



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIMICHE

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN

CHIMICA INDUSTRIALE

TESI DI LAUREA MAGISTRALE

NANOSTRUTTURE DI ORO PER APPLICAZIONI IN IMAGING E

PER IL TEST ELISA USANDO L'EFFETTO SERRS

Relatore: Prof. Moreno Meneghetti

Controrelatore: Prof. Fabrizio Mancin

LAUREANDO: Fabrizio Bertorelle

ANNO ACCADEMICO 2011-2012

INDICE

1 INTRODUZIONE	1
1.1 <u>Nanoparticelle d'oro</u>	3
1.1.1 Caratteristiche chimico-fisiche	4
1.1.1.1 Plasmoni di superficie localizzati	4
1.1.1.2 Proprietà chimiche, funzionalizzazione della superficie e stabilità in soluzione	10
1.1.2 Metodi di sintesi	14
1.1.2.1 Metodi chimici o <i>bottom up</i>	14
1.1.2.2 Metodi fisici o <i>top down</i>	16
1.1.2.3 Sintesi mediante <i>Laser Ablation</i> : un metodo veloce, semplice e pulito	16
1.2 <u>Spettroscopia Raman</u>	23
1.2.1 Spettroscopia SERS	28
1.2.1.1 Meccanismo di <i>enhancement</i> elettromagnetico	28
1.2.1.2 Meccanismo di <i>enhancement</i> chimico	30
1.2.2 <i>Hot spots</i> e SERS <i>reporters</i>	32
1.2.3 <i>Quenching</i> della fluorescenza	33
1.2.4 SERS applicato al <i>biosensing</i>	34
1.3 <u>Il cancro: caratteristiche principali</u>	36
1.3.1 Anticorpi: struttura e funzione	37
1.3.2 Risposte immunitarie verso i tumori	38
1.3.3 Il cancro alla prostata	40
1.3.4 Nanoparticelle d'oro per <i>targeting</i> , <i>imaging</i> tumorale e immunosaggi	40
2 SCOPO DELLA TESI	45
3 PARTE SPERIMENTALE	47
3.1 <u>Sintesi delle nanoparticelle d'oro per ablazione laser</u>	47
3.1.1 Apparato strumentale	47
3.1.2 Caratterizzazione delle nanoparticelle d'oro mediante spettrofotometria UV-Visibile ..	48
3.2 <u>Aggregazione delle nanoparticelle</u>	51
3.2.1 Aggregazione previa diluizione	53
3.2.2 Aggregazione in funzione del pH	58
3.3 <u>Funzionalizzazione delle nanoparticelle d'oro</u>	63
3.3.1 Funzionalizzazione con i SERS <i>reporters</i>	64
3.3.1.1 Correlazione tra l'intensità del segnale SERS e la quantità di SERS <i>reporter</i>	67
3.3.2 Funzionalizzazione con anticorpi	76
3.3.3 Funzionalizzazione con mPEG-SH	76
3.4 <u>Nanostrutture usate per gli esperimenti <i>in vitro</i> ed ELISA</u>	77
3.4.1 Materiali e protocollo sperimentale	78
3.4.2 Caratterizzazione delle nanostrutture	80

INDICE

3.5 <u>Incubazione dei nanosistemi con cellule tumorali per test di <i>targeting</i> e <i>imaging</i></u>	93
3.6 <u>Utilizzo dei nanosistemi nel test ELISA</u>	94
3.6.1 Test ELISA <i>sandwich</i> classico	94
3.6.2 Test ELISA <i>sandwich</i> con nanoparticelle d'oro funzionalizzate.....	95
3.7 <u>Tecnica di <i>imaging</i>: misure SERS tramite strumentazione micro-Raman</u>	98
4 RISULTATI E DISCUSSIONE	101
4.1 <u>Misure Raman in modalità <i>multiplexing</i> per verifica del <i>targeting</i> su cellule tumorali</u>	101
4.1.1 Analisi dati e risultati	102
4.2 <u>Misure Raman sui campioni del test ELISA</u>	110
5 CONCLUSIONI	117
6 BIBLIOGRAFIA	119
7 RINGRAZIAMENTI	123

1. INTRODUZIONE

Negli ultimi decenni, lo sviluppo tecnologico e quello della strumentazione scientifica hanno permesso agli scienziati di manipolare e caratterizzare materiali di dimensioni nanometriche.

La nanoscienza, disciplina a cavallo tra chimica, fisica e scienza dei materiali, sta evolvendo velocemente ottenendo risultati incoraggianti anche con applicazioni che avranno certamente importanti implicazioni per la futura qualità della vita.

I materiali con dimensioni nanometriche possiedono caratteristiche chimico-fisiche molte volte diverse dai rispettivi materiali *bulk*. Queste proprietà possono trovare impiego in molti campi strategici quali l'energia e la medicina.

L'ambito biomedico è il campo di applicazione dei nanomateriali di cui si parlerà in questo elaborato di tesi, ovvero delle nanoparticelle d'oro (AuNP).

Date le dimensioni sub-micrometriche, generalmente di qualche decina di nanometri, le nanoparticelle di oro opportunamente funzionalizzate possono essere facilmente internalizzate in sistemi biologici come le cellule, le quali presentano dimensioni di gran lunga maggiori, dell'ordine di qualche decina di micron.

La scelta dell'oro come materiale di partenza non è casuale; è noto infatti che l'oro nella forma *bulk* è "sicuro" per l'uomo e, più in generale, anche per gli altri esseri viventi. Indagini recenti[1] hanno dimostrato che, solitamente, non si osservano effetti avversi anche per l'oro puro in forma di nanoparticelle, mentre sussiste una citotossicità minima per nanoparticelle funzionalizzate con alcuni tipi di stabilizzanti su alcune linee cellulari. Tossicità che possono essere elevate sono invece state rilevate per altri metalli in forma nanoparticellare, quali argento e rame.

Alla luce di questi risultati la medicina dimostra un particolare interesse per le nanoparticelle d'oro. Dal punto di vista chimico, esse possono inoltre essere facilmente funzionalizzate, rendendole ottime candidate per utilizzi nel campo della diagnostica, delle tecniche di *bioimaging* o come *drug-carriers*.

Questo lavoro di tesi si occupa di AuNP funzionalizzate opportunamente per *targeting* e *imaging* in modalità *multiplexing* di cellule tumorali del cancro alla prostata e dell'utilizzo delle stesse nel test ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) con lo scopo di aumentarne la sensibilità rispetto all'ELISA tradizionale.

1 – INTRODUZIONE

Dopo un'introduzione dei concetti di base, la tesi descriverà la parte sperimentale con i vari passaggi di funzionalizzazione e di caratterizzazione dei nanosistemi creati. Nell'ultima parte dell'elaborato verranno esposti i risultati ottenuti per l'*imaging* delle cellule tumorali e per il test ELISA.

1.1 Nanoparticelle d'oro

Fin da tempi antichi l'oro ha suscitato grande interesse per le caratteristiche che l'hanno reso un metallo 'prezioso'. Esso è inerte alla maggior parte dei composti chimici e viene attaccato solamente dall'acqua regia (una miscela di acido cloridrico e acido nitrico), dallo ione cianuro e dal mercurio con il quale forma un'amalgama.

L'oro è un metallo della terza serie di transizione, 9^a triade insieme al rame e all'argento e la sua configurazione elettronica, $[\text{Xe}]5d^{10}6s^1$, lo rende particolarmente stabile.

In effetti, questa inerzia chimica contraddistingue anche altri elementi di quella zona della tavola periodica, come per esempio Platino, Mercurio, e i loro "analoghi leggeri" Palladio e Argento. L'oro si distingue comunque, tra questi elementi, per la sua particolare inerzia.

Anche le nanoparticelle d'oro sono, al pari del materiale massivo, tra quelle di natura metallica che mostrano maggiore stabilità [2]. Esse erano conosciute già nel IV-V secolo a.c. in Cina, Egitto, Arabia e India dove venivano usate a scopo medico[2,3].

Nel medioevo l'oro colloidale veniva studiato dagli alchimisti che lo ritenevano di grande importanza terapeutica. Si legge, ad esempio, di Paracelso e delle proprietà terapeutiche della "*quinta essentia aurii*" ottenuta per riduzione di acido cloroaurico con estratti etanolici dalle piante.

Nel 1583 l'oro colloidale viene addirittura descritto come un elisir di lunga vita dall'alchimista David de Planis-Campy, medico di Re Luigi XIII.

Il primo libro sull'oro colloidale pervenuto fino ai giorni nostri risale al 1618. L'autore - il filosofo e dottore in medicina Francesco Antonii - descrive i metodi di preparazione e i consigli per l'uso medico.

Dal XVII secolo in poi l'oro colloidale viene usato anche per colorare vetri (vetro rubino), seta e porcellane[3].

Successivamente, nel 1718, il dottore e filosofo Hans Heinrich pubblica un trattato nel quale spiega che facendo bollire la soluzione di "oro bevibile" (è un altro modo con cui venivano chiamate le nanoparticelle d'oro a quell'epoca) in presenza di amido se ne aumentava drasticamente la stabilità[2].

Il primo vero studio sistematico sulle nanoparticelle d'oro è da attribuire a M. Faraday che nel 1857 pubblica un ben noto articolo[4] nel quale studia le proprietà ottiche di film sottili ottenuti lasciando seccare soluzioni di oro colloidale[2] e

attribuisce il caratteristico colore delle soluzioni proprio alla natura colloidale dell'oro.

Faraday ottiene le sue nanoparticelle per riduzione di $(\text{AuCl}_4)^-$ con fosforo in disolfuro di carbonio; alcune di queste preparazioni sono tuttora conservate al Royal Institution of Great Britain a Londra[2,3].

All'inizio del '900 il fisico tedesco Gustav Mie presenta uno studio teorico sull'assorbimento del plasmone di risonanza di nanoparticelle d'oro sfruttando le teorie elettromagnetiche di Maxwell[5]; il suo lavoro getta le fondamenta teoriche che hanno permesso di comprendere il fenomeno della risonanza plasmonica delle nanoparticelle metalliche.

1.1.1 Caratteristiche chimico-fisiche

1.1.1.1 Plasmoni di superficie localizzati

Le nanoparticelle di alcuni metalli appaiono intensamente colorate in modo diverso rispetto al metallo in forma massiva, ad esempio quelle di argento hanno un colore giallo chiaro mentre quelle d'oro sono rosse.

La ragione fisica di questo comportamento deriva dalla proprietà delle particelle nota come plasmone di superficie localizzato.

Quando le nanoparticelle metalliche sono investite da un campo elettromagnetico (ad esempio radiazione elettromagnetica corrispondente a luce visibile) gli elettroni della banda di conduzione del metallo iniziano ad oscillare coerentemente con il campo elettrico dell'onda incidente (Fig. 1.1). Il campo elettrico incidente induce quindi una polarizzazione degli elettroni di conduzione che comporta una redistribuzione di cariche positive e negative (gli elettroni di conduzione) sulla superficie della nanoparticella. A sua volta questa redistribuzione genera una forza di richiamo (o *restoring force*) che riporta il sistema alle condizioni iniziali.

La conseguenza di tutto ciò è l'instaurarsi di un'oscillazione dipolare conosciuta come oscillazione del plasmone di superficie o, meglio, plasmone di superficie localizzato. Risonanza plasmonica superficiale localizzata (o LSPR, *Localized Surface Plasmonic Resonance*) corrisponde perciò alla risonanza con cui viene eccitato il plasmone di superficie localizzato.

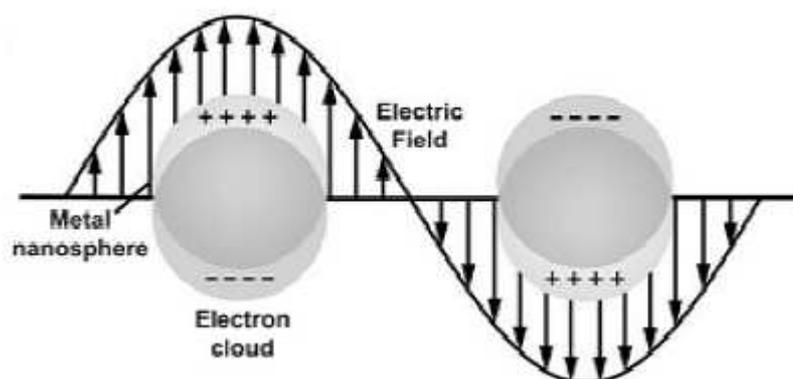


Figura 1.1: Rappresentazione dell'interazione tra onda elettromagnetica e nanoparticella

Per molti metalli, come Pb, In, Hg, Sn e Cd, la risonanza plasmonica risiede nella regione UV dello spettro elettromagnetico e quindi le nanoparticelle di questi metalli non mostrano particolari effetti di colore.

I metalli da conio invece costituiscono un'eccezione perché grazie alle transizioni *d-d* possiedono una risonanza plasmonica situata nella regione visibile dello spettro e quindi risultano colorati. Le nanoparticelle d'oro infatti hanno una LSPR localizzata a circa 520 nm che le fa apparire rosse.

La LSPR non è situata sempre alla stessa lunghezza d'onda. Essa può dipendere dalla forma delle nanoparticelle e in piccola parte dalle loro dimensioni. Inoltre, la LSPR viene anche influenzata dal tipo di solvente e/o dal tipo di leganti presenti sulla superficie.

Il fisico tedesco Gustav Mie nel 1908 fu il primo a razionalizzare la natura del plasmone di risonanza e la sua teoria descrive l'estinzione (assorbimento e *scattering*) di nanoparticelle sferiche di dimensioni arbitrarie.

La teoria di Mie parte dall'assunzione che la particella e il mezzo nella quale è immersa siano omogenei e descrivibili mediante le funzioni dielettriche dei rispettivi *bulk*.

Per mettere in relazione la frequenza di risonanza del plasmone della nanoparticella con la costante dielettrica si considera l'interazione della luce con una particella molto più piccola della lunghezza d'onda della luce incidente, $\lambda \gg 2R$, dove R è il raggio della particella. Sulla base di ciò, il campo elettrico incidente può essere considerato costante lungo tutta la particella e l'interazione è di tipo elettrostatico anziché elettrodinamico. Questo tipo di approssimazione è denominata "quasi-statica" e prevede una distribuzione dipolare delle cariche sulla particella (Fig. 1.2).

1 – INTRODUZIONE

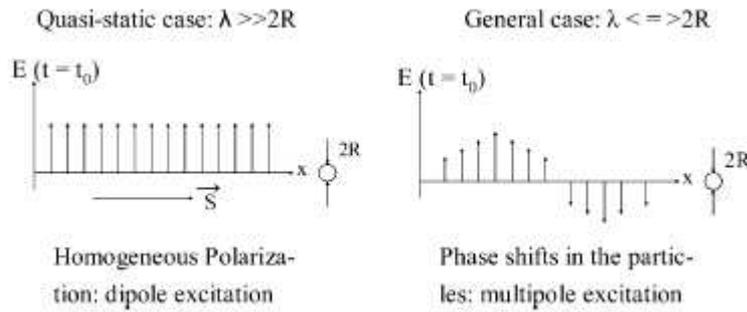


Figura 1.2 L' approssimazione quasi-statica genera una distribuzione dipolare, ma nel caso la particella avesse un diametro confrontabile con la lunghezza d'onda incidente l' approssimazione verrebbe meno e si instaurerebbero dei multipoli .

In approssimazione quasi-statica la sezione d'urto totale σ_{ext} è descritta dalla seguente equazione:

$$\sigma_{\text{ext}} = 9 \frac{\omega}{c} \epsilon_m^{3/2} V \frac{\epsilon_2(\omega)}{[\epsilon_1(\omega) + 2\epsilon_m]^2 + [\epsilon_2(\omega)]^2} \quad (\text{eq. 1.1})$$

dove V è il volume della particella, ω è la frequenza angolare della radiazione incidente, c è la velocità della luce, ϵ_m è la costante dielettrica del mezzo e ϵ_1 ed ϵ_2 sono la parte reale ed immaginaria della costante dielettrica del metallo della nanoparticella.

La condizione di risonanza si verifica quando $\epsilon_1 = -2\epsilon_m$, situazione in cui σ_{ext} assume un valore molto alto. È altresì intuibile come il mezzo (es. solvente o molecole che funzionalizzano la superficie) sia di fondamentale importanza nel determinare la frequenza di risonanza in quanto mezzi diversi possiedono costanti dielettriche diverse e quindi la frequenza di risonanza cambia.

L'assorbanza della soluzione colloidale è esprimibile tramite la equazione 1.2:

$$A = (N\sigma_{\text{abs}}L/\ln 10) \quad (\text{eq. 1.2})$$

dove A è l'assorbanza, N è il numero di particelle per unità di volume, L è il cammino ottico e σ_{abs} è la sezione d'urto dell'assorbimento.

Come detto in precedenza, la LSPR è dipendente anche dalle dimensioni della particella. Considerando sempre particelle di forma sferica, al variare delle dimensioni è possibile osservare due effetti:

- 1) Intrinsic size effect: si verifica riducendo le dimensioni delle particelle ($1\text{nm} < R < 20\text{nm}$) ed è dovuto allo smorzamento (*damping*) che subisce l'eccitazione a seguito dell'interazione degli elettroni con le pareti della particella; si manifesta con un abbassamento del picco di assorbimento

plasmonico.

- 2) *Extrinsic size effect*: si verifica aumentando le dimensioni delle nanoparticelle ($R > 20\text{nm}$) ed è dovuto al fatto che in questo caso l'approssimazione dipolare quasi-statica non è più valida. Più grande diventa la nanoparticella, più multipoli tendono ad instaurarsi perché la luce non può più polarizzarla omogeneamente e come conseguenza, il ritardo degli effetti del campo elettromagnetico attraverso la nanoparticella comporta un allargamento e uno *shift* del picco plasmonico. Le risonanze relative ai multipoli sono situate a energie minori e quindi si assiste ad un *red-shift* del picco di assorbimento plasmonico (Fig. 1.3).

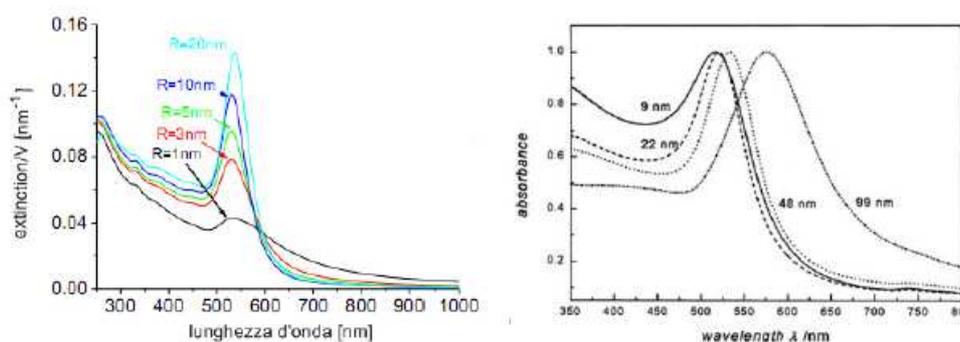


Figura 1.3 Gli effetti dell'*intrinsic size effect* a sinistra e *extrinsic size effect* a destra.

Finora sono state sempre considerate particelle di forma sferica ma gli stessi concetti possono essere ampliati anche a particelle non sferiche. In questa circostanza bisogna ricordare le modifiche di Gans alla teoria di Mie le quali sono applicabili per particelle di forma ellissoidale. In questo caso la polarizzabilità della particella non è più uguale in tutte le direzioni e quindi la si distingue in longitudinale e trasversale. Di conseguenza si assiste alla comparsa di due picchi di risonanza plasmonica relativi all'oscillazione del plasmone lungo i due assi dell'ellissoide.

Il primo picco, detto trasversale, cade a circa 520nm come per le particelle sferiche e si riferisce all'oscillazione degli elettroni perpendicolarmente rispetto all'asse maggiore dell'ellissoide. Il secondo picco, detto longitudinale, cade a lunghezze d'onda maggiori e si riferisce all'oscillazione degli elettroni lungo l'asse maggiore dell'ellissoide (Fig. 1.4). Questo fenomeno si osserva chiaramente nei *nanorods*, ovvero nanoparticelle a forma di bastoncino.

1 – INTRODUZIONE

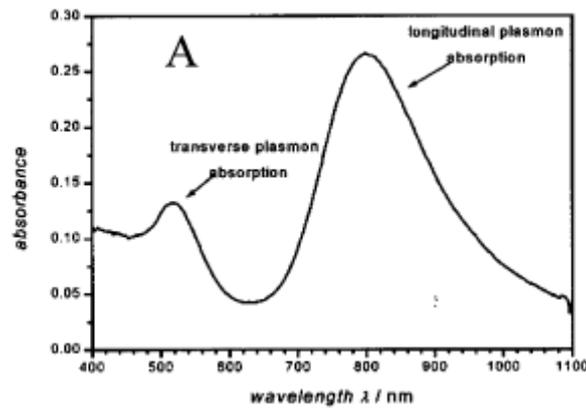


Figura 1.4 Risonanza plasmonica trasversale e longitudinale in un *nanorod* .

Sfruttando la teoria di Mie si può verificare che la sezione d'urto di *scattering* di nanosfere d'oro è circa quattro o cinque ordini di grandezza superiore rispetto a quella dei più comuni coloranti. Si consideri, a titolo di esempio, lo spettro di nanoparticelle d'oro riportato in figura 1.5:

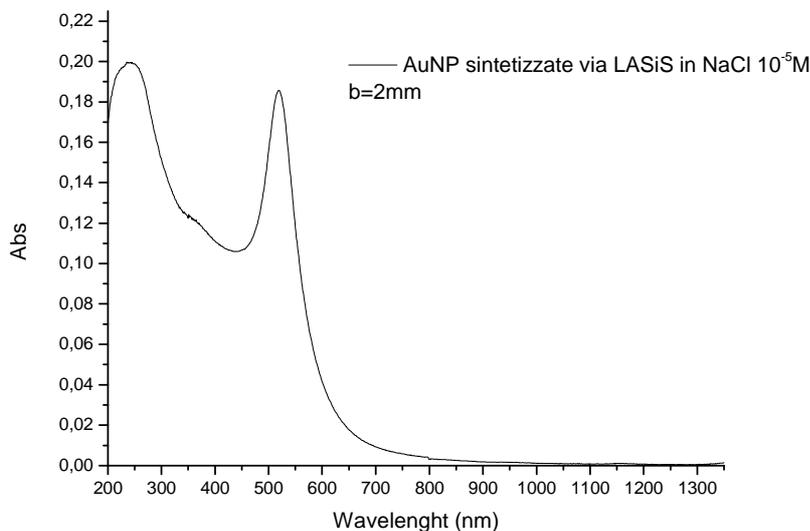


Figura 1.5 AuNP sintetizzate per Laser Ablation

Le nanoparticelle in questione possiedono le seguenti caratteristiche (ricavate tramite *fitting* dello spettro UV-VIS, vedi par. 3.1.2 *Caratterizzazione delle nanoparticelle d'oro mediante spettrofotometria Uv-Visibile*):

R (m)	Spheres %	1-RSS	MaxSPA(m²)	MaxSPA(cm²)
8,40E-09	86	0	1,82E-16	1,82E-12
$\epsilon(\text{cm}^{-1} \text{M}^{-1})$	Abs(b=2mm 520nm) mol/L			
4,76E+08	0,19	1,95E-09		

Come è possibile osservare dalla tabella, il coefficiente di estinzione molare è dell'ordine di $10^8 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, di gran lunga superiore rispetto, ad esempio, al coefficiente di estinzione molare della Rodamina 6G o della Malachite Green che sono entrambi dell'ordine di $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Da notare è anche la concentrazione nanomolare di questo campione di nanoparticelle. È praticamente impossibile ottenere lo stesso valore di assorbanza con una concentrazione equivalente di un colorante tradizionale.[2,6,7]

È possibile osservare un esempio visivo di come cambia il colore delle nanoparticelle a seconda di dimensioni e forma nell'immagine sottostante (Fig 1.6):

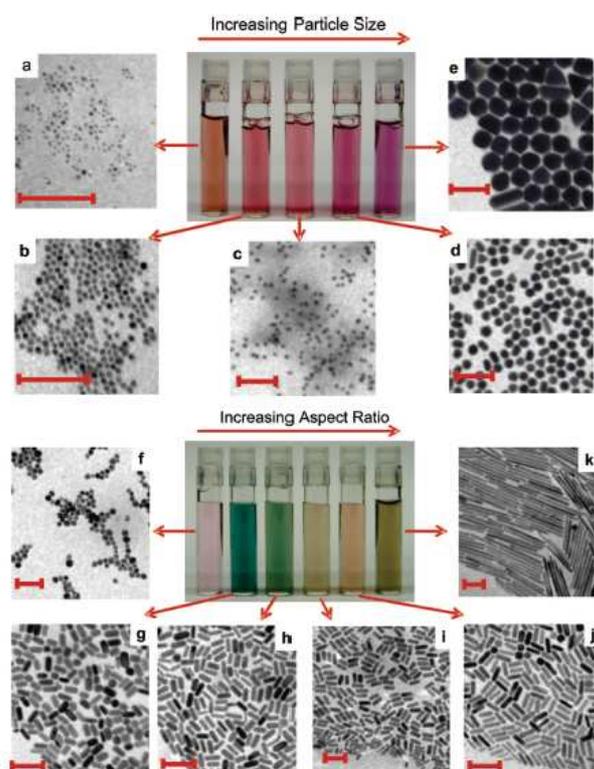


Figura 1.6: nei riquadri in alto (a-e) si vede come cambia il colore aumentando le dimensioni delle nanosfere. In basso (f-k) si vede la variazione di colore all'aumentare della lunghezza dei *nanorods*.

1.1.1.2 Proprietà chimiche, funzionalizzazione della superficie e stabilità in soluzione

Come già accennato in precedenza, l'oro è un materiale con una significativa inerzia chimica e il suo alto potenziale di riduzione standard ne conferisce la resistenza all'ossidazione in ambiente secco e umido.

Sebbene non sia molto reattivo, è risaputo che l'oro forma un forte legame con lo zolfo dovuto alla retrodonazione π , nella quale si ha la formazione di un legame σ in cui Au accetta elettroni da S e di un legame π dovuto alla parziale delocalizzazione degli elettroni metallici dagli orbitali occupati d dell'oro agli orbitali d vuoti dello zolfo[8]. Altri buoni leganti, spesso usati in letteratura, sono gruppi amminici, fosfinici e carbossilati[2].

Sfruttando il legame Au-S è possibile funzionalizzare la superficie delle nanoparticelle con un gran numero di molecole diverse, a seconda delle esigenze, a patto che queste molecole contengano gruppi tiolici o disolfurici (Fig. 1.7).

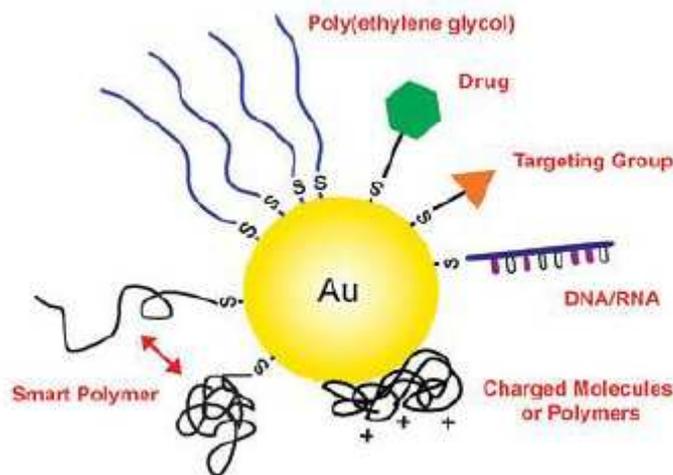


Figura 1.7: È possibile funzionalizzare in modo relativamente semplice una nanoparticella derivatizzando piccole o grosse molecole con un gruppo -SH

In questo modo diventa possibile costruire delle nanoparticelle “intelligenti”. Ad esempio in questo lavoro di tesi ci si propone di funzionalizzare le AuNP con un anticorpo opportunamente derivatizzato con un gruppo -SH terminale, in modo che diventino attive per il *targeting* su cellule che esprimono l'antigene per quel determinato anticorpo (Fig. 1.8).

1 – INTRODUZIONE

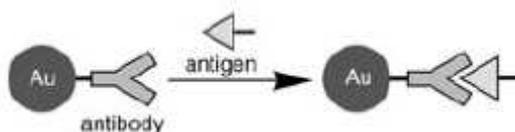


Figura 1.8: Rappresentazione schematica del funzionamento del sistema AuNP-Anticorpo-Antigene

Le AuNP stanno interessando sempre di più il mondo biologico grazie alla quasi assente citotossicità e alla facile coniugazione con molecole peptidiche, frammenti di DNA, farmaci, anticorpi, polimeri ecc. Le applicazioni più frequenti, sia *in vivo* che *in vitro* riguardano il *targeting* e il *sensing* biologico che sfrutta anche la proprietà del plasmone di superficie.[2,3,9]

La funzionalizzazione delle nanoparticelle è resa possibile anche dal fatto che queste sono stabili nel mezzo in cui sono disperse, in questo caso l'acqua.

In generale esistono due modi in cui si può stabilizzare un colloide per evitare che condensino per formare un'unica fase solida, fenomeno termodinamicamente favorito vista la diminuzione dell'area superficiale che comporta:

- 1) Stabilizzazione sterica: consiste nel far adsorbire sulla nanoparticella un polimero in modo che formi uno strato protettivo di spessore δ . La condensazione o aggregazione è impedita dal polimero stesso in quanto le particelle non possono avvicinarsi ad una distanza inferiore a 2δ (Fig. 1.9). Questo tipo di stabilizzazione permette di ottenere aggregati fortemente resistenti agli elettroliti e quindi non si ha aggregazione neanche aumentando di molto la forza ionica della soluzione.



Figura 1.9: Stabilizzazione sterica

- 2) Stabilizzazione di carica: si verifica quando la superficie della particella è carica elettricamente, ad esempio per la presenza di ioni superficiali. È efficace specialmente in soluzioni acquose in quanto a causa della carica superficiale le molecole d'acqua si riorganizzano per formare un doppio

1 – INTRODUZIONE

strato elettrico attorno alla particella. La stabilità del colloide in questo caso è dovuta al potenziale repulsivo generato dall'*overlap* tra i due doppi strati elettrici delle particelle che entrano nel rispettivo raggio di azione (Fig. 1.10). In questa situazione mantenere una bassa forza ionica della soluzione è fondamentale per evitare l'aggregazione non voluta delle nanoparticelle. Aumentando la forza ionica infatti il doppio strato elettrico verrebbe distrutto e l'effetto repulsivo annullato.

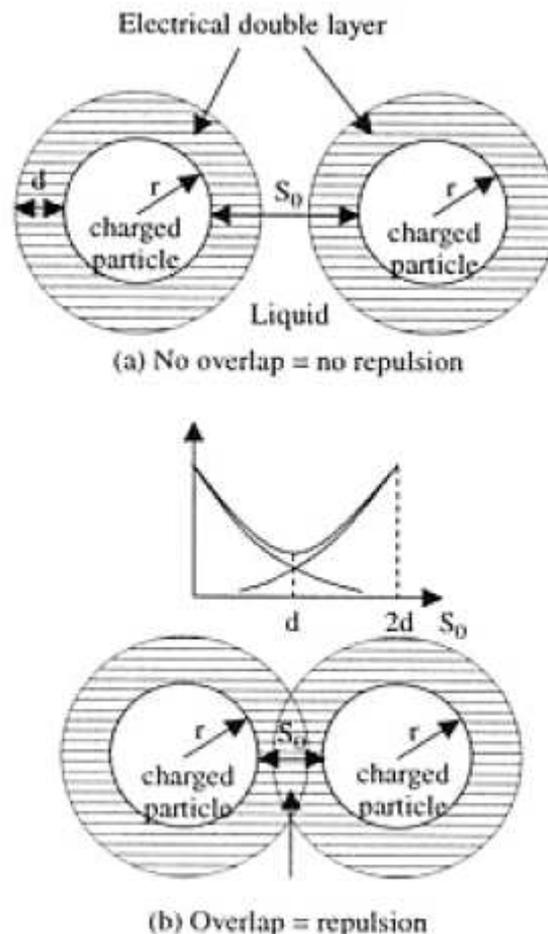


Figura 1.10: l'effetto del doppio strato elettrico nella stabilizzazione di carica

Come vedremo più avanti (par. 1.1.2.3 *Sintesi mediante Laser Ablation: un metodo veloce, semplice e pulito*) le nanoparticelle sintetizzate mediante *Laser Ablation* possiedono una stabilizzazione di carica che le rende particolarmente maneggevoli in ambiente acquoso. Sempre nei capitoli successivi vedremo anche i modi in cui è possibile avere un'aggregazione controllata delle nanoparticelle d'oro (par 3.2 *Aggregazione delle nanoparticelle*). Infine, come vedremo più avanti (par 3.3.3 *Funzionalizzazione con mPEG-SH*), le preparazioni di AuNP per il *targeting*

1 – INTRODUZIONE

vengono funzionalizzate con mPEG-SH; il polimero oltre a svolgere una funzione di biocompatibilità con la cellula serve a stabilizzare stericamente le nanoparticelle aggregate in modo che si preservino nel tempo.

