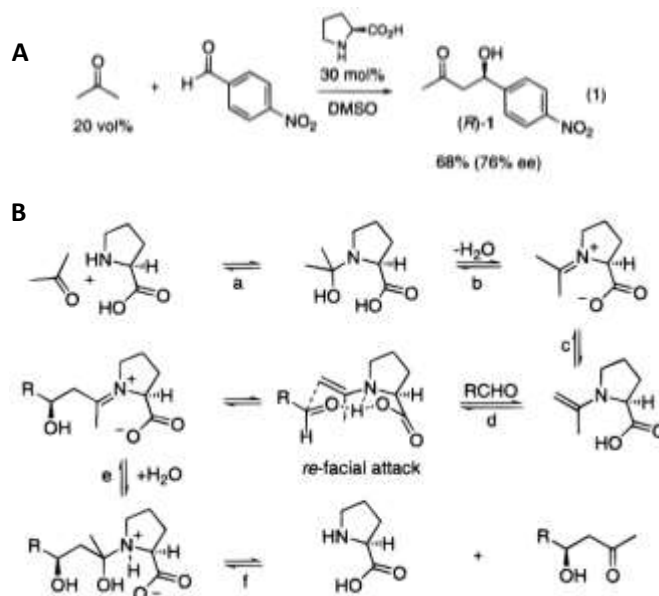
[Figura 13] Schema reazione di condensazione aldolica.

Molte molecole di interesse presentano gruppi  $\beta$ -idrossi-carbonilici, proprio per questo numerosi sforzi sono stati effettuati per svolgere una reazione chemio-, regio- ed enantioselettiva<sup>(34)</sup>. Svariate trasformazione enzimatiche presentano una controparte sintetica; seppur il risultato ottenuto dalle due reazioni sia lo stesso il meccanismo naturale o con il catalizzatore sintetico può variare notevolmente. La formazione asimmetrica del legame C-C costituisce un caso principe di questo aspetto. La reazione chimica mediata dall' enzima è principalmente portata avanti da equivalenti enolati in combinazione con un catalizzatore chirale in una reazione

in cui spesso sono coinvolti anche metalli<sup>(35)</sup>. Molti enzimi sono però in grado di sfruttare un meccanismo diverso in grado di catalizzare l'aldolizzazione diretta partendo da due gruppi carbonilici non modificati. La prima classe di aldolasi sfrutta un meccanismo basato su un intermedio ad enammina mentre la classe II media il processo utilizzando zinco come cofattore<sup>(36)</sup>.

### 1.10.1 Reazione aldolica catalizzata da prolina

A partire dagli anni 2000 si è iniziato a studiare l'aminoacido prolina come possibile catalizzatore achirale che sfruttasse un meccanismo simile alle aldolasi di classe I per generare un nuovo legame C-C tra acetone e una varietà di aldeidi<sup>(37)</sup>. La prolina agisce come un mini-enzima fornendo sia il gruppo nucleofilo che il gruppo acido/basico sotto forma di carbossilato<sup>(38)(39)</sup>. L'aminoacido favorisce tutti i passaggi intermedi, rappresentati in Figura 14, coinvolti nell'attivazione dei substrati e la loro corretta orientazione per generare un prodotto enantioarricchito<sup>(40)</sup>. In particolare vengono favoriti i seguenti passaggi intermedi: l'attacco nucleofilo del gruppo amminico (a); deidratazione dell'ammina intermedia (b); la deprotonazione dello ione imminio (c); la formazione del legame carbonio-carbonio (d); la risoluzione dell'intermedio imminio-aldolo con ricostituzione del catalizzatore ed uscita del substrato (e, f)<sup>(41)</sup>.



[Figura 14] Meccanismo proposto per la reazione aldolica asimmetrica catalizzata da prolina.

## 2 MATERIALI E METODI

---

### 2.1 Reagenti e solventi

- *Alfa Aesar*: NaBH<sub>4</sub>
- *Carbosynth*: EDC\*HCl
- *CARLO ERBA*: ACN per HPLC
- *Fluka*: HCl 3M in MeOH; 2,2,2-Trifluoroetanolo
- *GenScript*: HOAt
- *Iris Biotech GmbH*: HATU; Resina Fmoc-(Rink Amide); Oxyma Pure;
- *Sigma-Aldrich*: DMF; MeOH; Cys; NAC; NaOH; ACN per sintesi; DIPEA; AcOEt; NaHCO<sub>3</sub>; NaCl; Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; THF; NEt<sub>3</sub>; Trt-Cl; Boc<sub>2</sub>O; Dietiletere; Esano; DCM; TFA; TIS; DIC; 2-etil-1-esilamina; Sephadex G-75; EtOH, KHSO<sub>4</sub>.

### 2.2 Strumentazione

#### 2.2.1 Spettroscopia UV-Vis

L'acquisizione dello spettro di assorbimento nel campo UV-VIS è effettuato con lo spettrofotometro Shimadzu UV-2501PC. Lo strumento è in grado di fornire letture dai 190 ai 900nm attraverso l'uso di un doppio monocromatore: uno per le lunghezze d'onda corte e uno per quelle più lunghe. Per la rilevazione del segnale viene utilizzato un il detector a fotomoltiplicatore R-928.

#### 2.2.2 High-Performance Liquid Chromatography.

Le misure di HPLC vengono effettuate utilizzando Agilent 1200 (Palo Alto, CA) montato con un detector per l'UV e Colonna C18 che funge da fase stazionaria.

#### 2.2.3 Dicroismo Circolare

Lo strumento utilizzato per le misurazione di DC è Jasco J-1500. Le cuvette utilizzate sono in quarzo a diverso cammino ottico (da 0.1cm a 1cm). Lo strumento funziona sia nella regione UV che quella ad infrarossi.

#### **2.2.4 Risonanza magnetica nucleare (NMR).**

Gli spettri  $^1\text{H}$  NMR sono effettuati a  $25^\circ\text{C}$  con Bruker Avance 200, 400 e 500MHz. La molteplicità di un segnale è indicata con br:ampia, s:singoletto, d:doppietto, t:tripletto, m:multipletto.

#### **2.2.5 Microscopia a trasmissione elettronica (TEM)**

Le immagini acquisite con TEM (Microscopia a trasmissione elettronica) sono effettuate usando la strumentazione FEI TECAI G12, la quale sfrutta un filo di tungsteno come fonte di elettroni per l'effetto termoionico. Lo strumento permette la visualizzazione di campioni liquidi dopo che una goccia del campione molto diluito viene depositata sopra una maglia di rame coperta da un film di carbonio che agisce da supporto.

(Misure effettuate al dipartimento di Biologia Vallisneri)

#### **2.2.6 Spettroscopia di massa**

Le misure sono state acquisite con Agilent 1200 HPLC accoppiato ad un Agilent 6120 quadrupolo singolo, con sistema di ionizzazione ESI (electrospray ionization). Come colonne sono state utilizzate Agilent EC-C18 ( $4\ \mu\text{m}$ ,  $4.6 \times 100\ \text{mm}$ ) e Phenomenex Jupiter 5u C4 300A ( $250 \times 4.60\ \text{mm}$  5u micron). Eluenti: A = 9:1  $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$ , 0.05 % TFA; B= 1:9  $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$ , 0.05 % TFA.

### **2.3 Sintesi di nanoparticelle di oro**

Per la sintesi dei nanosistemi oggetto di studio sono stati utilizzati sia il metodo basato sulla sintesi di Turkevich-Frens sia il metodo di Martin.

### 2.3.1 Sintesi metodo Turkevich

La sintesi di nanoparticelle di oro con metodo Turkevich prevede di partire da una soluzione acquosa contenente un sale d'oro: acido tetracloruro aurico (III) che viene ridotto utilizzando una soluzione di trisodio citrato (NaCt). La reazione viene svolta in un pallone posto su piastra riscaldante. La soluzione stock viene preparata aggiungendo a 100ml di acqua deionizzata (MΩ) 50 mg di  $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  (339.785 g/mol + 54.045 g/mol; 0.128 mmol).

Separatamente si preleva una quantità di citrato di sodio diidrato 4 volte molare in eccesso rispetto al sale d'oro ( $\text{NaCt} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) (258.06 g/mol + 36.03 g/mol; 0.5 mmol) e li si scioglie in 10 ml di acqua. La prima soluzione, contenente il sale di oro, viene portata ad ebollizione e, per evitare evaporazione, sopra al pallone viene posto un refrigerante a bolle. Una volta raggiunta la temperatura di ebollizione la soluzione di citrato di sodio viene aggiunta e il tutto lasciato in agitazione sotto refrigerante a bolle per 10 minuti; infine, quando la temperatura viene abbassata, l'abbattitore è rimosso e la soluzione lasciata in agitazione per altri 15 minuti. Inizialmente la soluzione si presenta di colore giallo a causa del sale d'oro; quando la reazione di riduzione inizia il colore passa prima a trasparente per poi diventare nero ed infine rosso.

Per la rimozione di sali derivanti dal sodio citrato viene utilizzata una colonna SEC G75: 8 g di resina vengono pesati e lasciati idratare overnight; la mattina seguente la soluzione viene travasata all'interno colonna e lasciata ad impaccare per 8 ore. La colonna è quindi pronta per essere utilizzata per la separazione e concentrazione delle nanoparticelle.

### 2.3.2 Sintesi metodo Martin

Anche la sintesi con metodo Martin prevede di partire da una soluzione in cui 50 mg di  $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  (339.785 g/mol + 54.045 g/mol; 0.128 mmol) vengono sciolti in 20 ml di acqua. Successivamente si preleva una quantità 10 volte molare in eccesso di sodio boro idruro ( $\text{NaBH}_4$ , 37.83 g/mol) e li si scioglie in 2 ml di acqua MΩ. La soluzione di oro viene posta sotto agitazione e il sodioboroidruro preparato fresco viene aggiunto goccia a goccia fino a esaurimento. Inizialmente la soluzione



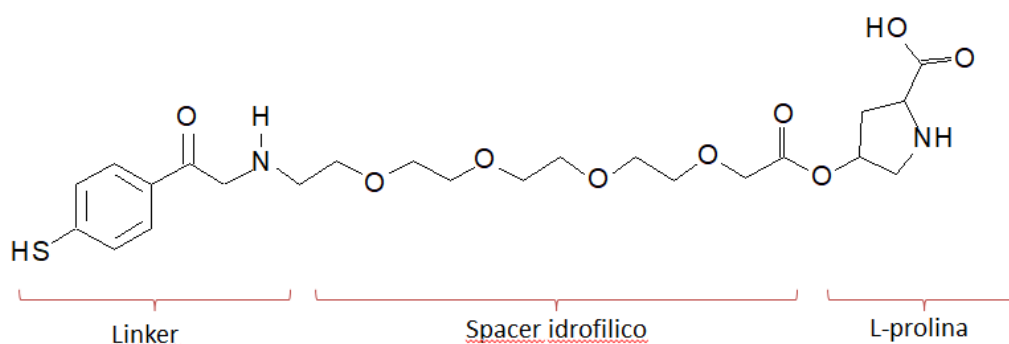
si presenta di colore giallo a causa del sale d'oro; quando la reazione di riduzione inizia il colore passa immediatamente a nero/rosso. La soluzione viene quindi lasciata in agitazione per almeno 30 minuti e controllata tramite spettroscopia UV per monitorare l'evoluzione della formazione delle nanoparticelle.

## 2.4 Sintesi di 4-[N-(tritylsulfenyl)benzoyl]-14-amino-3,6,9,12-tetraoxatetradecanoyl]-L-proline

Per la funzionalizzazione di un secondo pool di nanoparticelle è stata sintetizzata la molecola: 4-[N-(tritylsulfenyl)benzoyl]-14-amino-3,6,9,12 tetraoxatetradecanoyl]-L-proline (Figura 15).

Suddetta molecola è stata prodotta unendo 3 diverse porzioni:

- 1) Linker
- 2) Spacer idrofilico
- 3) L-prolina



[Figura 15] Schema del ligando anfifilico sintetizzato.

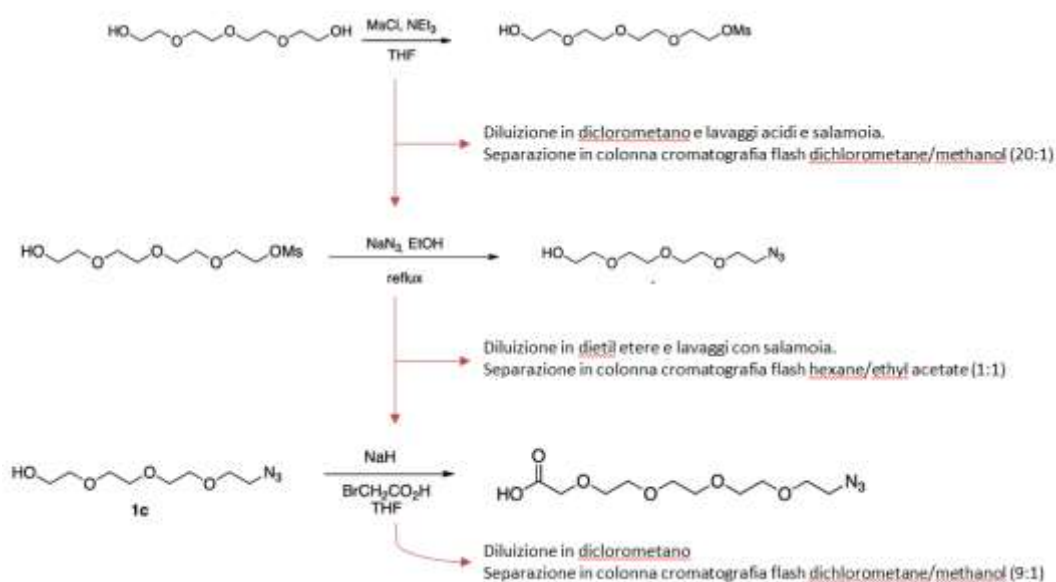
L'immobilizzazione della prolina su nanoparticelle può essere vista come una versione minimalista di un'aldolasi di tipo I; con la prolina che svolge il ruolo di sito attivo dell'enzima mentre il supporto d'oro che costituisce la struttura peptidica non direttamente coinvolta nell'attività catalitica. Dipendentemente dalla funzionalizzazione le AuNPs stabilizzate possono essere idrofobiche e precipitare in acqua. Pertanto nella funzionalizzazione si è inserito uno spaziatore anfifilico contenente sia una catena alchilica (per promuovere la reazione di scambio sulla

superficie della nanoparticelle) sia una parte idrofila derivata dal tetraetilenglicole per aumentare la solubilità del catalizzatore in acqua.

### 2.4.1 Sintesi 14-azido-3,6,9,12-tetraoxatetradecanoic acid

Seguendo lo schema sotto riportato si è sintetizzato lo spacer idrofilico. A una soluzione di 22,7 mL di tetraetilenglicole (MW: 194,22 g/mol, 140 mmol) e 15 mL Et<sub>3</sub>N in 100 mL THF a 0 °C vengono aggiunti goccia a goccia 10,8 mL di metansolfonilcloruro (MW: 114,55 g/mol, 140 mmol). La miscela di reazione è stata quindi riscaldata a temperatura ambiente e agitata vigorosamente per tutta la notte.

Il giorno successivo la miscela è diluita con 250 mL di CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> e lavata con soluzione acquosa NH<sub>4</sub>Cl (50 mL) e salamoia (20 mL). Il prodotto viene scaricato in una beuta, anidrificato con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>(s) e concentrato sotto vuoto per ottenere il prodotto grezzo. Il residuo oleoso è controllato mediante cromatografia su strato sottile eluendo con diclorometano/metanolo (20:1) per ottenere 2,95 g del composto mesilato come olio. Il processo è schematizzato in Figura 16.