1.1.2 Metodi di sintesi

Nei prossimi paragrafi passeremo brevemente in rassegna i metodi più comuni per sintetizzare le AuNP. I metodi di sintesi chimici vengono anche chiamati *bottom up* perché si parte da materiale atomico (ioni in soluzione) e se ne accrescono le dimensioni fino ad ottenere le nanoparticelle (ad esempio tramite reazioni di ossidoriduzione). I metodi fisici invece sono conosciuti anche come metodi *top down* perché solitamente si parte dal materiale in forma massiva e se ne riducono le dimensioni fino ad arrivare alle nanoparticelle. L'ablazione laser è il metodo per la sintesi di AuNP utilizzato in questo lavoro di tesi ed è di tipo *top down*.

1.1.2.1 Metodi chimici o *bottom up*

Solitamente la sintesi chimica di AuNP avviene in soluzione acquosa per riduzione di un sale di oro come HAuCl_4 tramite un agente riducente.

I primi atomi metallici ridotti fungono da centro di nucleazione e al procedere della reazione questi nuclei si accrescono fino a dare le nanoparticelle.

La cinetica di nucleazione delle nanoparticelle d'oro è stata studiata da Szimongdy e Svedberg [10,11] i quali hanno visto che le dimensioni delle AuNP che si vengono a formare dipendono fortemente dal rapporto sale di oro/agente riducente.

Un metodo molto comune e a lungo utilizzato per produrre AuNP in ambiente acquoso è la sintesi di Turkevitch [12] che utilizza HAuCl_4 come sale e citrato di sodio come agente riducente e stabilizzante. Questo tipo di sintesi permette di ottenere nanoparticelle d'oro con un diametro di circa 15-20nm.

AuNP di dimensioni diverse sono ottenibili con il metodo di Frens [13], che utilizza gli stessi reagenti del metodo Turkevitch, ma variando opportunamente il rapporto HAuCl_4 /Citrato di sodio è possibile ottenere nanoparticelle con dimensioni tra 16 e 147nm.

Per ottenere nanoparticelle sferiche con dimensioni di 1.5-5.2nm si fa ricorso alla sintesi di Brust-Shriffin che viene condotta in una miscela bifasica acqua/toluene in presenza di cloruro aurico acido, tetraottilammonio bromuro, dodecantiolo e sodio-boro idruro; HAuCl_4 si trova inizialmente solubilizzato in fase acquosa e viene trasferito in toluene grazie al tetraottilammonio bromuro che agisce da *phase-*

transfer reagent. Una volta raggiunta la fase organica avviene la riduzione con NaBH_4 a cui segue la stabilizzazione con dodecantiolo[14].

Un altro metodo di sintesi meno frequente consiste in un sistema bifasico che utilizza delle micelle inverse come ambiente di reazione. Gli ioni metallici passano dalla fase organica a quella acquosa all'interno della micella dove avviene la riduzione. Ammettendo che le micelle siano tutte grandi uguali è possibile ottenere particelle monodisperse.

Un ulteriore metodo è il *seeding-growth* nel quale nanoparticelle precedentemente preparate con una qualsiasi delle altre sintesi vengono poste in una soluzione contenente agente riducente e HAuCl_4 . Le nanoparticelle fungono da centri di nucleazione e si accrescono. Solitamente questo tipo di sintesi viene condotta in due *step*: nel primo ha luogo la formazione dei vari centri di nucleazione, nel secondo viene proibita la nascita di altri centri di nucleazione e solo quelli esistenti si accrescono. Questo metodo è usato spesso per sintetizzare *nanorods* e permette di controllare molto bene le dimensioni delle particelle. [16,17,18]

In conclusione, i vantaggi dei metodi di sintesi chimici consistono in:

- Possibilità di utilizzare diversi solventi/ambienti di reazione
- Buon controllo della forma e delle dimensioni delle nanoparticelle

Ad ogni modo il metodo di sintesi chimico presenta alcuni difetti per nulla trascurabili, legati soprattutto alla presenza di stabilizzanti e leganti sulla superficie delle AuNP. Questi, seppur necessari, possono complicare un'ulteriore funzionalizzazione della nanoparticella perché rendono meno accessibili gli atomi superficiali[24]. Questa situazione è particolarmente svantaggiosa nel campo della catalisi dove è richiesta una superficie altamente accessibile e libera da contaminanti[19,20], oppure nello studio delle interazioni fisico-chimiche delle AuNP in determinati ambienti dato che il ruolo del *core* metallico viene nascosto[21,22,23]. È possibile “rimpiazzare” i leganti presenti sulla superficie delle AuNP tramite reazioni di *place exchange* (ad esempio introducendo in soluzione tioli diversi da quelli già presenti) ma essendo reazioni all'equilibrio sono di difficile controllo e sono influenzate dall'ingombro sterico dei vari sostituenti nonché dalla temperatura (che può essere un problema per sostituenti termosensibili)[2,25].

L'utilizzo di diversi reagenti in fase di sintesi e la presenza di stabilizzanti sul prodotto finito solleva anche un ulteriore problema riguardante la biocompatibilità. L'ambiente fisiologico infatti è molto delicato e molti degli stabilizzanti e reagenti

usati solitamente sono tossici[1]. La purificazione del prodotto inoltre è un processo lungo, può portare alla produzione di ingenti quantità di materiale di scarto ed è possibile che quantità in tracce di sostanze tossiche rimangano nel prodotto purificato.

1.1.2.2 Metodi fisici o *top down*

I metodi fisici per la produzione di AuNP sono solitamente meno utilizzati rispetto ai metodi chimici. I più frequenti sono la sonolisi, la CVD, irradiazione UV e radiolisi. Il vantaggio che hanno questi metodi in confronto a quelli chimici è l'assenza di impurità nel prodotto finito. Non ci si soffermerà ulteriormente nella descrizione dei metodi *top down* e passeremo direttamente alla descrizione della tecnica dell'ablazione laser, il metodo fisico utilizzato per la produzione delle nanoparticelle d'oro in questo progetto di tesi.

1.1.2.3 Sintesi mediante *Laser ablation*: un metodo veloce, semplice e pulito

L'ablazione è il processo di rimozione di materiale dalla superficie di un oggetto mediante processi di vaporizzazione ed erosione. L'ablazione laser in soluzione, o LASiS (*Laser Ablation Synthesis in Solution*), è una tecnica che consente di ottenere nanoparticelle di vari metalli in diversi solventi (spesso acqua) con relativa facilità.

Il set-up sperimentale è relativamente semplice: consiste in un laser pulsato e un set di ottiche che focalizzano il fascio in prossimità di un *target* metallico immerso in una soluzione all'interno di un contenitore (Fig. 1.11).

La LASiS è una tecnica tipicamente *top-down* dato che il materiale di partenza è presente in forma massiva.

1 – INTRODUZIONE

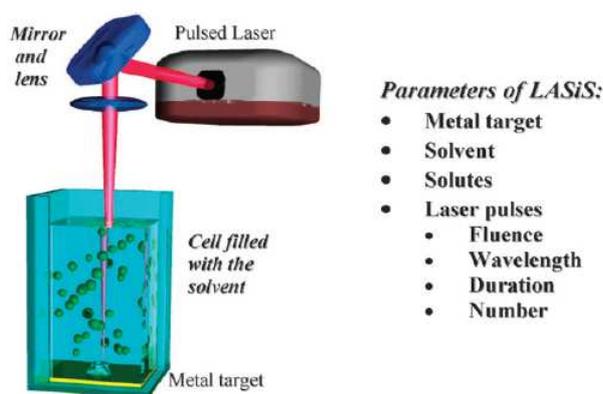


Figura 1.11: schema semplificato del set-up per l'ablazione laser in soluzione e lista dei principali parametri.

Nel metodo LASiS le nanoparticelle sono prodotte per condensazione di una nube di plasma formata dall'ablazione laser di un dischetto di metallo immerso in una soluzione. Solitamente il dischetto di metallo viene posto poco prima rispetto al fuoco del laser per prevenire l'ebollizione locale del solvente.

I meccanismi che stanno alla base del processo sono tutt'ora oggetto di studi a causa della loro complessità, ma molto probabilmente l'ablazione laser inizia con l'assorbimento dei fotoni incidenti da parte del *target* metallico con conseguente produzione di calore accompagnata da fotoionizzazione dell'area irradiata. Nell'istante successivo all'impulso si forma la nube di plasma, accompagnata dall'emissione di luce e da un'onda sonora e il materiale viene espulso dal *target* sottoforma di vapore, metallo fuso e piccoli frammenti solidi.

La fluenza e la durata dell'impulso sono parametri che influiscono la morfologia del materiale espulso. Solitamente basse fluenze portano alla formazione di nanoparticelle con un diametro medio piccolo (3-6nm) mentre alte fluenze causano un'ablazione più violenta, detta anche *boiling explosion*, e le nanoparticelle che si formano sono più grandi e irregolari.

Per quanto riguarda la durata dell'impulso bisogna innanzitutto premettere che l'ablazione inizia poche decine di picosecondi dopo l'irradiazione laser e la nube di plasma permane per decine di nanosecondi. Nel caso di impulsi a nanosecondi la nube di plasma è presente per un tempo pari a circa due volte la durata dell'impulso, quindi il materiale viene ablato mentre è ancora presente l'impulso. Questo genera un'espansione della nube di plasma che assorbendo parte della radiazione incidente si riscalda ulteriormente favorendo l'omogeneizzazione del materiale espulso in

termini di forma e dimensioni. Con impulsi della durata di femtosecondi o picosecondi l'impulso e la nube di plasma avvengono in tempi separati, il meccanismo dominante è la *boiling explosion* e il materiale espulso è di dimensioni maggiori e meno omogenee.

Anche la scelta della lunghezza d'onda del laser ha una certa importanza. La radiazione dei laser che operano nell'UV-Visibile infatti può essere consistentemente assorbita dalla nube di plasma e dalle nanoparticelle appena prodotte che presentino una LSPR in quella regione spettrale. L'utilizzo di un laser con lunghezza d'onda nel vicino infrarosso permette di minimizzare questi assorbimenti.

Il meccanismo prevalente nella formazione delle nanoparticelle con metodo LASiS consiste nella nucleazione durante il raffreddamento della nube di plasma, seguita da accrescimento dei nuclei e da coalescenza (Fig 1.12).

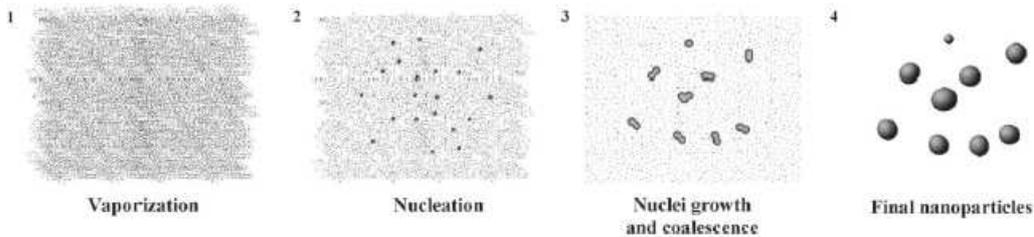


Figura 1.12: rappresentazione dei vari passaggi nella formazione di NP mediante LASiS

La *driving force* per la nucleazione dei *clusters* metallici all'interno della nube di plasma è la sovrasaturazione, data dal rapporto $p/p_0(T)$ dove p è la pressione di vapore reale e $p_0(T)$ è la pressione di vapore all'equilibrio alla temperatura T del sistema. L'energia libera da superare ΔG_N e il raggio minimo ottenibile R_N dipendono dalla sovrasaturazione secondo le seguenti (eq.ni 1.3):

$$\Delta G_N \propto \left[k_B T \ln \left[\frac{p}{p_0(T)} \right] \right]^{-2} \quad (\text{Eq.ni 1.3})$$

$$R_N \propto \left[k_B T \ln \left[\frac{p}{p_0(T)} \right] \right]^{-1}$$

Il processo di nucleazione è veloce mentre l'accrescimento è più lento perché è limitato dalla diffusione e dura per qualche centinaio di nanosecondi dopo l'impulso laser. Durante l'accrescimento, gli atomi di metallo condensano per formare i nuclei i quali a loro volta possono coagulare insieme originando la tipica struttura policristallina delle nanoparticelle prodotte con questo metodo.

Le dimensioni delle nanoparticelle dipendono prevalentemente dalla densità di atomi di metallo durante i processi di nucleazione e accrescimento e dalla temperatura. Tuttavia i profili di temperatura e densità atomica non sono omogenei in tutta la nube di plasma in quanto sussistono due regioni di confine tra il *target* metallico ed il solvente (Fig. 1.13).

Durante l'espansione della nube di plasma diverse specie possono partecipare a reazioni chimiche. Tale reattività è favorita dalla presenza dello strato contenente specie eccitate sia del metallo che del solvente nonché dalle estreme condizioni di temperatura e pressione che si verificano nella nube di plasma.

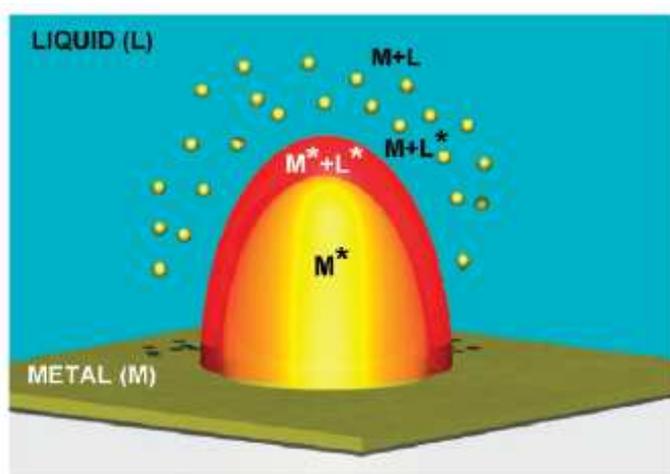


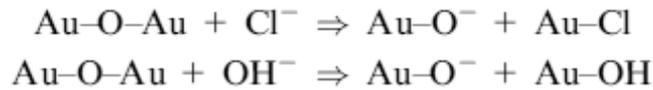
Figura 1.13: rappresentazione delle regioni di confine tra *target* e solvente. Con * sono indicate le specie eccitate o ionizzate che possono partecipare a reazioni chimiche.

Come accennato in precedenza, uno dei punti di forza della LASiS è la possibilità di ottenere nanoparticelle stabili in assenza di leganti. La stabilità in soluzione è garantita dalla presenza di cariche superficiali (vedi par. 1.1.1.2) e nel caso specifico delle AuNP, mediante esperimenti di *Z spectroscopy* ed elettroforesi, è stata verificata la presenza di cariche negative sulla superficie. Misure di tipo XPS, FTIR e SIMS hanno evidenziato la presenza di atomi di oro in stato di ossidazione +1 e +3 e specie Au-O-Au ed è stato ipotizzato che le cariche negative derivino dalla presenza di gruppi Au-O⁻ sulla superficie delle nanoparticelle. È probabile che l'ossidazione dell'oro si verifichi a causa dell'ambiente altamente reattivo della nube di plasma ed è stato stimato che circa il 3-7% degli atomi di oro superficiali siano interessati da questo fenomeno.

Ulteriori prove derivano da esperimenti di *Z potential* condotti variando il pH della soluzione di AuNP e si suppone che si instauri un equilibrio tra specie Au-O⁻ e Au-OH. È stato dimostrato anche che AuNP sintetizzate via LASiS in soluzioni contenenti piccole quantità di ioni Cl⁻ presentano una banda plasmonica più stretta.

1 – INTRODUZIONE

Questi risultati sono stati interpretati come prova della parziale ossidazione degli atomi superficiali e si suppone che gli ioni Cl^- e OH^- siano implicati nelle seguenti reazioni con la superficie delle nanoparticelle:



In definitiva gli ioni cloruro e ossidrile possono aumentare le cariche negative della superficie e prevenire l'aggregazione indesiderata delle nanoparticelle.

Come già visto al paragrafo 1.1.1.2, la stabilizzazione di carica può essere compromessa da un'elevata forza ionica in soluzione. La presenza di elettroliti in gran quantità può alterare la stabilità del colloide ed è quindi bene trovare il giusto compromesso tra concentrazione di sale in soluzione necessario per la liberazione delle cariche negative e la stabilità.

È stato visto (Fig. 1.14) che questo compromesso si realizza per AuNP sintetizzate in una soluzione di NaCl 10^{-5}M in quanto si ottiene un picco di assorbimento plasmonico più intenso e stretto, una percentuale di particelle sferiche alta e con dimensioni di circa 15-20 nanometri.

Aumentando la concentrazione di NaCl il doppio strato elettrico presente sulle nanoparticelle decresce annullando gli effetti di repulsione elettrostatica e si assiste a precipitazione del sistema.

Con la LASiS si possono ottenere nanoparticelle metalliche con diametro di circa 10-40nm quando la sintesi è condotta in acqua e di 5-15nm quando è condotta in solventi organici. La forma è prevalentemente sferica o sferoidale e con struttura policristallina e altamente difettiva.

1 – INTRODUZIONE

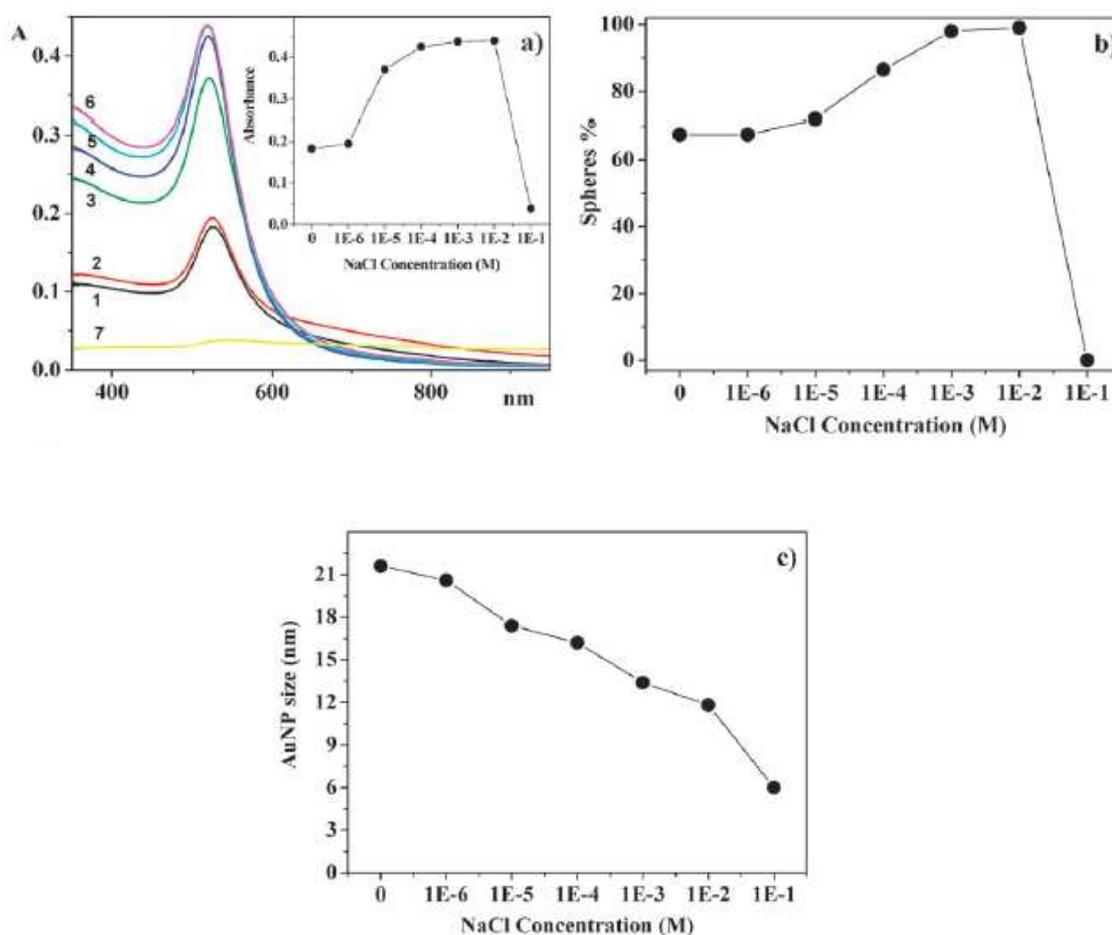


Figura 1.14: LASiS di AuNP in soluzione con concentrazioni crescenti di NaCl. a) Spettri UV-Visibile ($b=2\text{mm}$) che corrispondono a 0M (1) 10^{-6}M (2) 10^{-5}M (3) 10^{-4}M (4) 10^{-3}M (5) 10^{-2}M (6) 10^{-1}M (7). Il grafico interno riporta il valore di assorbanza del plasmone per tutte le soluzioni. b) Percentuale di AuNP sferiche in funzione della concentrazione. c) Diametro medio delle AuNP calcolato tramite fitting dello spettro UV-Visibile in funzione della concentrazione di NaCl.

In conclusione, la LASiS è una valida alternativa ai metodi di riduzione chimica per la produzione di nanoparticelle e offre numerosi vantaggi tra cui:

- Semplicità di esecuzione e manualità richiesta minima che si traduce in un guadagno di tempo per l'operatore;
- Costo del *target* metallico inferiore rispetto ai sali metallici usati in sintesi chimica, il che si traduce in risparmio di denaro;
- Set-up sperimentale semplice;
- È una tecnica eco-sostenibile in quanto i prodotti di scarto sono minimi e presenta una buona riproducibilità;

1 – INTRODUZIONE

- Permette di ottenere nanoparticelle “nude” (senza stabilizzanti) che quindi non devono essere purificate ed essendo molto reattive si prestano facilmente ad una funzionalizzazione *one-step*;
- Possibilità di utilizzare diversi solventi e diversi metalli con lo stesso set-up sperimentale;

Ad ogni modo anche la LASiS ha i suoi svantaggi:

- Il controllo sulle dimensioni delle nanoparticelle è più limitato rispetto ai metodi chimici e c'è una certa dispersione sulle dimensioni;
- Con la produzione di circa 1-5mg/h di nanoparticelle con un laser a nanosecondi l'esportazione del metodo su scala industriale è sfavorevole;
- Il costo per le apparecchiature (laser e ottiche di focalizzazione) si aggira tra i 15000€ e i 20000€. Questa spesa può risultare sconveniente se si dispone già di un laboratorio chimico.

Tuttavia bisogna tenere conto del fatto che alcuni dei problemi legati alla LASiS sono da attribuirsi ad una comprensione solo parziale dei meccanismi che stanno alla base del metodo e quindi ulteriori studi possono perfezionare il metodo.[26,27]

1.2 Spettroscopia Raman

Una tecnica che sarà fondamentale per produrre i risultati sperimentali che verranno esposti nel seguito è la tecnica spettroscopica dello *scattering* Raman.

Con diffusione o *scattering* Raman si intende lo studio della luce diffusa da parte di un mezzo materiale; la diffusione si ha quando inviando un raggio di luce su un mezzo materiale possiamo osservare luce anche in direzioni diverse da quella di propagazione iniziale del raggio.

L'esperimento di diffusione Raman viene eseguito inviando sul campione una radiazione laser, e quindi altamente monocromatica, di frequenza ω_L e raccogliendo la radiazione diffusa di frequenza ω_i ad un certo angolo, solitamente a 180° (condizioni di *back-scattering*). La frequenza ω_i può essere inferiore oppure superiore rispetto a quella incidente. In questi casi si parla di *scattering* anelastico. Usualmente la differente frequenza dipende dall'accoppiamento della radiazione con le vibrazioni del campione in esame.

I laser in spettroscopia Raman sono molto vantaggiosi per i seguenti motivi:

- La radiazione diffusa è di per sé molto più debole rispetto a quella elastica (da 10^6 a 10^8 volte meno intensa). Quindi utilizzare una sorgente molto intensa come un laser ci permette di osservare una quantità misurabile di radiazione diffusa.
- L'alta monocromaticità di una sorgente laser ci permette di osservare dei Raman *shift* molto piccoli. Ricordando infatti che il Raman *shift* è la differenza di numeri d'onda tra radiazione incidente e diffusa, e che le energie che separano gli stati vibrazionali sono molto più piccole rispetto all'energia della luce visibile del laser, appare ovvio che se la sorgente è estremamente monocromatica non va a sovrapporsi con la radiazione diffusa che differisce al massimo di qualche migliaio di cm^{-1} .
- L'alta monocromaticità della radiazione inoltre ci permette di usare dei filtri selettivi (*notch filter*) che la escludono dalla radiazione diffusa evitando così l'acceccamento del rivelatore e permettendo di raccogliere solamente le componenti di *scattering* anelastico.

In uno spettro di diffusione Raman si possono osservare tre diverse componenti:

- Componenti elastiche: in questo caso la radiazione emessa dal mezzo

materiale ha la stessa frequenza di quella incidente, ovvero $\omega_i = \omega_L$. Questo tipo di componente viene anche chiamata *scattering* di Rayleigh.

- Componenti anelastiche: dette anche *scattering* Raman, in questo caso la radiazione diffusa dal mezzo materiale ha una frequenza diversa da quella incidente, ovvero $\omega_i \neq \omega_L$. Le componenti di diffusione Raman a loro volta si suddividono in Stokes e anti-Stokes. Le Stokes hanno frequenza $\omega_i < \omega_L$ mentre le anti-Stokes hanno frequenza $\omega_i > \omega_L$. (Fig. 1.15)

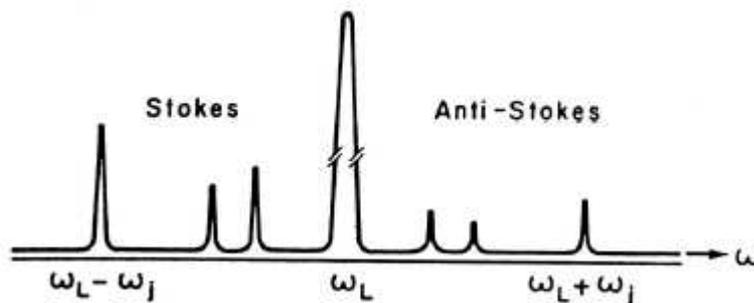


Figura 1.15: rappresentazione schematica di uno spettro Raman, con i rami Stokes e anti-Stokes

I modi di vibrazione delle molecole sono responsabili dei fenomeni di Raman *scattering* e nello spettro, la posizione relativa del picco è indipendente dalla frequenza incidente ω_L e l'energia è caratteristica dello stato vibrazionale responsabile dello *scattering*.

Gli spettri Raman infatti non riportano le frequenze o le lunghezze d'onda assolute ma bensì una differenza di queste, che li rende quindi indipendenti dalla frequenza della radiazione incidente.

Tale differenza si chiama Raman *shift* ed è riportata in numeri d'onda:

$$\Delta\tilde{\nu} = \tilde{\nu}_L - \tilde{\nu}_i = (1/\lambda_L) - (1/\lambda_i) \quad [\text{cm}^{-1}]$$

Negli spettri Stokes il Raman *shift* è positivo mentre negli anti-Stokes è negativo.

La spettroscopia Raman quindi serve per indagare gli stati vibrazionali.

I picchi Stokes e anti-Stokes sono simmetrici rispetto al picco centrale di *scattering* di Rayleigh ma nella pratica si vanno a osservare solamente quelli Stokes perché sono più intensi.

Dal punto di vista molecolare è possibile descrivere lo *scattering* Raman con una rappresentazione a livelli come quella in figura 1.16:

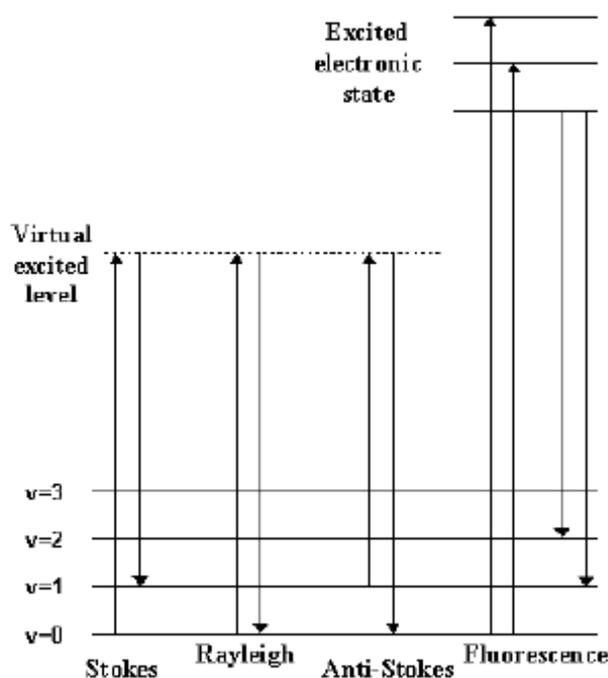


Figura 1.16: schema a livelli che rappresenta i fenomeni di scattering Raman (Stokes e anti-Stokes), scattering Rayleigh e fluorescenza.

Un fotone con energia $\hbar\omega_L$ del raggio incidente viene distrutto e la molecola passa ad uno stato eccitato virtuale dal quale decade istantaneamente emettendo un fotone di energia $\hbar\omega_S$.

Se il fotone emesso ha la stessa energia del fotone incidente allora si parla di *scattering* di Rayleigh e in questo caso la molecola viene eccitata dallo stato vibrazionale $v=0$ dello stato elettronico fondamentale allo stato eccitato virtuale, quindi decade al livello vibrazionale $v=0$ dello stato elettronico fondamentale.

Se invece il fotone emesso ha energia inferiore al fotone distrutto allora siamo in presenza di *scattering* Raman-Stokes e in questo caso la molecola viene eccitata dallo stato vibrazionale $v=0$ dello stato elettronico fondamentale allo stato eccitato virtuale, quindi decade istantaneamente al livello vibrazionale $v=1$ dello stato elettronico fondamentale. Si osserva che la differenza di energia assorbita ed emessa ($\hbar\omega_L - \hbar\omega_S$) corrisponde proprio all'energia del quanto vibrazionale coinvolto.

Nell'ultimo caso il fotone emesso ha energia superiore a quello incidente, questo perché la molecola per effetto termico si trova già al livello vibrazionale $v=1$ dello stato elettronico fondamentale, quindi avviene l'eccitazione allo stato eccitato virtuale, dopodiché la molecola decade al livello vibrazionale $v=0$ dello stato

elettronico fondamentale, quindi l'energia del fotone emesso vale $\hbar\omega_S = \hbar\omega_L + \hbar\omega_i$ dove $\hbar\omega_i$ è l'energia del quanto vibrazionale. Quest'ultimo caso genera il ramo anti-Stokes dello spettro.

Quando la frequenza del raggio laser incidente è prossima o corrisponde a quella di una transizione elettronica del campione in esame si parla di Raman risonante. In questo caso i segnali rilevati sono più intensi ma la larghezza di banda resta comunque quella tipica di uno spettro vibrazionale.

Il fenomeno del Raman *scattering*, dal punto di vista classico, prevede che l'oscillazione del dipolo indotto (μ_{ind}) causata da un campo elettrico incidente su una molecola generi r.e.m. in tutte le direzioni. Il dipolo indotto a sua volta dipende da α , ovvero la polarizzabilità molecolare, che corrisponde ad una deformazione della nube elettronica dovuta al fatto che gli elettroni tendono a seguire il campo elettrico applicato (eq.ni 1.4).

$$\begin{aligned} \vec{\mu}_{ind} &= \alpha \cdot \vec{E}(t) \\ \text{con } \vec{E}(t) &= \vec{E}_0 \cos(\omega_L t) \quad (\text{Eq.ni 1.4}) \end{aligned}$$

Tuttavia la polarizzabilità molecolare non è una quantità costante ma fluttua a seguito delle vibrazioni molecolari e può essere espansa in serie di Taylor sulle coordinate normali di vibrazione Q_i (Eq.ni 1.5):

$$\alpha = \alpha_0 + \left(\frac{\partial \alpha}{\partial Q_i} \right)_0 Q_{0,i} \cos(\omega_i t) + \dots \quad (\text{Eq.ni 1.5})$$

Introducendo questa espressione in quella del momento di dipolo indotto, si ottiene la seguente espressione:

$$\begin{aligned} \vec{\mu}_{ind} &= \alpha_0 \vec{E}_0 \cos(\omega_L t) + \frac{1}{2} \left(\frac{\partial \alpha}{\partial Q_i} \right)_0 Q_{0,i} \vec{E}_0 \{ \cos[(\omega_L - \omega_i)t] + \cos[(\omega_L + \omega_i)t] \} \\ & \quad (\text{Eq. 1.5bis}) \end{aligned}$$

L'equazione 1.5bis dimostra che il dipolo indotto oscilla alle frequenze ω_L (*scattering* di Rayleigh), $\omega_L - \omega_i$ (*scattering* Raman, ramo Stokes) e $\omega_L + \omega_i$ (*scattering* Raman, ramo anti-Stokes).

Le 1.5 forniscono anche la regola di selezione per la spettroscopia Raman ovvero:

$$\left(\frac{\partial \alpha}{\partial Q_i} \right)_0 \neq 0$$

(Eq. 1.6)

Quindi risultano Raman-attivi solamente i modi vibrazionale per cui si ha una variazione della polarizzabilità.

In conclusione, l'utilizzo della spettroscopia Raman è vantaggioso per i seguenti motivi:

- È semplice da eseguire;
- I segnali sono stabili;
- Vetro e acqua non interferiscono sulle misure a causa dei modi vibrazionali non Raman attivi;
- È un tipo di spettroscopia non invasiva;

Per quanto riguarda questo progetto di tesi, la caratteristica più importante riguarda la capacità di *fingerprint*, tipica delle spettroscopie vibrazionali.

Questa peculiarità rende possibile distinguere la presenza di molecole diverse in un unico spettro e in questo caso si parla di spettroscopia in modalità *multiplexing*.

Importanti aumenti del segnale Raman si ottengono se le molecole si trovano nelle vicinanze di nanoparticelle metalliche.

In questo caso si ottengono segnali notevolmente intensificati e si parla quindi di *Surface Enhanced Raman Spectroscopy*, ovvero SERS.

1.2.1 Spettroscopia SERS

La spettroscopia SERS nasce alla fine degli anni '70 quando Van Duyne *et al.* [28] osservano un aumento dell'intensità del segnale Raman attribuibile all'adsorbimento di specie chimiche su superfici metalliche rugose.

L'aumento di intensità era di diversi ordini di grandezza superiore rispetto all'intensità registrata in assenza del metallo e infatti studi condotti successivamente hanno confermato che lo *scattering* Raman può subire un'amplificazione (*enhancement*) quando specie molecolari si trovano in prossimità di una superficie metallica rugosa o con *pattern* nanometrici.

Successivamente è stato realizzato che l'eccitazione dei plasmoni di superficie era la causa principale dell'*enhancement* dei segnali Raman.

Con la spettroscopia SERS si può avere un'amplificazione del segnale pari a 10^4 - 10^8 volte rispetto al Raman classico ed è possibile raggiungere un *enhancement* di addirittura 10^{14} volte quando il SERS è accoppiato con il Raman risonante. Nell'ultimo caso si parla di SERRS (*Surface Enhanced Resonance Raman Scattering*).

Con questi valori di *enhancement* tale spettroscopia raggiunge una sensibilità tale da permettere di rilevare una singola molecola. [29,30]

Esistono due principali meccanismi, tutt'ora oggetto di studio, ritenuti responsabili dell'effetto SERS:

- 1) Meccanismo elettromagnetico
- 2) Meccanismo chimico

Il primo contribuisce maggiormente all'*enhancement* mentre il secondo solo limitatamente.

1.2.1.1 Meccanismo di *enhancement* elettromagnetico

Il campo elettromagnetico di una radiazione incidente su una superficie di una nanoparticella può essere notevolmente amplificato se ci si trova in condizioni di risonanza plasmonica.

Il meccanismo di *enhancement* elettromagnetico è basato sull'amplificazione dei campi elettromagnetici della radiazione laser incidente e della radiazione di *scattering* Raman dovuta all'interazione con il plasmone di superficie .

In sostanza, la luce proveniente dal laser eccita i plasmoni di superficie che iniziano ad oscillare generando un campo elettrico dipolare (par. 1.1.1.1). L'interazione coerente tra il campo elettrico incidente e il campo elettrico dipolare porta ad una redistribuzione e amplificazione delle intensità del campo elettrico attorno alla nanoparticella metallica. Una molecola in prossimità della superficie, o adsorbita, risente dell'intensità amplificata del campo e quindi lo *scattering* Raman di questa molecola risulterà anch'esso amplificato. Si può pensare alla nanoparticella metallica come ad una piccola antenna che amplifica e trasmette la radiazione diffusa Raman.

Si consideri una nanoparticella di forma sferica.

Quando la radiazione laser è in risonanza con il plasmon di superficie, la nanosfera irradia un campo elettrico dipolare E_{SP} . L'entità di tale campo sulla molecola vicina alla superficie dipende dal raggio r della nanoparticella, la distanza d dalla molecola, la costante dielettrica ϵ del metallo e del mezzo (ϵ_0) e dal campo elettrico incidente E_0 [30]:

$$E_{SP} = \frac{\epsilon - \epsilon_0}{\epsilon + 2\epsilon_0} \left(\frac{r}{r+d} \right)^3 E_0 \quad (\text{Eq. 1.7})$$

La molecola risente di un campo elettrico locale [30]:

$$E_M = E_0 + E_{SP} \quad (\text{Eq. 1.8})$$

e come si deduce dalla 1.7 è tanto più grande quanto più la molecola è vicina alla superficie ($d \rightarrow 0$).

Il fattore di *enhancement* $A(\nu)$ nel punto in cui si trova la molecola è dato dal rapporto E_M / E_0 .

Il fattore di *enhancement* elettromagnetico del SERS, G_{SERS} , è determinato dal prodotto dei fattori di *enhancement* $|A(\nu_L)|^2$ e $|A(\nu_S)|^2$ dei campi elettromagnetici del laser e dello *scattering* Raman rispettivamente.

G_{SERS} è particolarmente elevato in condizioni di risonanza, ovvero quando

$\text{Re}(\epsilon) = -2\epsilon_0$ e la parte immaginaria di ϵ è piccola.

La potenza del segnale SERS, P_{SERS} , dipende dal numero di molecole N implicate nel processo, dall'intensità della radiazione laser I_L , dai due fattori di *enhancement* $|A(\nu_L)|^2$ e $|A(\nu_S)|^2$ e dalla sezione d'urto delle molecole adsorbite σ_{ads}^R [30]:

$$P_{SERS} \propto N \cdot I_L \cdot |A(\nu_L)|^2 \cdot |A(\nu_S)|^2 \cdot \sigma_{ads}^R \quad (\text{Eq. 1.9})$$

Da queste considerazioni è possibile osservare che il fattore di *enhancement* G_{SERS} e la potenza P_{SERS} sono proporzionali alla quarta potenza dell'*enhancement* del campo elettromagnetico.

L'*enhancement* dipende dal tipo di metallo, dalla forma e dimensione delle nanoparticelle e dalla frequenza della luce incidente.

In linea di principio ogni metallo può essere usato come substrato per fare spettroscopia SERS, ma oro, argento e in minor misura anche il rame, sono i substrati migliori perché la condizione di risonanza plasmonica si verifica nell'UV-Visibile e molti dei laser che si usano in spettroscopia Raman hanno lunghezze d'onda in questa regione dello spettro. Inoltre la componente immaginaria della costante dielettrica dei metalli da conio, che è proporzionale al *damping* del plasmone di superficie, è bassa.[30,31]

1.2.1.2 Meccanismo di *enhancement* chimico

Il meccanismo di *enhancement* chimico è supportato più che altro da evidenze sperimentali e si suppone che agisca in concomitanza con il meccanismo elettromagnetico.

È stato visto infatti che molecole simili possono presentare differenti intensità dei segnali SERS sotto le stesse condizioni di misura. Il meccanismo elettromagnetico è un fenomeno non selettivo e quindi non dipende dal tipo di molecola adsorbita sulla superficie. Si suppone che l'ulteriore contributo al segnale SERS, non spiegabile con la teoria dell'*enhancement* elettromagnetico, provenga da un meccanismo diverso.

Il meccanismo di *enhancement* chimico ipotizza che l'interazione adsorbato-metallo comporti una modifica degli stati elettronici della molecola adsorbita e/o la comparsa di nuovi stati a causa di fenomeni di trasferimento di carica tra metallo e adsorbato e *vice versa*.

A supporto dell'ultima ipotesi abbiamo il fatto che spesso orbitali HOMO e LUMO dell'adsorbato sono disposti simmetricamente, in termini energetici, rispetto all'energia di Fermi del metallo(Fig. 1.17).

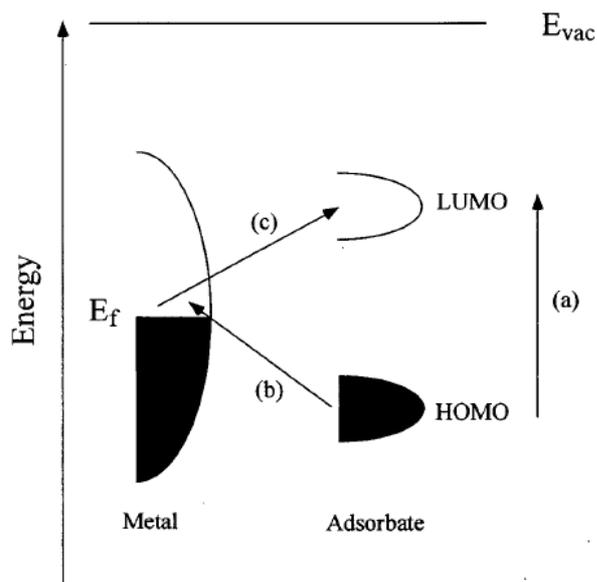


Figura 1.17: interazioni tra orbitali molecolari e stati elettronici del metallo. Sono evidenziati i possibili fenomeni di trasferimento di carica.

In questo caso i trasferimenti di carica tra metallo e molecola (o il contrario) possono avvenire ad un'energia pari alla metà di quella dell'eccitazione elettronica della molecola in assenza del metallo.

Ad ogni modo, si suppone che la diseccitazione elettronica del sistema avvenga per emissione di un fotone con frequenza tipica dei fotoni dello *scattering* Raman e che quindi ci sia un aumento della sezione d'urto di *scattering*.

In conclusione la differenza tra i due meccanismi, elettromagnetico e chimico, sta nel fatto che nel primo l'intensità del segnale aumenta a causa dell'amplificazione del campo elettrico, nel secondo l'amplificazione è dovuta all'aumento della sezione d'urto di *scattering*. [30,31]

1.2.2 *Hot spots e SERS reporters*

Finora è stato considerato unicamente il caso di una particella sferica isolata; tuttavia è possibile ottenere un ulteriore *enhancement* del segnale SERS (dell'ordine di 10^{11}) quando ci si trova in presenza di aggregati di nanoparticelle.

Evidenze sperimentali e calcoli teorici mostrano che avvicinando due nanoparticelle sferiche ad una distanza inferiore a 5nm, nel punto intermedio tra le due, si manifesta un'amplificazione del campo elettrico locale di diversi ordini di grandezza superiore rispetto a quando le nanoparticelle sono isolate.

Questo *enhancement* del campo elettrico deriva dall'interferenza costruttiva della risonanza plasmonica di superficie delle due particelle e la regione interparticellare in cui si sperimenta questa amplificazione di campo è chiamata *hot spot* (Fig. 1.18).

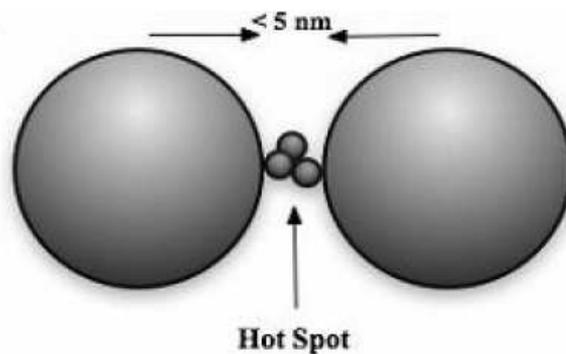


Figura 1.18: rappresentazione di un *Hot spot* tra due nanoparticelle

I segnali SERS quindi aumentano notevolmente quando le molecole da rilevare si trovano in un *hot spot* anziché sulla superficie di una nanoparticella isolata. Studiando geometrie con *clusters* costituiti da più di due particelle i risultati non hanno prodotto innalzamenti maggiori; questo perché non è possibile avere tre o più particelle tutte molto vicine tra loro, così da ottenere lo stesso incremento.[33,34]

Tuttavia recenti studi hanno mostrato che le dimensioni delle nanoparticelle che formano l'*hot spot* hanno una certa influenza sul fattore di *enhancement* del SERS. Questo risulta particolarmente amplificato quando le due nanoparticelle hanno dimensioni molto simili.[32]

Il fattore determinante resta comunque la distanza interparticellare: se è troppo grande l'effetto SERS è fortemente ridotto.

Come si vedrà nella sezione sperimentale di questa tesi, le nanoparticelle d'oro vengono fatte aggregare in modo che si formino degli *hot spots*, all'interno dei quali successivamente vengono inserite delle molecole di colorante.

Queste molecole saranno poi facilmente rilevabili mediante l'utilizzo della spettroscopia SERS ed è per questo che prendono il nome di SERS *reporters*.

1.2.3 Quenching della fluorescenza

Come è stato già accennato, in questo progetto di tesi le AuNP vengono funzionalizzate con coloranti diversi i quali dovranno risultare distinguibili tramite misure SERS in modalità *multiplexing*.

Affinchè sia possibile registrare uno spettro vibrazionale appare ovvia la necessità di “abbattere” i processi di fluorescenza tipici dei coloranti.

Sperimentalmente si può notare che l'adsorbimento di un colorante su nanoparticelle metalliche provoca un'alterazione dei meccanismi di diseccitazione degli stessi il che si traduce in un abbattimento, o *quenching*, della fluorescenza.

Il *quenching*, oltre che radiativamente, può avvenire per interazioni intermolecolari (tra molecole adsorbite sulla stessa NP), per trasferimento energetico e per trasferimento elettronico (Fig. 1.19).[35]

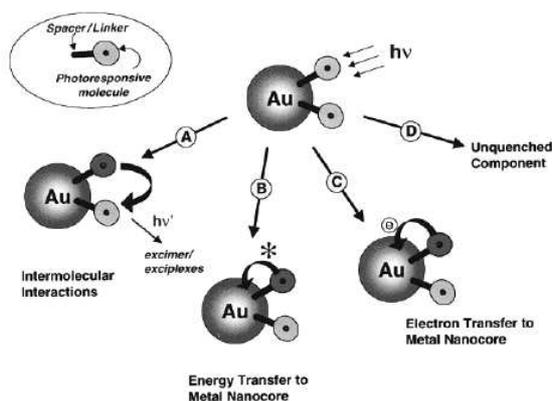


Figura 1.19: meccanismi di diseccitazioni di coloranti su AuNP.

Non ci si soffermerà oltre sull'argomento; in questa sede l'importanza del *quenching* risiede unicamente nel fatto che permette di registrare spettri vibrazionali tramite spettroscopia SERS con un basso contributo di fluorescenza.

1.2.4 SERS applicato al *biosensing*

Come è stato visto, la spettroscopia SERS può essere utilizzata nell'acquisizione di spettri Raman di piccole molecole quando si trovano in prossimità o adsorbite sulla superficie, ad esempio, di una nanoparticella.

Il SERS però può essere sfruttato anche nel riconoscimento di molecole biologiche (*biosensing*) come lipidi, zuccheri, acidi nucleici, proteine ecc. e per il *sensing in vivo* e *in vitro* di materiale biologico.[1,2,3,9,30,36]

Il *biosensing* tramite spettroscopia SERS può essere effettuato in due modi: intrinseco ed estrinseco.

Nel primo caso lo spettro Raman registrato è quello dell'analita di interesse; a tal proposito si riporta un esperimento implementato da Van Duyne et al. per il *sensing in vivo* della concentrazione di glucosio in un topo.[30,37]

Un substrato di argento rugoso è stato impiantato chirurgicamente sotto la pelle di un topo in modo da entrare in contatto con i fluidi interstiziali della cavia. Le molecole di glucosio si adsorbivano reversibilmente sulla superficie e quindi si poteva monitorarne la concentrazione attraverso l'acquisizione di spettri SERS. La misura era resa possibile grazie ad un vetrino posizionato lungo la linea mediana del dorso dell'animale (Fig. 1.20).

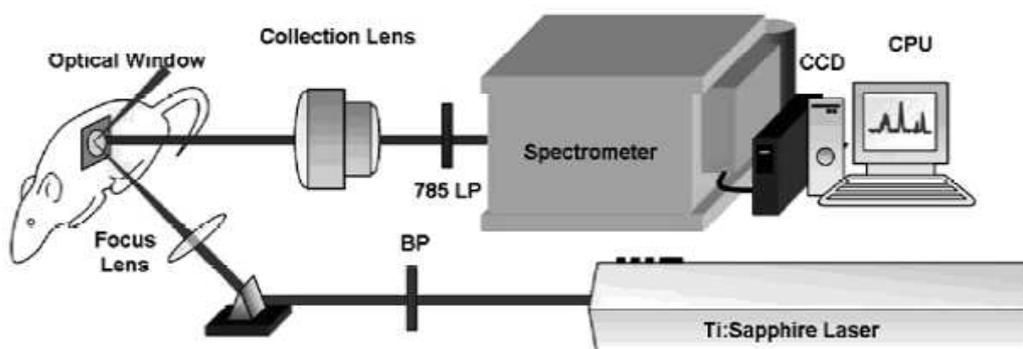


Figura 1.20: Il Set-up dell'esperimento di Van Duyne e colleghi per il *sensing in vivo* del glucosio su un ratto.

Nel *biosensing* con SERS estrinseco invece lo spettro acquisito è quello di un colorante efficace nel dare diffusione Raman. Se si riesce ad associare la presenza del colorante a quella dell'analita cercato allora è possibile eseguire misure analitiche di tipo sia qualitativo che quantitativo.

1 – INTRODUZIONE

Misure di SERS estrinseco sono oggetto di questa tesi, infatti come si vedrà nella parte sperimentale, gli aggregati di nanoparticelle sono funzionalizzati in modo da effettuare *targeting* su cellule tumorali. Gli spettri SERS che verranno registrati non sono quelli di materiale biologico tumorale ma quelli del colorante con cui le AuNP sono funzionalizzate. Potendo far riconoscere alle particelle le cellule tumorali, i segnali SERS indicheranno questo tipo di cellule.

1.3 Il cancro: caratteristiche principali

Il cancro, o carcinoma, è caratterizzato da una crescita irregolare di cellule e dalla possibilità della loro diffusione in altre parti del corpo.[40]

Il tumore è una massa di cellule, espressione visibile di un processo di formazione del tessuto neoplastico che può essersi sviluppato per anni.[39]

Si pensa che lo sviluppo del cancro sia dovuto a un susseguirsi casuale di mutazioni genetiche del DNA di cellule che proliferano per molti cicli e per lunghi periodi.

Le cellule tumorali si differenziano da quelle sane per il fatto di mostrare un'anormale proliferazione, dovuta alla latenza nella risposta dei meccanismi intracellulari di controllo.[39] Alla sua proliferazione può essere associata anche un'anomala vascolarizzazione dei tessuti interessati.

Una caratteristica importante legata ai tumori è la presenza dei cosiddetti *markers*, chiamati anche *biomarkers*. Si tratta di sostanze, usualmente di natura proteica, che possono essere trovate nel sangue, in qualche fluido corporeo o nei tessuti e dimostrano la presenza di qualche tipo di cancro nell'organismo.

Alcuni di questi *markers* hanno concentrazioni che sono proporzionali alla massa tumorale, per cui il monitoraggio della loro concentrazione è utile a fini diagnostici o per seguire l'andamento delle terapie in corso.[40]

Il tumore viene diagnosticato come tale quando è sufficientemente differenziato dalle cellule circostanti. Non esiste però un metodo univoco per questa determinazione e di solito si ricorre all'analisi microscopica del tessuto interessato, anche attraverso agenti di contrasto che aiutano il riconoscimento e l'individuazione delle cellule malate (tecniche di *imaging*).

I tumori benigni solitamente rispecchiano i tessuti d'origine. Essi possono svilupparsi e crescere in ogni ambiente, ma non sono invasivi e restano separati dall'ambiente adiacente grazie ad una capsula di tessuto connettivo che li ricopre.[39] Tuttavia possono provocare problemi legati alle dimensioni che raggiungono e alla possibilità di generare pressione sugli organi vicini.

I tumori maligni invece, presentano due importanti caratteristiche distintive: anormalità cellulari rispetto alle cellule vicine sane e l'invasione di tessuti adiacenti. Quest'ultima è la prova definitiva dell'osservazione di un tumore maligno infatti, al contrario dei tumori benigni, essi non hanno un involucro protettivo e crescono in

modo disordinato e disorganizzato; possono quindi penetrare nel sistema linfatico o circolatorio e colonizzare altri siti dell'organismo generando quelle che vengono chiamate metastasi.[39]

1.3.1 Anticorpi: struttura e funzione

Gli anticorpi, o immunoglobuline (Ig), sono glicoproteine che svolgono la funzione di localizzare antigeni esterni e attivare una risposta da parte del sistema immunitario. Sono sintetizzati dai linfociti B e possono essere espressi sulla loro superficie oppure creati in forma solubile e rilasciati nell'organismo.

Gli anticorpi solubili agiscono da mediatori del sistema immunitario legandosi agli antigeni esterni e li neutralizzano segnalandoli al sistema immunitario.

A causa della unicità della loro sintesi, il sistema immunitario è in grado di produrre anticorpi specifici, almeno in teoria, per qualsiasi antigene. Questa è la caratteristica che li rende molto interessanti dal punto di vista sperimentale, terapeutico e diagnostico.

Gli anticorpi possiedono una caratteristica forma a "Y" e sono costituiti da quattro catene polipeptidiche uguali a due a due: due catene pesanti (*heavy chain*) e due leggere (*light chain*) (Fig. 1.20).

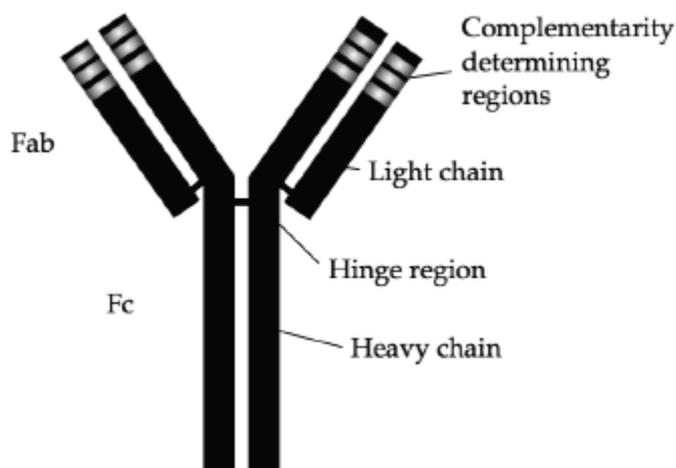


Fig. 1.20: rappresentazione schematica di un anticorpo.

Le quattro catene polipeptidiche sono legate tra loro attraverso una serie di legami disolfurici, covalenti e non covalenti.

Le catene leggere sono formate da un dominio variabile e uno costante, mentre le catene pesanti sono formate da un dominio variabile e da tre o quattro domini costanti.

Ogni regione variabile della catena pesante o della catena leggera contiene tre regioni ipervariabili o CDR (*Complementarity determining regions*). La porzione CDR

dell'anticorpo determina la specificità verso un antigene e contribuisce maggiormente al legame con quest'ultimo.

Il frammento che contiene un'intera catena leggera, legata mediante ponti disolfuro al frammento contenente la regione variabile e il primo dominio costante della catena corrisponde alla porzione dell'anticorpo necessaria per il riconoscimento antigenico, ed è pertanto chiamata Fab (*Fragment Antigen Binding*).

La porzione restante delle catene pesanti prende il nome di Fc, che sta per "frammento cristallizzabile" poiché tale struttura tende a cristallizzare facilmente in soluzione. Il frammento Fc è responsabile della maggior parte delle attività biologiche e delle funzioni degli anticorpi.

Gli anticorpi prodotti da una popolazione di differenti cloni di linfociti trattati con lo stesso antigene vengono definiti "anticorpi policlonali" (pAb); quelli prodotti da un'unica famiglia di cloni di linfociti avranno tutti una identica specificità verso un antigene e vengono invece chiamati "anticorpi monoclonali" (mAb).[38]

1.3.2 Risposte immunitarie verso i tumori

È opinione comune che il potenziamento dell'immunità contro i tumori possa costituire un approccio molto promettente alla terapia del cancro.

Una delle funzioni fisiologiche dell'immunità acquisita è la prevenzione della crescita di cellule trasformate e la loro distruzione prima che generino una massa tumorale; questo fenomeno è stato chiamato "sorveglianza immunologica". Molti dati sperimentali suffragano l'ipotesi che la sorveglianza immunologica svolga un ruolo importante nella prevenzione della crescita tumorale; tuttavia, la constatazione che i tumori si sviluppino in soggetti peraltro perfettamente attivi dal punto di vista immunologico sembra suggerire che la risposta anti-tumorale sia spesso debole, e facilmente superabile da tumori in rapida crescita.

Come già accennato, le neoplasie esprimono vari tipi di molecole che possono essere riconosciute come estranee dal sistema immunitario. Se il sistema immunitario di un individuo risponde ad un tumore, evidentemente questo esprime antigeni riconosciuti come *non-self* (estranei).

Nei tumori sperimentali, indotti da carcinogeni chimici o da radiazioni, gli antigeni sono costituiti da forme mutate di proteine cellulari normali.

In molte neoplasie umane spontanee invece, gli antigeni che evocano una risposta immunitaria sembrano essere proteine perfettamente normali: esse sono però iperespresse, o la loro espressione, solitamente limitata a particolari tessuti o stadi di sviluppo, è deregolata.

Sebbene non ci si aspetterebbe che questi antigeni *self*-normali siano in grado di generare una risposta immunitaria, la loro espressione aberrante è sufficiente per attivare il sistema immunitario.

Il principale meccanismo attraverso cui il sistema immunitario distrugge i tumori è l'uccisione delle cellule neoplastiche da parte dei linfociti T citotossici (CTL) specifici per gli antigeni tumorali.

Ad ogni modo le risposte immunitarie spesso non riescono a tenere sotto controllo la crescita neoplastica. La risposta immunitaria infatti è quasi del tutto inefficace nel caso di tumori maligni perché questi crescono con una rapidità che supera di gran lunga le potenzialità del sistema immunitario. Inoltre le neoplasie sviluppano particolari meccanismi per sfuggire alle risposte immunitarie. Alcune cellule neoplastiche perdono l'espressione degli antigeni bersaglio della risposta immunitaria: se tali antigeni non sono essenziali per il mantenimento del fenotipo neoplastico, la variante tumorale continua a crescere e a disseminarsi indisturbata.

La terapia di tumori disseminati che non possono essere operati chirurgicamente si basa attualmente sulla chemioterapia e sulla radioterapia, che hanno spesso effetti collaterali devastanti sui tessuti normali.

Dato che la risposta immunitaria è altamente specifica, si è a lungo sperato che l'immunità anti-tumorale potesse essere sfruttata per combattere selettivamente i tumori senza danneggiare i tessuti sani.

In molte forme di cancro sono stati sperimentati anticorpi monoclonali rivolti verso vari antigeni tumorali, spesso coniugati con potenti tossine; tali anticorpi si legano al bersaglio cellulare attivando il sistema immunitario dell'ospite o veicolando le tossine all'interno della cellula neoplastica.

Il trattamento terapeutico del paziente con tecniche immunologiche è detto immunoterapia.

Molte strategie innovative di immunoterapia dei tumori si basano sulla stimolazione della risposta immunitaria del paziente nei confronti delle cellule neoplastiche, ad esempio attraverso la vaccinazione con le cellule del suo stesso tumore o con

antigeni da esse derivati. Un'altra tecnica denominata "immunoterapia cellulare adottiva" consiste nell'inoculare nel paziente linfociti tumore-specifici.[38]

1.3.3 Il cancro alla prostata

Un tipo di cancro molto diffuso è quello alla prostata.

La prostata è una ghiandola dell'apparato genitale maschile con la funzione di secernere il liquido seminale.

Nel 2003-2005, il cancro della prostata ha rappresentato il 20,5% di tutti i tumori incidenti esclusi gli epitelomi della cute e l'8,6% di tutti i decessi per cancro tra gli uomini. Il cancro prostatico è risultato al primo posto per numero di casi e al terzo posto tra le cause più frequenti di morte neoplastica negli uomini. Nel 2006, in Italia, i decessi per cancro prostatico sono stati 7.460 (dati Airtum).[41]

Il rischio di contrazione del cancro alla prostata aumenta con l'invecchiamento, in particolare dopo i 50 anni.

Gli attuali metodi di *screening* consistono nella rilevazione nel sangue dell'antigene PSA (*Prostate Specific Antigen*) oppure in un esame digitale rettale. La diagnosi viene confermata comunque tramite una biopsia della prostata in cui viene prelevata una parte del tessuto.

Altri antigeni, oltre al PSA, che vengono sovra-espressi dalle cellule tumorali del cancro alla prostata sono il PSMA (*Prostate Specific Membrane Antigen*) e il PSCA (*Prostate Stem Cell Antigen*).

PSMA e PSCA possono essere riconosciuti da anticorpi specifici. In questa tesi verranno usati due anticorpi specifici che vengono chiamati D2B e 4C4. Il primo consente il riconoscimento di PSMA mentre il secondo quello di PSCA.

1.3.4 Nanoparticelle d'oro per *targeting*, *imaging* tumorale e immunosaggi

Negli ultimi anni diversi gruppi di ricerca hanno riportato lavori e studi sul *targeting* e *imaging* tumorale con nanoparticelle d'oro funzionalizzate con anticorpi.

El Sayed *et al.* hanno funzionalizzato AuNP con anticorpi monoclonali per l'antigene specifico del cancro orale. Le nanoparticelle sono state successivamente incubate con

diverse linee cellulari: una linea di cellule epiteliali non maligne, e due linee cellulari maligne del cancro orale. Utilizzando la microscopia *dark-field* e acquisendo gli spettri di assorbimento è stato riscontrato che le nanoparticelle coniugate con gli anticorpi si legavano specificatamente alla superficie delle cellule tumorali, con un'affinità del 600% maggiore rispetto alle cellule non cancerose.[42]

Un esempio di *targeting* e *imaging in vivo* lo hanno riportato Qian *et al.* nel 2008 utilizzando AuNP funzionalizzate con molecole *reporters* che mostrano attività SERS, PEG tiolato come stabilizzante e un PEG eterofunzionale (HS-PEG-COOH) che tramite il tiolo si lega alla AuNP e tramite il carbossile si lega ad un frammento di anticorpo per l'antigene specifico EGFR delle cellule cancerose (Fig. 1.21).[43]

Dopo aver iniettato questi nanosistemi nell'apparato circolatorio di un topo da laboratorio con una massa tumorale che poteva essere riconosciuta da quel preciso anticorpo, sono stati ottenuti degli spettri SERS con laser a 785 nm sia sulla zona malata che su tessuti sani per esempio del fegato. Più precisamente sono stati ottenuti spettri SERRS perché le molecole *reporters* impiegate possedevano transizioni elettroniche in corrispondenza della lunghezza d'onda di eccitazione del laser.

Come si può vedere in figura 1.22, i picchi Raman sono evidenti solo nel sito tumorale e non sono presenti nemmeno quando si utilizzano NP prive dell'anticorpo. Studi quantitativi di biodistribuzione ottenuti tramite la spettrometria ICP-MS, *Inductively Coupled Plasma-mass Spectrometry*, hanno inoltre rivelato che le AuNP funzionalizzate per il *targeting* attivo si sono accumulate nel sito tumorale 10 volte più efficacemente rispetto a quelle non funzionalizzate con l'anticorpo e nonostante si siano trovate nanoparticelle nel fegato e nella milza, non sono state rinvenute tracce di esse nel cervello, nei muscoli o in altri organi maggiori.

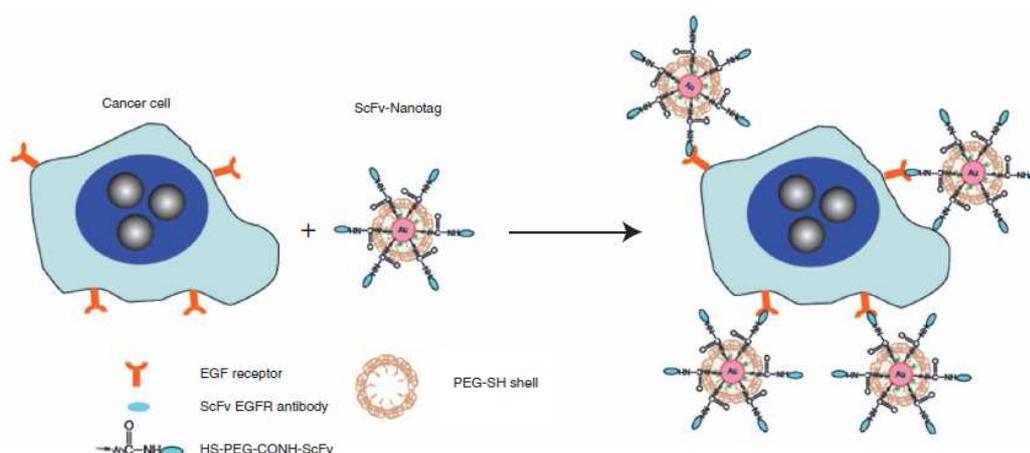


Figura 1.21: schema dell'interazione tra nano sistema e cellula tumorale nel lavoro di Qian *et al.*

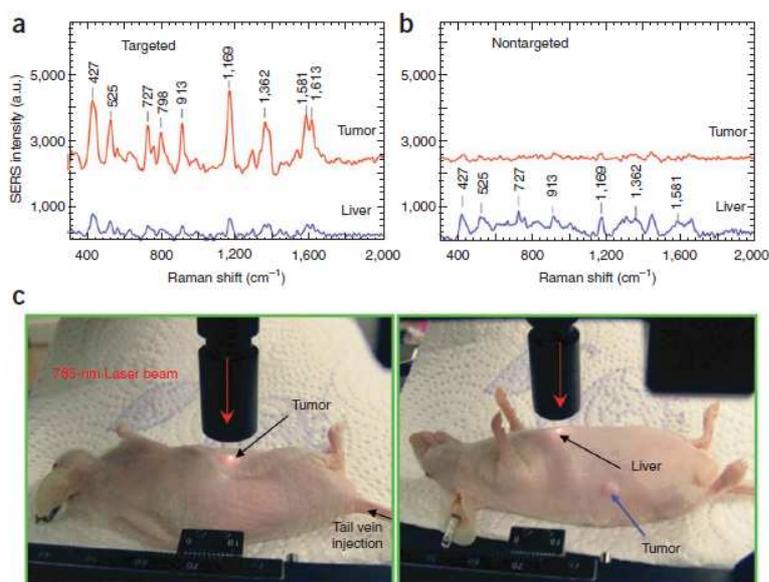


Figura 1.22: *targeting in vivo*. (a) spettri SERS delle AuNP con anticorpo rilevati nel sito tumorale.