[Figura 16] Schema sintesi spacer idrofilico.

Sinteticamente, 9,1 g del prodotto mesilato e 500 mg di sodio azide (MW: 65,01 g/mol) in 50 mL di etanolo vengono riscaldati e portati a riflusso per una notte,

quindi raffreddati a temperatura ambiente. Il prodotto è concentrato tramite evaporatore rotante sotto vuoto e il work-up viene effettuato con 70 mL di dietil etere e 20 mL di salamoia. La miscela organica viene scaricata in una beuta, anidrificata con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>(s) e concentrata sotto vuoto per ottenere il prodotto grezzo. Il prodotto viene controllato tramite eluendo con un gradiente di esano/etil acetato (1:1) per ottenere 1,2 g dell'azide come olio.

Nel terzo ed ultimo passaggio per la produzione dello spacer a una sospensione di NaH (781 mg, 32,58 mmol) in THF (26 mL) sotto argon, vengono aggiunti 1,2g dell'azide (5,47 mmol) sciolti in 27.5mL di THF e lasciati in agitazione per un'ora e mezza.

Una volta terminato il tempo la miscela viene addizionata goccia a goccia con una soluzione ottenuta sciogliendo 1,54 g di bromuro di acido acetico (MW: 141.30 g/mol; 9,20 mmol) in 27mL di THF e lasciata in agitazione per una notte.

La mattina seguente l'eccesso di NaH viene eliminato con una lenta aggiunta di acqua, il THF evaporato sotto vuoto e la miscela lavata con HCl 1M ed estratta con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Lo strato organico è stato essiccato su Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e il solvente evaporato. La miscela grezza è stata purificata mediante colonna flash (eluente CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH, 9:1) ottenendo 0.4 mg di prodotto oleoso.

#### **2.4.2 Sintesi di tert-Butyl N-tert-Butoxycarbonyl-4-hydroxy-L-proline**

A una soluzione di DIC (8,3 mL, 54,22 mmol) e ButOH (6,06 mL, 63,2 mmol), è stato aggiunto CuI (1,02 g, 5,4 mmol) e la miscela è stata agitata a temperatura ambiente sotto argon per 3 giorni. È stata quindi aggiunta una soluzione di N-Boc-4-idrossi-L-prolina (2,09 g, 9,03 mmol) in DCM secco (36 mL) e il tutto posto nuovamente in agitazione per altri 3 giorni. La reazione è stata diluita con DCM (40 mL), filtrata attraverso un filtro di Celite e portata a secco. Il residuo grezzo è stato sottoposto a purificazione in cromatografia flash (EtOAc/esano 2:1), ottenendo un estere tert-butilico intermedio come olio incolore (0,5 g).

### **2.4.3 Sintesi tert-Butyl 4-(14-azido-3,6,9,12-tetraoxa-tetradecanoyl)-N-Boc-L-proline**

In un pallone vengono inseriti 450 mg dello spacer idrofilico prodotto come descritto dal paragrafo 2.5.1 e 230 mg di diisopropilcarbodiimmide sciolti in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (20 mL). Successivamente viene addizionata una soluzione di 0.5 g di N-Boc-terBu-OH-idrossiprolina prodotta come da 2.5.2 e DMAP (cat., 20 mg) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (20 mL) e lasciata in agitazione per 6 ore.

Alla miscela viene fatto work-up con lavaggi acidi e salamoia. Lo strato organico viene poi essiccato su Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e il solvente evaporato. La miscela grezza è stata analizzata per rivelare eventuali impurezze o prodotti indesiderati mediante TLC (AcOEt : Hex, 4 : 1) ottenendo 900 mg di prodotto come olio giallo.

### **2.4.4 Sintesi linker: acido tritilsulfenimercaptobenzoico**

Ad una soluzione di acido mercaptobenzoico (0,5g, 3,2 mmol) e DIPEA (4,8 mL, 27,42 mmol) in acetonitrile (20 mL), viene aggiunto 1 g di trietil cloruro e la soluzione è posta in agitazione per 24 ore. Il solvente è stato evaporato ottenendo 0.9 g come solido bianco.

### **2.4.5 Sintesi tert-Butyl 4-[N-(11-tritilsulfenyl)mercaptobenzoyl]-14-amino-3,6,9,12-tetraoxatetradecanoyl]-N-Boc-L-proline**

Vengono preparate due soluzioni: la prima raggiunta sciogliendo 130 mg del prodotto ottenuto al punto 2.5.3 e 90 µL di DIPEA in 2,5 mL di DMF; la seconda preparata sciogliendo 108 mg di linker (0.274 mmol), 88,4mg di TBTU e 43,6 µL di DIPEA in 6 mL di DMF. In un pallone da 100 mL si aggiungono la seconda soluzione, 76 mg di HOAt e 135 mg di EDC\*HCl per attivare il gruppo carbossilico. Successivamente si aggiunge la prima soluzione (contenente l'ammina) e DIPEA per basificare. La reazione viene lasciata proseguire overnight e la mattina seguente il DMF viene eliminato tramite evaporatore rotante sotto vuoto. Il prodotto viene sciolto in acetato e si effettuano lavaggi basici e con salamoia. In ultimo lo strato organico viene essiccato con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e il solvente evaporato ottenendo 200 mg del prodotto di coupling.

### 2.4.6 Sintesi 4-[N-(11-mercaptoundecanoyl)-14-amino-3,6,9,12-tetraoxatetradecanoyl]-L-proline

L'ultimo step di preparazione della molecola con cui andremo a funzionalizzare le nanoparticelle che successivamente prepareremo è la deprotezione da:

1. il gruppo BOC su NH.
2. il ter-Butanolo su COOH della prolina.
3. il trifenil all'estremità dell'acido mercaptobenzoico.

Ad una soluzione del prodotto ottenuto in 2.4.5 (130 mg, 0,14 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (4 mL) sotto argon, sono stati aggiunti TFA (382 µL, 5,68 mmol) e TIS 64 µL. La miscela è lasciata in agitazione per 24 ore.

## 2.5 Sintesi in fase solida

La sintesi in fase solida di peptidi si basa sull'allungamento della sequenza amminoacidica mentre questa è ancorata a un supporto solido. Il vantaggio principale di questa tecnica è la facilità con cui è possibile rimuovere i reagenti e i solventi dal peptide senza dover adottare specifici accorgimenti o laboriose tecniche di purificazione. Il supporto solido è costituito da una resina, inerte e insolubile con una specifica funzionalizzazione che permette l'immobilizzazione della prima molecola sulla resina. Una volta che il primo aminoacido viene fissato sulla resina tramite il gruppo carbossilico la sequenza peptidica viene allungata linearmente verso l'N-terminale alternando reazioni di N-deprotezione e coupling amminoacidico.

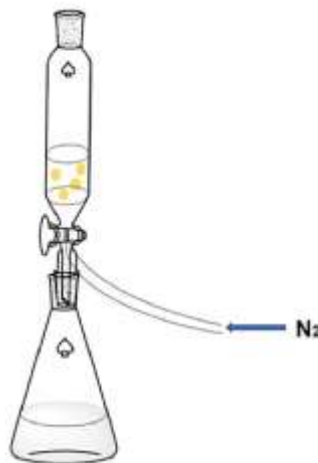
I gruppi protettori utilizzati in questo esperimento sono:

1. il gruppo Boc per proteggere la funzione amminica della prolina
2. il gruppo Fmoc per proteggere il gruppo amminico della cisteina
3. il gruppo tritile per proteggere lo zolfo della cisteina<sup>(42)</sup>.

L'intero processo si svolge in un piccolo reattore, Figura 17, con due uscite; una per il flusso di solventi e una per il flusso di azoto. Ogni passaggio deve essere sottoposto a flusso di azoto per garantire una miscelazione continua.

Sinteticamente, 3 grammi della resina 2-clorotritil vengono rigonfiati utilizzando 15 mL di DMF. Il legame tra la resina e la cisteina viene realizzato preparando una soluzione con 2,46 g (corrispondenti a 3 equivalenti molari del loading della resina) di Fmoc-Cys(Trt)-OH e 2.15 mL di N,N-diisopropiletilammina (DIPEA) in 35 mL di DMF.

La reazione viene lasciata andare per 1 ora. Dopo aver lavato con DMF nel reattore viene immessa una soluzione contenente DCM, MeOH e DIPEA (80:15:5) per saturare tutti i siti della resina che non

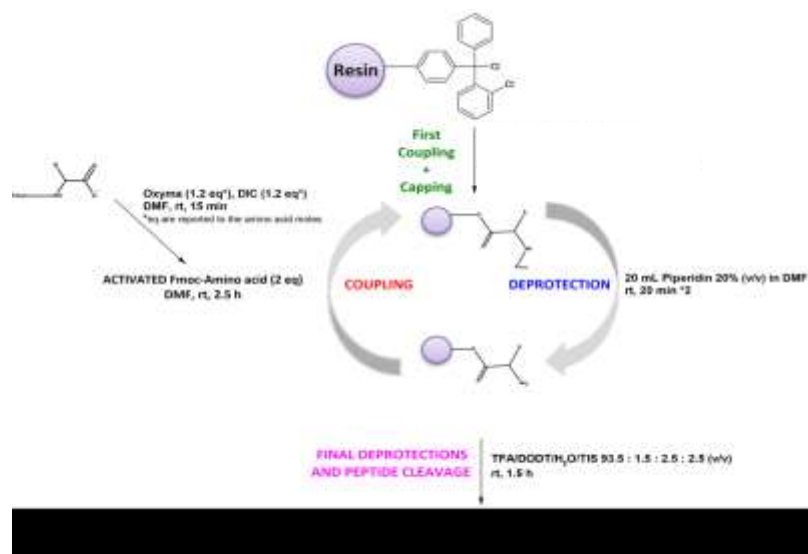


**[Figura 17] Reattore utilizzato per la sintesi del dipeptide.**

abbiano reagito con la cisteina. Si lascia agitare sotto flusso di azoto per 20 minuti. La resina viene lavata tre volte con DCM e poi tre volte con DMF.

Si esegue successivamente fase di deprotezione della cisteina rimuovendo il gruppo temporaneo (t) Fmoc. Nel reattore viene aggiunta una soluzione di PIP al 20% in DMF per 20 minuti; dopo questo tempo si effettua un lavaggio con DMF e si ripete il processo con PIP. La resina viene lavata sia con DMF che DCM finiti i quali si procede alla fase di coupling.

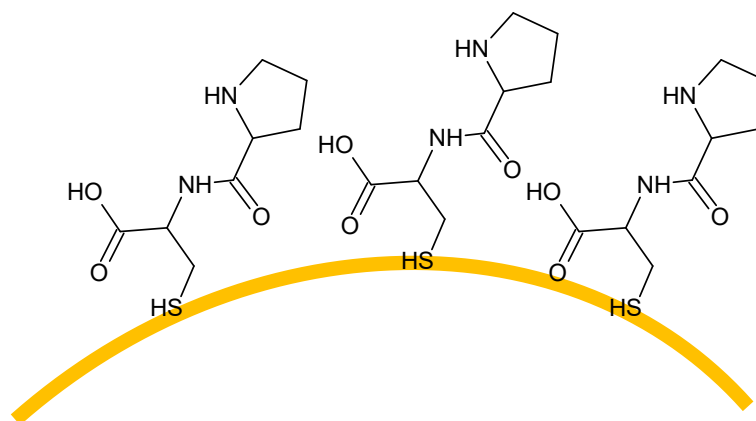
Si prepara una soluzione contenente 1.93 g di Boc-Pro-OH, 1.27g di Oxima Pure e 1.66 mL di DIC, in un volume di 20 mL di DMF. L'accoppiamento viene effettuato nell'arco di 1 ora sotto un flusso continuo di azoto. Successivamente la resina viene lavata con DMF e poi con DCM per asciugare la resina e rimuovere il DMF. L'ultimo passaggio consiste nel distacco del peptide dalla resina. Nel reattore si aggiunge una soluzione contenente DCM ed esafluoroisopropanolo (7:3) e si lascia agitare per 1 ora. Questa procedura viene ripetuta una seconda volta per assicurare la massima resa possibile; al termine del passaggio la resina viene scaricata in un pallone ed essiccata per ottenere il prodotto solido (Figura 18). Abbiamo ottenuto 1.2 g di prodotto.



[Figura 18] Schema generale di SPPS. Gli aminoacidi vengono introdotti nel seguente ordine: Fmoc-Cys(trt)-OH, Boc-Pro.

Analizzando il prodotto ottenuto in TLC (eluente DCM:EtOH 90:10) notiamo che la condensazione ha dato luogo solo al prodotto di interesse e non si osserva la presenza di altri sottoprodotti. È quindi possibile saltare il passaggio di purificazione su flash cromatografia che sarebbe altrimenti richiesto. Il prodotto viene raccolto in un pallone a fondo tondo ed essiccato con rotavapor.

La deprotezione dei due residui avviene contemporaneamente, con una soluzione contenente TFA, DCM e TIS. La deprotezione dal gruppo tritil viene eseguita lavando la soluzione con acqua, poiché il peptide è solubile in acqua, mentre il Trt non lo è. Alla fine del processo si sono ottenuti 450 mg di prodotto, che sono stati utilizzati per decorare le AuNPs (Figura 19).



[Figura 19] Funzionalizzazione NPs con dipeptide Cys-Pro.

## 3 RISULTATI E CONCLUSIONI

---

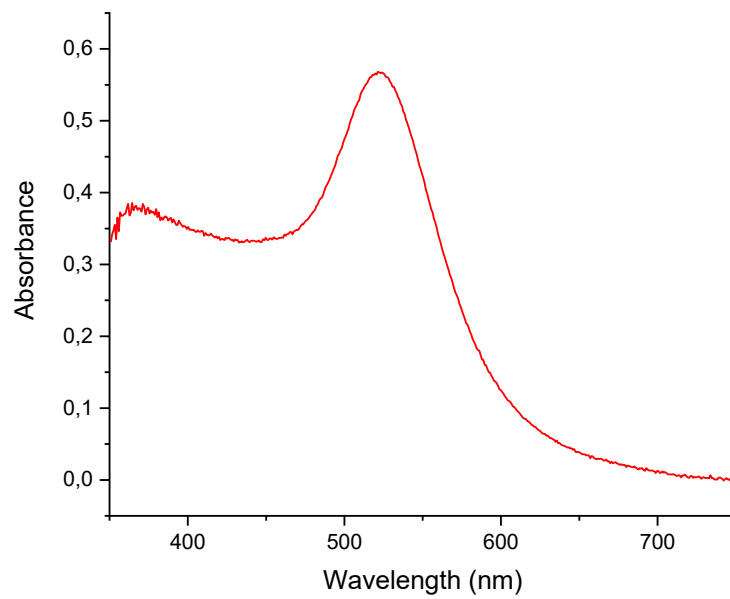
Come già anticipato l'obiettivo finale di questo progetto è quello di sintetizzare nanosistemi con diversi tipi di funzionalizzazione in grado di catalizzare reazioni di condensazione aldolica. Il vantaggio di tale tecnologia consiste nel comprendere in un unico oggetto sia i vantaggi forniti dall'avere un sistema basato su nanoparticelle, utili per la fase di recupero del catalizzatore oltre che per alcuni tipi di reazione, e la catalisi adoperata da funzionalizzazioni già collaudate ed efficienti. Una volta sintetizzati i diversi sistemi sono stati confrontati per capire quale presentasse le migliori caratteristiche e capacità catalitiche.