(b) Gli spettri SERS nel tumore non sono stati rilevati in caso di particelle senza anticorpo.

(c) Set-up sperimentale

Da osservazioni sul rapporto s/n degli spettri si stima che la massima profondità entro la quale il tumore risulta rilevabile sia di 1-2cm usando lunghezze d'onda del NIR, tra 700 e 900 nm poiché in questa regione dello spettro gli assorbimenti di acqua ed emoglobina non sono rilevanti e quindi non causano interferenze.

Oltre all'applicazione per il *targeting* e *imaging* sia *in vivo* che *in vitro*, AuNP funzionalizzate con anticorpi, SERS reporters e uno stabilizzante, possono essere impiegate negli immunosaggi come il test ELISA per aumentarne la sensibilità (vedi par. 3.6 *Utilizzo dei nanosistemi nel test ELISA*).

In un articolo di Grubisha *et al.* del 2003 è stato messo a punto un immunosaggio in grado di rilevare concentrazioni femto-molari di antigene PSA utilizzando AuNP funzionalizzate con un SERS reporter e un anticorpo specifico per tale antigene.

Il *set-up* sperimentale è illustrato in figura 1.23 e il funzionamento è quello di un tipico immunosaggio di tipo *sandwich*: in un substrato vengono immobilizzati degli anticorpi di cattura che riconoscono degli antigeni specifici. Nello *step* successivo il substrato viene trattato con la soluzione di AuNP funzionalizzate che, possedendo anch'esse un anticorpo opportuno, si legano all'antigene di cui sopra. Dopo alcuni lavaggi per eliminare eventuali AuNP non legate, si eseguono misure SERS sul substrato. È stato visto che il segnale è proporzionale alla concentrazione dell'antigene e che la sensibilità è superiore agli immunosaggi convenzionali.

Ma non è tutto, il punto di forza consiste nella possibilità di rilevamento di diversi analiti sfruttando la spettroscopia SERS in modalità *multiplexing*, ad esempio fissando al substrato anticorpi di cattura differenti (che quindi cattureranno antigeni differenti) e utilizzando nanoparticelle con SERS *reporters* e anticorpi diversi.[44]

Questo non è possibile negli immunosaggi convenzionali che si basano su spettroscopie di assorbimento e fluorescenza.

In conclusione le nanoparticelle funzionalizzate con molecole SERS *reporters* stanno suscitando un interesse sempre maggiore nel campo della nanomedicina poiché, sfruttando le capacità *multiplexing* della spettroscopia Raman, è possibile rilevare simultaneamente due o più marcatori biologici, cosa che non è possibile ottenere con le tecniche di *imaging* ottiche.

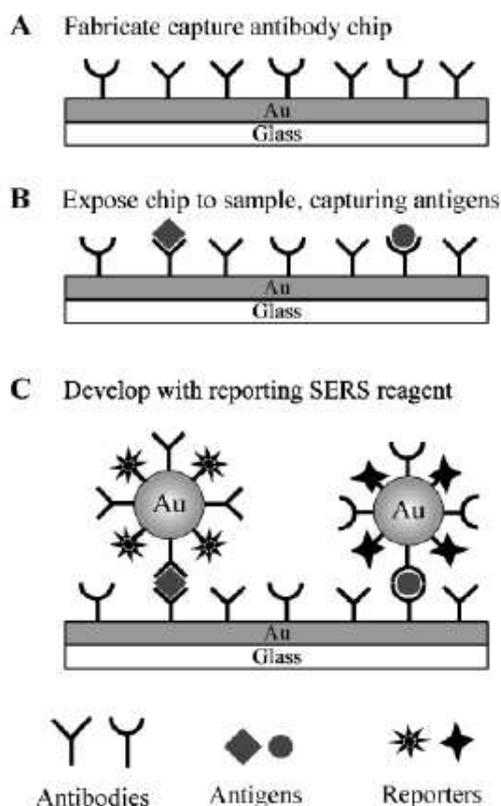


Figura 1.23: immunosaggio per la determinazione di antigeni differenti utilizzando spettroscopia SERS in modalità *multiplexing*

2. SCOPO DELLA TESI

L'obiettivo di questo lavoro di tesi è la sintesi e la caratterizzazione di nanoparticelle d'oro funzionalizzate per il *targeting* e *imaging in vitro* di cellule tumorali del cancro alla prostata e la loro applicazione nel saggio immunologico ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) di tipo *sandwich*.

Le AuNP sono state sintetizzate mediante ablazione laser in ambiente acquoso e successivamente sono state fatte aggregare in modo da formare gli *hot spots* necessari per ottenere un *enhancement* del segnale SERS. Si procede quindi alla funzionalizzazione con un colorante per ottenere un segnale SERS, un anticorpo monoclonale per il *targeting* attivo e infine un poli-etilenglicole tiolato che stabilizza il nanocomposito e lo rende biocompatibile.

Per quanto riguarda il *targeting* e l'*imaging* di cellule tumorali sono state utilizzate due preparazioni provenienti da un precedente lavoro di tesi, pertanto la loro sintesi e caratteristiche verranno solamente accennate e ci si concentrerà sulla verifica della specificità del *targeting* mediante misure micro-Raman in modalità *multiplexing* che invece sono state oggetto di questa tesi.

Verranno poi esposte la sintesi, la caratterizzazione e i risultati preliminari di cinque preparazioni utilizzate nel test ELISA. Esse si differenziano per i diversi SERS *reporters* e i diversi anticorpi con cui sono funzionalizzate.

Oggetto della presente tesi è anche l'ottimizzazione di alcuni passaggi del processo di sintesi dei nanosistemi. In particolare si vedrà quali sono i parametri che influiscono sul controllo dell'aggregazione e sull'intensità del segnale SERS.

Il presente lavoro di tesi è stato possibile grazie alla collaborazione con la sezione di Immunologia del Dipartimento di Patologia dell'Università di Verona e in particolare con il Prof. Marco Colombatti, il Dr. Giulio Fracasso e il loro gruppo di ricerca, che hanno fornito gli anticorpi monoclonali e hanno condotto gli esperimenti con le cellule e il test ELISA.

3. PARTE SPERIMENTALE

3.1 Sintesi delle nanoparticelle d'oro per ablazione laser

3.1.1 Apparato strumentale

L'apparato strumentale utilizzato per la sintesi delle nanoparticelle d'oro consiste in un laser impulsato, una lente di focalizzazione del fascio avente una focale di 40 cm e uno specchio a 45° che riflette la radiazione all'interno della cella di ablazione in cui si trovano la soluzione liquida e il *target* metallico. Il laser impiegato è un laser Nd:YAG, (modello YG-981E-10® della *Quantel*), avente come mezzo attivo un cristallo di granato di ittrio e alluminio (*yttrium aluminium garnet*, $Y_2Al_5O_{12}$) drogato con ioni Nd^{3+} . Per l'ablazione è stata utilizzata la sua riga fondamentale ($\lambda=1064$ nm), con impulsi della durata di 9 ns e una frequenza di ripetizione di 10 Hz; la potenza impiegata è stata ~ 900 mW, che si traduce in una fluenza di ~ 15 J/cm² sul campione. Quest'ultimo era costituito da un disco di Au 99.9% dello spessore inferiore a 1 mm, posto qualche mm prima del fuoco. È stata adottata questa accortezza per evitare l'ebollizione locale del solvente a causa dell'eccessiva concentrazione di energia nel punto di fuoco. La cella di ablazione, sul fondo della quale era posizionato il dischetto d'oro, è stata riempita con circa 15 mL di una soluzione 10^{-5} M di NaCl in acqua bidistillata.

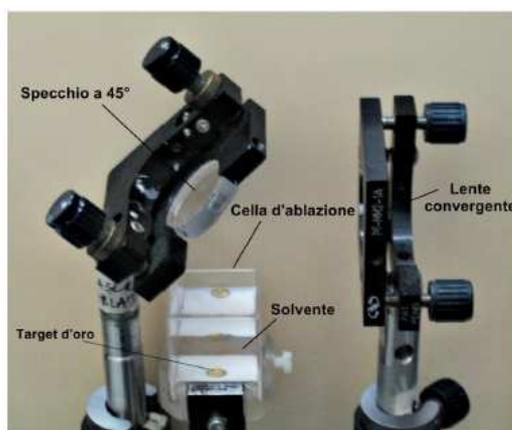


Figura 3.1: apparato strumentale per la sintesi di AuNP per ablazione laser. Il fascio laser proviene da destra e non è visibile ad occhio nudo.

3.1.2 Caratterizzazione delle nanoparticelle d'oro mediante spettrofotometria Uv-Visibile

Dopo qualche minuto dall'inizio dell'ablazione è possibile osservare la formazione delle nanoparticelle poiché dal *target* inizia ad espandersi nella soluzione una nuvola di plasma. Con il passare dei minuti la soluzione all'interno della cella di ablazione inizia ad assumere la colorazione rossa tipica delle AuNP (Fig3.2).

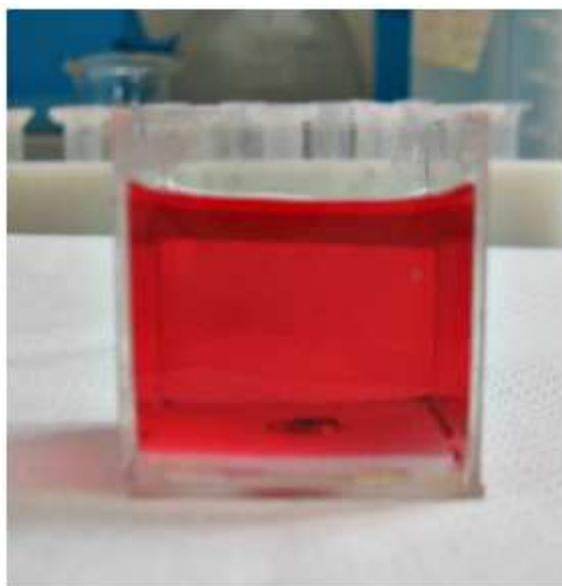


Fig 3.2: soluzione di AuNP colloidali ottenute via LASiS.

Dopo un tempo generalmente compreso tra 20 e 50 minuti, l'ablazione viene fermata e per valutare qualità e concentrazione delle AuNP appena prodotte si adotta una tecnica semplice e veloce: la spettroscopia UV-Visibile. Dall'assorbanza e dalla forma del picco plasmonico infatti è possibile avere una stima della concentrazione e della morfologia delle nanoparticelle.

Lo spettrofotometro utilizzato per raccogliere i dati è un *Varian Cary 5*, e tutti gli spettri sono stati registrati in cuvetta da 2 mm nel *range* 200-1350 nm, acquisendo una misura ad intervalli di 1 nm, con una durata di scansione di 600nm/min. Successivamente, grazie ad un programma di interpolazione di spettri di assorbimento di AuNP (SPRFit, disponibile online e sviluppato dal gruppo di ricerca operante nel laboratorio dove è stato svolto questo lavoro di tesi), si sono potute ricavare informazioni sulla dimensione e morfologia delle particelle basandosi sui modelli di Mie e Gans descritti nel paragrafo 1.1.1.1.[45]

3 – PARTE SPERIMENTALE

In figura 3.3 è riportato un esempio di spettro UV-Vis di AuNP sintetizzate via LASiS con i parametri sopra descritti. Solitamente dopo 20-50 minuti di ablazione l'assorbanza risulta compresa tra 0.10 e 0.30 e il picco plasmonico è centrato intorno a 520nm.

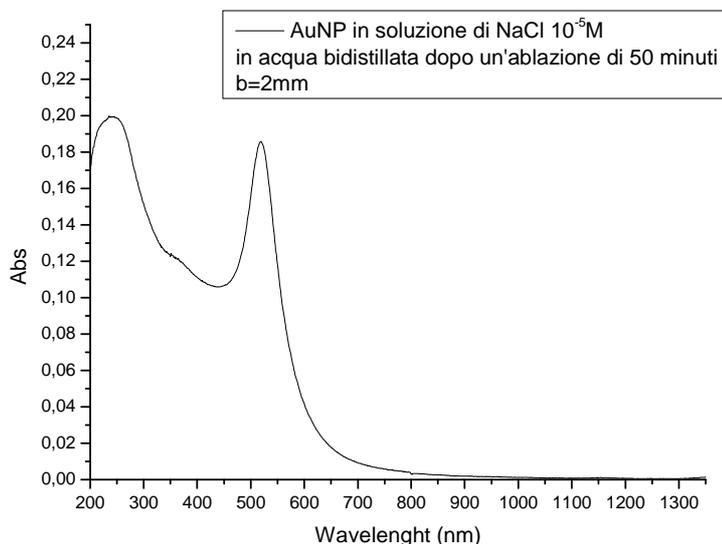


Figura 3.3: spettro UV-Visibile di AuNP sintetizzate via LASiS

In figura 3.4 si riporta un confronto tra lo spettro Uv-Vis delle nanoparticelle di cui sopra e il *fitting* di tale spettro calcolato con il programma SPRfit.

Il programma restituisce i valori riportati nella prima riga della seguente tabella:

R (m)	<i>Spheres</i> %	$1-RSS$	$MaxSPA(m^2)$	$MaxSPA(cm^2)$
8,40E-09	86	0,00033749	1,82E-16	1,82E-12
$\epsilon(M^{-1} cm^{-1})$	<i>Abs</i> (b=2mm 520nm)	<i>mol/L</i>		
4,76E+08	0,19	1,95E-09		

Dove $R(m)$ è il raggio medio delle AuNP in metri, *Spheres* % è la percentuale di particelle sferiche in soluzione, $1-RSS$ è il *residual sum of squares* del *fitting* rispetto ai dati sperimentali (il *fitting* è buono quanto più $1-RSS$ è piccolo) e $MaxSPA$ è la sezione d'urto per particella a 520nm.

3 – PARTE SPERIMENTALE

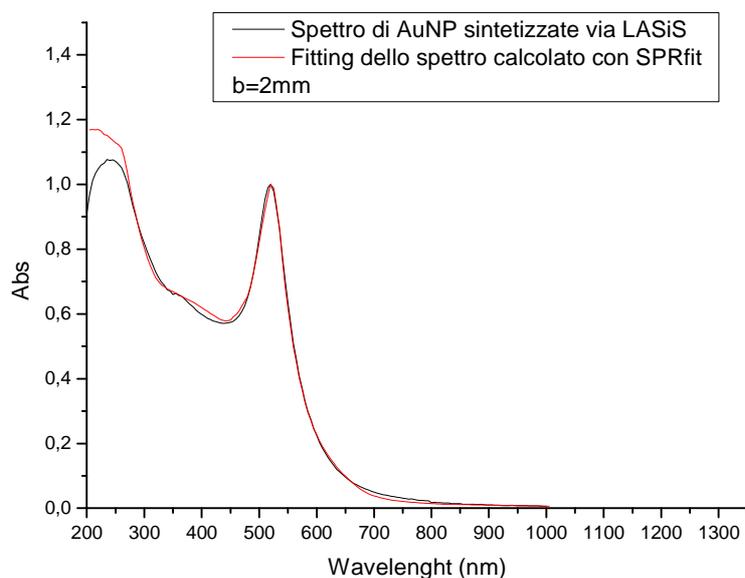


Figura 3.4: confronto tra spettro Uv-vis sperimentale e *fitting* con il programma SPRfit, gli spettri sono normalizzati sul picco di assorbimento plasmonico

Da questi dati è possibile ricavare il coefficiente di estinzione molare dalla equazione 3.1:

$$\varepsilon = \frac{N_A \sigma_{ext}}{\ln 10} \text{ (eq. 3.1)}$$

Mentre dalla legge di Lambert-Beer è possibile ricavare la concentrazione molare:

$$A = \varepsilon b C \text{ (eq. 3.2)}$$

La concentrazione delle AuNP sintetizzate via LASiS con i parametri sopra descritti è risultata sempre dell'ordine di 10^{-9} M mentre il raggio medio è di solito compreso tra 8 e 9nm.

3.2 Aggregazione delle nanoparticelle

Nel capitolo 1 è stata vista l'importanza degli *hot spots* nella preparazione di nano compositi destinati all'*imaging*. Infatti quando il SERS *reporter* si trova nel punto intermedio tra due particelle risente di un campo elettrico ulteriormente amplificato e il segnale Raman-SERS risulta notevolmente più intenso.

Affinché si formino gli *hot spots* è necessario aggregare le nanoparticelle. A tal scopo è stata utilizzata una tecnica “pulita” e semplice: la centrifugazione. Con questa procedura la soluzione di nanoparticelle non viene contaminata dall'introduzione di molecole estranee e la superficie degli aggregati non risulta ingombrata.

Il procedimento consiste in tre passaggi fondamentali anche se, come vedremo in seguito(par. 3.2.1 e 3.2.2), questo procedimento può essere ottimizzato:

- 1) Dalla soluzione di AuNP si preleva un'aliquota (generalmente 0.5-2 ml) e la si trasferisce in una provetta eppendorf;
- 2) La provetta viene messa in centrifuga a 30000g per 10 minuti. Terminata la centrifugazione, la soluzione all'interno della eppendorf appare trasparente e sul fondo si nota un addensamento di colore scuro;
- 3) Si rimuove il surnatante e si riporta a volume con la stessa quantità di acqua bidistillata, quindi si procede a sonicazione in bagno a ultrasuoni fino a quando le nanoparticelle si ridisperdono.

In caso di necessità è possibile ottenere soluzioni di aggregati a concentrazioni maggiori in due modi:

- 1) Al punto 3) si riporta a volume con una quantità inferiore di acqua bidistillata.
- 2) Al punto 3) si porta a volume con un'altra aliquota di AuNP invece che con acqua bidistillata, quindi si sonica e si ripete il procedimento a partire dal punto 2).

Di solito la ridispersione delle AuNP aggregate è immediata mentre in alcuni casi permangono dei sedimenti grossolani sul fondo. Nei casi più estremi gli aggregati non sono disperdibili e restano sul fondo.

L'aggregazione delle nanoparticelle è accompagnata da un viraggio di colore della soluzione da rosso a grigio-blu scuro (Fig. 3.5).

3 – PARTE SPERIMENTALE



Figura 3.5: a sinistra un campione di AuNP isolate, a destra un campione di AuNP aggregate

Il modo migliore per valutare la qualità dell'aggregazione rimane ancora la spettroscopia UV-Visibile infatti, come già accennato nel capitolo 1, la presenza di particelle di forma allungata o aggregati comporta la comparsa di un picco plasmonico longitudinale a lunghezze d'onda maggiori rispetto a quello trasversale a 520nm caratteristico delle nanoparticelle sferiche (Fig. 3.6).

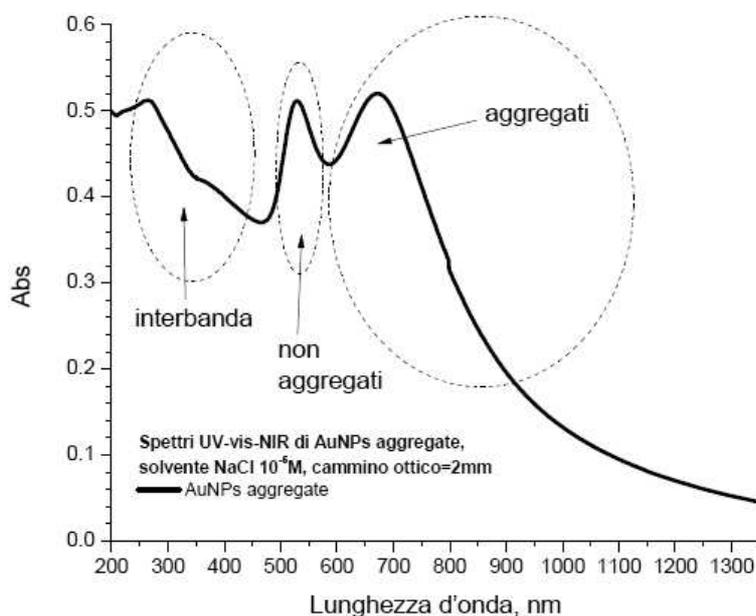


Figura 3.6: spettro UV-Vis-NIR di AuNP sintetizzate via LASiS e aggregate per centrifugazione. Sono evidenziate le tre zone caratteristiche delle transizioni interbanda, delle AuNP aggregate e delle AuNP isolate (non aggregate).

Lo spettro di figura 3.6 è di una soluzione di AuNP sintetizzate per *laser ablation* e poi fatte aggregare per centrifugazione ed è suddivisibile in tre zone: la prima a lunghezze d'onda inferiori a 450nm in cui si trovano le transizioni interbanda, la seconda, indice della quantità di AuNP non aggregate, a 520nm in corrispondenza

del picco plasmonico e la terza a circa 600-700nm dove è situato il picco longitudinale, indice della quantità di aggregati.

Ai fini di questo progetto di tesi, l'aggregazione viene valutata positivamente se lo spettro presenta un picco di assorbimento alto a 600-700nm e un'assorbanza molto bassa a 1000nm. Nella pratica si valuta il rapporto delle assorbanze e l'aggregazione è "buona" quando:

$$\frac{Abs(600-700nm)}{Abs(1000nm)} \geq 4 \text{ (eq. 3.3)}$$

Si cerca di ottenere un'assorbanza bassa a 1000nm perché essa è indice di aggregati molto grossi o di *nanorods*, entrambi meno adatti allo scopo di questa tesi poiché useremo la risonanza plasmonica a 600-700nm per l'eccitazione con il laser dello spettrometro Raman che ha una lunghezza d'onda pari a 633 nm.

Le immagini al TEM (Fig. 3.7) mostrano che questi aggregati hanno una dimensione media di circa 100nm, con un numero medio di 10-20 particelle per aggregato.

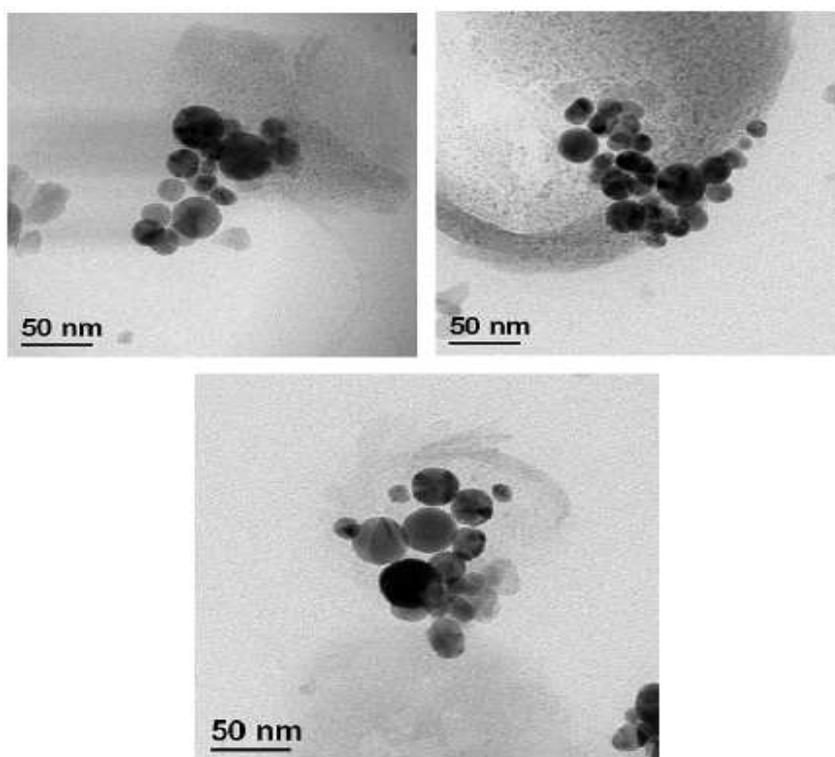


Figura 3.7: immagini al TEM degli aggregati di AuNP

3.2.1 Aggregazione previa diluizione

Nel paragrafo 3.2 si è accennato al fatto che non sempre il procedimento di aggregazione per centrifugazione va a buon fine. Spesso capita che si formino

3 – PARTE SPERIMENTALE

aggregati grossolani e ben visibili ad occhio nudo la cui ridispersione risulta difficile se non addirittura impossibile. Le soluzioni di aggregati grossolani e poco disperdibili presentano uno spettro UV-Vis come quello in figura 3.8.

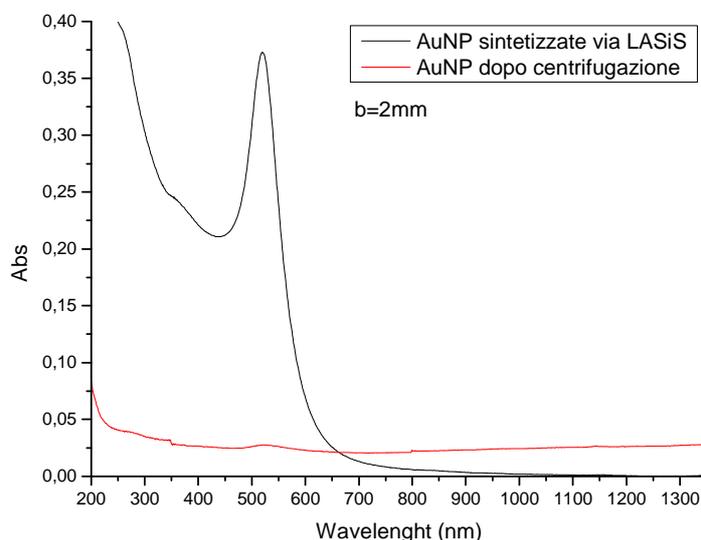


Figura 3.8: spettro di assorbimento di AuNP non aggregate (in nero) e spettro di assorbimento di AuNP dello stesso campione dopo centrifugazione (in rosso) con il procedimento descritto nel paragrafo 3.2.

Nel tentativo di migliorare lo spettro delle particelle aggregate sono stati effettuati degli esperimenti in cui prima di procedere con la centrifugazione le nanoparticelle venivano diluite con delle aliquote diverse di acqua bidistillata. Dopo la rimozione del surnatante le AuNP aggregate sono state riprese con lo stesso volume di acqua bidistillata in cui si trovavano prima della diluizione in modo che la concentrazione finale fosse uguale a quella iniziale. Infine sono stati registrati gli spettri UV-Vis di tutti i campioni.

Tra un passaggio e l'altro è possibile perdere nanoparticelle: esse possono restare attaccate alle pareti della provetta o venire accidentalmente prelevate in minima parte durante l'operazione di rimozione del surnatante. Ciò, ovviamente, porta ad una diminuzione degli assorbimenti negli spettri UV-Vis e quindi il confronto tra questi può risultare più difficile. Allo scopo di ovviare a questo problema tutti gli spettri, salvo diverse indicazioni, saranno normalizzati alla lunghezza d'onda di 450nm. Quest'ultima infatti è la lunghezza d'onda caratteristica delle transizioni interbanda delle AuNP ed è indice della quantità di oro, aggregato o meno, all'interno del campione. Risulta comprensibile quindi che normalizzare gli spettri su tale

3 – PARTE SPERIMENTALE

lunghezza d'onda equivale ad avere gli spettri in cui la concentrazione di Au è veramente la stessa per tutti i campioni.

A titolo di esempio si riportano i risultati dell'esperimento su un campione di nanoparticelle denominato "G" che presenta un'assorbanza iniziale di 0.37(520nm, b=2mm) e una concentrazione di $4.62 \cdot 10^{-9}$ mol/L. In tabella 3.1 vengono riportati i dettagli sulle varie diluizioni, i valori delle assorbanze a 520nm, 600-700nm (in corrispondenza del picco caratteristico degli aggregati) e a 1000nm nonché il rapporto Abs(600-700nm)/Abs(1000nm). In figura 3.9 invece sono riportati gli spettri UV-Vis dei vari campioni.

Campione	AuNP (μL)	H ₂ O bidistillata (μL)	Rapporto di diluizione	Abs 520nm (b=2mm)	Abs 600-700nm (b=2mm)	λ(nm) picco aggregati	Abs 1000nm (b=2mm)	Abs 600-700nm/ Abs 1000nm
G1	500	0	non diluito	1,10	0,80	n.p.	0,90	0,9
G2	500	500	1:1	1,25	1,11	725	0,86	1,3
G3	500	750	1:1.5	1,21	1,00	n.p.	0,96	1,0
G4	500	1000	1:2	1,24	0,95	n.p.	0,94	1,0
G5	500	1500	1:3	1,24	0,95	n.p.	0,94	1,0
G6	500	2500	1:5	1,36	1,33	676	0,36	3,7
G7	500	5000	1:10	1,42	1,33	639	0,16	8,3
G8	500	7500	1:15	1,36	1,46	666	0,22	6,6

Tabella 3.1: con n.p. (non presente) si intende che non è stato rilevato il picco caratteristico degli aggregati tra 600-700nm.

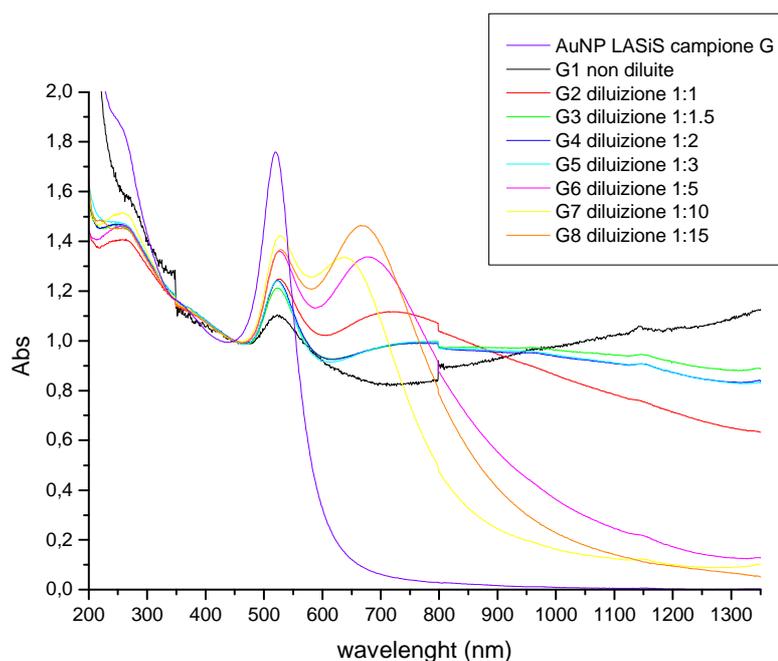


Figura 3.9: spettri UV-Vis dei campioni G(1-8).

3 – PARTE SPERIMENTALE

Quello che si nota osservando gli spettri in figura 3.9 è un netto miglioramento dell'aggregazione all'aumentare della diluizione nonché una diminuzione dell'assorbimento a 1000 nm.

L'andamento dei valori delle assorbanze è riportato nel grafico in figura 3.10 e si osserva che il campione migliore si ottiene diluendo la preparazione G in rapporto 1:10 con acqua bidistillata; come sempre la bontà degli aggregati ottenuti viene valutata in base al rapporto $Abs(600-700nm)/Abs(1000nm)$ (Fig 3.11) in concomitanza con la presenza di un picco poco scodato a 600-700nm.

Con rapporti di diluizioni inferiori il picco degli aggregati scompare lasciando posto ad un'unica grossa banda ad assorbanza costante che va da 600 nm fino al NIR.

La situazione peggiore si ottiene non diluendo le nanoparticelle, in questo caso l'unica cosa che si vede nello spettro è il picco plasmonico, appena visibile dato che presenta un'assorbanza pari a circa l' 8% rispetto a quella delle AuNP appena sintetizzate (Fig. 3.8).

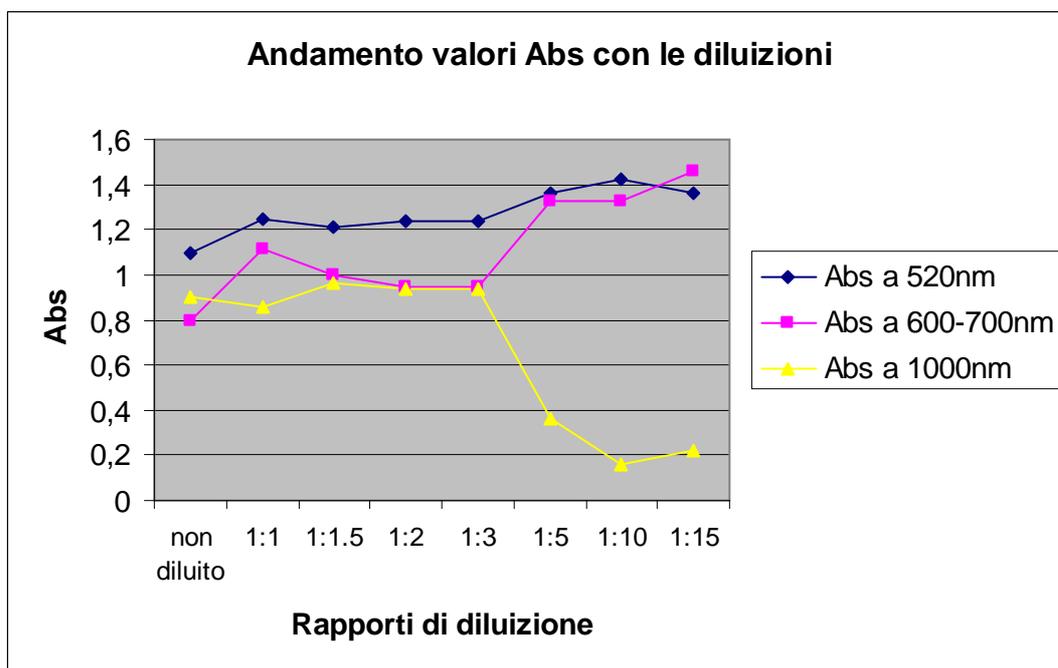


Figura 3.10: il grafico riporta i valori di assorbanza per ogni diluizione

3 – PARTE SPERIMENTALE

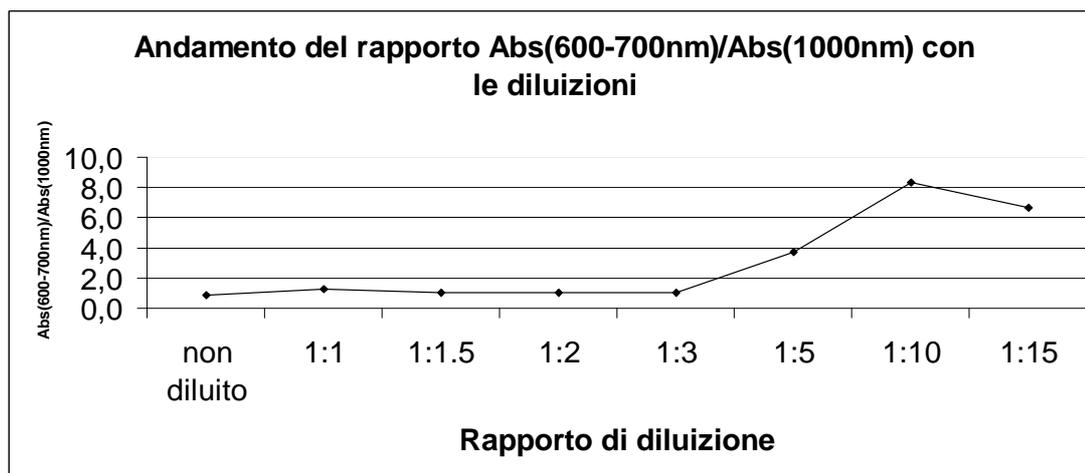


Figura 3.11: il rapporto più alto tra l'assorbanza a 600-700nm e quella a 1000nm si verifica in una diluizione 1:10 per questo campione.

Lo stesso esperimento è stato condotto su altri campioni e gli andamenti riscontrati sono gli stessi del campione G preso in esame tranne per il fatto che la diluizione con cui si ottiene lo spettro migliore è diversa.

Si consideri la tabella 3.2 in cui sono messi a confronto i risultati dell'esperimento di diluizione di altri due campioni ("E" avente concentrazione $3.00 \cdot 10^{-9}$ mol/L ed "F" con concentrazione $1.32 \cdot 10^{-9}$ mol/L) con quelli del campione G (in questa tabella i valori di assorbanza sono quelli reali, non normalizzati):

Campione	Abs(520nm) iniziale	Rapporto di diluizione migliore	Abs(520nm) al momento della centrifugazione (calcolata)
E	0,28	1:5 - 1:10	0,046 - 0,025
F	0,17	1:5	0,028
G	0,37	1:10	0,033

Tabella 3.2

Con *Abs(520nm) iniziale* si intende l'assorbanza a 520nm ($b=2\text{mm}$) del rispettivo campione di AuNP non aggregate mentre nell'ultimo riquadro a destra è riportata l'assorbanza della soluzione di AuNP diluite prima di essere centrifugate. Ad esempio il campione G è stato diluito 1:10 quindi la sua assorbanza al momento della centrifugazione sarà un undicesimo di quella iniziale.

Ad ogni modo è stato appurato che si può ottenere una preparazione con dei buoni aggregati se la soluzione di AuNP al momento della centrifugazione presenta valori di assorbanza all'interno di un certo *range* tra 0.02-0.05.

3.2.2 Aggregazione in funzione del pH

È stato visto come sia possibile controllare l'aggregazione delle AuNP semplicemente diluendole con acqua bidistillata. Il procedimento è semplice e il risultato certo, inoltre non comporta l'introduzione di altri composti chimici in soluzione. Tuttavia la diluizione implica l'utilizzo di ingenti volumi di acqua e un notevole dispendio di tempo, soprattutto nel caso si vogliano ottenere soluzioni concentrate di AuNP aggregate.

Allo scopo di ovviare a tali problemi è stato investigato come il pH influisca sull'aggregazione delle AuNP.

Gli esperimenti seguono un procedimento del tutto simile a quello descritto nel paragrafo 3.2.1 per le diluizioni con acqua bidistillata: vengono preparati diversi campioni in altrettante provette eppendorf con lo stesso volume di AuNP e prima di procedere con la centrifugazione (30000g, 10 minuti) si immettono nei vari campioni diverse aliquote di una soluzione acquosa acida o basica. Dopo la centrifugazione il surnatante viene rimosso e le AuNP, ora aggregate, vengono ridisperse per sonicazione nello stesso volume iniziale di acqua bidistillata. In questo modo la concentrazione delle AuNP all'inizio e alla fine dell'esperimento è la stessa e il pH finale è di nuovo neutro come quello di partenza. Infine, come sempre, sono stati registrati gli spettri UV-Vis per valutare la qualità degli aggregati.

Per quanto riguarda gli esperimenti di aggregazione in ambiente acido è stata utilizzata una soluzione a pH 2.70 di acido solforico in acqua bidistillata. Sono stati preparati diversi campioni con il procedimento descritto sopra in modo che dopo l'aggiunta di aliquote diverse della suddetta soluzione il *range* di pH variasse tra circa 2.7 e 4.

Il tentativo di aggregazione in ambiente acido ha avuto esito negativo: si sono formati aggregati molto grossi, visibili ad occhio nudo, e non disperdibili. Un esempio degli spettri UV-Vis che si sono ottenuti è riportato in figura 3.12.

3 – PARTE SPERIMENTALE

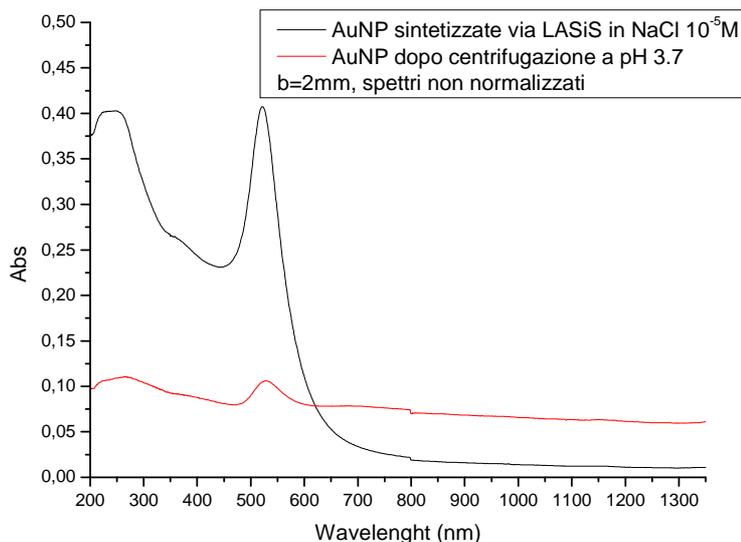


Figura 3.12: in nero lo spettro un campione di AuNP appena sintetizzate mentre in rosso lo spettro dello stesso campione di AuNP dopo il trattamento in soluzione acida.

Ricordando quanto detto nel paragrafo 1.1.1.2 e 1.1.2.3, le nanoparticelle sintetizzate via LASiS sono stabili in soluzione grazie alla presenza di cariche superficiali negative che portano alla formazione del doppio strato elettrico. Aggiungendo una soluzione di acido solforico alla soluzione di AuNP si provoca la distruzione del doppio strato elettrico a causa dell'aumento considerevole della forza ionica; questo è il motivo per cui si sono ottenuti tali risultati centrifugando in ambiente acido le nanoparticelle.

L'aggregazione delle AuNP in ambiente basico invece ha portato a risultati positivi e ha consentito di ottimizzare le procedure per l'ottenimento degli aggregati desiderati. Il procedimento è sempre lo stesso ma in questo caso è stata utilizzata una soluzione di NaOH a $\text{pH} \approx 12$: all'interno dei vari campioni sono state immerse diverse aliquote della soluzione di soda caustica dopodiché si è proceduto al ciclo di centrifugazione con successiva rimozione del surnatante e ridispersione per sonicazione nello stesso volume di acqua bidistillata presente all'inizio.

I risultati riportati di seguito si riferiscono alla stessa preparazione G su cui sono state effettuate le prove di aggregazione diluendo con acqua bidistillata, questo permette un confronto tra i due metodi.

In tabella 3.2, similmente per quanto fatto nelle aggregazioni per diluizione, si riportano i dettagli dell'esperimento. Con la dicitura "pH effettivo" si intende il pH

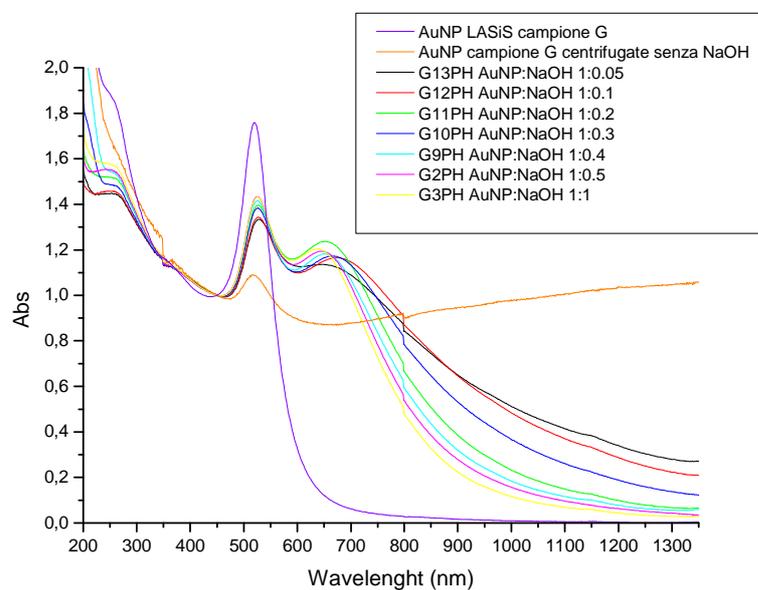
3 – PARTE SPERIMENTALE

del campioni al momento della centrifugazione, infatti si ricorda che al termine dell'esperimento i campioni vengono ridispersi in ambiente neutro.

Campione	AuNP (μL)	Soluzione NaOH pH 12 (μL)	Rapporto di diluizione	Abs 520nm (b=2mm)	Abs 600-700nm (b=2mm)	λ picco aggregati	Abs 1000nm (b=2mm)	Abs 600-700nm/ Abs 1000nm	pH effettivo
G13PH	500	25	1:0.05	1,33	1,13	644	0,51	2,2	9,73
G12PH	500	50	1:0.1	1,34	1,16	674	0,48	2,4	10,03
G11PH	500	100	1:0.2	1,39	1,23	652	0,23	5,3	10,33
G10PH	500	150	1:0.3	1,38	1,17	670	0,36	3,3	10,51
G9PH	500	200	1:0.4	1,41	1,18	654	0,18	6,6	10,63
G2PH	500	250	1:0.5	1,43	1,19	649	0,15	7,9	10,73
G3PH	500	500	1:1	1,43	1,20	642	0,11	10,9	11,03
G4PH	500	750	1:1.5	1,50	1,04	640	0,11	9,5	11,21
G5PH	500	1000	1:2	1,56	0,85	n.p.	0,08	10,6	11,33
G6PH	500	1500	1:3	1,67	0,60	n.p.	0,05	12,0	11,51
G7PH	500	2500	1:5	1,75	0,23	n.p.	0,07	3,3	11,73
G8PH	500	5000	1:10	1,78	0,17	n.p.	0,05	3,4	12,03

Tabella 3.2

In figura 3.13 sono riportati gli spettri UV-Vis dei vari campioni, per comodità di lettura sono stati separati in due grafici diversi.



3 – PARTE SPERIMENTALE

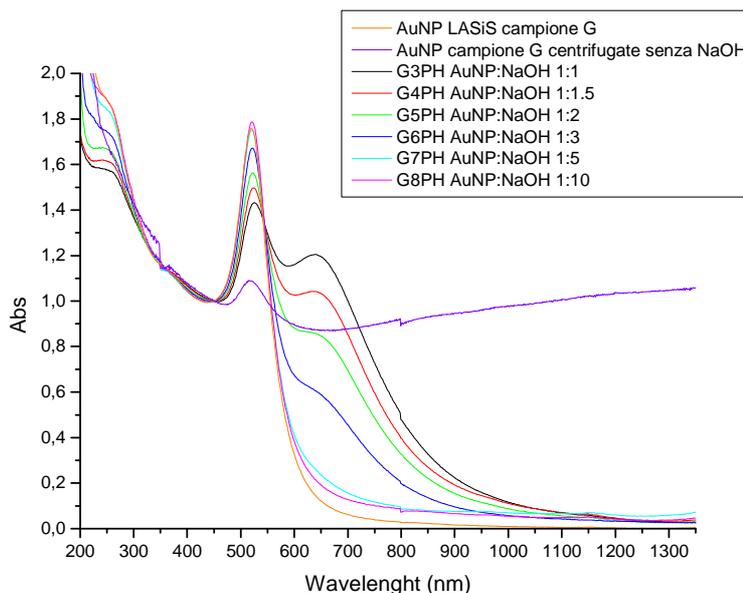


Figura 3.13: spettri dei campioni G#PH

In figura 3.14 sono riportati gli andamenti delle assorbanze a 520nm, 600-700nm e 1000nm in funzione del pH effettivo della soluzione.

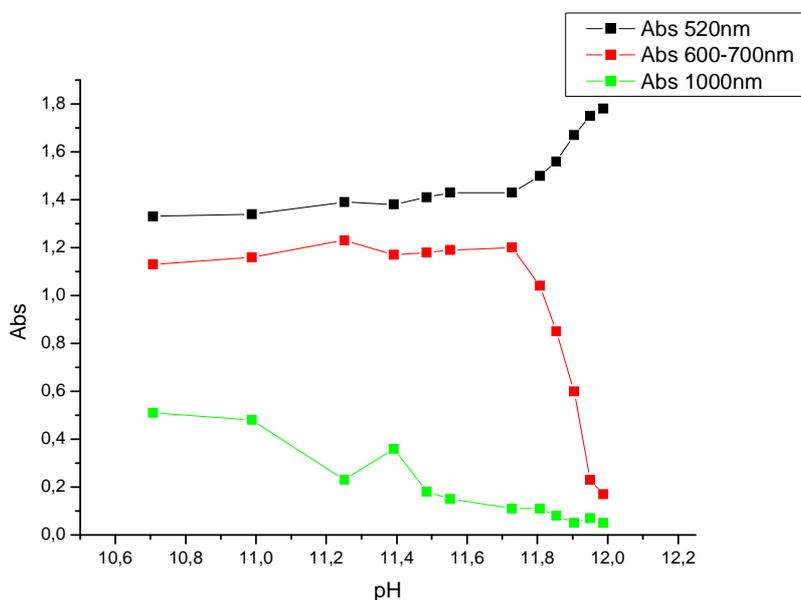


Figura 3.14: andamenti delle assorbanze in funzione del pH della soluzione al momento della centrifugazione.

Osservando gli spettri si nota subito che l'aggiunta di piccole aliquote di NaOH porta ad una buona aggregazione: l'assorbanza a 1000nm è bassa mentre il picco plasmonico longitudinale è ben definito. Aumentando l'aliquote di NaOH si nota una

3 – PARTE SPERIMENTALE

progressiva diminuzione dell'assorbanza a 600-700nm; nei campioni G7 e G8, corrispondenti ad un valore di pH prossimo a 12, il picco caratteristico degli aggregati è scomparso e si vede solo quello plasmonico. In questo caso sembra che la centrifugazione non abbia effetto.

La figura 3.14 permette di osservare meglio l'andamento delle assorbanze: fino ad un pH di circa 11.7 l'assorbanza del plasmone a 520nm e quella del picco caratteristico degli aggregati rimangono pressoché costanti dopodiché, quando il pH è vicino a 12, l'assorbimento a 600-700nm scende drasticamente fino a valori prossimi allo zero mentre l'assorbanza a 520nm cresce leggermente. L'assorbimento a 1000nm invece diminuisce all'aumentare del pH.

Tale comportamento è spiegabile richiamando alcuni concetti esposti nel paragrafo 1.1.2.3: gli ioni OH^- permettono lo sblocco delle cariche negative sulla superficie delle nanoparticelle. Evidentemente una quantità non troppo elevata di ioni idrossido sbloccano il giusto numero di cariche negative necessarie per una buona aggregazione (impedendo la formazione di aggregati troppo grandi) con il metodo della centrifugazione. Troppi ioni idrossido invece sbloccano un grande numero di cariche e le forze di repulsione tra particelle sono talmente elevate da impedire qualsiasi aggregazione.

Effettuando altri esperimenti come quello descritto sopra su campioni diversi si sono riscontrati andamenti simili a quelli in figura 3.14, tuttavia conoscere a priori la quantità di NaOH che permette una buona aggregazione è difficile perché dipende da molte variabili come la concentrazione delle AuNP e il numero di cariche che è necessario vengano attivate sulla superficie. Questo dipende poi dalle dimensioni delle AuNP la cui superficie è proporzionale a R^2 .

Il metodo è quindi valido e permette di controllare l'aggregazione, ma è empirico e solitamente per trovare la quantità giusta di soda si procede con delle prove.

In conclusione questi esperimenti hanno permesso di ottimizzare i processi di aggregazione delle AuNP. L'aggregazione controllata con NaOH inoltre presenta alcuni vantaggi rispetto all'aggregazione previa diluizione: è veloce, facile da eseguire e solitamente basta qualche decina di μL per una buona aggregazione, quindi si ottengono preparazioni concentrate di AuNP aggregate in pochi passaggi.

3.3 Funzionalizzazione delle nanoparticelle d'oro

Come già descritto, l'obiettivo di questo lavoro di tesi è la sintesi di nanosistemi in grado di effettuare *targeting* e *imaging* su cellule tumorali e per l'applicazione nel test ELISA.

I nanosistemi ottenuti sono costituiti da:

- Aggregati di AuNP, per l'amplificazione del campo elettrico necessario per l'effetto SERS;
- Un colorante, di cui rilevare lo spettro SERRS;
- Un anticorpo, per svolgere la funzione di *targeting* sulle cellule tumorali o per il test ELISA;
- Catene di mPEG-SH, polimero utilizzato per stabilizzare gli aggregati funzionalizzati e per fornire biocompatibilità al sistema;
- Tampone isototonico PBS (*Phosphate Buffer Saline*, 0.15M NaCl + 10mM PO_4^{3-} , pH 7.4) e molecole di BSA (*Bovin Serum Albumin*) per compatibilità con i sistemi cellulari .

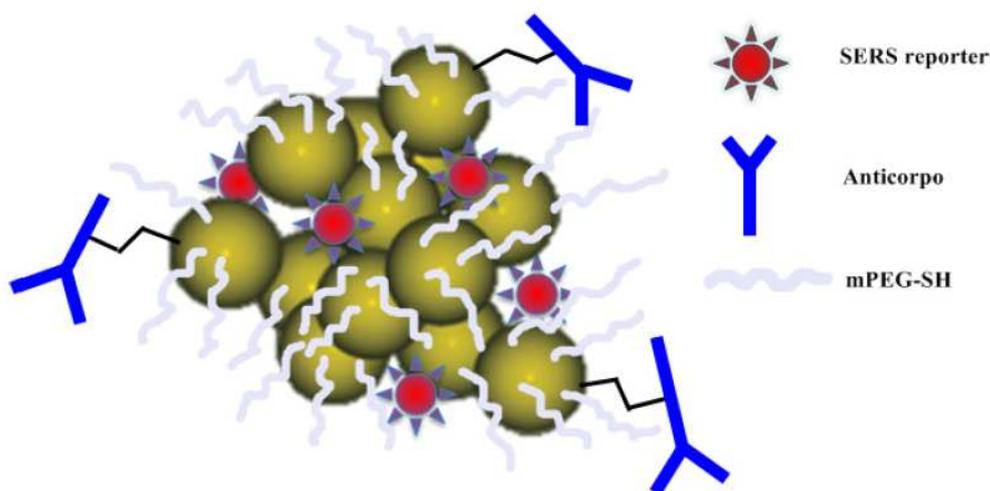


Figura 3.15: rappresentazione schematica dei nanosistemi

I vari *step* della funzionalizzazione (i dettagli sperimentali vengono presentati nel paragrafo 3.4) fino ad arrivare ai nanocompositi completi, vengono descritti nel seguito.

L'aggregazione delle nanoparticelle è stata già presa in considerazione precedentemente, quindi ci si soffermerà sulla funzionalizzazione con i SERS *reporters*, gli anticorpi e il mPEG-SH. Verrà presentato anche un esperimento

condotto ai fini di correlare l'intensità del segnale SERS con la quantità di SERS *reporter* con cui sono state funzionalizzate le nanoparticelle.

3.3.1 Funzionalizzazione con i SERS *reporters*

In questo lavoro di tesi sono stati utilizzati tre SERS *reporters*: Texas Red funzionalizzato con un gruppo tiolico (TR-cys-SH), Malachite Green funzionalizzata con un gruppo tiolico (MG-cys-SH), Nile Blue funzionalizzato con un gruppo disolfuro (LipNB). Le funzionalizzazioni di questi coloranti non sono state oggetto di questo lavoro di tesi e si rimanda ai lavori originali per i dettagli[46,47,48,49].

La funzionalizzazione con gruppi tiolici o con il gruppo disolfuro consegue al fatto che l'oro forma un forte legame con lo zolfo e quindi composti contenenti tioli o disolfuri si legano stabilmente alle AuNP.

Per introdurre un gruppo tiolico in TR e MG è stata utilizzata la cisteamina (Fig. 3.16) mentre il *nile blue* è stato funzionalizzato con l'acido lipoico (Fig. 3.16) che presenta un eterociclo a cinque atomi contenente un disolfuro.

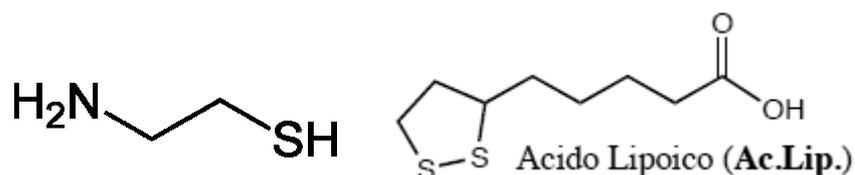
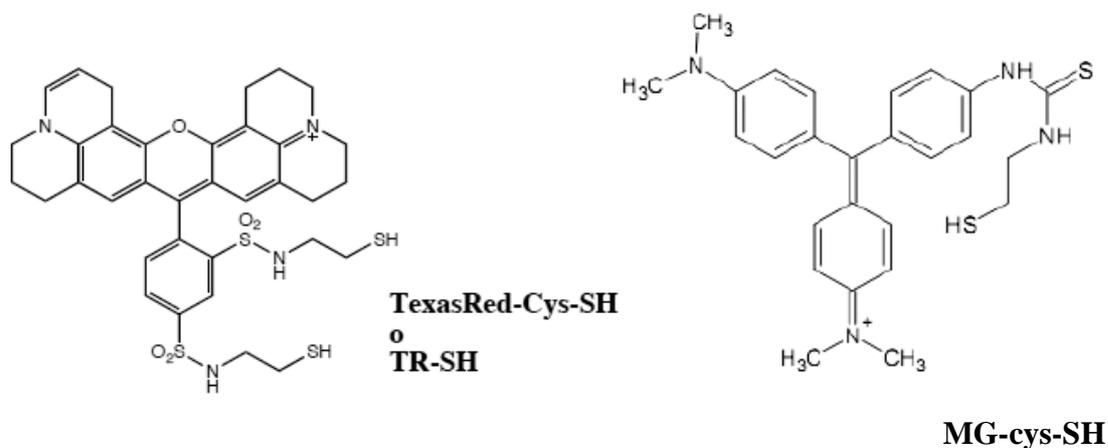


Figura 3.16: a sinistra la cisteamina, a destra l'acido lipoico.

In figura 3.17 sono riportate le strutture molecolari dei tre coloranti.



3 – PARTE SPERIMENTALE

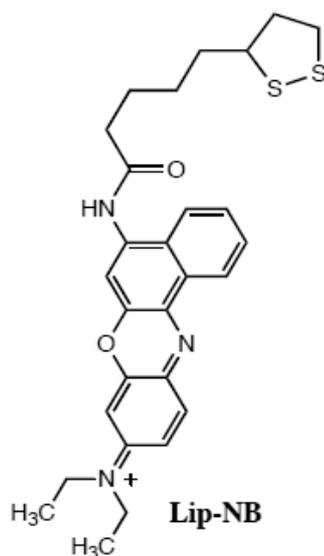


Figura 3.17: le strutture dei tre SERS reporters utilizzati.

I tre coloranti sono stati scelti appositamente per eseguire misure SERRS, infatti come è possibile osservare negli spettri UV-Visibile dei rispettivi coloranti (Fig. 3.18, 3.19, 3.20), le bande di assorbimento sono centrate a circa 600nm. Questo significa che i coloranti presentano transizioni elettroniche in prossimità della lunghezza d'onda d'eccitazione del laser (633nm), di conseguenza l'effetto SERS è accoppiato con il Raman risonante (da cui SERRS, *Surface Enhanced Resonance Raman Scattering*, vedi anche par 1.2.1) e quindi i segnali risultano notevolmente amplificati.

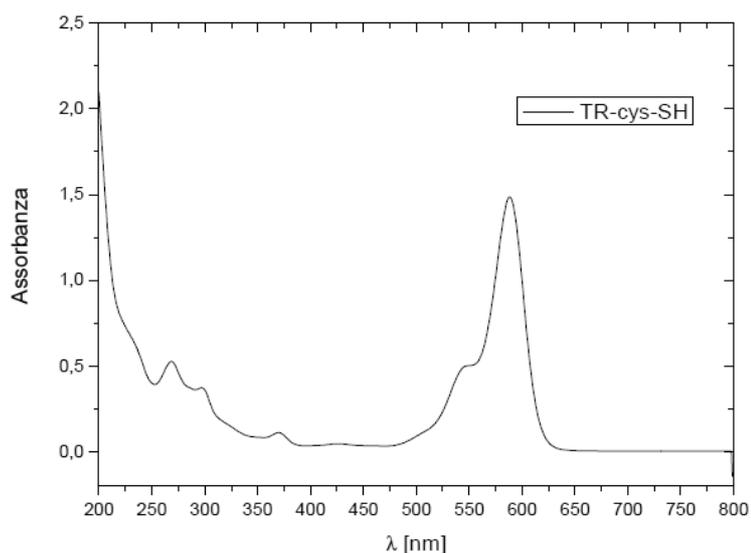


Figura 3.18: spettro UV-Visibile del colorante TR-cys-SH (b=2mm).

3 – PARTE SPERIMENTALE

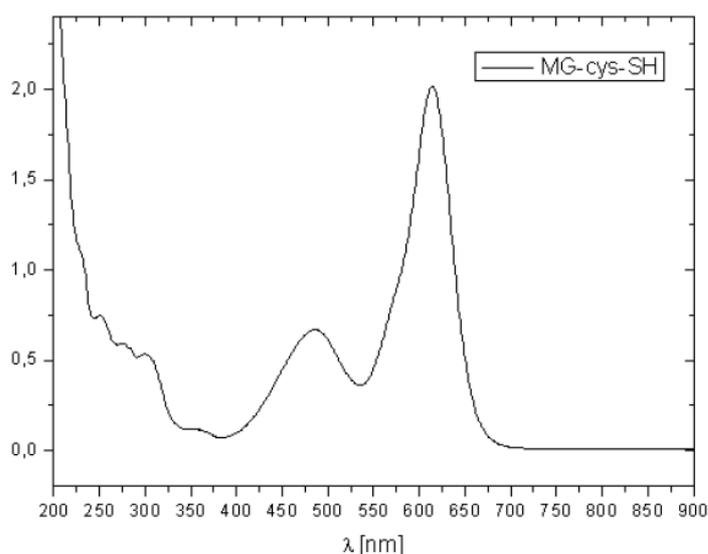


Figura 3.19: spettro UV-Visibile del colorante MG-cys-SH(b=2mm).

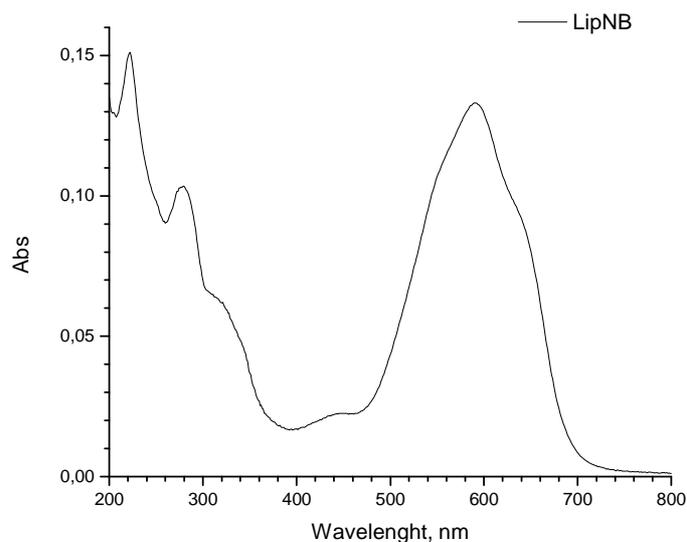


Fig 3.19: spettro UV-Visibile del colorante LipNB (b=2mm).

La funzionalizzazione delle AuNP aggregate con i suddetti coloranti è relativamente semplice: un certo volume della soluzione di colorante viene immesso in una provetta contenente le nanoparticelle aggregate, quindi si lascia reagire per un'ora sotto agitazione. Terminato il tempo di reazione si procede alla purificazione delle AuNP tramite centrifugazione (30000g ,10 minuti).

Al termine del ciclo di centrifugazione si rimuove il surnatante contenente il colorante che non ha reagito e le particelle vengono ridisperse in acqua bidistillata in un bagno ad ultrasuoni.

Per calcolare la resa della reazione si usa lo spettro UV-Vis del surnatante. Infatti la concentrazione del colorante che resta legata alle particelle non risulta essere direttamente misurabile. In particolar modo in presenza della risonanza plasmonica

3.3.1.1 Correlazione tra l'intensità del segnale SERRS e la quantità di SERS reporter

È stato condotto un esperimento in cui diversi campioni con la stessa quantità di AuNP aggregate sono state fatte reagire con quantità sempre maggiori di un SERS reporter, in questo caso il Nile Blue lipoico.

Questo esperimento è utile per capire come cambia il segnale SERRS in funzione della quantità di colorante con cui sono funzionalizzate le AuNP, inoltre sarà possibile determinare la concentrazione iniziale di colorante che genera il massimo segnale, utile ai fini di una maggiore rilevabilità dei nanosistemi con le tecniche di *imaging*.

Sono stati preparati 18 campioni con 500 μ L l'uno di AuNP aggregate i quali sono stati poi funzionalizzati con una quantità di colorante variabile tra $2,25 \cdot 10^{-10}$ mol e $1,13 \cdot 10^{-8}$ mol. La quantità usata solitamente nella sintesi dei nanosistemi per *imaging* è intermedia tra queste.

Negli spettri che verranno riportati, i campioni sono identificati con una sigla contenente un numero che corrisponde al volume (in μ L) della soluzione di LipNB 45 μ M utilizzata per quel campione e una lettera (a o b) che distingue due campioni identici in modo da verificare la riproducibilità dell'esperimento.

Si precisa che i primi 8 campioni (da AuNP5a a AuNP50b) e i restanti 10 campioni (da AuNP50a(2) a AuNP250b) provengono da due differenti preparazioni di nanoparticelle e gli spettri devono essere normalizzati a 450nm per avere campioni normalizzati per la stessa quantità di oro.

La normalizzazione a 450 nm è utile anche per correggere la perdita di particelle durante le fasi di preparazione. Inoltre il fattore che si può ricavare dalla normalizzazione, per ogni soluzione, può essere utilizzato per normalizzare anche gli spettri SERRS che, chiaramente hanno intensità proporzionali alle quantità di particelle presenti. Come sempre, gli spettri UV-Vis sono stati registrati in una cuvetta da 2mm.

3 – PARTE SPERIMENTALE

In figura 3.20 sono riportati gli spettri UV-Vis di tutti i campioni normalizzati a 450nm mentre in figura 3.21 si possono osservare gli spettri SERRS moltiplicati per i rispettivi fattori di normalizzazione.

Gli spettri UV-Vis e SERRS dei surnatanti non sono stati riportati perché al loro interno non sono state rilevate tracce di colorante e questo indica che tutto il colorante ha reagito con le AuNP.