### 3.1 Sintesi delle AuNPs

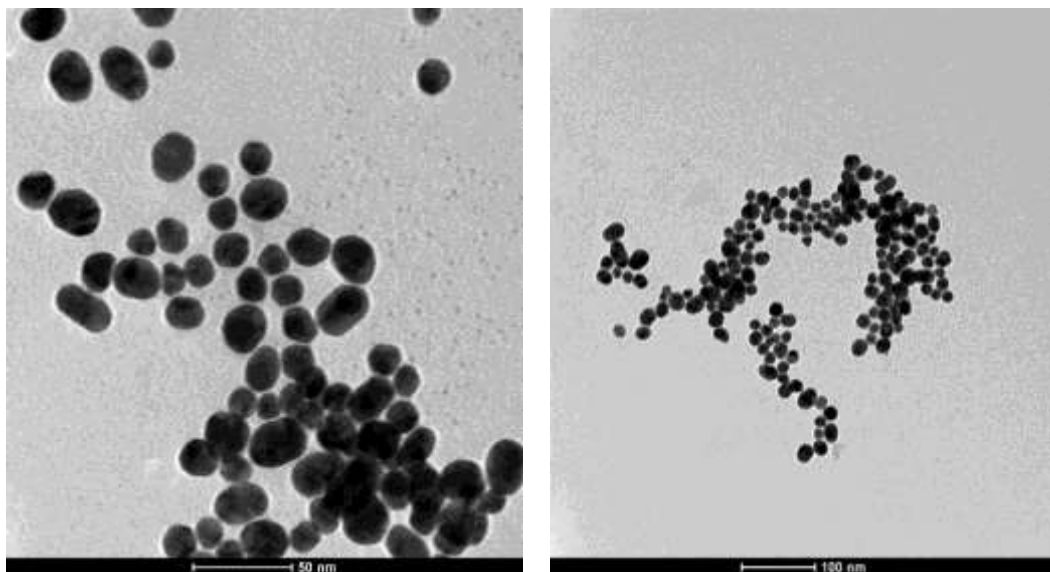
Tutti e tre i sistemi prodotti utilizzano come struttura core delle nanoparticelle ottenute tramite sintesi utilizzando il metodo Turkevich-Frens o Martin. La formazione di queste nanoparticelle è stata caratterizzata tramite analisi allo spettrofotometro UV-VIS e tramite immagini ricavate al TEM.

Nello spettro UV-VIS in Figura 20 è possibile osservare un massimo di assorbimento intorno a 520 nm. L'intensità e la posizione del picco corrispondente all'oscillazione plasmonica di superficie variano in funzione di diversi parametri. In questo caso la forma simmetrica e stretta del picco indica una soluzione colloidale in un cui le nanoparticelle hanno forma sferica e dimensione monodispersa; ovvero i cluster di oggetti dispersi hanno all'incirca uguale dimensione e forma. Questa ipotesi ci viene confermata dalle immagini raccolte al TEM riportate in Figura 21. Guardando alla scala è possibile misurare il diametro delle nanoparticelle, che si aggira intorno ai 15-20nm. La forma di queste NPs è per la maggior parte sferica e per i nostri esperimenti continueremo a considerare la popolazione come unicamente sferoidale.



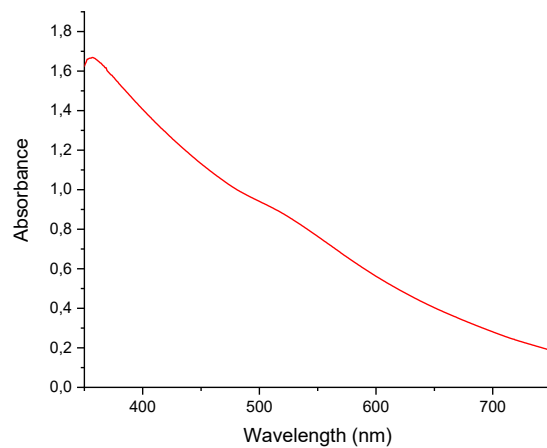


**[Figura 20] Spettro UV-Vis soluzione nanoparticelle preparata con metodo Turkevich-Frens.**



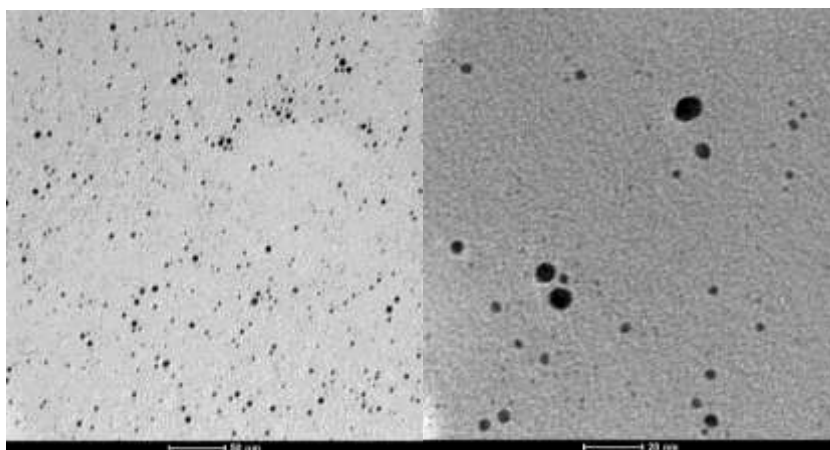
**[Figura 21] Immagini al TEM della soluzione di nanoparticelle con sintesi Turkevich.**

Le nanoparticelle ottenute invece tramite metodo Martin mostrano dati diversi riportati in Figura 22:



**[Figura 22] Spettro UV-VIS soluzione nanoparticelle preparata con metodo Martin.**

Lo spettro UV-VIS che otteniamo è ben diverso da quello osservato per le nanoparticelle precedentemente ottenute. Il picco relativo alla banda plasmonica di assorbimento non è più chiaramente visibile alla lunghezza di 520 nm come lo era nello spettro in Figura 20. Il picco relativo alla banda plasmonica delle nanoparticelle è nascosto dall'assorbimento di oro ancora presente in soluzione; si nota comunque una variazione dell'assorbimento a 520 nanometri dove lo spettro assume un punto di flesso dovuto appunto alle nanoparticelle presenti in soluzione. La presenza delle nanoparticelle ci viene confermata dalle immagini TEM (figura 23); queste sono in media 3 volte più piccole rispetto a quelle sintetizzate in precedenza e raggiungono dimensioni medie intorno di 5 nanometri di diametro.

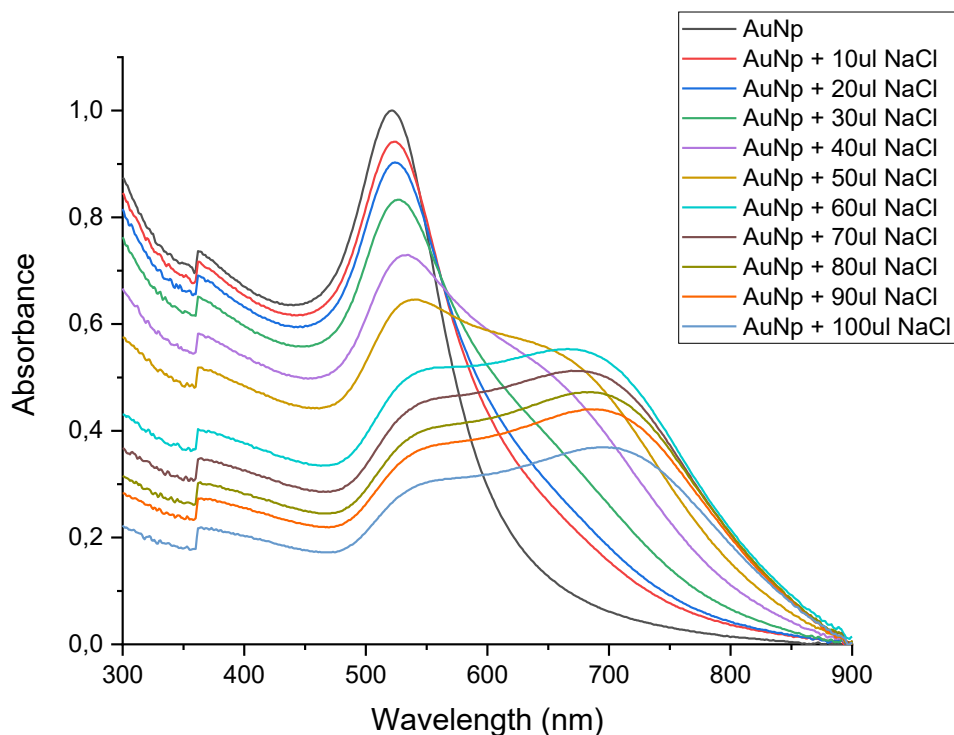


**[Figura 23] Immagini TEM della soluzione di nanoparticelle preparata con sintesi Martin.**

### 3.1.1 Stabilità nanoparticelle

AuNPs sintetizzate con metodo Turkevich sono state saggiate per verificarne la stabilità in condizioni di forza ionica crescente.

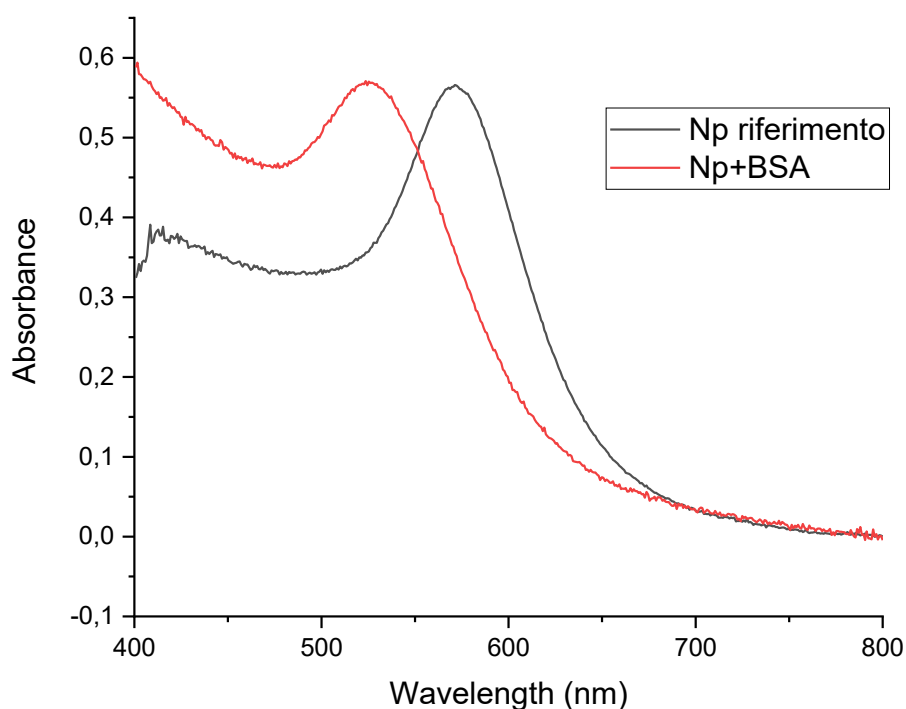
In genere, le nanoparticelle all'aumentare di pH e forza ionica aggregano e precipitano. L'aggregazione e la precipitazione delle nanoparticelle è otticamente visibile poiché la soluzione cambia gradualmente colore a causa dell'accoppiamento plasmonico, passando dal rosso al viola. Il picco plasmonico tipico delle nanoparticelle stabilizzate, a 520 nm, in caso di aggregazione presenta un ampio red-shift; questo fenomeno è dovuto alle interazioni degli anioni citrato con i cationi  $\text{Na}^+$  in soluzione, che portano i sistemi ad aggregare. L'esperimento è riportato in Figura 24 mostra chiaramente come aggiunte successive di una soluzione di NaCl 10mM influiscano sull'aggregazione del nanosistema, come dimostra il red-shift della banda plasmonica.



[Figura 24] Stabilità AuNPs “naked”.

## 3.2 Nanoparticelle di oro funzionalizzate con BSA

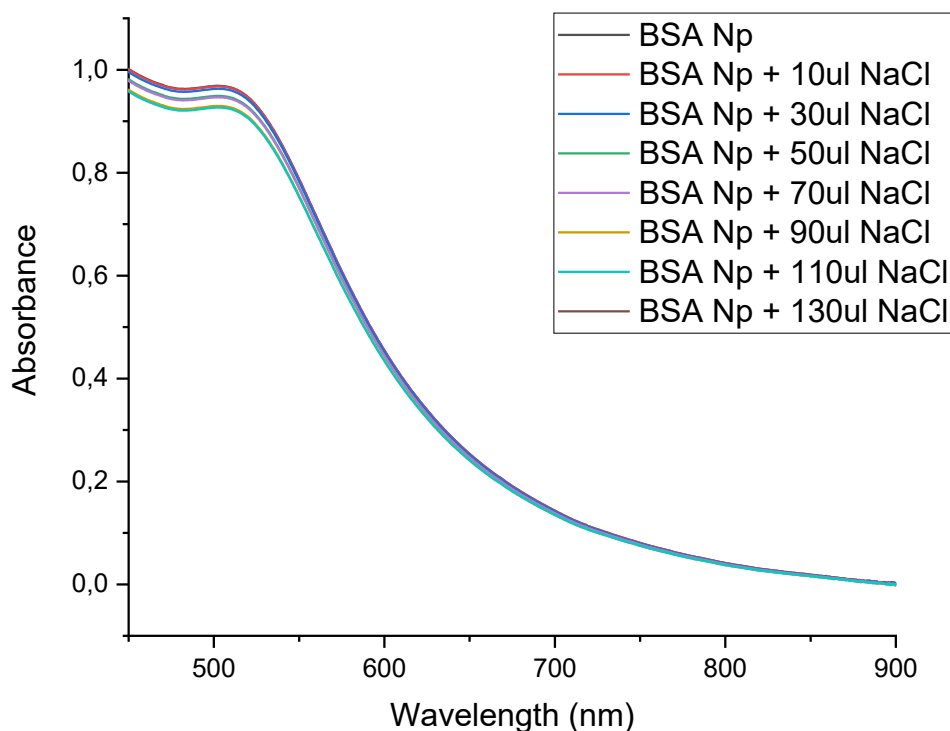
Una volta preparata la soluzione con le AuNPs funzionalizzate si è registrato lo spettro UV-VIS (Figura 25) per verificare se ci fosse qualche informazione relativa all'avvenuta formazione della corona:



**[Figura 25] Confronto fra spettro UV-Vis soluzione NP partenza e funzionalizzate con BSA.**

Dallo spettro in Figura 25 si nota come la nuova preparazione di nanoparticelle funzionalizzata con la Albumina Siero Bovina modifichi il suo spettro di assorbimento shiftando verso il blu di circa 50 nm. Questo shift ci conferma la presenza della BSA sulla superficie della nanoparticella come protein corona.

L'importanza della corona di proteine sta nel fatto che essa può alterare le proprietà fisiche, chimiche e biologiche delle nanoparticelle. Ad esempio la stabilità delle nanoparticelle in un ambiente biologico può venire alterata influenzando la loro aggregazione, sedimentazione e comportamento in generale. Per comprendere meglio l'effetto del protein corona sulla stabilità delle nanoparticelle, l'esperimento per verificare la stabilità delle nanoparticelle, già effettuato sul pool di partenza, è stato nuovamente effettuato sulle nuove AuNPs.