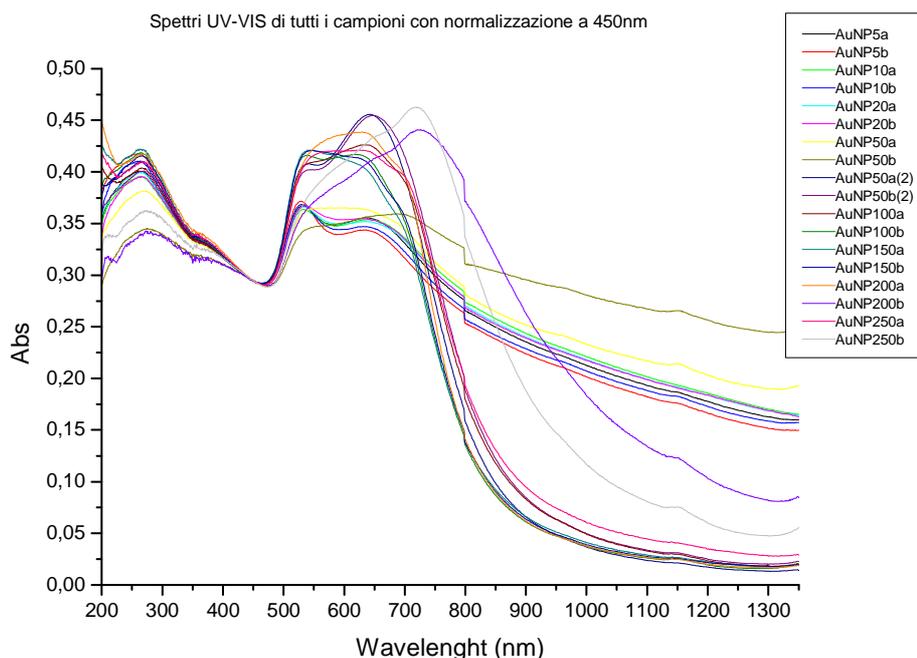


Figura 3.20: Spettri UV-Vis dei vari campioni di AuNP aggregate funzionalizzate con LipNB

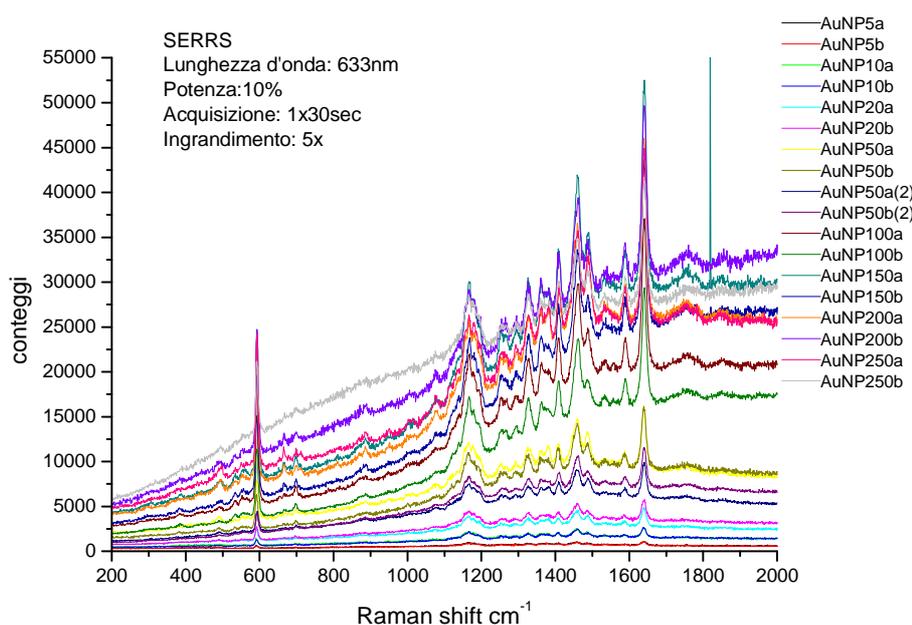


Figura 3.21: Spettri SERRS dei vari campioni di AuNP aggregate funzionalizzate con LipNB

3 – PARTE SPERIMENTALE

Per monitorare l'andamento del segnale SERRS in funzione della quantità di colorante sono state scelte tre bande intense e distanti tra loro: 1640cm^{-1} , 1163cm^{-1} e 592cm^{-1} . Le intensità dei picchi sono state ricavate sottraendo il contributo di fluorescenza e calcolando l'intensità media tra le singole coppie di campioni (nel caso di AuNP50(a-b)(1-2) l'intensità media è calcolata su quattro valori).

I risultati sono riassunti in tabella 3.3:

Nome campione	conteggi a 1640cm^{-1}	\pm	conteggi a 1163cm^{-1}	\pm	conteggi a 592cm^{-1}	\pm
AuNP5(a-b)	505	27	447	28	384	25
AuNP10(a-b)	1171	275	770	190	810	67
AuNP20(a-b)	2271	148	1491	10	1501	89
AuNP50(a-b)(1-2)	5722	1440	3202	2048	3190	1130
AuNP100(a-b)	14981	1959	7268	944	8727	1129
AuNP150(a-b)	21213	1672	9044	1100	15107	1472
AuNP200(a-b)	19654	578	8367	3	14835	751
AuNP250(a-b)	16751	2912	6970	951	13473	1771

Tabella 3.3

Plottando in un grafico (Fig. 3.22, 3.23, 3.24) i dati riportati in tabella 3.4 in funzione delle moli di LipNB si ottengono dei risultati interessanti.

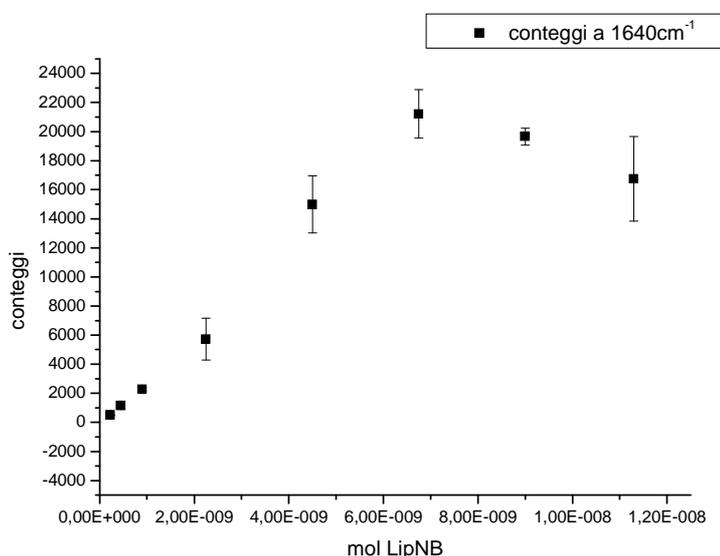


Figura 3.22: *plot* dei dati in tabella 3.3 per l'intensità a 1640cm^{-1} .

3 – PARTE SPERIMENTALE

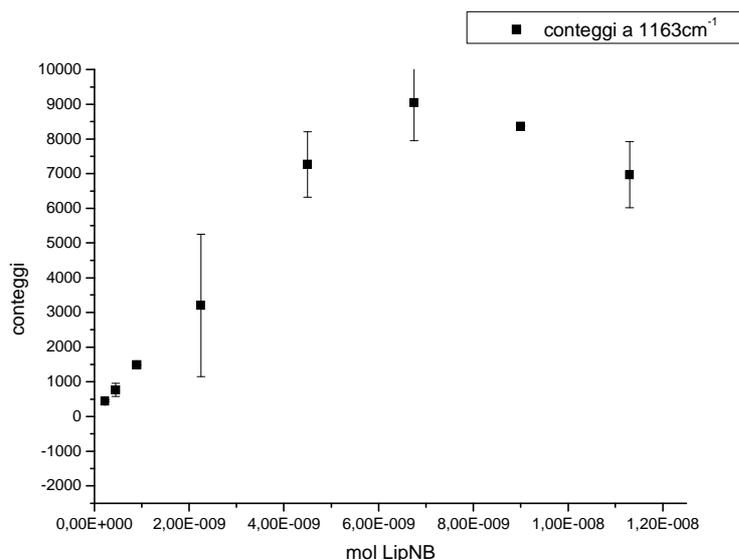


Figura 3.23: *plot* dei dati in tabella 3.3 per l'intensità a 1163cm⁻¹.

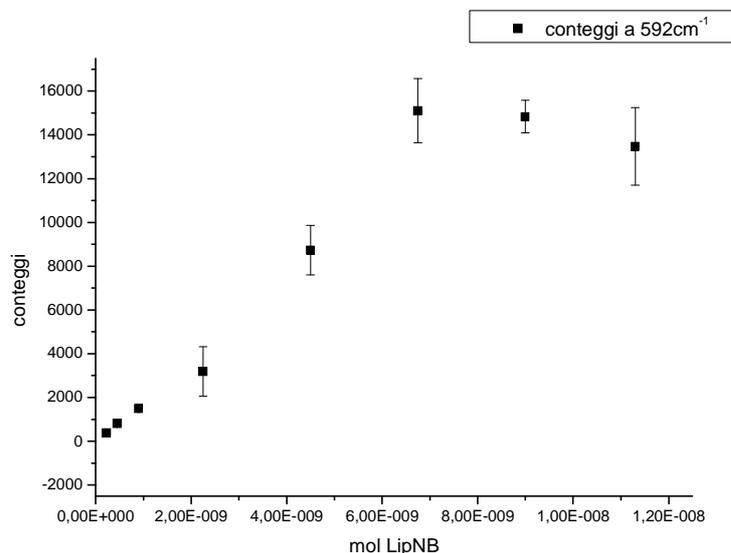


Figura 3.24: *plot* dei dati in tabella 3.3 per l'intensità a 592cm⁻¹.

È possibile formulare una ragionevole ipotesi sui risultati ottenuti:

- 1) con un numero molto grande di *hot spots* le molecole di LipNB occuperanno gradualmente gli *hot spots*, e l'intensità del segnale aumenterà linearmente con la quantità di colorante;
- 2) quando tutti gli *hot spots* saranno occupati, le molecole andranno a disporsi in altri punti della superficie e sperimenteranno un *enhancement* del campo elettrico molto più basso rispetto a quelle che si trovano negli *hot spots*. Queste non contribuiranno però significativamente al segnale SERRS che rimarrà costante aumentando ancora la quantità di colorante.

3 – PARTE SPERIMENTALE

Ci si poteva quindi ragionevolmente aspettare che vi fosse un incremento lineare del segnale SERRS per le concentrazioni più basse del colorante e una saturazione del segnale per le concentrazioni maggiori.

AuNP150a e AuNP150b sono i campioni con il segnale medio più alto rilevato e sono stati funzionalizzati con circa $7 \cdot 10^{-9}$ moli di colorante.

Come ricordato più volte, le nanostrutture vengono stabilizzate con mPEG-SH che le rende anche biocompatibili. Tutti i campioni appena visti sono quindi stati funzionalizzati con il polimero e sono stati nuovamente raccolti gli spettri UV-Vis e SERRS normalizzandoli come sopra.

In figura 3.25 sono riportati gli spettri di tutti i campioni dopo la funzionalizzazione con mPEG-SH e si nota immediatamente che il picco caratteristico degli aggregati tra 600nm e 700nm è diventato una “spalla” e nella gran parte delle preparazioni è addirittura scomparso. La variazione dello spettro mostra che le particelle hanno subito una parziale disaggregazione. Questo processo si può osservare in particolare con il Nile Blue mentre con gli altri coloranti il fenomeno è molto meno pronunciato. In figura 3.26 sono riportati gli spettri SERRS delle varie preparazioni. Si deve ricordare che questi spettri sono stati raccolti con una potenza del laser pari al 50% della potenza massima e quindi i conteggi sono almeno 5 volte superiori rispetto a quelli in figura 3.21 che sono stati raccolti con una potenza del 10%.

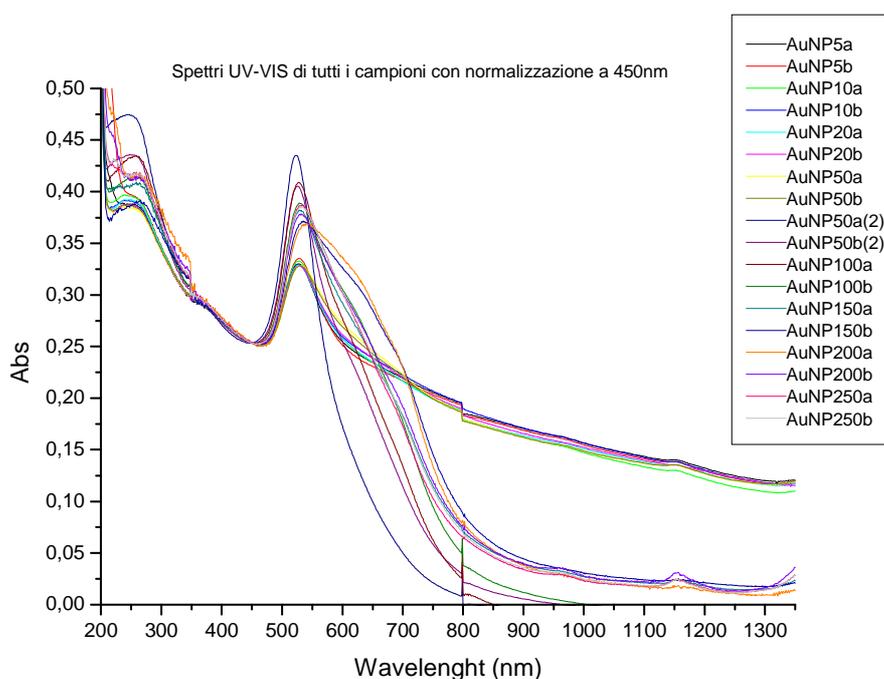


Figura 3.25: spettri UV-Visibile delle AuNP funzionalizzate con Nile Blue e mPEG-SH.

3 – PARTE SPERIMENTALE

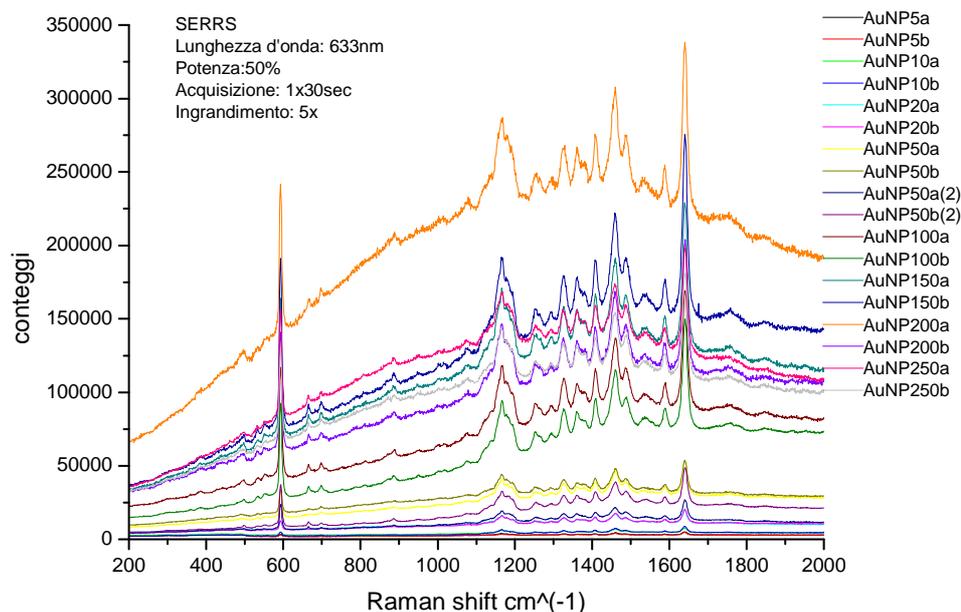


Figura 3.26: spettri SERRS delle AuNP funzionalizzate con Nile Blue e mPEG-SH

Allo stesso modo di quanto fatto sopra si riportano in tabella 3.4 le nuove intensità medie tra le coppie di campioni (ricavate sempre sottraendo il contributo di fluorescenza), mentre nelle figure 3.27, 3.28, 3.29 è possibile osservare i *plot* dei dati in tabella 3.4 sempre in funzioni delle moli di LipNB.

Nome campione	conteggi a 1640cm ⁻¹	±	conteggi a 1163 cm ⁻¹	±	conteggi a 592cm ⁻¹	±
AuNP5(a-b)	1944	170	1234	171	1441	8
AuNP10(a-b)	3684	374	2632	370	2426	210
AuNP20(a-b)	8673	424	5849	573	6016	479
AuNP50(a-b)(1-2)	21823	3460	12468	7022	19682	6516
AuNP100(a-b)	79154	3977	38775	2776	70471	6508
AuNP150(a-b)	115558	13774	53485	5186	105589	9420
AuNP200(a-b)	111994	18339	57501	7411	92144	6838
AuNP250(a-b)	76423	770	36138	961	67970	6300

Tabella 3.4

3 – PARTE SPERIMENTALE

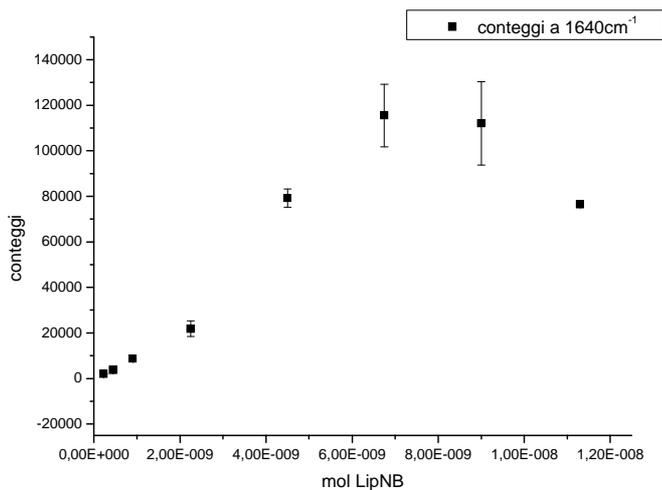


Figura 3.27: *plot* dei dati in tabella 3.4 per l'intensità a 1640cm⁻¹.

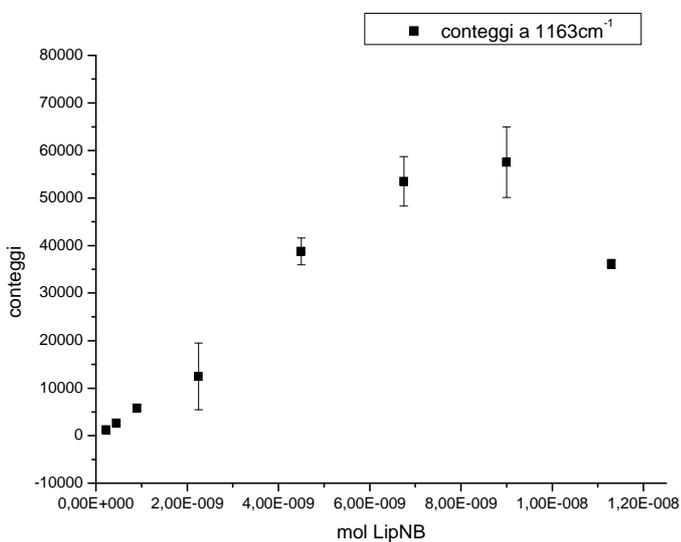


Figura 3.28: *plot* dei dati in tabella 3.4 per l'intensità a 1163cm⁻¹.

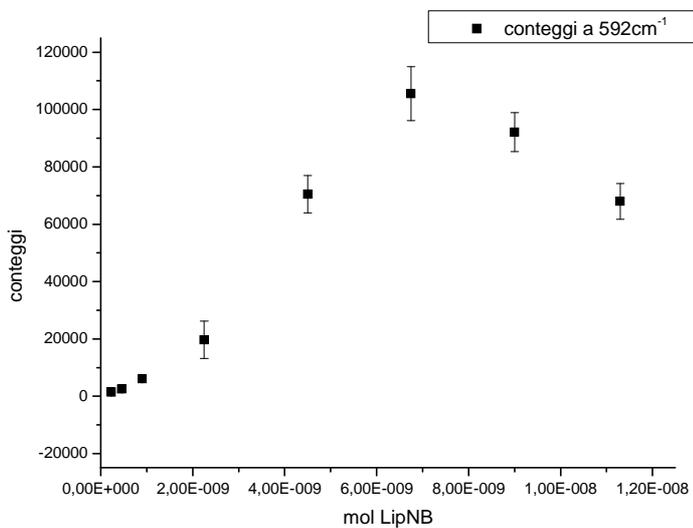


Figura 3.29: *plot* dei dati in tabella 3.4 per l'intensità a 592cm⁻¹.

3 – PARTE SPERIMENTALE

L'andamento dell'intensità del segnale SERRS in funzione della quantità di LipNB è praticamente lo stesso anche dopo la funzionalizzazione con il mPEG-SH, quindi si può constatare che il polimero e la parziale disaggregazione delle AuNP non hanno influito molto sul *trend* dei dati.

Visto che le particelle si sono disaggregate è molto probabile che siano diminuiti gli *hot spots*. In tabella 3.5 sono riportate le variazioni percentuali delle intensità medie dopo la funzionalizzazione con il polimero. Il calcolo è stato fatto dividendo per cinque le intensità che sono state registrate usando la potenza del laser al 50%.

Nome campione	Variazione percentuale dei conteggi a 1640cm ⁻¹	Variazione percentuale dei conteggi a 1163 cm ⁻¹	Variazione percentuale dei conteggi a 592cm ⁻¹
AuNP5(a-b)	-23	-45	-25
AuNP10(a-b)	-37	-32	-40
AuNP20(a-b)	-24	-22	-20
AuNP50(a-b)(1-2)	-24	-22	23
AuNP100(a-b)	6	7	61
AuNP150(a-b)	9	18	40
AuNP200(a-b)	14	37	24
AuNP250(a-b)	-9	4	1

Tabella 3.5

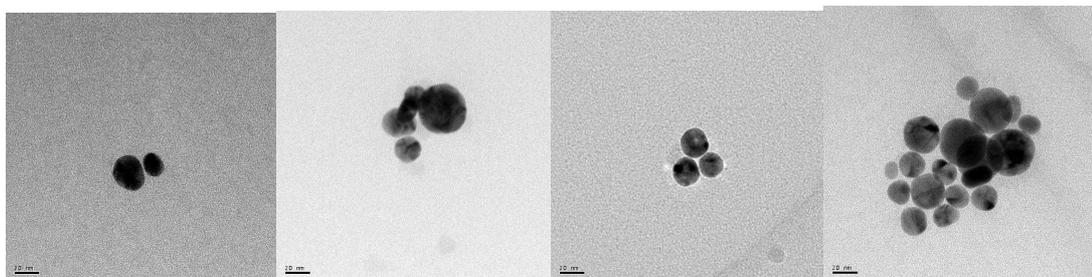
Si osserva che nei campioni con meno colorante l'intensità media diminuisce anche del 20-40% mentre i campioni con più colorante si comportano in modo inverso e la loro intensità media aumenta fino anche al 40%.

La ragione di questo comportamento non è per ora chiara. La prima osservazione è che i primi otto campioni (da AuNP5a a AuNP50b) e i restanti dieci (da AuNP50a(2) a AuNP250b) provengono da due preparazioni diverse, poiché la quantità totale di soluzione colloidale era troppo grande per una sola sintesi LASiS, e ciò può essere causa di un diverso numero di *hot spots*. La diminuzione di aggregazione dopo l'aggiunta del polimero sembra però mostrare che l'aggregazione è solo parzialmente importante e questo può derivare dal fatto che sono necessari solo un piccolo numero di *hot spots* per avere un segnale SERRS e che questi *hot spots* sono i più stabili rispetto ad una disaggregazione come quella indotta dal polimero.

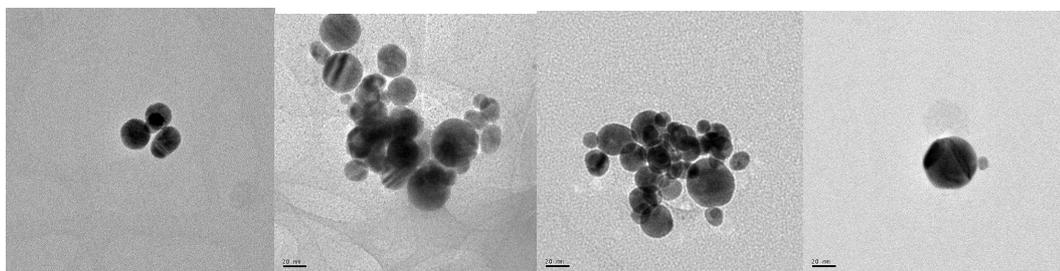
Dal punto di vista di quanto si voleva ottenere e cioè l'andamento dell'intensità del segnale SERRS aumentando la concentrazione del colorante, i risultati ottenuti sono importanti: l'andamento del segnale SERRS con la quantità di colorante ha un comportamento lineare a basse concentrazioni e arriva a saturazione.

3 – PARTE SPERIMENTALE

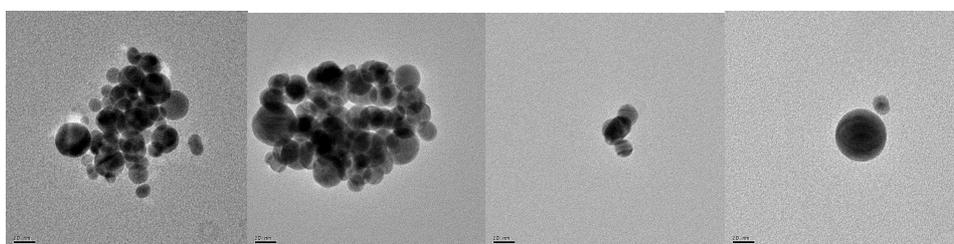
Quantificare il numero di aggregati è molto difficile e le immagini al TEM (fig. 3.30) di alcuni dei campioni dell'esperienza appena esposto non riescono a dare ragione del numero di aggregati in funzione delle variazioni degli spettri UV-Vis. Nuovi studi saranno necessari per cercare di trovare queste correlazioni.



(a)



(b)



(c)

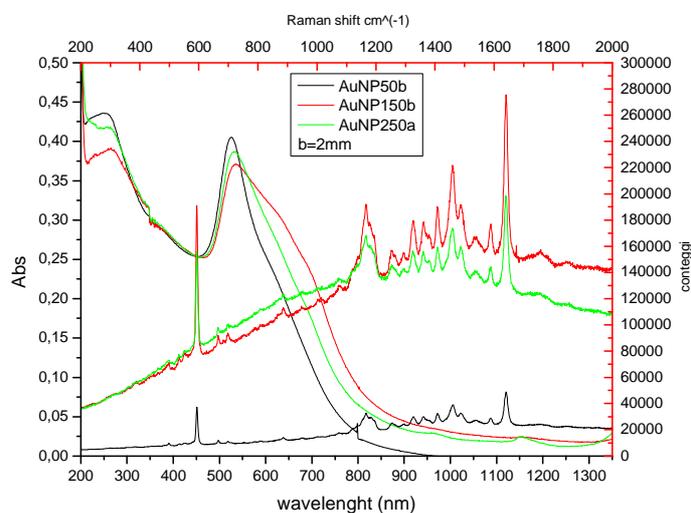


Figura 3.30: immagini al TEM dei campioni (a) AuNP50b, (b) AuNP150b e (c) AuNP250a.

A sinistra sono stati riportati per comodità gli spettri UV-Vis e SERRS dei tre campioni.

3.3.2 Funzionalizzazione con anticorpi

Dopo la reazione con il colorante si procede alla funzionalizzazione delle nanostrutture con l'anticorpo.

I due anticorpi monoclonali utilizzati in questa tesi sono stati forniti dal gruppo di ricerca del Prof. Marco Colombatti del dipartimento di Immunologia del Policlinico "G.B. Rossi" di Verona e sono coperti da brevetto.

L'anticorpo avente sigla D2B è selettivo nei confronti dell'antigene PSMA (*Prostate Specific Membrane Antigen*) del tumore alla prostata. L'anticorpo con sigla 4C4 riconosce invece l'antigene PSCA (*Prostate Stem Cell Antigen*), anch'esso sovra espresso in cellule prostatiche cancerose.

Prima di essere utilizzati per funzionalizzare le nanoparticelle d'oro gli anticorpi devono essere derivatizzati con 2-Iminotiolano (conosciuto anche come reagente di Traut, Fig. 3.31) che usando i gruppi amminici dell'anticorpo crea una funzione tiolica che poi consente l'aggancio dell'anticorpo stesso alle nanoparticelle

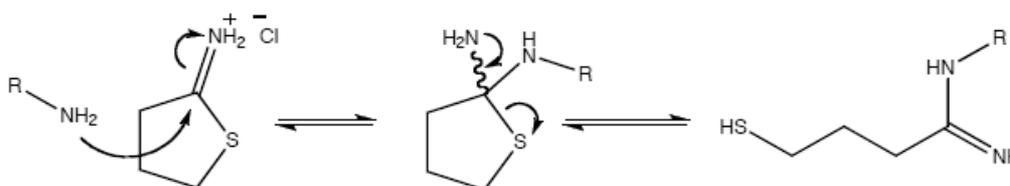


Fig. 3.31 Reazione dell'imminotiolano con ammine

I dettagli sperimentali della reazione sono riportati nel paragrafo 3.4.1.

3.3.3 Funzionalizzazione con mPEG-SH

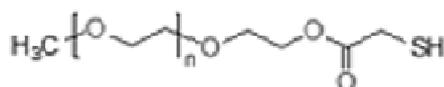


Figura 3.32: metossi-polietilenglicole-tiolato (mPEG-SH)

La funzionalizzazione con il mPEG-SH (fig. 3.32) rappresenta l'ultimo stadio per la sintesi delle nanostrutture: esso le rende biocompatibili e le stabilizza in modo che le preparazioni possano essere conservate per diversi mesi.

È stata utilizzata una soluzione 0.5g/L di mPEG-SH 5000Da, preparata di fresco per evitare la formazione di disolfuri che rallentano la cinetica di reazione con le particelle. La reazione di funzionalizzazione richiede comunque qualche ora poiché le particelle sono già funzionalizzate e le dimensioni del polimero ne rallentano la diffusione.

3.4 Nanostrutture usate per gli esperimenti *in vitro* ed ELISA

Le nanostrutture utilizzate per gli esperimenti di *targeting* e *imaging in vitro* e per i test Elisa sono state ottenute secondo i diversi passaggi sopra riportati.

Le nanostrutture per gli esperimenti *in vitro* erano state comunque ottenute in un lavoro di tesi precedente e si vogliono qui ricordare le loro caratteristiche principali.

Si tratta di due preparazioni denominate AS1 e AS2 che differiscono tra di loro per il colorante e l'anticorpo con cui sono funzionalizzate.

La prima (AS1) è funzionalizzata con colorante TR-cys-SH e anticorpo D2B mentre la seconda (AS2) ha come colorante la MG-cys-SH e come anticorpo il 4C4.

In figura 3.33 sono riassunti i componenti principali delle due preparazioni. Caratterizzazioni delle nanostrutture si possono trovare nel lavoro di tesi originale [46].



Figura 3.33: Riassunto dei componenti principali delle due preparazioni AS1 e AS2.

Le nanostrutture sintetizzate in questa tesi sono destinate all'utilizzo nel test ELISA.

Le preparazioni sono state denominate FB1, FB2, FB3, FB4 e FB5.

FB1 e FB2 sono entrambe funzionalizzate con il colorante TR-cys-SH ma la prima contiene l'anticorpo D2B (ed è quindi simile alla preparazione AS1) mentre la seconda ne è sprovvista e serve da campione di riferimento nel test ELISA. Le stesse considerazioni valgono per le preparazioni FB3 e FB4, funzionalizzate entrambe con LipNB, ma l'anticorpo (sempre D2B) è presente solo su FB3 e quindi FB4 è il riferimento.

FB5 invece è funzionalizzata con TR-cys-SH e anticorpo 4C4 e il suo riferimento è FB2.

Ovviamente tutte le preparazioni sono funzionalizzate con mPEG-SH.

3 – PARTE SPERIMENTALE

In figura 3.34 sono riassunti i principali componenti di tutte e cinque le preparazioni.

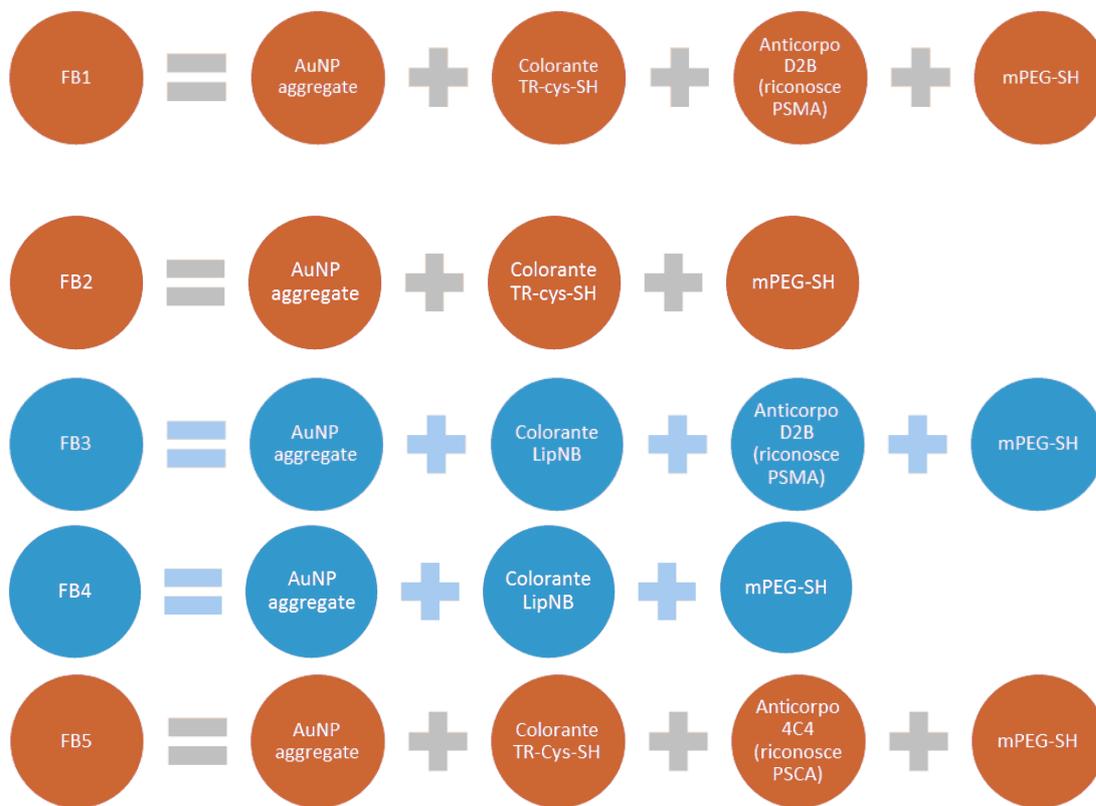


Figura 3.34: Riassunto dei componenti principali delle preparazioni FB1, FB2, FB3, FB4 e FB5.

3.4.1 Materiali e protocollo sperimentale

Materiali

	AuNP	TR-cys-SH 3.3·10 ⁻⁵ M	LipNB 4.5·10 ⁻⁵ M	NaHCO ₃ 1M/2-IT 0.5g/L	Anticorpo D2B 1.10g/L	Anticorpo 4C4 1.00g/L	PBS	mPEG-SH 0.5g/L	BSA
FB1	5mL	100µL		340µL/34µL	910µL		1mL	180µL	10mg/mL
FB2	5mL	100µL					1mL	180µL	10mg/mL
FB3	5mL		100µL	340µL/34µL	910µL		1mL	180µL	10mg/mL
FB4	5mL		100µL				1mL	180µL	10mg/mL
FB5	5mL	100µL		340µL/34µL		1.000mL	1mL	180µL	10mg/mL

Tabella 3.6

Procedimento

25mL di una soluzione di AuNP vengono distribuiti in 13 fiale eppendorf da 2mL e fatte aggregare per centrifugazione (30000g, 10 minuti) senza diluizioni o aggiunte di base. Ogni fiala viene ripresa con 384µL di H₂O bidistillata in modo da ottenere una soluzione più concentrata quindi il contenuto delle 13 fiale viene riunito in 5 fiale da 1mL ciascuna di AuNP aggregate.

3 – PARTE SPERIMENTALE

Successivamente viene addizionata la soluzione di colorante e dopo 1 ora le particelle sono state centrifugate (30000g, 10 minuti) e ridisperse.

Gli anticorpi sono stati derivatizzati con 2-iminotiolano (2-IT) per poter essere ancorati alla superficie degli aggregati tramite il gruppo tiolico. Alla soluzione di anticorpo sono stati aggiunti NaHCO₃ 1M e 2-IT (0.5g/L) e il tutto è stato lasciato in agitazione a temperatura ambiente per 2 ore e poi per una notte in frigorifero a 4°C.

L'anticorpo derivatizzato viene purificato dalla miscela di reazione utilizzando una membrana da 5000Da della Vivaspin e viene recuperato con dei lavaggi di PBS (10 lavaggi per il D2B e 5 per il 4C4).

La soluzione di anticorpo è stata aggiunta alle nanoparticelle dopo essere state centrifugate, quindi le provette sono state messe in agitazione per 6 ore a temperatura ambiente e poi poste in frigorifero a 4°C per una notte.

Il giorno successivo tutte le fiale sono state sonicate e i nanomateriali sono stati purificati per centrifugazione e ripresi in acqua bidistillata.

Sono stati quindi aggiunti in ogni provetta 180µL di una soluzione di mPEG-SH 0.5g/L preparata di fresco e la reazione è proseguita per 3 ore.

Dopo un'ulteriore purificazione per centrifugazione le nanostrutture vengono riprese in 1ml di PBS e si aggiungono infine 10mg di BSA in cristalli in ogni soluzione.

Nota: tutti i campioni FB vengono sottoposti allo stesso numero di centrifughe e dispersione, per omogeneizzare il trattamento su tutti i campioni (anche FB2 e FB4 che non sono state funzionalizzate con un anticorpo).

3.4.2 Caratterizzazione delle nanostrutture

In Figura 3.35 viene riportato lo spettro di assorbimento UV-Visibile delle AuNP di partenza e in tabella 3.7 il risultato ottenuto con il programma di *fitting* SPRfit.

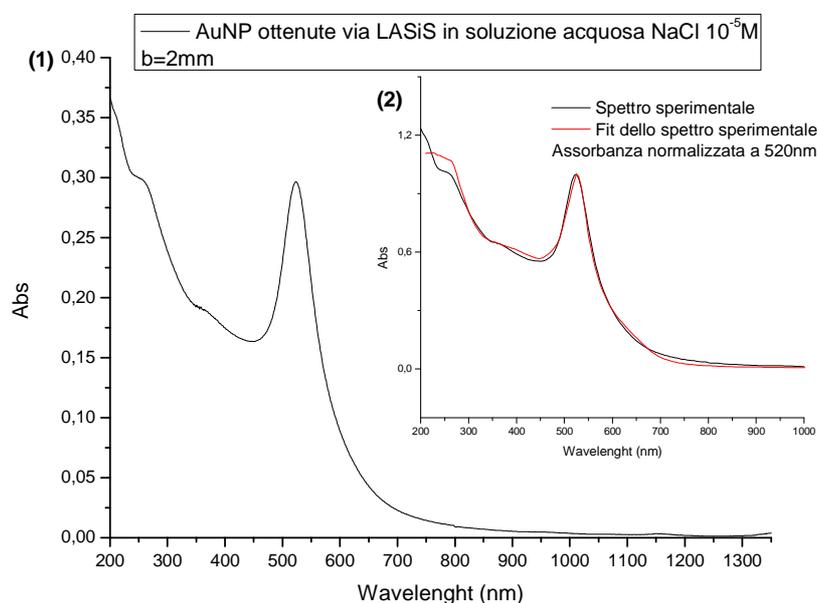


Figura 3.35: (1) Spettro di assorbimento delle AuNP utilizzate nelle preparazioni FB (2) Confronto tra spettro sperimentale e *fitting* eseguito con SPRfit.

R (m)	Spheres %	1-RSS	MaxSPA(m ²)	MaxSPA(cm ²)
9,40E-09	74,5	0,000786281	2,67E-16	2,67E-12
$\epsilon(\text{cm}^{-1} \text{M}^{-1})$	Abs (b=2mm 520nm)	mol/L		
6,99E+08	0,294234574	2,11E-09		

Tabella 3.7

In seguito vengono riportati gli spettri UV-vis-NIR e Raman-SERRS registrati dopo ogni passaggio di sintesi per tutte le preparazioni. Gli spettri vengono riportati non normalizzati.

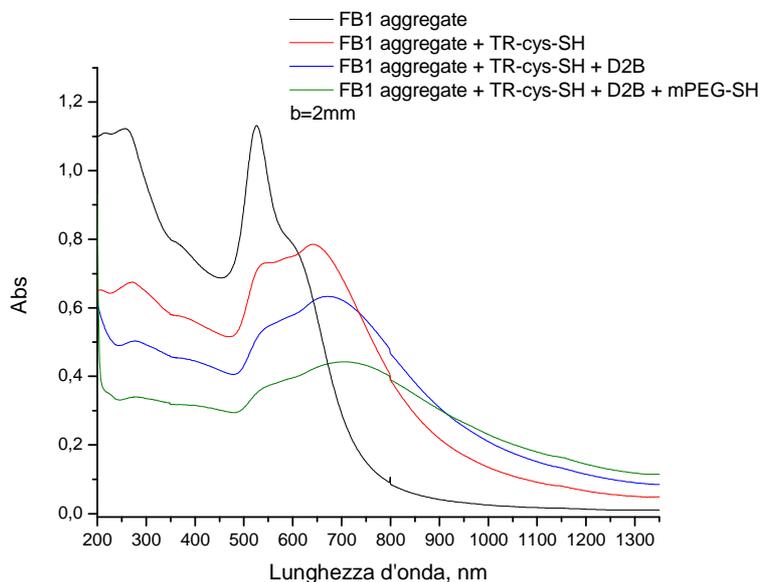
Preparazione FB1: AuNP aggregate + TR-cys-SH + D2B + mPEG-SHSpettri di assorbimento UV-Vis-NIR

Figura 3.36: raccolta degli spettri di assorbimento UV-Vis-NIR del campione FB1 durante le fasi di preparazione.

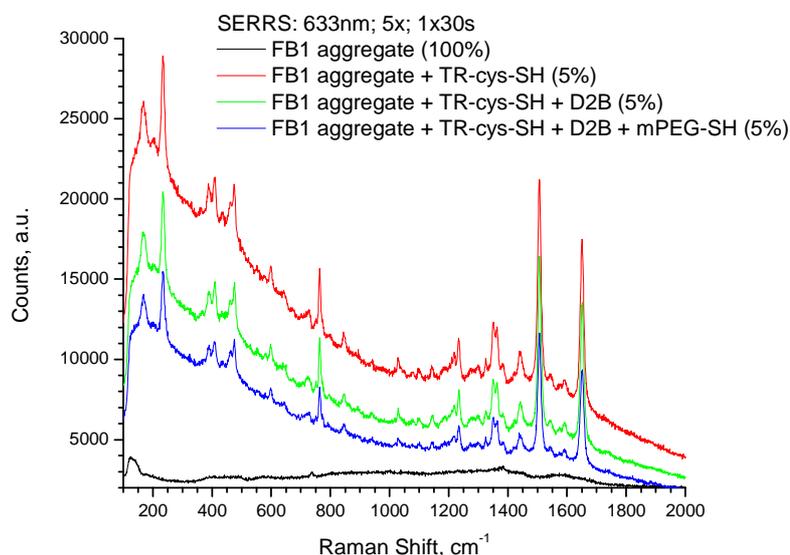
Spettri Raman-SERRS

Figura 3.37: raccolta degli spettri SERRS del campione FB1 durante le fasi di preparazione, tra parentesi è indicata la potenza del laser.

Negli spettri UV-Vis-NIR si osserva che con il progredire della funzionalizzazione l'assorbanza della soluzione diminuisce progressivamente. Il comportamento è

3 – PARTE SPERIMENTALE

imputabile alla perdita di nanoparticelle d'oro nei processi di rimozione del surnatante o per la loro adesione alle pareti della provetta.

Anche i segnali SERRS diminuiscono con l'avanzare della funzionalizzazione ma restano comunque intensi. Ciò è indice di una buona ingegnerizzazione della nanostruttura e del fatto che le molecole di colorante restano legate agli hot spots delle nanostrutture.

Sovrapponendo lo spettro Raman allo spettro UV-Vis-NIR si osserva che la lunghezza d'onda del laser ($\lambda=632.8\text{nm}$), usata per acquisire gli spettri Raman, entra in risonanza con le risonanze plasmoniche degli aggregati funzionalizzati e quindi consente la registrazione dello spettro SERRS (Fig. 3.38).

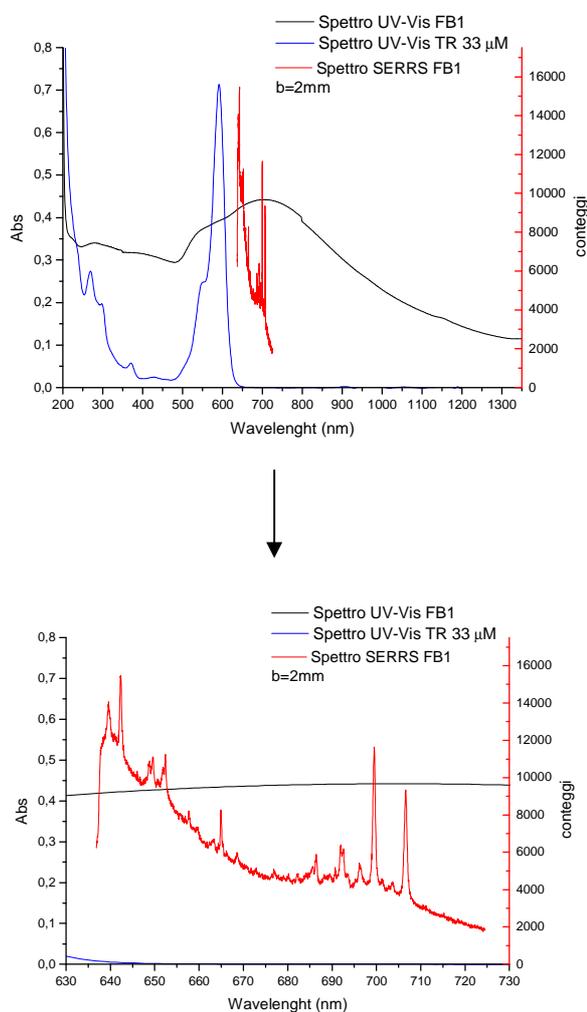


Figura 3.38: Spettri finali UV-Vis-NIR e Raman-SERRS sovrapposti.

Preparazione FB2: AuNP aggregate + TR-cys-SH + mPEG-SH

Spettri di assorbimento UV-Vis-NIR

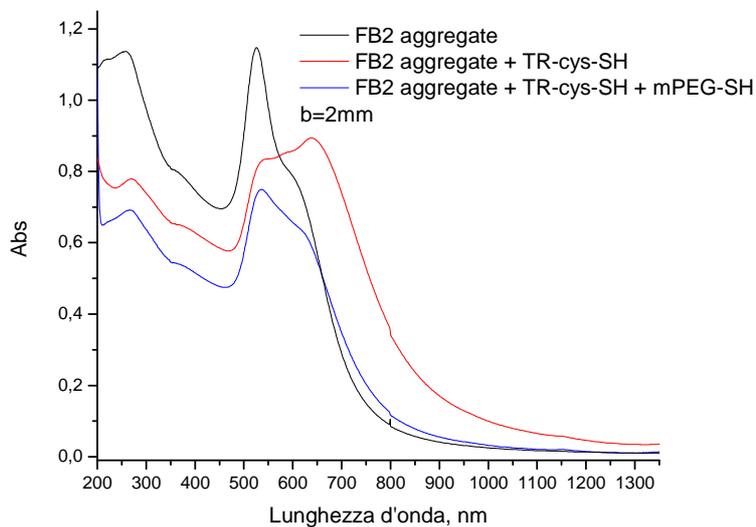


Figura 3.39: raccolta degli spettri di assorbimento UV-Vis-NIR del campione FB2 durante le fasi di preparazione.

Spettri Raman-SERRS

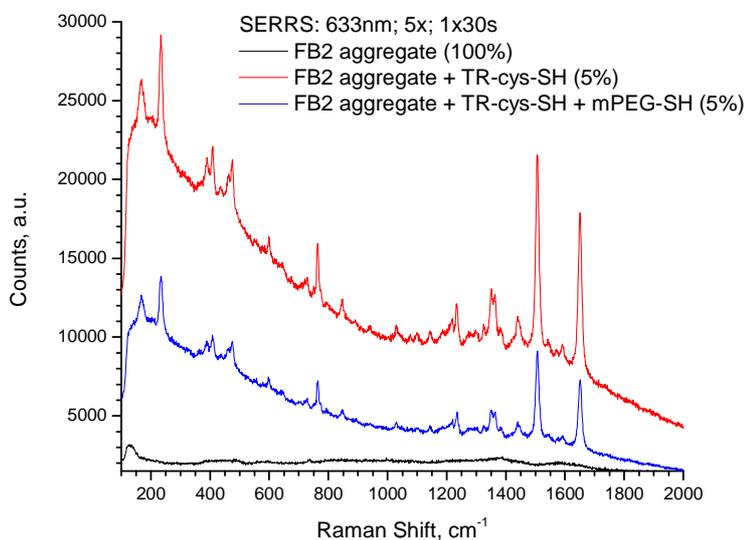


Figura 3.40: raccolta degli spettri SERRS del campione FB2 durante le fasi di preparazione, tra parentesi è indicata la potenza del laser.

Per quanto riguarda la diminuzione delle assorbanze negli spettri UV-Vis-NIR e la diminuzione del segnale SERRS valgono le stesse considerazioni fatte per FB1.

3 – PARTE SPERIMENTALE

In figura 3.41 si osserva lo spettro finale UV-Vis-NIR sovrapposto a quello Raman: sebbene il picco degli aggregati risulti meno accentuato rispetto a quello di FB1 le condizioni per ottenere uno spettro SERRS è rispettata .

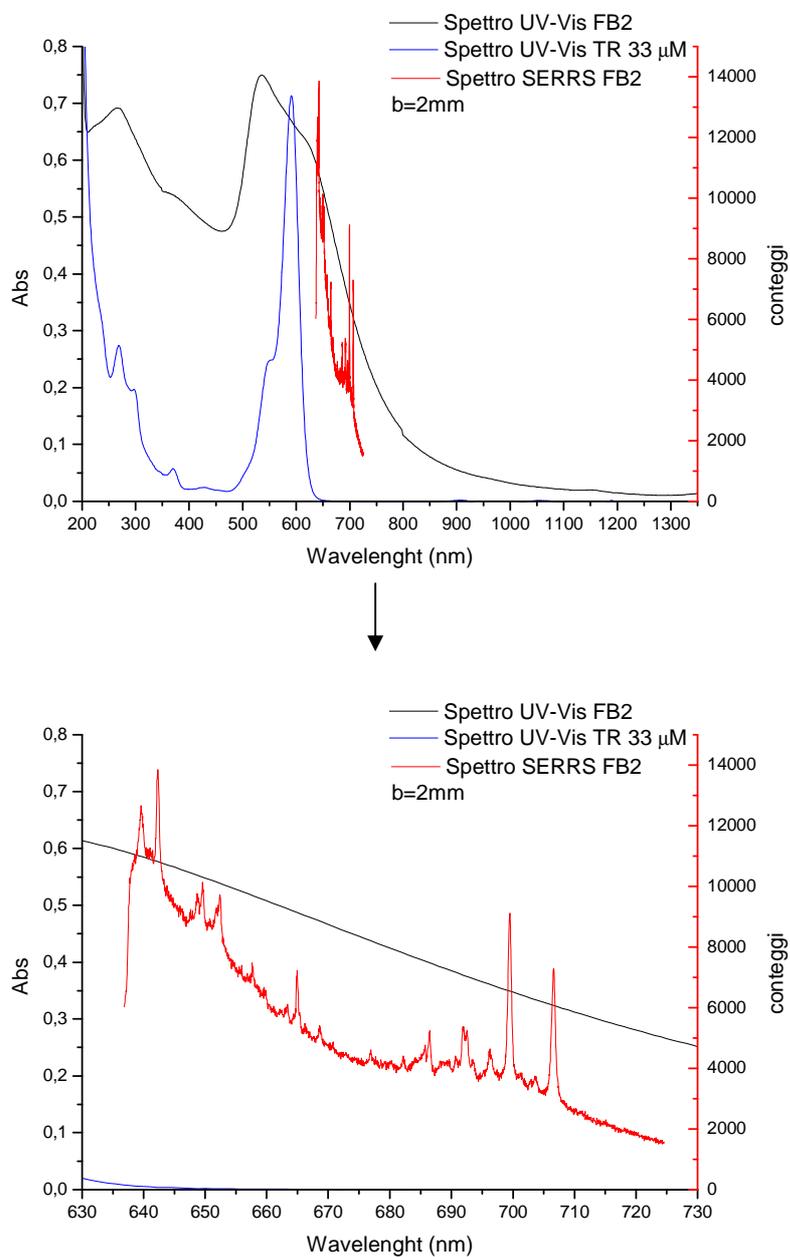


Figura 3.41: Spettri finali UV-Vis-NIR e Raman-SERRS sovrapposti.

3 – PARTE SPERIMENTALE

Preparazione FB3: AuNP aggregate + LipNB + D2B + mPEG-SH

Spettri di assorbimento UV-Vis-NIR

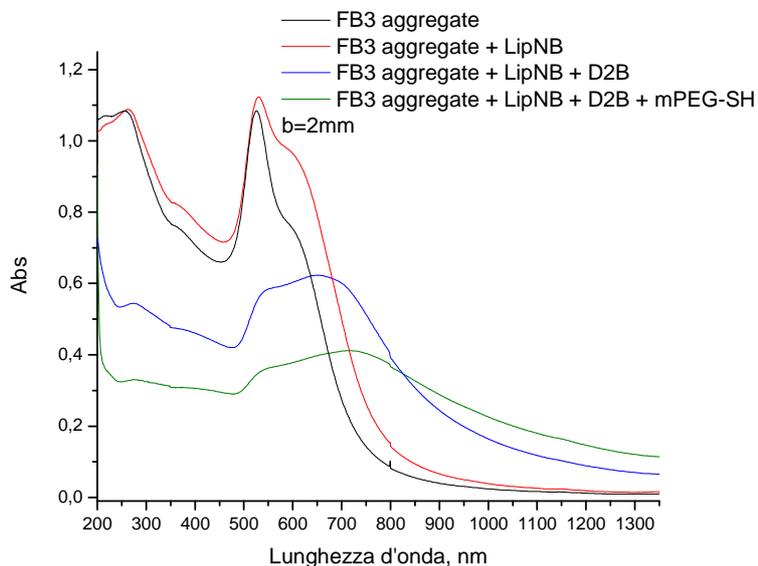


Figura 3.42: raccolta degli spettri di assorbimento UV-Vis-NIR del campione FB3 durante le fasi di preparazione.

Spettri Raman-SERRS

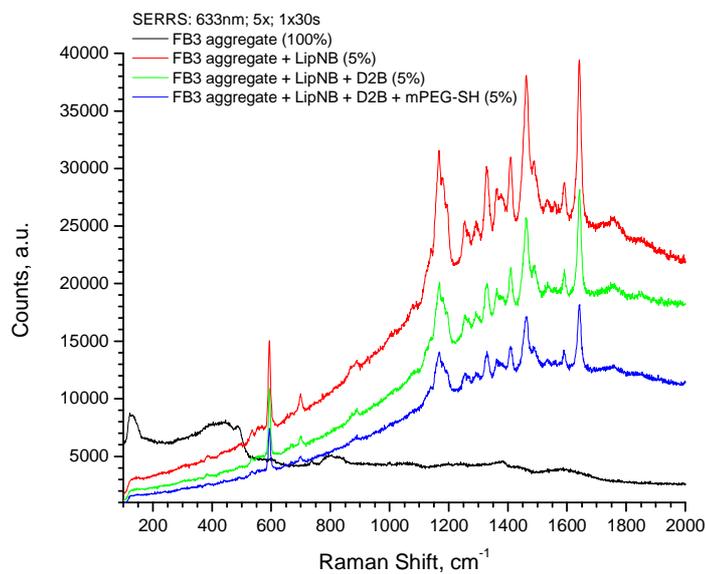


Figura 3.43: raccolta degli spettri SERRS del campione FB3 durante le fasi di preparazione, tra parentesi è indicata la potenza del laser.

3 – PARTE SPERIMENTALE

Sovrapponendo gli spettri finali UV-Vis-NIR e Raman SERRS:

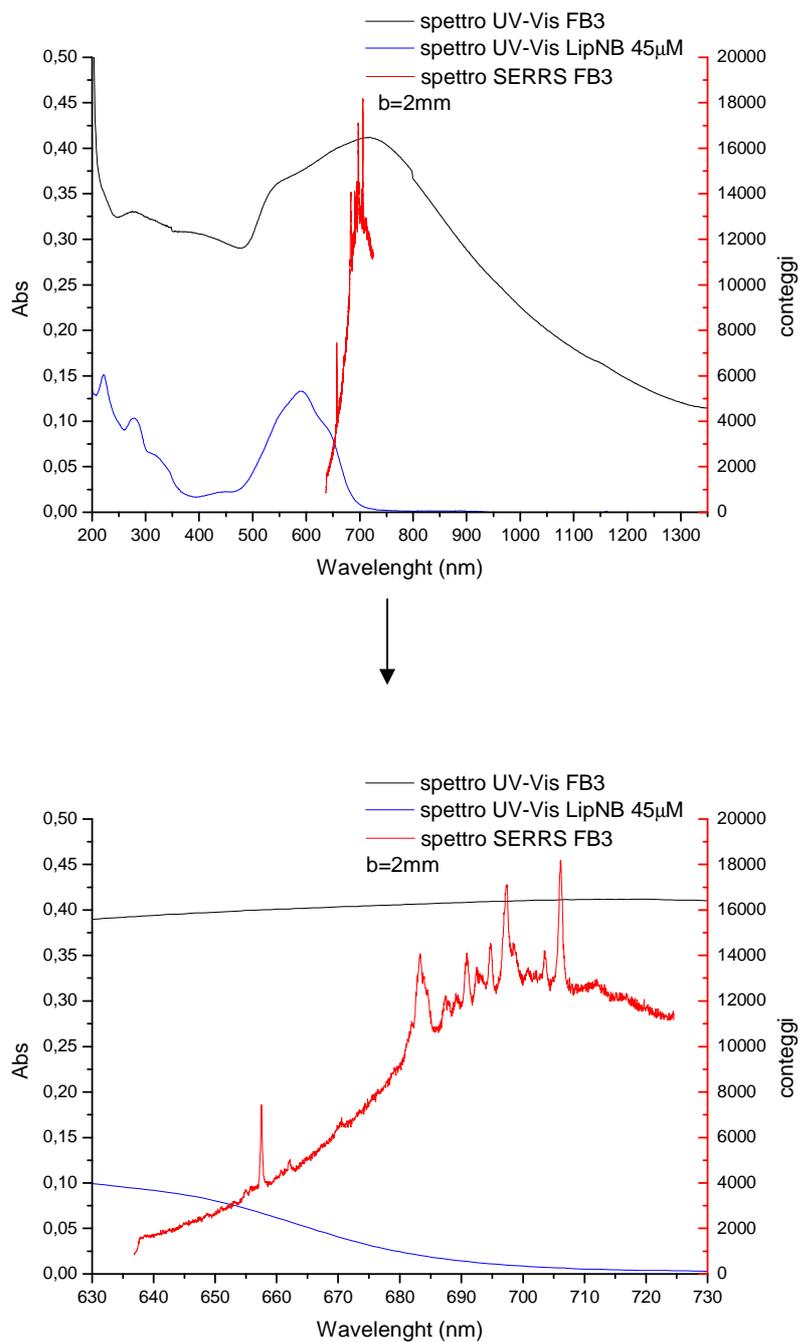


Figura 3.44: Spettri finali UV-Vis-NIR e Raman-SERRS sovrapposti.

Preparazione **FB4: AuNP aggregate + LipNB + mPEG-SH**

Spettri di assorbimento UV-Vis-NIR

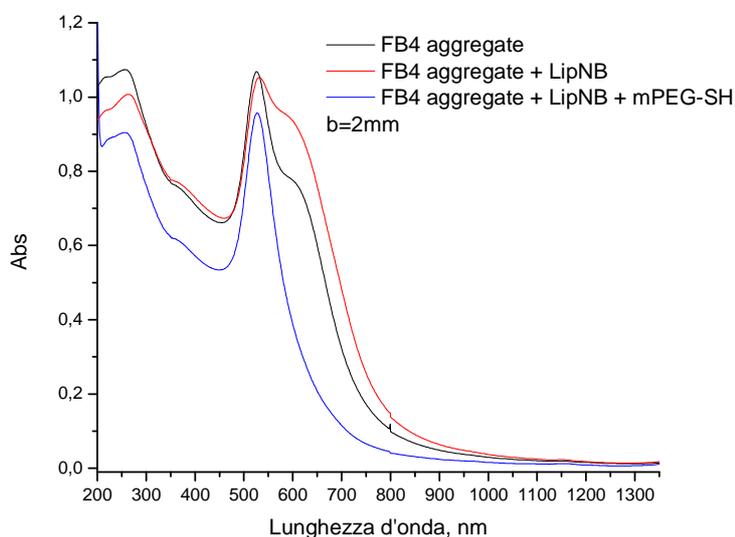


Figura 3.45: raccolta degli spettri di assorbimento UV-Vis-NIR del campione FB4 durante le fasi di preparazione.

Spettri Raman-SERRS

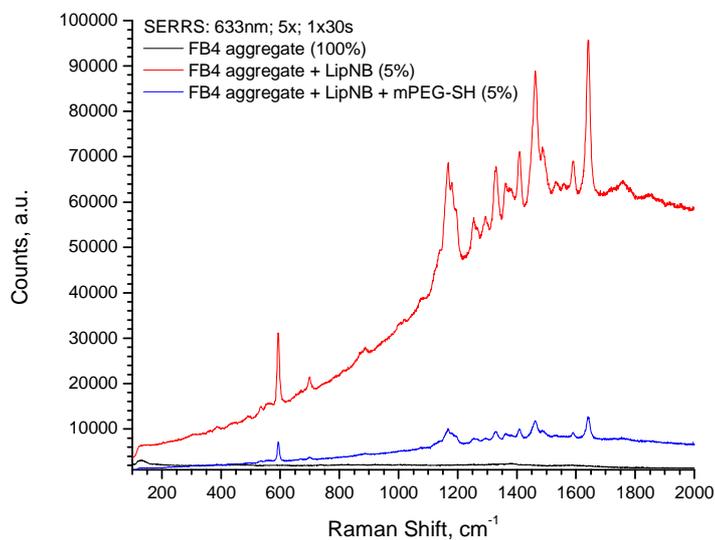


Figura 3.46: raccolta degli spettri SERRS del campione FB4 durante le fasi di preparazione, tra parentesi è indicata la potenza del laser.

3 – PARTE SPERIMENTALE

Sovrapponendo gli spettri finali UV-Vis-NIR e Raman SERRS:

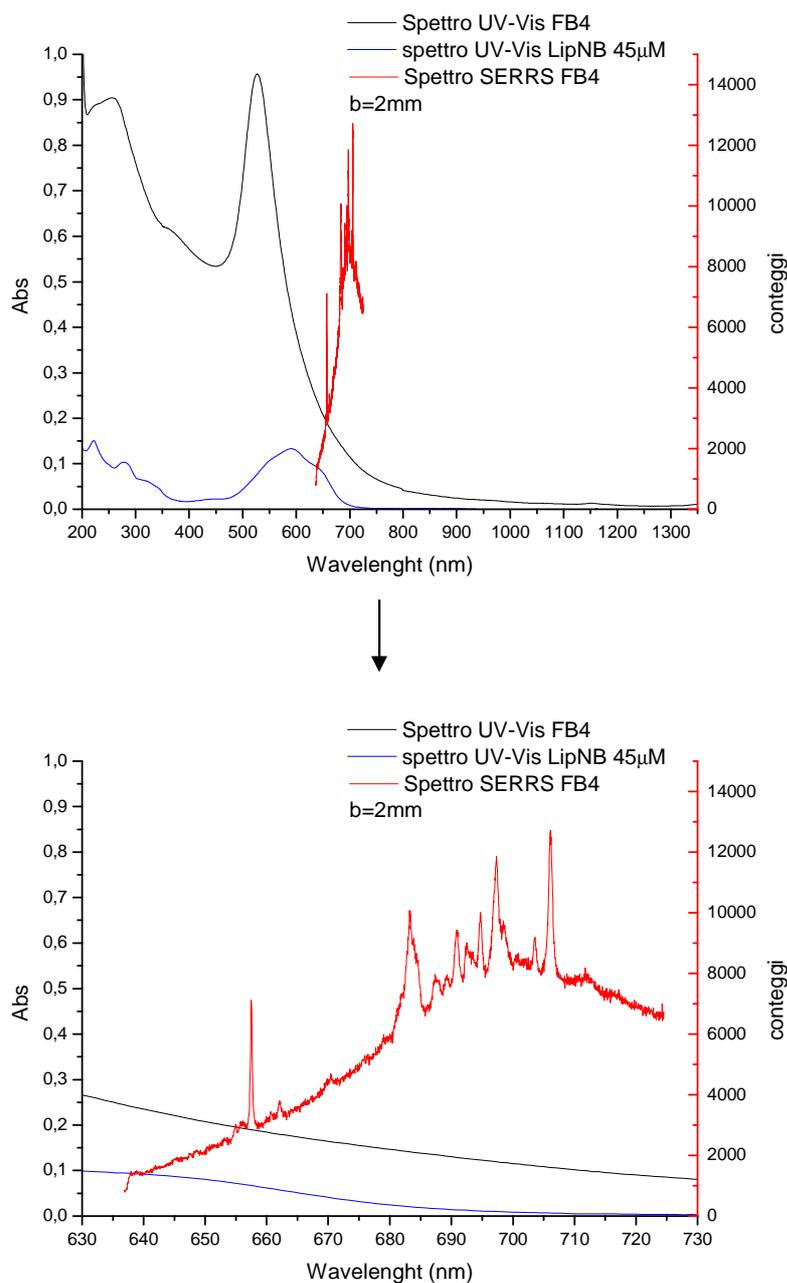


Figura 3.47: Spettri finali UV-Vis-NIR e Raman-SERRS sovrapposti.

In questa preparazione si nota lo stesso comportamento già osservato e commentato negli esperimenti di correlazione del segnale SERRS con la quantità di SERS *reporter* (par. 3.3.1.1) ovvero disaggregazione dei nanosistemi accompagnata da una diminuzione del segnale SERRS. Questo comportamento si osserva in particolare per il LipNB dopo aggiunta di mPEG-SH.