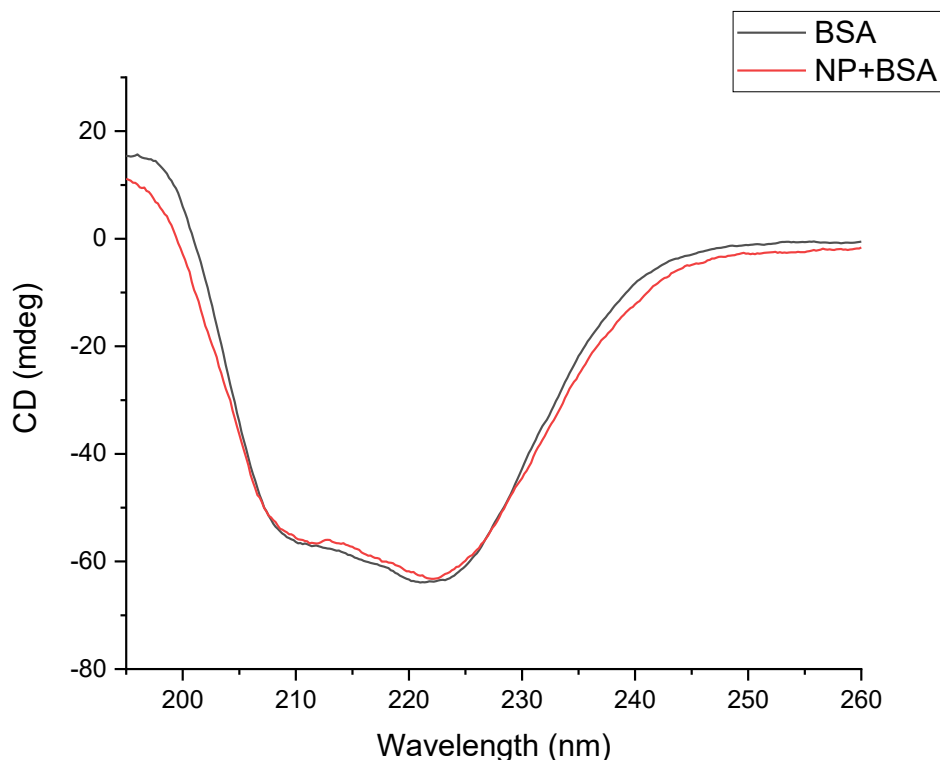


**[Figura 26] Stabilità delle nanoparticelle di oro funzionalizzate con BSA.**

Come si può notare dalla Figura 26, nonostante l'aumento della forza ionica, non si osserva alcun cambiamento nella banda di risonanza plasmonica. Pertanto, l'adsorbimento della BSA sulla superficie delle nanoparticelle aumenta la stabilità della soluzione colloidale anche quando la concentrazione di sale aumenta. Questo rappresenta un grande vantaggio per un sistema a livello industriale poiché permette di svolgere reazioni chimiche e processi in ambienti meno finemente controllati dato che si dispone di un range di stabilità più ampio all'interno del quale il sistema non collassa. La spettroscopia di dicroismo circolare permette di analizzare la chiralità delle biomolecole attraverso la loro attività ottica. Il risultato è uno spettro dato dalla differenza di assorbimento della luce polarizzata circolarmente a destra e a sinistra. In questo caso la tecnica viene utilizzata per studiare il ripiegamento delle proteine; solamente nel caso in cui la proteina montata in superficie mantenga la struttura tridimensionale la BSA potrà agire da catalizzatore per la reazione di condensazione aldolica.

Dallo spettro CD identifichiamo sono due bande di assorbimento all'estremo UV: una transizione forte  $\pi \rightarrow \pi^*$  a 190 nm e una transizione più debole e ampia  $n \rightarrow \pi^*$  nell'intervallo 210-220 nm<sup>(43)</sup>.

Per la BSA nativa i due picchi negativi a 210 e 222 nm sono caratteristici della struttura  $\alpha$ -elica della proteina. Lo spettro tipico della BSA libera in soluzione è quello in nero indicato nell'immagine seguente (Figura 27) mentre il grafico rosso rappresenta lo spettro di assorbimento del sistema nanoparticella funzionalizzata BSA.



**[Figura 27] Confronto dello spettro di dicroismo circolare della BSA libera e legate alla nanoparticella.**

Un eventuale differenza nella forma degli spettri ci informerebbe della differenza tra i due campioni. Dagli spettri CD in Figura 27 si può osservare che le curve relative alla BSA (nero) e NP-BSA (rosso) sono sovrapponibili. Per valutare la conservazione dell'elica è possibile utilizzare il parametro R, che indica il rapporto dell'ellitticità molare tra i due massimi negativi.

**[Tabella 1]**

Campione	$\theta_{208}$	$\theta_{222}$	$R = \theta_{222}/\theta_{208}$
BSA	-52,94	-63,71	1.20
NP-BSA	-52,30	-63,21	1.21

Quando R assume valori intorno a 1 la struttura è un' $\alpha$ -elica mentre  $R \gg 1$  indicano la presenza di aggregati<sup>(44)</sup>. In base al valore R calcolato per i due campioni possiamo dire che la proteina una volta che viene adsorbita sulla superficie della nanoparticella mantiene la struttura terziaria presente in forma libera ed è quindi funzionante per eseguire i processi di catalisi enzimatica da noi desiderati.

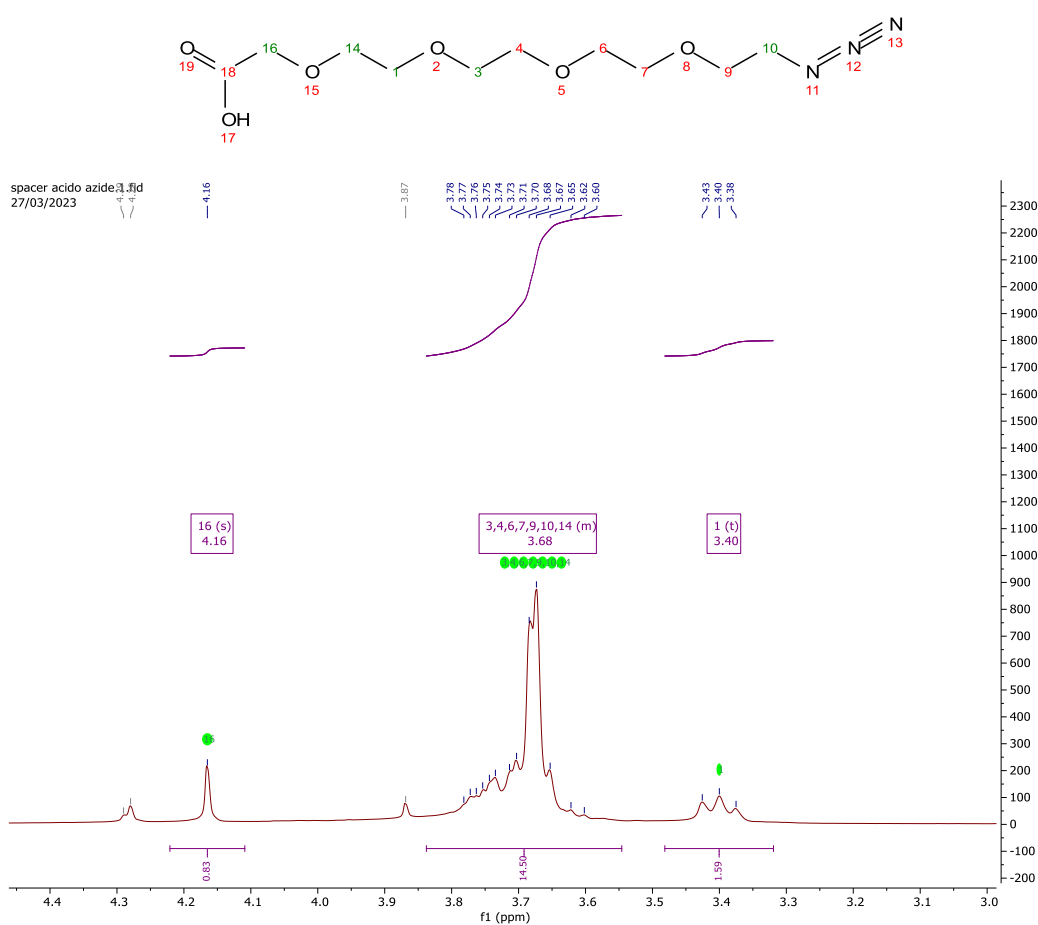
### **3.3 Nanoparticelle di oro funzionalizzate con 4-[N-(11-mercaptobenzoil)-14-amino-3,6,9,12-tetraoxatetradecanoil]-L-prolina**

La realizzazione di questo secondo nanosistema è stata seguita durante la produzione della molecola tramite NMR dei vari intermedi di sintesi. La molecola finale è stata ottenuta tramite coupling dei 3 subcomponenti principali:

- l'acido 14-azido-3,6,9,12-tetraossatetradecanoico
- il tert-Butyl N-tert-Butossilcarbonil-4-idrossi-L-prolina
- l'acido 4-tritilmercaptobenzoico

### 3.3.1 Spacer idrofilico: Acido 14-azido-3,6,9,12-tetraossatetradecanoico

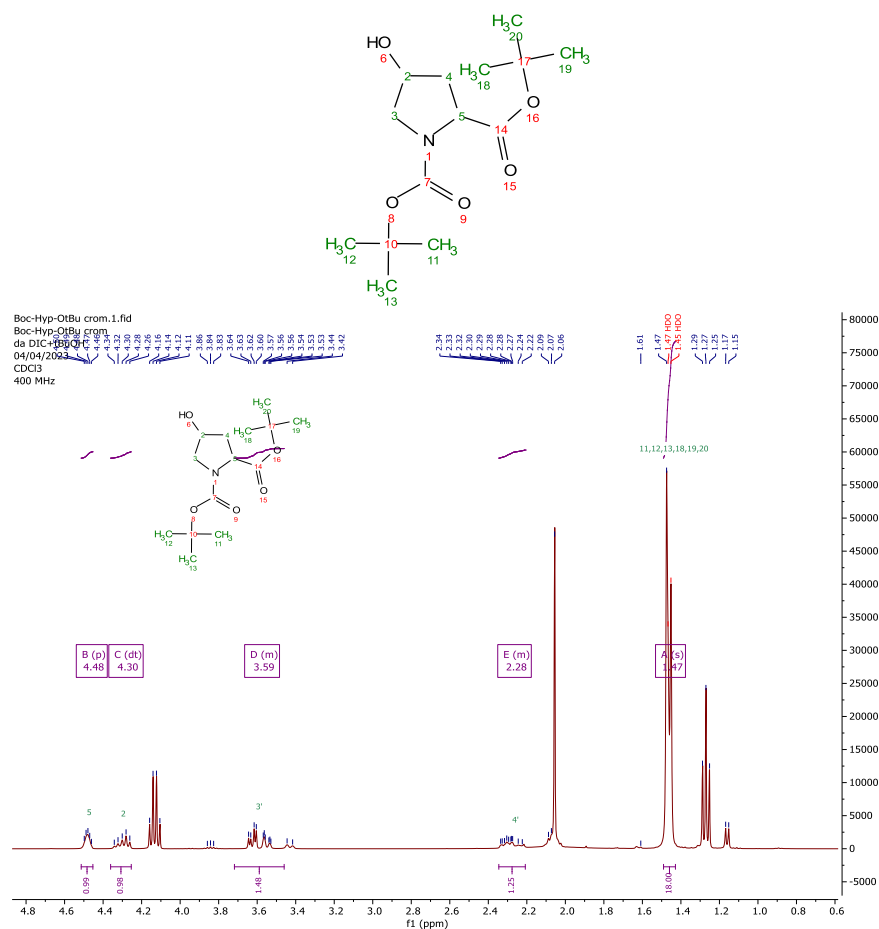
Lo spacer idrofilico costituito dall'acido 14-azido-3,6,9,12-tetraossatetradecanoico viene caratterizzato tramite spettroscopia NMR. In Figura 28 è riportato lo spettro  $^1\text{H-NMR}$  in cui l'assegnazione dei picchi è stata facilitata dalla predizione dello spettro NMR della molecola effettuato dal software MestreNova. I risultati riportati mostrano bene tutti i 18 idrogeni presenti all'interno della catena carboniosa dello spacer.



[Figura 28]  $^1\text{H-NMR}$  (200 MHz, Chloroform-d)  $\delta$  4.16 (s, 2H), 3.84 – 3.55 (m, 14H), 3.40 (t,  $J = 5.0$  Hz, 2H).



### 3.3.2 Boc-prolina-(estere tertbutilico)

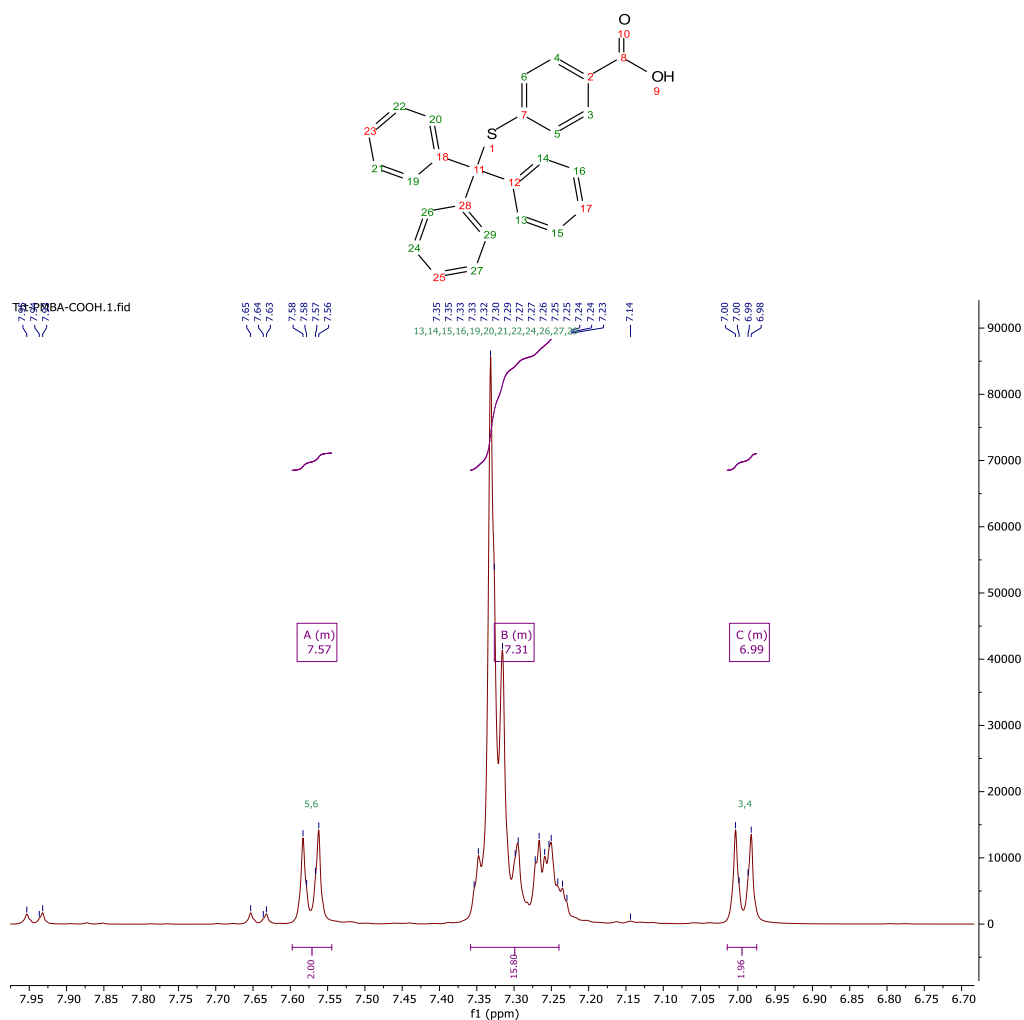


[Figura 29]  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, Chloroform-d)  $\delta$  4.48 (p,  $J = 3.6$  Hz, 1H), 4.30 (dt,  $J = 15.7, 7.7$  Hz, 1H), 3.72 – 3.46 (m, 2H), 2.35 – 2.21 (m, 2H), 1.47 (s, 18H).

La sintesi della prolina avente entrambi i gruppi NH protetti ha richiesto due successivi passaggi che complessivamente impiega 6 giorni di reazione; alla fine di questi il prodotto ottenuto è stato analizzato tramite NMR per valutarne la bontà (Figura 29). Nel grafico si notano molto bene a 1.47 ppm i 18 idrogeni relativi ai 2 gruppi tert-butil legati alla prolina. L'assegnazione dei segnali è resa difficoltosa dalla loro sovrapposizione, inoltre, anche il valore delle aree dei picchi, che è correlato al numero di protoni che li generano, non è preciso e non corrisponde esattamente al valore atteso per la molecola in esame. Riteniamo comunque il risultato soddisfacente per stabilire che il prodotto ottenuto sia quello di interesse.

### 3.3.3 Linker: Acido 4-tritilmercaptobenzoico

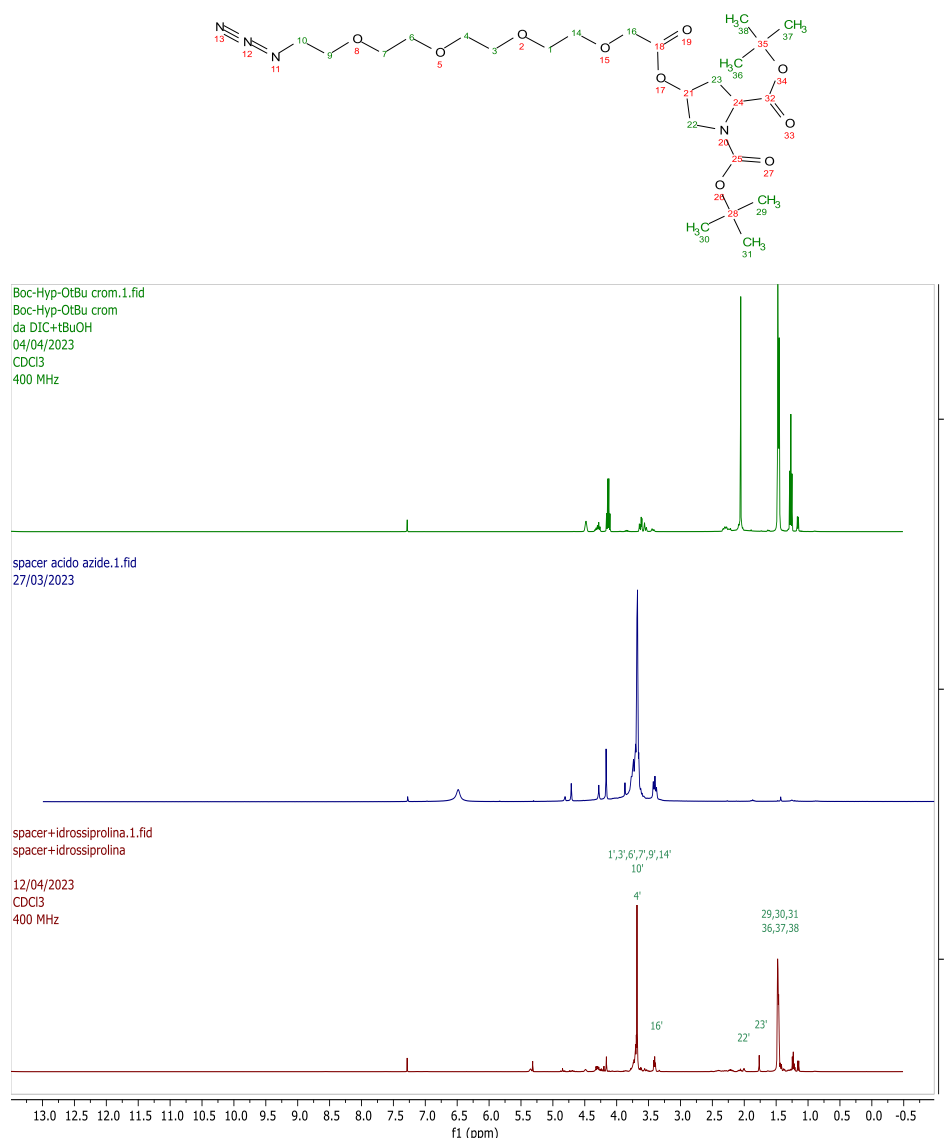
La porzione del linker è stata ottenuta a partire dall'acido *para*-mercaptobenzoico protetto all'estremità –SH con tritile.



[Figura 30] <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 7.60 – 7.54 (m, 2H), 7.36 – 7.24 (m, 15H), 7.01 – 6.97 (m, 2H).

L'NMR in Figura 30 relativo al prodotto mostra sia i 15 idrogeni appartenenti ai 3 anelli aromatici del gruppo protettore tritile tra 7.36 e 7.24ppm mentre i due doppietti a 7.6 e 7 ppm appartengono alle due coppie rigide e splittate dei protoni del pMBA.

### 3.3.4 Coupling fra spacer e idrossiprolina



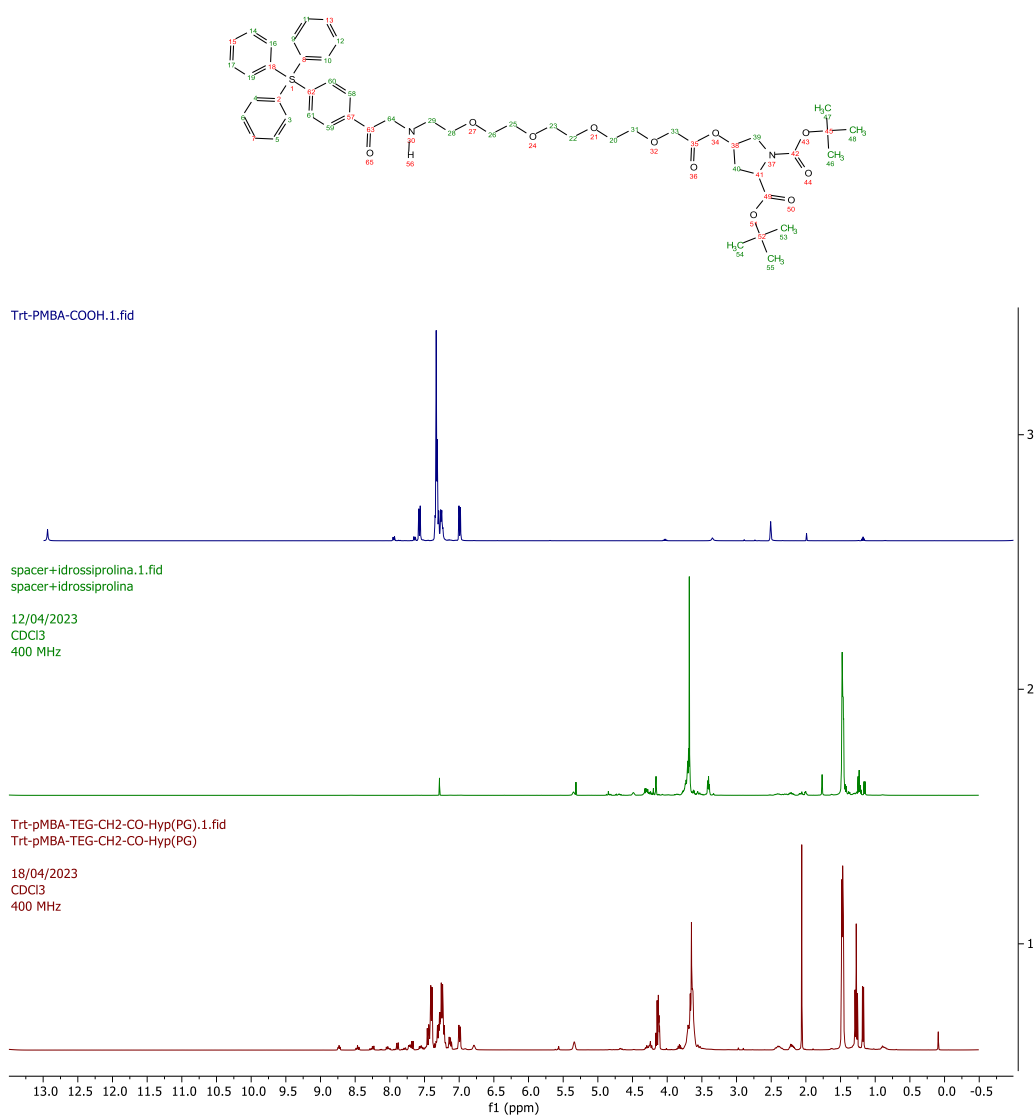
[Figura 31] Allineamento spettri NMR dei reagenti e prodotto di coupling.

Negli spettri <sup>1</sup>H-NMR sopra riportati (Figura 31) vengono allineati i segnali relativi ai reagenti della reazione di coupling (in verde l'idrossiprolina e in blu lo spacer idrofobico) e il prodotto descritto dallo spettro in rosso. Lo stacking di questi spettri mette in risalto come il risultato della reazione conservi tutte le caratteristiche degli spettri dei reagenti di partenza:

- 18H a 1.4ppm relativi ai 6C dei gruppi tert-butil
- 18H della catena carboniosa dello spacer idrofilico
- 6H dell'anello della prolina

### 3.3.5 Prodotto finale

Nell'ultima fase di coupling il prodotto precedentemente ottenuto diventa substrato per una nuova reazione di coupling al linker. Lo spettro NMR sotto riportato (Figura 32) mostra l'allineamento di reagenti (verde e blu) e del prodotto in rosso evidenzia molto bene come le caratteristiche del primo prodotto di coupling vengano integrate con una nuova porzione di molecola che riconosciamo dai 15H a 7.5-7.0ppm relativi al gruppo tritil del linker.

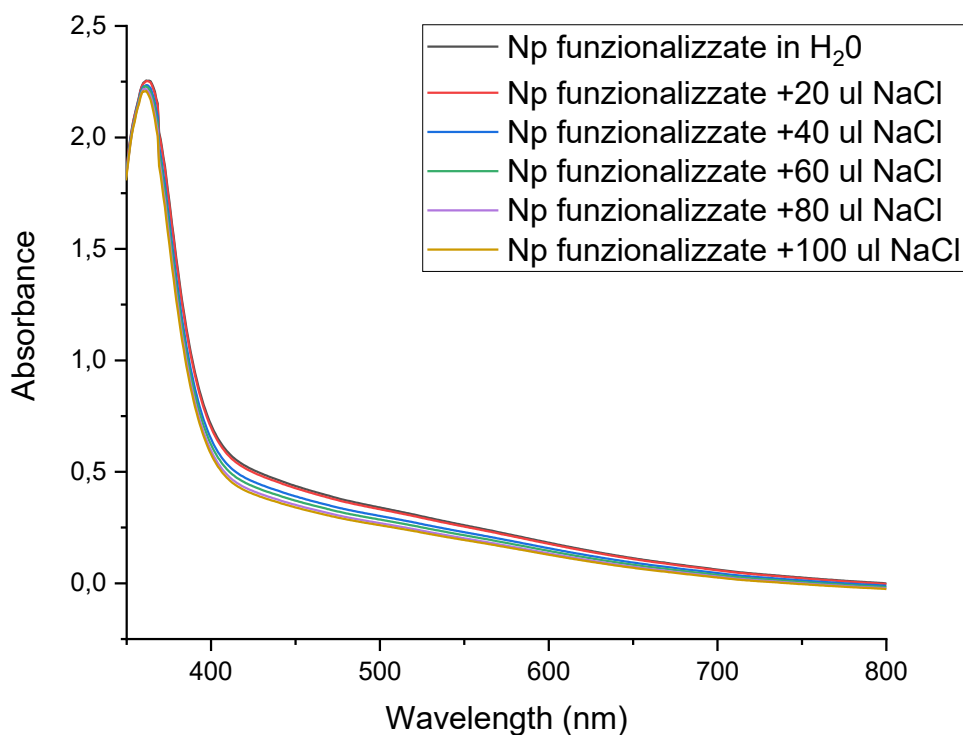


[Figura 32] Allineamento spettri NMR di reagenti e prodotto.

### 3.4 Stabilità del sistema nanoparticella 4-[N-(11-mercaptbenzoyl)-14-amino-3,6,9,12-tetraoxatetradecanoyl]-L-proline

Il sistema è stato testato per verificare se la funzionalizzazione anche in questo caso, come per le nanoparticelle ricoperte di BSA, garantisca alterate e vantaggiose proprietà per quanto riguarda la stabilità del sistema a concentrazioni saline crescenti.

La soluzione di nanoparticelle è stata saggiata tramite aggiunte progressive della preparazione di NaCl 10 mM. L'analisi allo spettro UV porta allo spettro UV-VIS in Figura 33:

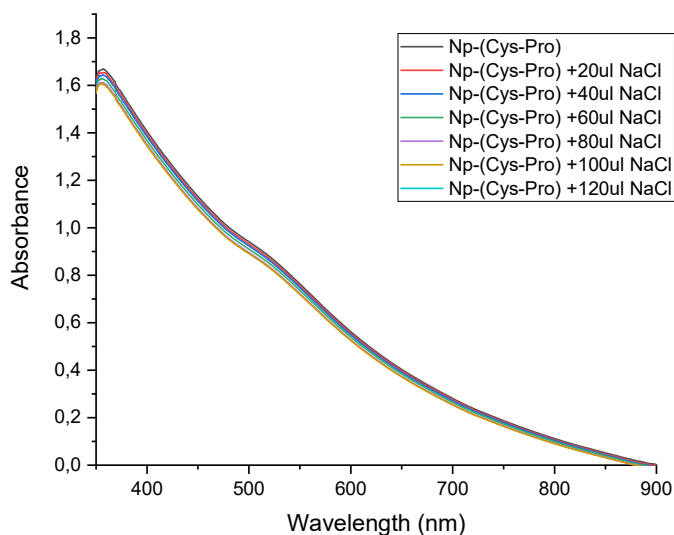


[Figura 33] Analisi stabilità allo spettro UV-Vis soluzione nanoparticelle.

Lo spettro registrato ci conferma come la presenza di una funzionalizzazione protegga il sistema dalla forza ionica della soluzione aumentando la stabilità e impedendo l'agglomerazione e collasso dello stesso.

### 3.5 Nanoparticelle di oro funzionalizzate con dipeptide

Dopo la sintesi del sistema nanoparticella di oro funzionalizzato con il dipeptide cisteina-prolina viene studiata la stabilità del nanosistema:



**[Figura 34] Spettro UV-Vis stabilità nanoparticelle funzionalizzate con dipeptide.**

Anche in questo caso lo spettro in Figura 34, come nei due sistemi precedenti, ci conferma come la presenza di uno strato di funzionalizzazione sulla parte più esterna della nanoparticella impedisca agli ioni sale presenti in soluzione di interagire con le molecole stabilizzanti il core della particella e causarne la precipitazione.

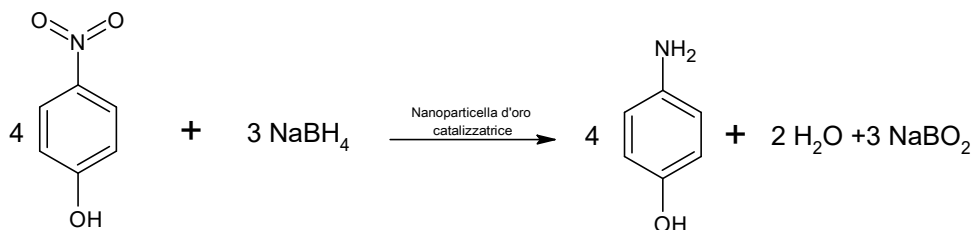
## 3.6 Catalisi delle reazioni

Gli esperimenti svolti mirano a valutare la capacità delle nanoparticelle funzionalizzate di svolgere due tipi di reazioni:

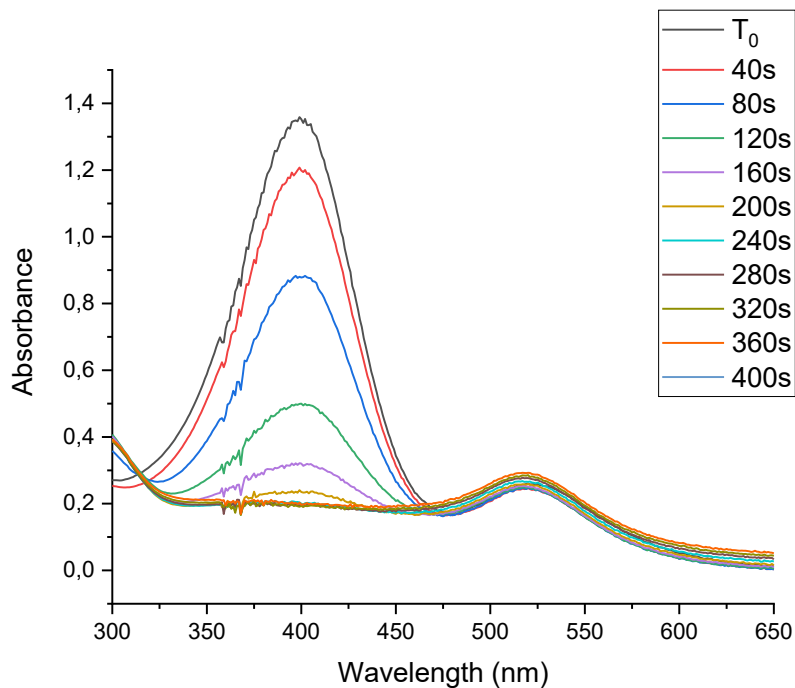
- Riduzione del gruppo fenolo
- Reazioni di condensazione aldolica

### 3.6.1 Riduzione gruppo fenolo

La riduzione del p-nitrofenolo (4-NP) con  $\text{NaBH}_4$  è stata utilizzata per valutare l'attività catalitica delle soluzioni colloidali di oro supportate. Il processo di riduzione è stato monitorato mediante spettrofotometria UV-VIS. Negli spettri l'assorbimento a 400 nm corrisponde al 4-NP (il reagente), mentre l'assorbimento all'estremità sinistra dello spettro (300 nm) corrisponde al p-amminofenolo (4-AP): il prodotto della reazione di riduzione. In assenza di catalizzatore la reazione non procede e non si ha alterazione della concentrazione del substrato (dati non mostrati). La Figura 36 illustra la variazione di assorbanza a 400 e 300 nm in presenza di nanoparticelle di oro. La soluzione  $1.4 \cdot 10^{-4}$  di paranitrofenolo viene fatta reagire con le NP di oro che attivano la reazione e convertono il reagente nel corrispettivo prodotto ridotto come si evince dal calo dell'assorbanza a 400 nm e il concomitante aumento di quella a 300 nm. Poiché la quantità di  $\text{NaBH}_4$  (agente riducente) è notevolmente superiore a quella richiesta dalla stechiometria, la reazione segue una cinetica di pseudo primo ordine verso il 4-NP.



[Figura 35] Stechiometria della reazione di riduzione 4-NP.

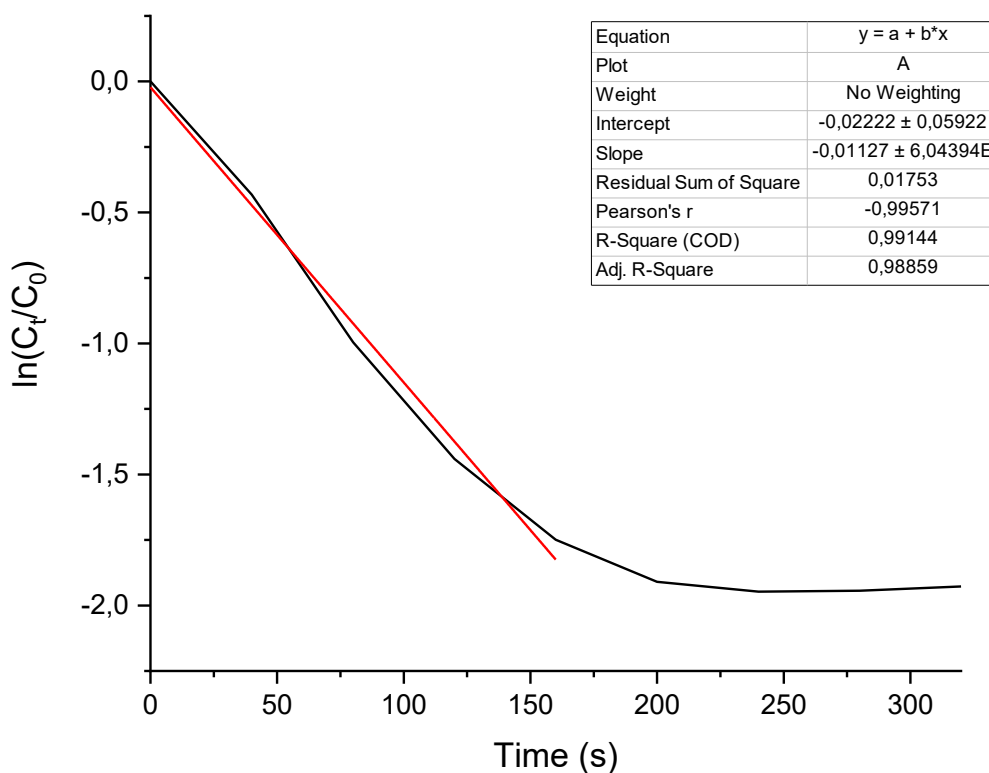


**[Figura 36] Time-course dello spettro UV-Vis della riduzione del 4-NP utilizzando una soluzione colloidale di oro come catalizzatore.**

La Figura 37 mostra il grafico del  $\ln(C_t/C_0)$  rispetto al tempo di reazione della reazione di riduzione del 4-NP catalizzata dalle nanoparticelle.

Il coefficiente lineare derivato dall'interpolazione dei dati mostra un valore superiore a 0,99, suggerendo che la riduzione catalitica del 4-NP segua una cinetica di pseudo primo ordine. L'interpolazione è stata effettuata su un tempo di reazione di 150 secondi poiché, dopo questo tempo di reazione, il substrato risulta completamente consumato e l'utilizzo di dati oltre questo punto falserebbe l'analisi dei precedenti (Figura 36 e 37).



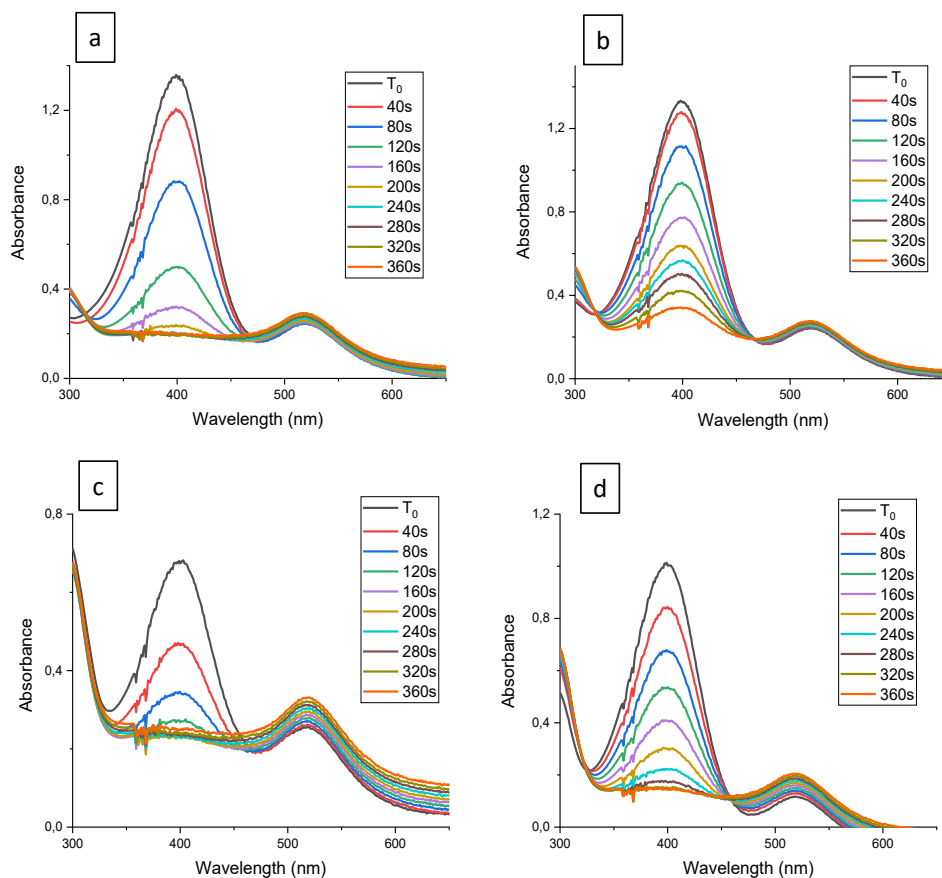


**[Figura 37] Grafico del  $\ln(C_t/C_0)$  rispetto al tempo di reazione per le AuNPs.**

Successivamente si è voluta investigare la capacità delle nanoparticelle di catalizzare la stessa reazione, riduzione del paranitrofenolo in amminofenolo, tramite cicli successivi di reazione. L'esperimento è stato preparato esattamente come quello appena analizzato ma dopo il primo ciclo reazione della durata di 6 minuti la concentrazione del substrato è ristabilita. Il processo è stato ripetuto 4 volte al fine di valutare la capacità catalitica della nanoparticelle su 4 cicli e i dati di ciascuna reazione sono stati raccolti tramite spettro UV-VIS.

Nella Figura 38 sotto riportata sono riportati gli spettro UV-VIS relativi alle 4 reazioni:

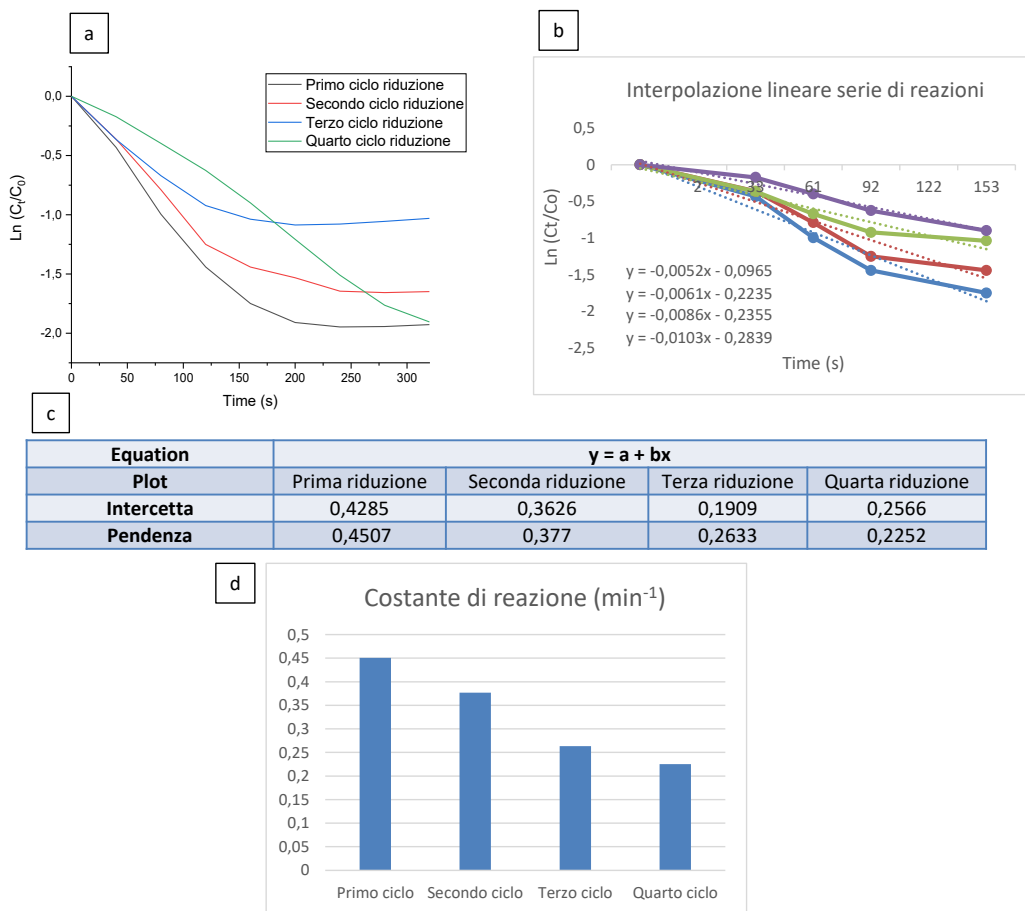
- a) Primo ciclo di reazione.
- b) Secondo ciclo di reazione.
- c) Terzo ciclo di reazione.
- d) Quarto ciclo di reazione.



**[Figura 38] Spettri-UV dei 4 cicli di riduzione paranitrofenolo.**

Osservando i grafici in Figura 38 risulta chiaro come l'attività delle nanoparticelle venga mantenuta durante l'intero svolgimento dell'esperimento; anche al quarto ciclo di reazione una volta che il substrato viene reintegrato nel sistema la catalisi procede convertendo tutto il 4-paranitrofenolo nel corrispettivo prodotto ridotto con tempistiche simili al primo ciclo di reazione. Una volta accertato che le particelle rimanessero attive nel corso delle reazioni ci si è interrogati quantitativamente sull'effettivo mantenimento della capacità catalitica e della costante di reazione.

Un'elaborazione sul rapporto  $\ln(C_t/C_0)$  rispetto al tempo è stata effettuata per tutti i cicli di reazione e successivamente i risultati riportati nella tabella e grafico sottostanti.



[Figura 39]

- Grafico  $\text{Ln}(C_t/C_0)$  rispetto al tempo per i vari cicli di reazione.
- Grafico interpolazione lineare dati.
- Tabella dati di interpolazione lineare.
- Grafico costante di reazione.

Anche in questo caso l'interpolazione è stata effettuata solo sui primi 150 secondi di reazione; prima che l'esaurimento del substrato alterasse i dati<sup>(45)</sup>.

Nonostante la reazione continui a svolgersi nel corso dell'esperimento si nota, (Figura 39d) come la costante di reazione (determinata grazie alle pendenze del grafico 39b) diminuisca di ciclo in ciclo.

Il valore della costante di reazione passa infatti da un massimo di  $0,45 \text{ min}^{-1}$  nel primo ciclo a un minimo di  $0,22 \text{ min}^{-1}$  nel quarto.

### 3.6.2 Reazione di condensazione aldolica

Analogamente ad alcune aldolasi anche la albumina siero bovina e la prolina sono in grado di catalizzare reazioni aldoliche asimmetriche dirette tra due diversi composti carbonilici per ottenere prodotti aldolici con rese ed enantioselettività eccellenti. La reazione aldolica è tra le più importanti reazioni di formazione del legame carbonio-carbonio e coinvolge una molecola con funzione aldeidica e una molecola chetonica. Come già precedentemente descritto l'utilizzo di catalizzatori chirali quali prolina e BSA rappresenta una vantaggiosa risorsa in quanto poco costose e comodamente ottenibili. Gli svantaggi dell'uso di questi, sebbene siano facilmente reperibili, sta' nella grande quantità che è necessaria per svolgere reazione di condensazione e la mancanza in letteratura di un modo per riciclarli e separarli dai prodotti.

Si è anzitutto verificato che i catalizzatori fossero effettivamente in grado di convertire i substrati nei prodotti desiderati: come reagente aldeidico e chetonico si sono utilizzati 4-nitrobenzaldeide e il cicloesano.

Con riferimento agli spettri  $^1\text{H-NMR}$  dei due prodotti (syn e anti) riportati in letteratura (figura 40) abbiamo deciso di replicare l'esperimento.

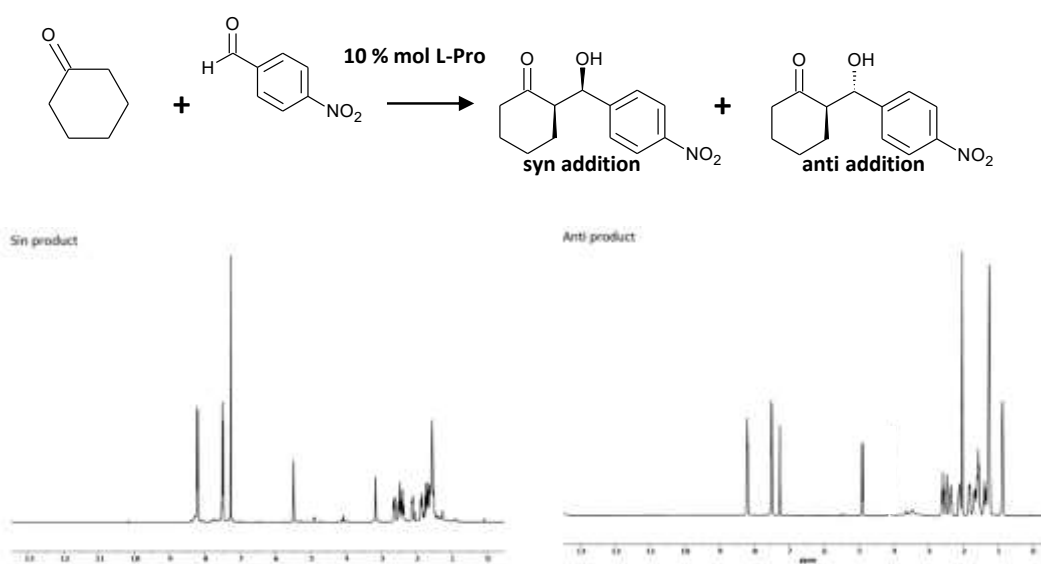
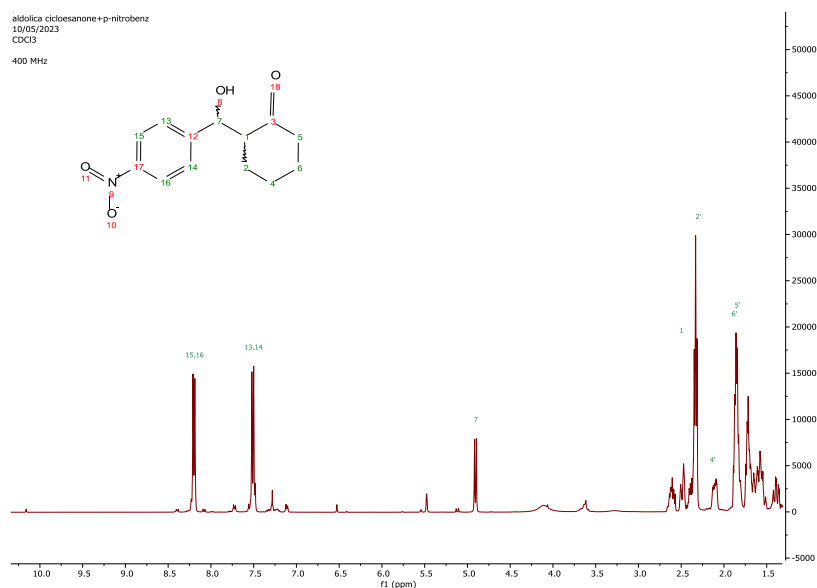


Figura 40 Spettri NMR dei prodotti syn e anti da letteratura.

Al termine della procedura il prodotto della condensazione della 4-nitrobenzaldeide e cicloesano catalizzato da prolina è stato separato mediante cromatografia flash e caratterizzato mediante spettroscopia NMR (Figura 41). Il rapporto nella formazione dei prodotti anti/syn è stata maggiore del 95% con una conversione quantitativa. Si riporta lo spettro NMR del prodotto ottenuto nell'isomero anti.



[Figura 41]  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, Chloroform- $d$ )  $\delta$  8.28 – 8.15 (m, 2H), 7.50 (dd,  $J = 8.8, 7.1$  Hz, 2H), 4.91 (d,  $J = 8.3$  Hz, 1H), 2.49 (ddt,  $J = 13.8, 4.5, 2.3$  Hz, 1H), 2.35 – 1.75 (m, 8H).

Asserita la capacità di ottenere il prodotto di interesse siamo andati a valutare la capacità di ogni singolo sistema da noi preparato di convertire i substrati (aldeide e chetone) nei corrispondenti prodotti di addizione syn/anti.



[Figura 42] Reazioni di condensazione aldolica da testare.

Nel primo esperimento effettuato si è testata la capacità del sistema controllo AuNPs-(Cys-Pro) di catalizzare la reazione. La reazione è monitorata mediante analisi HPLC, utilizzando colonna C18 con il seguente gradiente:

[Tabella 2]

Time (min)	%B
0	10
9	100
11	100
12	10

In queste condizioni il tempo di ritenzione della 4-nitrobenzaldeide è 7.789 minuti mentre il cicloesano non è visibile nell'HPLC. Successivamente è stato condotto l'esperimento di catalisi nelle stesse condizioni riportate in letteratura per la prolina, ma in soluzione acquosa. La reazione è stata monitorata con HPLC dopo 6, 24, 48 ore producendo i risultati in Figura 43A.

Nei cromatogrammi ripostati in Figura 43 A, si può notare come con il passare delle ore il picco relativo al substrato 4-nitrobenzaldeide vada progressivamente a ridursi fino a sparire dopo un tempo di 48 ore. In contemporanea alla scomparsa del primo picco vi è la crescita di un secondo picco HPLC con un tempo di ritenzione pari a 8.227 minuti, relativo al prodotto di addizione anti. In aggiunta dopo 48 ore è possibile notare la presenza di un terzo picco HPLC, di poco separato rispetto a quello del prodotto maggioritario appena descritto, con  $t_r = 8.499$  minuti attribuito al prodotto disteroisomerico syn.



**Figura 43**

- A. HPLC dopo 6, 24, 48 ore della reazione catalizzata da AuNP-(Cys-Pro).**
- B. HPLC dopo 6, 24, 48 ore della reazione catalizzata da AuNP-(BSA)**
- C. HPLC dopo 48 ore della reazione catalizzata da AuNP-(ligando sintetizzato).**

Grazie al calcolo delle aree sottese ai picchi è possibile stimare l'eccesso disteroisomerico di una forma rispetto all'altra; utilizzando la formula:

$$\frac{Area_1 - Area_2}{Area_1 + Area_2} \cdot 100 = de\%$$

Inserendo i dati forniteci dall'HPLC si determina un de percentuale pari al 64%.

Con un secondo esperimento si è preso in considerazione il sistema **AuNPs-(BSA)**. Anche in questo caso la reazione che si è analizzata è quella di condensazione aldolica fra 4-nitrobenzaldeide e cicloesano. Utilizzando lo stesso gradiente ricordiamo dal primo esperimento che il picco con  $t_r$  7.789 minuti corrisponde all'aldeide substrato. I grafici HPLC Figura 43 B sono stati raccolti anche in questo caso dopo un tempo di 6, 24 e 48 ore. Dopo 48 ore il sistema riesce a convertire quasi completamente il substrato nei 2 prodotti enantiomerici; nell'ultimo grafico il picco a 7.489 è infatti portato a 0.

Riusciamo immediatamente ad identificare i due picchi relativi alle due forme dell'aldolo prodotto a  $t_r$  8.293 e 8.493 minuti che sono in rapporto simile (quasi 1:1). Nonostante qualitativamente si noti già l'assenza di un prodotto significativo diastereomericamente arricchito calcoliamo comunque la %de utilizzando la formula precedentemente riportata e i dati forniti dall'HPLC. L'equazione conferma una %de del 13%; risultato poco indicativo di una reazione chirale favorita. Vi è anche da segnalare la presenza di un quarto picco nelle HPLC registrate dopo 24 e 48 ore con tempo di ritenzione 5.722 minuti: questo  $t_r$  da HPLC svolte in precedenza (non riportate) corrisponde alla BSA libera in soluzione. Presumibilmente l'agitazione del sistema, necessaria per favorire la reazione, stressa eccessivamente l'interazione fra l'enzima e nanoparticella determinando il distacco di una frazione sul totale della proteina adsorbita che viene immessa in soluzione e rilevata in fase di analisi. Nella terza e ultima fase di sperimentazione si è testato il nanosistema **AuNPs-(ligando sintetizzato)**. I risultati sono stati raccolti con HPLC utilizzando una colonna C18 con il seguente gradiente:

[Tabella 3]

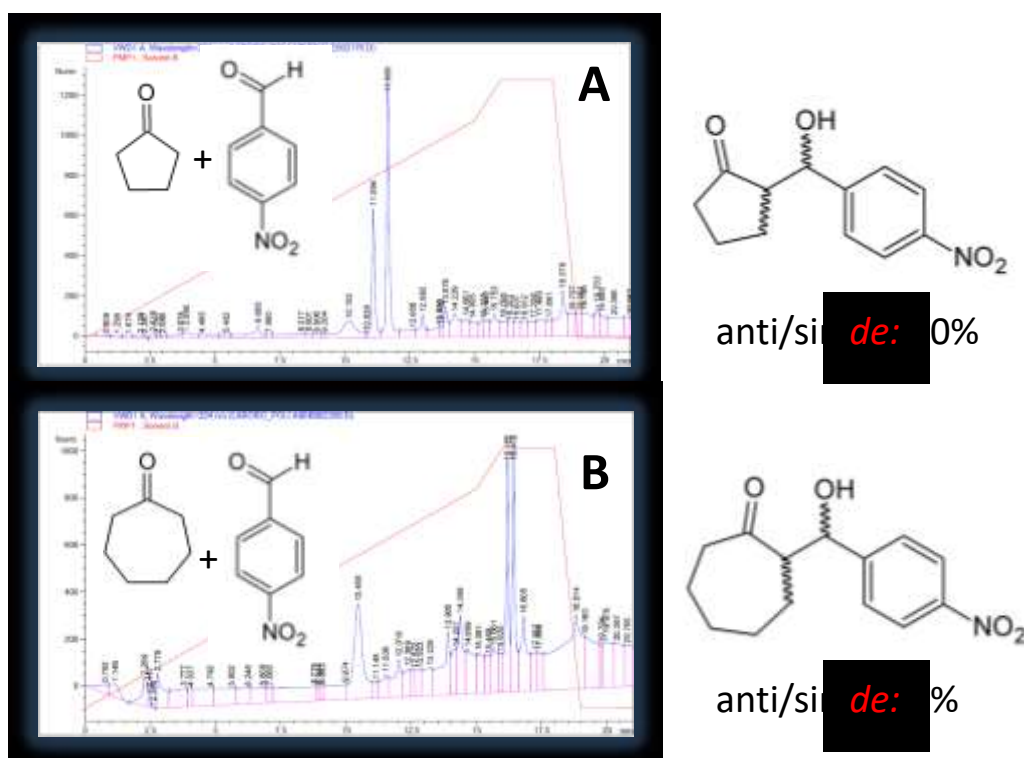
Time (min)	%B
0	10
15	80
16	100
18	100
19	10

Data la variazione del gradiente è stato necessario effettuare un nuovo test per identificare il nuovo  $t_r$  del substrato, il nuovo tempo di ritenzione per la 4-



nitrobenzaldeide ora è di 10.868 minuti. La reazione monitorata dopo 48 ore (Figura 43 C) utilizzando i dati forniti dall'HPLC risulta in un de% del 45% a favore dell'isomero anti.

Ulteriori studi sono stati effettuati utilizzando sempre il nanocatalizzatore **AuNPs-(ligando sintetizzato)** riguardo la capacità del sistema di catalizzare la reazione di condensazione tra la 4-nitrobenzaldeide e due diversi substrati chetonici ciclici quali: ciclopentanone e cicloeptanone. Tutte le reazioni sono state effettuate utilizzando 6 mg di AuNPs-(ligando sintetizzato) in rapporto con le stesse quantità molari dei vari substrati; i dati sono stati raccolti dopo 48 ore di reazione (Figura 44 A-B). Tutte e due le reazioni consumano la più parte del substrato aldeidico portando alla formazione dei due prodotti distereoisomerici. Notiamo però che concomitantemente all'aumento della catena carboniosa della porzione ciclica del chetone diminuisce il rapporto de e la percentuale di substrato convertito a parità di tempo di reazione.



[Figura 44]

- A. HPLC dopo 48 della reazioni con ciclopentanone come substrato
- B. HPLC dopo 48 della reazioni con cicloeptanone come substrato



## 4 CONCLUSIONI

---

Negli ultimi 20 anni il campo delle nanotecnologie e della nanocatalisi si è rapidamente espanso da quando è stato riconosciuto il potenziale nanoparticelle di oro. Studi accademici e industriali mirano a risolvere e sfruttare quei meccanismi ancora incerti ma che ragionevolmente rappresentano valide alternative e innovazioni nel campo di lavoro. Molti di questi catalizzatori sono attivi, selettivi e duraturi in condizioni blande e dipendono dall'interazione tra le nanoparticelle e la relativa funzionalizzazione.

Seguendo gli obiettivi del nostro progetto siamo riusciti a sintetizzare tre diversi nanosistemi in grado di svolgere attività catalitica in acqua per la formazione di un legame C-C e per la riduzione del gruppo nitro aromatico.

Coniugare in un unico sistema questi due tipi di catalisi genera un prodotto interessante sia da un punto di vista chimico che in ottica di applicazioni a processi su larga scala dove recupero del catalizzatore e sprechi rappresentano una grande barriera nella produzione di molecole di interesse.

Sfruttando la capacità intrinseca delle nanoparticelle d'oro di catalizzare reazioni di riduzione abbiamo ottimizzato la capacità da parte dei nostri nanosistemi di convertire il paranitrofenolo in 4-aminofenolo tramite una catalisi riduttiva utilizzando un blando riducente: l' $\text{NaBH}_4$ . La reazione è stata inoltre testata per processi ciclici dimostrando il mantenimento delle capacità catalitiche nonostante vi sia una modesta perdita percentuale di parte dell'attività ad ogni iter ripetuto.

In una seconda fase di sperimentazione si è testata la capacità delle funzionalizzazioni chirali di catalizzare reazioni di condensazione aldolica che producessero prodotti diastereomericamente arricchiti.

Facendo riferimento al lavoro di Domenico C. M. Albanese e Nicoletta Gaggero si è sfruttata la capacità di una tasca idrofobica della BSA di agire da catalizzatore per questo tipo di reazioni. Il sistema risulta effettivamente attivo portando alla completa conversione del substrato nei prodotti di interesse; non altrettanto efficiente è risultato tuttavia il processo di diastereoselezione (punto cardine dell'utilizzo di catalizzatori chirali per svolgere la reazione). Inoltre durante il processo l'agitazione della soluzione provoca stress al sistema con perdita di parte

della proteina adsorbita sulla superficie della nanoparticella liberandola in soluzione e perdendo così i vantaggi, forniti dalle nanoparticelle, nella fase di recupero del catalizzatore.

Gli ulteriori nanosistemi realizzati durante questo periodo di tirocinio sfruttano la prolina come catalizzatore chirale per la reazione di condensazione aldolica mimando il meccanismo di un'aldolasi di tipo I con intermedio ad enammina. Un primo sistema è stato realizzato tramite sintesi di peptidi in fase solida che, una volta purificati, sono stati impiegati nella funzionalizzazione. Il secondo invece è stato realizzato tramite ancoraggio di un ligando tiolo-anfifilico con prolina sulla superficie della nanoparticella d'oro. Entrambi i nanocatalizzatori sono altamente attivi in ambiente acquoso per la reazione aldolica diretta di tipo enamminico; è richiesta infatti solo una ridotta quantità di nanoparticelle per ottenere il prodotto desiderato in resa quantitativa e, cosa importante, con una diastereoselettività elevata. È stata inoltre verificata la capacità del sistema AuNPs-(ligando sintetizzato) di catalizzare la reazione utilizzando substrati chetonici alternativi; il sistema risulta efficiente nella conversione dei reagenti nei prodotti di interesse anche se non presenta una selezione verso una delle due forme diastereoisomeriche.

## 5 BIBLIOGRAFIA

---

1. Sanchez Florence and Konstantin Sobolev. «Nanotechnology in concrete – A review». *Construction and Building Materials* 24, (2010): 2060–71. <https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2010.03.014>.
2. Hulla J.E., Sahu S.C. and Hayes A.W. «Nanotechnology: History and future». *Human and Experimental Toxicology* 34, (2015) 1318–1321. <https://journals.sagepub.com/doi/full/10.1177/0960327115603588>.
3. Bhushan Bharat. «Introduction to Nanotechnology». In *Springer Handbook of Nanotechnology*, (2017). [https://doi.org/10.1007/978-3-662-54357-3\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-662-54357-3_1).
4. Robert S. Averback. «Introduction to Nanotechnology». *Physics Today* 1 57, (2004): 62–63. <https://doi.org/10.1063/1.1809098>.
5. Khan A., Rashid R., Murtaza G. and Zahra. A. «Gold nanoparticles: Synthesis and applications in drug delivery». *Trop. J. Pharm. Res.* 13, (2014): 1169–1177. <https://doi.org/10.4314/tjpr.v13i7.23>.
6. Sperling Ralph, Pilar Rivera Gil, Feng Zhang, Marco Zanella and Wolfgang J. Parak. «Biological Applications of Gold Nanoparticles». *Chemical Society Reviews* 37, (2008): 1896–1908. <https://doi.org/10.1039/B712170A>.
7. Abbas Manzar, Hepi Hari Susapto and Charlotte A. E. Hauser. «Synthesis and Organization of Gold-Peptide Nanoparticles for Catalytic Activities». *ACS Omega* 7, (2022): 2082–90. <https://doi.org/10.1021/acsomega.1c05546>.
8. Masse Florence, Pascale Desjardins, Mathieu Ouellette, Camille Couture, Mahmoud Mohamed Omar, Vincent Pernet, Sylvain Guérin and Elodie Boisselier. «Synthesis of Ultrastable Gold Nanoparticles as a New Drug Delivery System». *Molecules* 24, (2019): 2929. <https://doi.org/10.3390/molecules24162929>.
9. Ogarev, V. A., V. M. Rudoi, e O. V. Dement'eva. «Gold Nanoparticles: Synthesis, Optical Properties, and Application». *Inorganic Materials: Applied Research* 9, (2018): 134–40. <https://doi.org/10.1134/S2075113318010197>.

10. Wozniak Anna and Malankowska Anna. «Size and shape-dependent cytotoxicity profile of gold nanoparticles for biomedical applications. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*». *J.Mater. Sci. Mater. Med.* 28, (2017): 92. <https://doi.org/10.1007/s10856-017-5902-y>.
11. Dong Jiaqi, Paul L. Carpinone, Georgios Pyrgiotakis, Philip Demokritou and Brij M. Moudgil. «Synthesis of Precision Gold Nanoparticles Using Turkevich Method». *KONA Powder and Particle Journal* 37, (2020): 224–32. <https://doi.org/10.14356/kona.2020011>.
12. Grys David-Benjamin, Bart de Nijs, Andrew R. Salmon, Junyang Huang, Wenting Wang, Wei-Hsin Chen, Oren A. Scherman and Jeremy J. Baumberg. «Citrate Coordination and Bridging of Gold Nanoparticles: The Role of Gold Adatoms in AuNP Aging». *ACS Nano* 14, (2020): 8689–96. <https://doi.org/10.1021/acsnano.0c03050>.
13. Kimling J., M. Maier, B. Okenve, V. Kotaidis, H. Ballot and A. Plech. «Turkevich Method for Gold Nanoparticle Synthesis Revisited». *The Journal of Physical Chemistry B* 110, (2006): 15700–707. <https://doi.org/10.1021/jp061667w>.
14. Herizchi Roya, Elham Abbasi, Morteza Milani and Abolfazl Akbarzadeh. «Current methods for synthesis of gold nanoparticles». *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology* 44, (2016): 596–602. <https://doi.org/10.3109/21691401.2014.971807>.
15. Jamkhande Prasad Govindrao, Namrata W. Ghule, Abdul Haque Bamer and Mohan G. Kalaskar. «Metal nanoparticles synthesis: An overview on methods of preparation, advantages and disadvantages, and applications». *Journal of Drug Delivery Science and Technology* 53, (2019): 101174. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2019.101174>.
16. Zeng H., Du X.-W., Singh S.C., Kulinich, S.A., Yang, S., He, J. and Cai W. «Nanomaterials via Laser Ablation/Irradiation in Liquid: A Review. *Adv. Funct. Mater*». *Adv. Funct. Mater.* 22, (2012): 1333–1353. <https://doi.org/10.1002/adfm.201102295>.
17. Thompson David T. «Using Gold Nanoparticles for Catalysis». *Nano Today* 2, (2007): 40–43. [https://doi.org/10.1016/S1748-0132\(07\)70116-0](https://doi.org/10.1016/S1748-0132(07)70116-0).
18. Taketoshi Ayako and Masatake Haruta. «Size- and Structure-specificity in

- Catalysis by Gold Clusters». *Chemistry Letters* 43, (2014): 380–87. <https://doi.org/10.1246/cl.131232>.
19. Lin Chao, Kai Tao, Dayin Hua, Zhen Ma and Shenghu Zhou. «Size Effect of Gold Nanoparticles in Catalytic Reduction of P-Nitrophenol with NaBH<sub>4</sub>». *Molecules* 18, (2013): 12609–20. <https://doi.org/10.3390/molecules181012609>.
  20. Aditya Teresa, Anjali Pal and Tarasankar Pal. «Nitroarene Reduction: A Trusted Model Reaction to Test Nanoparticle Catalysts». *Chemical Communications* 51, (2015): 9410–31. <https://doi.org/10.1039/C5CC01131K>.
  21. Zhao Pengxiang, Xingwen Feng, Deshun Huang, Guiying Yang and Didier Astruc. «Basic concepts and recent advances in nitrophenol reduction by gold- and other transition metal nanoparticles». *Coordination Chemistry Reviews* 287, (2015): 114–36. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2015.01.002>.
  22. Han Fengyan, Chenyao Hu, Xinglong Zhang, Chunxiu Jing, Ting Hu and Xiaofei Yang. «Mechanistic insights into the catalytic reduction of nitrophenols on noble metal nanoparticles/N-doped carbon black composites». *Composites Communications* 23, (2021): 100580. <https://doi.org/10.1016/j.coco.2020.100580>.
  23. Dominguez-Medina Sergio, Jan Blankenburg, Jana Olson, Christy F. Landes and Stephan Link. «Adsorption of a Protein Monolayer via Hydrophobic Interactions Prevents Nanoparticle Aggregation under Harsh Environmental Conditions». *ACS Sustainable Chemistry & Engineering* 1, (2013): 833–42. <https://doi.org/10.1021/sc400042h>.
  24. Pino Pablo del, Beatriz Pelaz, Qian Zhang, Pauline Maffre, G. Ulrich Nienhaus and Wolfgang J. Parak. «Protein Corona Formation around Nanoparticles – from the Past to the Future». *Materials Horizons* 1, (2014): 301–13. <https://doi.org/10.1039/C3MH00106G>.
  25. Mahmoudi Morteza, Markita P. Landry, Anna Moore and Roxana Coreas. «The Protein Corona from Nanomedicine to Environmental Science». *Nature Reviews Materials* 8, (2023): 422–38. <https://doi.org/10.1038/s41578-023-00552-2>.
  26. Albanese Domenico C. M. and Nicoletta Gaggero. «Albumin as a

- Promiscuous Biocatalyst in Organic Synthesis». *RSC Advances* 5, (2015): 10588–98. <https://doi.org/10.1039/C4RA11206G>.
27. Benedetti Fabio, Federico Berti and Silvia Bidoggia. «Aldolase Activity of Serum Albumins». *Organic & Biomolecular Chemistry* 9, (2011): 4417. <https://doi.org/10.1039/c0ob01219j>.
28. Bolaños Karen, Marcelo J. Kogan and Eyleen Araya. «Capping Gold Nanoparticles with Albumin to Improve Their Biomedical Properties». *International Journal of Nanomedicine* 14, (2019): 6387–6406. <https://doi.org/10.2147/IJN.S210992>.
29. Amblard Muriel, Jean-Alain Fehrentz, Jean Martinez and Gilles Subra. «Methods and Protocols of Modern Solid Phase Peptide Synthesis». *Molecular Biotechnology* 33, (2006): 239–54. <https://doi.org/10.1385/MB:33:3:239>.
30. Mikolajczak Dorian J. and Beate Kokschi. «Peptide–Gold Nanoparticle Conjugates as Artificial Carbonic Anhydrase Mimics». *Catalysts* 9, (2019): 903. <https://doi.org/10.3390/catal9110903>.
31. Behrendt Raymond, Peter White and John Offer. «Advances in Fmoc Solid-Phase Peptide Synthesis». *Journal of Peptide Science* 22, (2016): 4–27. <https://doi.org/10.1002/psc.2836>.
32. El-Faham Ayman and Fernando Albericio. «Carpino’s Protecting Groups, beyond the Boc and the Fmoc». *Peptide Science* 112, (2020): e24164. <https://doi.org/10.1002/pep2.24164>.
33. Trost B.M. and Brindle C.S. «The direct catalytic asymmetric aldol reaction» *Chem. Soc. Rev.* 39, (2010): 1600–32. <https://doi.org/10.1039/b923537j>.
34. Runikhina Sofiya, Dmitry Eremin and Denis Chusov. «Reductive Aldol-Type Reactions in the Synthesis of Pharmaceuticals». *Chemistry – A European Journal* 27, (2021): 15327–60. <https://doi.org/10.1002/chem.202101768>.
35. Adler Shira R. and Yitzhak Mastai. «Chiral polymeric nanoparticles for aldol reaction». *Reactive and Functional Polymers* 96, (2015): 1–4. <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2015.08.011>.
36. B. S. Vachan, Muthu Karuppasamy, Perumal Vinoth, Sundaravel Vivek



- Kumar, Subbu Perumal, Vellaisamy Sridharan, J. Carlos Menéndez. «Proline and its Derivatives as Organocatalysts for Multi- Component Reactions in Aqueous Media: Synergic Pathways to the Green Synthesis of Heterocycles». *Adv. Synth. Catal.* 362, (2020): 87-110. <https://doi.org/10.1002/adsc.201900558>
37. Khiar Noureddine, Raquel Navas, Eleonora Elhalem, Victoria Valdivia and Inmaculada Fernández. «Proline-Coated Gold Nanoparticles as a Highly Efficient Nanocatalyst for the Enantioselective Direct Aldol Reaction in Water». *RSC Advances* 3, (2013): 3861. <https://doi.org/10.1039/c3ra22955f>.
38. Mase Nobuyuki, Yusuke Nakai, Naoko Ohara, Hidemi Yoda, Kunihiko Takabe, Fujie Tanaka and Carlos F. Barbas. «Organocatalytic Direct Asymmetric Aldol Reactions in Water». *Journal of the American Chemical Society* 128, (2006): 734–35. <https://doi.org/10.1021/ja0573312>.
39. Kumar Ajeet, Manika Dewan, Arnab De, Amit Saxena, Swati Aerry and Subho Mozumdar. «Aldol Condensation in PEG-400 Catalyzed by Recyclable L-Proline Supported on Nano Gold Surface». *RSC Advances* 3, (2012): 603–7. <https://doi.org/10.1039/C2RA22522K>.
40. Emma Marco Giuseppe, Alice Tamburrini, Ada Martinelli, Marco Lombardo, Arianna Quintavalla, e Claudio Trombini. «A Simple and Efficient Protocol for Proline-Catalysed Asymmetric Aldol Reaction». *Catalysts* 10, (2020): 649. <https://doi.org/10.3390/catal10060649>.
41. Benjamin List, Linh Hoang, and Harry J. Martin. «New mechanistic studies on the proline-catalyzed aldol reaction | PNAS». *Proceedings of the national Academy of Sciences* 101, (2004) 5839-5842. <https://www.pnas.org/doi/10.1073/pnas.0307979101>.
42. Spears Richard J., Cliona McMahon and Vijay Chudasama. «Cysteine Protecting Groups: Applications in Peptide and Protein Science». *Chemical Society Reviews* 50, (2021): 11098–155. <https://doi.org/10.1039/D1CS00271F>.
43. Jahanban-Esfahlann Ali, Alireza Ostadrahimi, Rana Jahanban-Esfahlan, Leila Roufegarinejad, Mahnaz Tabibiazar and Ryszard Amarowicz. «Recent developments in the detection of bovine serum albumin».

- International Journal of Biological Macromolecules* 138, (2019): 602–17.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.07.096>.
44. Rohl Carol A. and Robert L. Baldwin. «Comparison of NH Exchange and Circular Dichroism as Techniques for Measuring the Parameters of the Helix–Coil Transition in Peptides». *Biochemistry* 36, (1997): 8435–42.  
<https://doi.org/10.1021/bi9706677>.
45. Wu Guangyu, Xiaoman Liu, Pei Zhou, Lei Wang, Mohammad Hegazy, Xin Huang and Yudong Huang. «A facile approach for the reduction of 4-nitrophenol and degradation of congo red using gold nanoparticles or laccase decorated hybrid inorganic nanoparticles/polymer-biomacromolecules vesicles». *Materials Science and Engineering: C94*, (2019): 524–33. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.09.061>.