3 – PARTE SPERIMENTALE

Preparazione FB5: AuNP aggregate + TR-cys-SH + 4C4 + mPEG-SH

Spettri di assorbimento UV-Vis-NIR

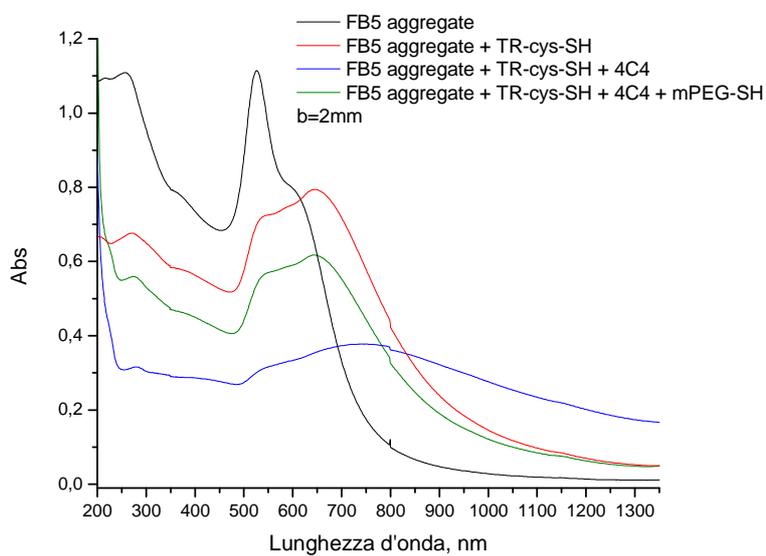


Figura 3.48: raccolta degli spettri di assorbimento UV-Vis-NIR del campione FB5 durante le fasi di preparazione.

Spettri Raman-SERRS

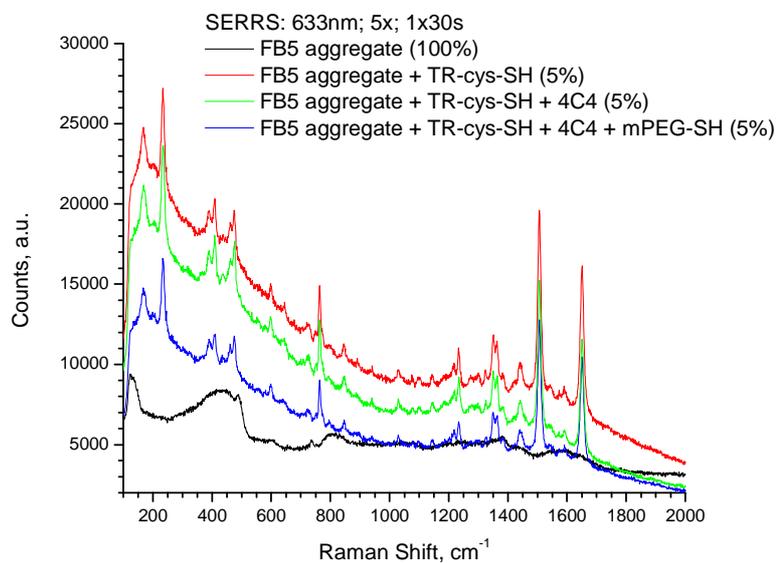


Figura 3.49: raccolta degli spettri SERRS del campione FB5 durante le fasi di preparazione, tra parentesi è indicata la potenza del laser.

3 – PARTE SPERIMENTALE

Sovrapponendo gli spettri finali UV-Vis-NIR e Raman SERRS:

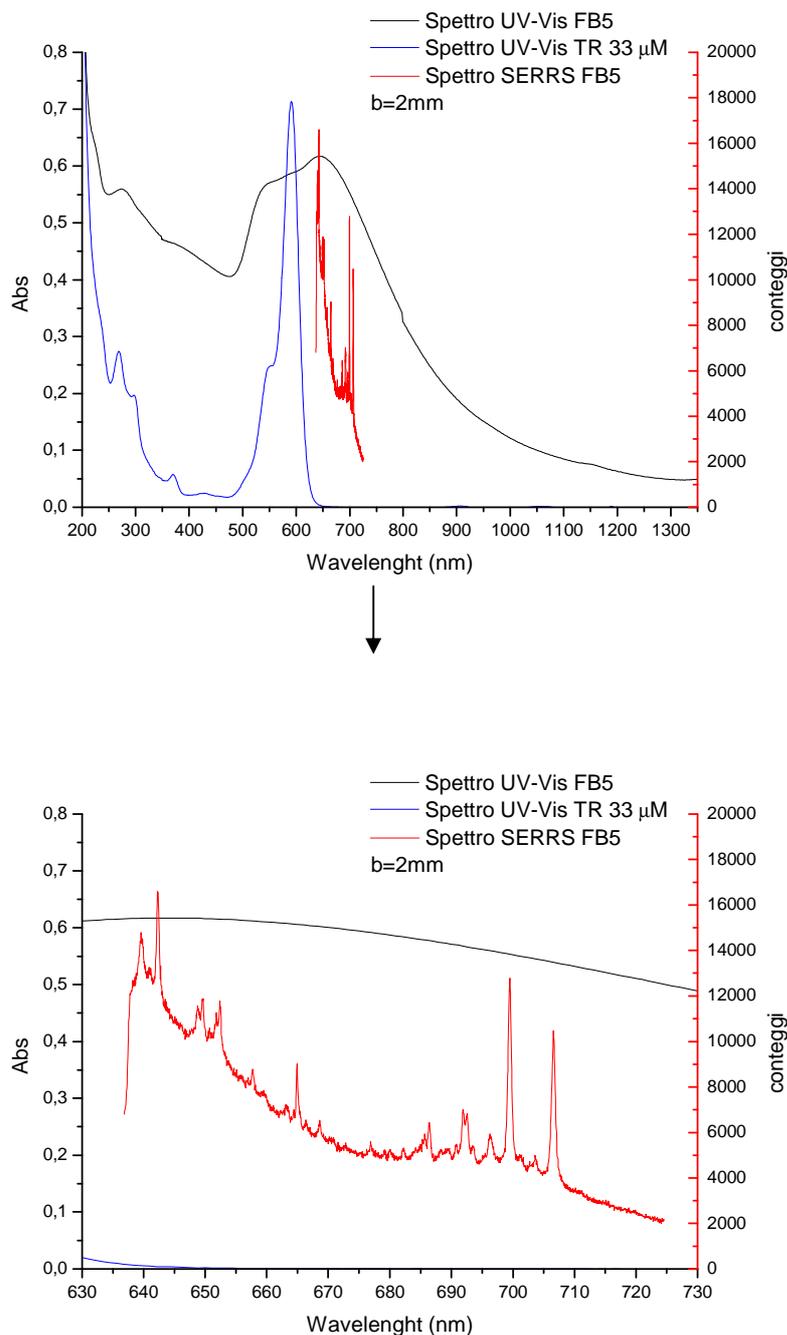


Figura 3.50: Spettri finali UV-Vis-NIR e Raman-SERRS sovrapposti.

In questo campione, dopo l'aggiunta del mPEG-SH si assiste ad una disaggregazione favorevole per il SERRS, come si osserva dagli spettri UV-Vis-NIR: si passa infatti dalla presenza di aggregati molto grossi (forte assorbimento a 1000nm) al ripristino del picco a 600-700nm caratteristico degli aggregati desiderati.

Resa di funzionalizzazione dell'anticorpo per le preparazioni FB1 e FB3

Una parte importante della preparazione delle nanostrutture è quella della funzionalizzazione con l'anticorpo.

La reazione dell'anticorpo con il 2-IT, la sua purificazione su membrana e la funzionalizzazione sulle AuNP vengono monitorate tramite spettroscopia UV-Vis confrontando l'assorbimento a 280nm degli spettri dopo ogni passaggio. Si è potuto osservare che la reazione con il 2-IT e la purificazione non hanno comportato perdite di anticorpo.

Per quanto riguarda la preparazione FB1 si può osservare in Figura 3.51 che l'anticorpo legato alle particelle risulta essere pari al 3% di quello iniziale:

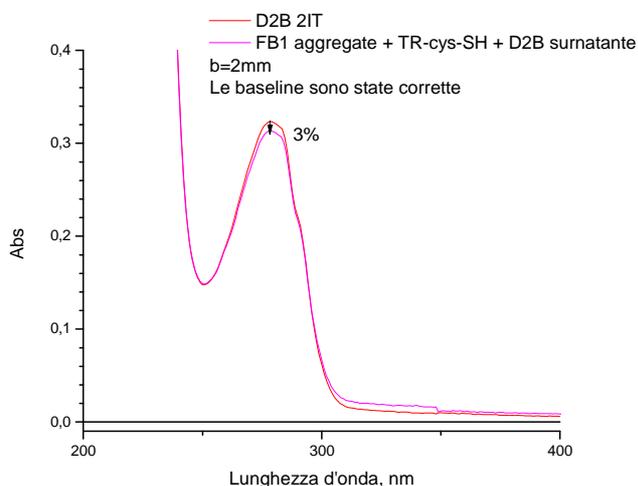


Figura 3.51: confronto tra gli spettri di assorbimento UV-Vis-NIR dell'anticorpo funzionalizzato e del surnatante dopo la reazione con le AuNP.

Per il campione FB3 la resa è invece pari al 13%:

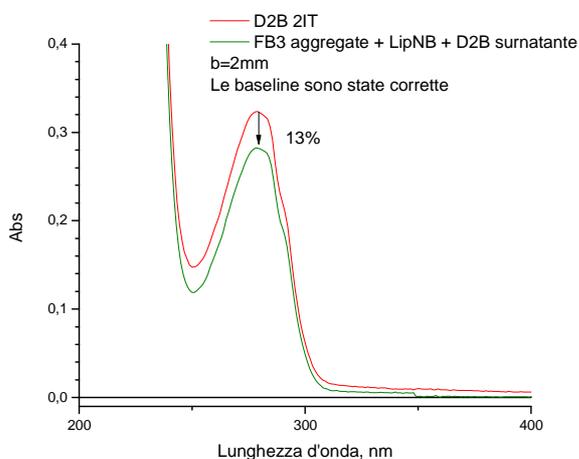


Figura 3.52: resa dell'anticorpo D2B sulla preparazione FB3

Resa di funzionalizzazione dell'anticorpo per la preparazione FB5

Anche in questo caso non è stato perso anticorpo nei passaggi di reazione con il 2-IT e la conseguente purificazione.

La resa dopo la funzionalizzazione delle particelle è risultata del 9%.

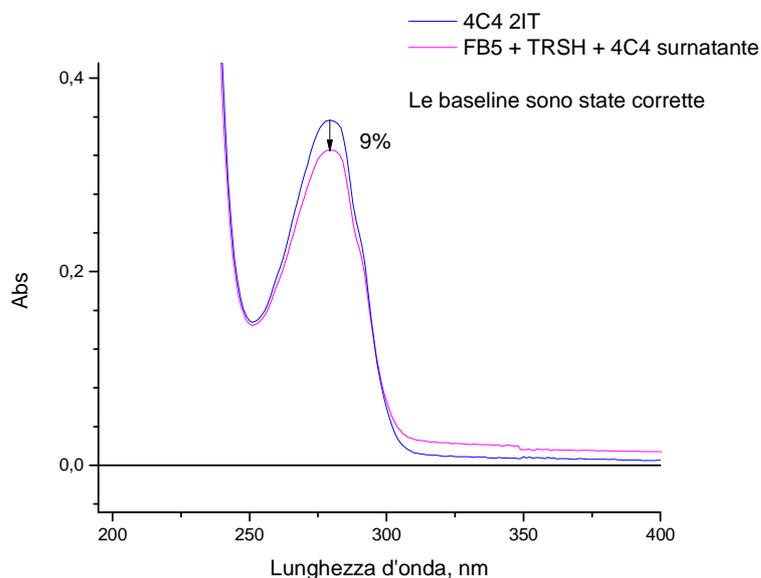


Figura 3.53: resa dell'anticorpo 4C4 sulla preparazione FB5.

Sebbene le rese siano basse, secondo il gruppo di Immunologia del Policlinico Universitario "G.B. Rossi" di Verona, che ha fornito gli anticorpi, le quantità legate sono comunque sufficienti per l'uso delle nanostrutture nei test ELISA.

3.5 Incubazione dei nanosistemi con le cellule tumorali per test di *targeting* e *imaging*

Una serie di test per verificare le proprietà di *targeting* e *imaging* delle preparazioni AS1 e AS2 erano state riportate in una tesi precedente [46]. In questo lavoro di tesi si è approfondita l'analisi studiando i casi in cui le capacità di *multiplexing* delle nanostrutture vengono verificate usando miscele di cellule che esprimono antigeni di diversa natura.

Le preparazioni AS1 e AS2 sono state perciò incubate con miscele di cellule appartenenti a linee cellulari diverse, per testare le capacità di *multiplexing*.

L'incubazione è stata effettuata nel laboratorio di Immunologia del prof. Colombatti all'Università di Verona.

I campioni con le varie miscele di linee cellulari sono indicati nell'elenco seguente (con i simboli "+" e "-" si indica se l'antigene è o non è presente sulle cellule):

- LNCaP (PSMA+) + PC3wt (PSMA- PSCA-) (rapporto 50:50)
- PC3 PSCA(PSCA+) + PC3wt (PSMA- PSCA-) (rapporto 50:50)
- LNCaP PSCA (PSMA+ PSCA+) + PC3wt (PSMA- PSCA-) (rapporto 50:50)
- LNCaP (PSMA+) + PC3 PSCA (PSCA+)

La procedura di incubazione dei nanosistemi è stata la seguente:

- deposizione delle cellule in pozzetti da 24 su vetrini polilisinati (10 μ g/mL): 160.000 cellule/pozzetto, lasciate una notte in incubatore;
- aspirazione del terreno di coltura e incubazione con NP diluite in PBS+BSA all'1% (volume di incubazione 200 μ L/pozzetto, 2h a 37°C);
- aspirazione delle NP;
- lavaggi con PBS (circa 1 mL per lavaggio, a temperatura ambiente);
- fissaggio con paraformaldeide 2% e saccarosio 4% per 20 minuti a temperatura ambiente;
- lavaggi con PBS;
- asciugatura dei vetrini a temperatura ambiente sotto cappa chimica per alcuni minuti.

3.6 Utilizzo dei nanosistemi nel test ELISA

ELISA è un acronimo che deriva dall'inglese *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*. Si tratta di un versatile metodo d'analisi immunologica usato in biochimica per rilevare la presenza di una sostanza usando uno o più anticorpi ad uno dei quali è legato un enzima.

La sostanza da rilevare può essere un antigene o una molecola più piccola, usualmente una proteina. Il test per l'HIV, ad esempio, è un test ELISA nel quale viene accertata la presenza nel sangue degli anticorpi generati dalla risposta del sistema immunitario al virus dell'AIDS.

Ci sono diversi varianti del test ELISA e si differenziano secondo il componente che si vuole rivelare. Nel test diretto viene determinata la presenza dell'antigene, in quello indiretto, la presenza di anticorpi contro l'antigene. Il saggio può essere *competitivo* o *non competitivo*. L'ELISA non competitivo diretto si effettua secondo diverse metodiche: semplice e sandwich ELISA.

Nel metodo semplice l'antigene è assorbito sulla placca e rilevato con un anticorpo marcato da un enzima o da una molecola fluorescente.

3.6.1 Test ELISA sandwich classico

Il test viene effettuato su una piastra in PVC o polistirene con 96 pozzetti (*wells*) come quella in figura 3.54.

La procedura del test ELISA *sandwich* classico può essere riassunta nei seguenti passaggi fondamentali:

- 1) Un anticorpo, detto *capture antibody*, viene purificato e legato sul fondo di ogni pozzetto della piastra;
- 2) Si aggiunge la soluzione test contenente l'antigene, permettendo la formazione del complesso *capture antibody*-antigene;
- 3) Le molecole che non si sono legate vengono eliminate con dei lavaggi dei pozzetti;
- 4) Un secondo anticorpo marcato, detto *detection antibody*, viene aggiunto, permettendo il suo legame all'antigene e il completamento del *sandwich*;
- 5) La quantificazione avviene misurando la quantità di *detection antibody* legato grazie ad una molecola fluorescente oppure di un enzima legato a questo anticorpo.

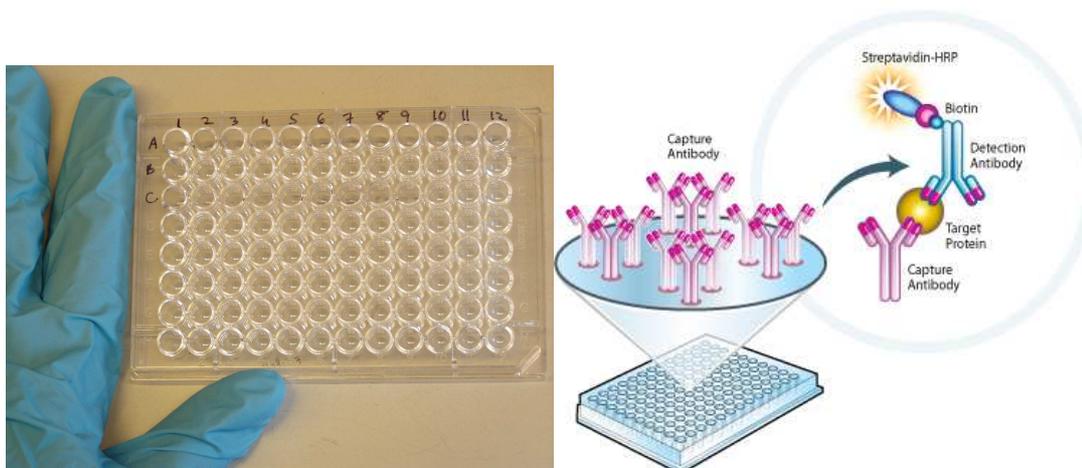


Figura 3.54: piastra per il test ELISA a sinistra e schema del *sandwich* a destra.

Nel test ELISA *sandwich* per la rilevazione dell'antigene PSMA del cancro alla prostata il *coating* della piastra viene effettuato con l'anticorpo monoclonale 7E11C dopodiché si immette nel pozzetto una soluzione di lisato cellulare contenente l'antigene PSMA. Dopo gli opportuni lavaggi si aggiunge la soluzione di anticorpo D2B complessato con una molecola di biotina (o vitamina B₇). Successivamente si introduce una soluzione del complesso streptavidina-HRP (*HorseRadish Peroxidase*): la streptavidina mostra una forte affinità per la biotina e quindi vi si lega mentre l'HRP è l'enzima che successivamente, in presenza di perossido di idrogeno, ossida un substrato che cambia colore. Inizialmente quindi il complesso streptavidina-HRP è incolore, la reazione di ossidazione parte dopo l'aggiunta nei pozzetti di una soluzione di acqua ossigenata. Quando il test è completamente sviluppato si introduce la cosiddetta "soluzione di stop" che blocca la reazione di ossidazione di HRP, nel caso specifico si tratta di una soluzione di HCl. La determinazione della quantità di antigene avviene tramite spettroscopia di assorbimento UV-Visibile. Una rappresentazione schematica del test ELISA *sandwich* classico è riportata in figura 3.54.

3.6.2 Test ELISA *sandwich* con nanoparticelle d'oro funzionalizzate

Lo schema del test è del tutto simile a quello classico tranne per il fatto che il *detection antibody* è quello con cui sono state funzionalizzate le nanoparticelle e la rilevazione avviene tramite spettroscopia SERRS (fig. 3.55).

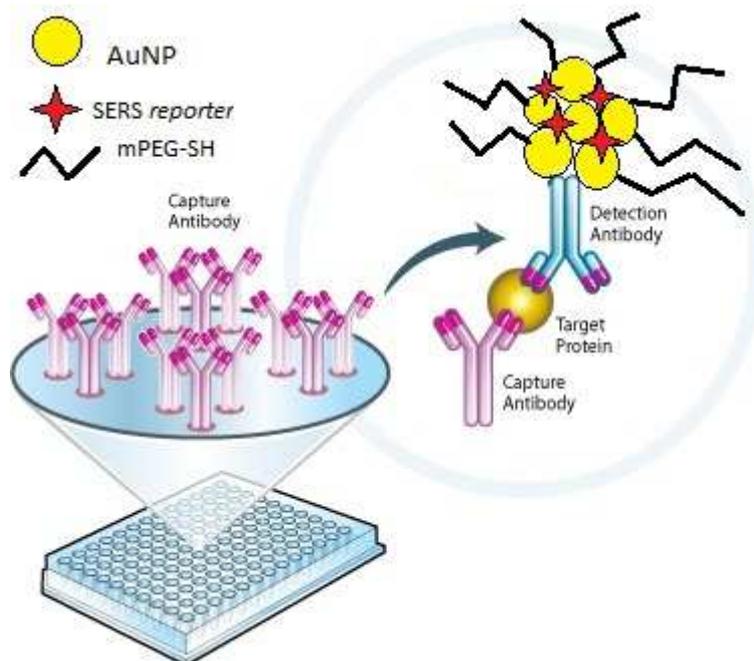


Figura 3.55: il test ELISA sandwich con le nanoparticelle d'oro funzionalizzate.

Lo scopo dell'utilizzo delle nanostrutture nel test ELISA è quello di aumentarne la sensibilità grazie all'impiego della spettroscopia SERRS anziché dell'UV-Visibile di assorbimento o di fluorescenza. Inoltre, sempre grazie alla spettroscopia SERRS, diventano realizzabili anche misure in modalità *multiplexing* e quindi si potrebbero rilevare diversi antigeni in un unico test.

In questa tesi ci si occupa solo dei test di verifica della sensibilità dell'ELISA con le nanoparticelle d'oro funzionalizzate.

Questi test sono stati effettuati sempre presso il laboratorio di Immunologia del Prof. Colombatti all'Università di Verona.

La prova di sensibilità viene condotta diminuendo la quantità di lisato cellulare su ogni pozzetto mentre si mantiene costante la quantità di preparazione di nanoparticelle aggiunta.

Il procedimento per l'esecuzione del test con le nanostrutture è riportato di seguito :

1. Il *coating* della piastra è stato effettuato con l'anticorpo 7E11C (1µg/pozzetto) in tampone carbonato (100 µL/pozzetto) e la piastra è stata incubata O/N a 4°C.
2. Sono stati effettuati quattro lavaggi con TBST¹, asciugando bene i pozzetti dopo l'ultimo lavaggio.

¹ TBS (*Tris Buffered Saline*): soluzione 50mM di TRIS (2-ammino-2-idrossimetil-propano-1,3diolo) e

3 – PARTE SPERIMENTALE

3. La saturazione è stata effettuata con TBST con BSA al 5% (200 μ L/pozzetto) per un'ora a temperatura ambiente.
4. Lavaggi come al punto 2.
5. Sui pozzetti vengono caricate le varie diluizioni di lisato cellulare PC3 PIP (PSMA+) in TBST con BSA allo 0.2% (100 μ L/pozzetto). Da un pozzetto al successivo la quantità di lisato in μ g diminuisce del 50%. Nei pozzetti senza lisato cellulare (controlli negativi) è stato aggiunto solo TBST con BSA allo 0.2%.
6. Lavaggi come al punto 2.
7. Viene aggiunta la preparazione FB1 (5 μ L/pozzetto) in TBST con BSA allo 0.2% (95 μ L/pozzetto) incubando per 1 ora a temperatura ambiente.
8. Lavaggi come al punto 2.
9. Si effettua l'ultimo lavaggio in PBS asciugando bene i pozzetti alla fine.
10. A ciascun pozzetto sono stati aggiunti 100 μ L di glicina 0.1M pH 3 per 5 minuti seguiti da 10 μ L di TRIS a pH 8 per la neutralizzazione.²
11. Tramite un sistema aspirante il liquido contenuto nei vari pozzetti è stato filtrato su una membrana di nitrocellulosa. Quest'ultima impedisce il passaggio ai nanosistemi e quindi le misure SERRS sono state effettuate direttamente su di essa.

150mM NaCl a pH 7.6. TBS-T: TBS con lo 0.05% di TWEEN, un polisorbato surfattante usato come *washing agent*. La funzione del TBST è quella di rimuovere i prodotti non reagiti. TBST con BSA al 5% invece è una soluzione usata per saturare i siti liberi del *sandwich*.

² Glicina e TRIS in questa fase servono per rimuovere il *sandwich* dal pozzetto e quindi filtrarlo.

3.7 Tecnica di *imaging*: misure SERS tramite strumentazione micro-Raman

Per effettuare le misure Raman-SERS è stato utilizzato lo strumento *InVia* della *Renishaw*[®], collegato ad un microscopio *Leika DM-LM* e interfacciato ad un computer.

Dotato di due sorgenti laser (Argon e He-Ne), quella utilizzata per questo lavoro di tesi è stata quella ad elio-neon, che emette radiazione rossa di lunghezza d'onda 632.8 nm, con un'intensità di circa 17 mW. All'interno dello strumento il fascio laser viene veicolato attraverso una serie di filtri aventi diversa densità ottica e viene così attenuato. Successivamente il raggio attraversa un sistema di lenti che funge da *beam expander* e che trasforma la radiazione quasi puntiforme in ingresso in un fascio a raggi paralleli di 6 mm di diametro in uscita; in questo modo l'apertura posteriore del microscopio viene illuminata uniformemente. Tra i due blocchi del *beam expander* si trova un diaframma, chiamato *pinhole*, che viene usato per effettuare microscopia confocale quando è richiesta una maggiore risoluzione spaziale in profondità. Il raggio viene riflesso da un *notch filter* (un filtro che riflette in modo selettivo la radiazione del laser) verso il microscopio e quindi verso il campione. La radiazione che viene diffusa da quest'ultimo viene diretta nuovamente verso il *notch filter* attraverso cui passa la radiazione Raman. Questa viene dispersa su un reticolo (1800 linee/mm) e quindi inviata, dopo una fenditura regolabile, verso il rivelatore CCD (*Charge-Coupled Device*).

Il campione può essere illuminato anche con luce visibile che consente di osservare lo stesso con una telecamera interna alla parte dello strumento detta *podule*. In questa parte si trova anche un riferimento interno in silicio monocristallino, necessario per la calibrazione rapida dello strumento. Il microscopio ottico è dotato di obbiettivi da 5×, 20×, 50× della *Olympus* e un 20× a focale lunga della *Leika*. Lo spot laser sul campione è di 2 μm usando l'obiettivo 50×, 7.0 μm per il 20× e 18 μm per il 5× in modalità standard.

La radiazione diffusa e raccolta dal microscopio passa, come detto prima, attraverso il *notch filter*. Questo filtro taglia la quasi totalità della luce diffusa elasticamente, con una capacità di *cut-off* di circa 80 cm⁻¹. Il CCD usato come rivelatore è costituito da 400 *pixel*, ognuno dei quali di dimensione 22μm×22μm, montato su uno

3 – PARTE SPERIMENTALE

spettrografo con focalizzazione planare. Ogni *pixel* è costituito da un diodo di silicio in grado di generare una corrente quando colpito da radiazioni elettromagnetiche.

Colonne di *pixel* costituiscono i canali all'interno dei quali vengono raccolti elettroni.

Il sensore può analizzare un intervallo di lunghezze d'onda o alternativamente centrarsi attorno ad un dato valore di Raman *shift*.

Questo apparato strumentale è dotato di elevata stabilità ed efficienza ottica, possibilità di scansione continua per finestre spettrali estese ed elevate risoluzioni spaziali.

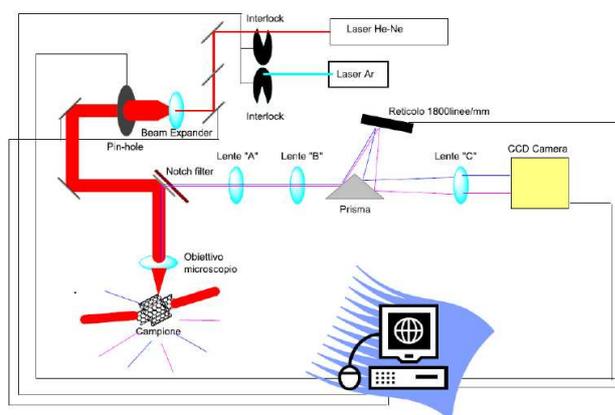


Figura 3.56: schema (in alto) e immagine (in basso) della strumentazione micro-Raman usata.

Imaging in modalità multiplexing

In modalità *multiplexing* lo spettro Raman è stato raccolto in zona *fingerprint* tra 1400cm^{-1} e 1800cm^{-1} .

Le preparazioni per il *targeting* su cellule AS1 e AS2 sono distinguibili grazie al fatto che il Texas Red possiede due picchi caratteristici a circa 1500cm^{-1} e 1650cm^{-1} mentre la Malachite Green presenta un picco a circa 1615cm^{-1} (a metà tra quelli del Texas Red).

3 – PARTE SPERIMENTALE

Lo spettro Raman SERRS quando sono presenti entrambi i coloranti Texas Red e Malachite Green è riportato in figura 3.57.

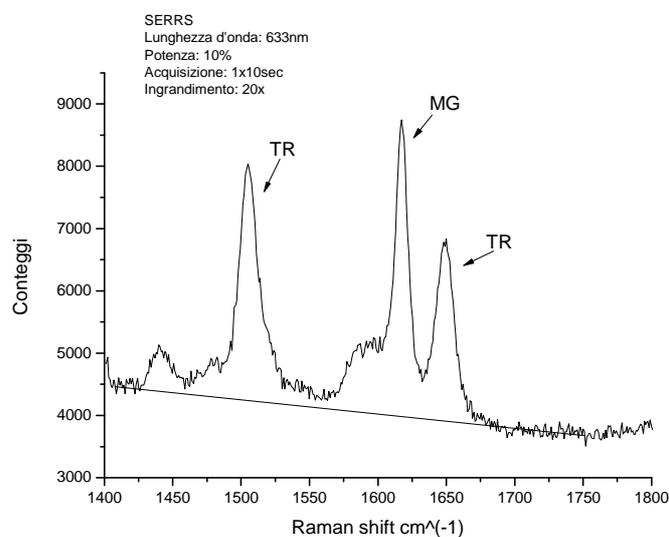


Figura 3.57: spettro Raman SERRS che mostra la presenza di entrambi i coloranti Texas Red e Malachite Green
Nelle preparazioni FB, il *multiplexing* è reso possibile grazie al picco a circa 1460cm⁻¹ del Nile Blue il quale è ben distinguibile dai due picchi del Texas Red (Fig. 3.58).

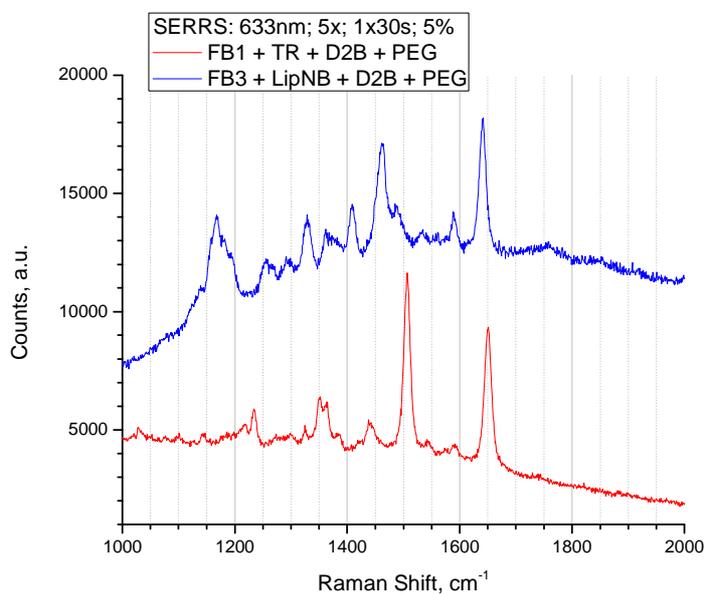


Figura 3.58: confronto tra spettri SERRS delle preparazioni FB1 e FB3.

4. RISULTATI E DISCUSSIONE

4.1 Misure Raman in modalità *multiplexing* per verifica del *targeting* su cellule tumorali

In questa sezione sono raccolti i risultati ottenuti dall'incubazione delle preparazioni AS1 e AS2 con miscele delle cellule indicate nel paragrafo 3.5.

Per ognuno dei quattro vetrini analizzati si riporta, nel seguito, l'immagine delle cellule, acquisita con il microscopio ottico illuminando il campione con luce visibile e utilizzando l'obiettivo 20x. Per registrare lo spettro Raman, il laser a 632.8nm è stato focalizzato su ogni cellula e su alcuni punti esterni detti "punti di vuoto". Nelle immagini i punti sono stati etichettati con un numero per consentirne il riconoscimento.

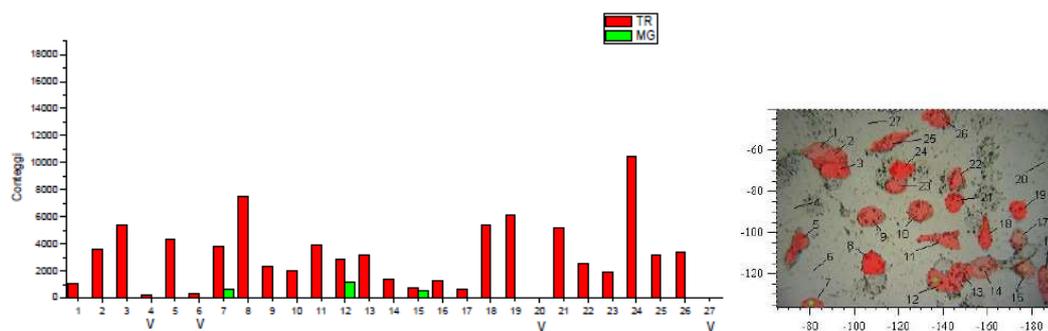
In totale, per ogni vetrino, sono state eseguite misure in un centinaio di cellule più alcuni punti di vuoto.

Gli spettri sono stati raccolti utilizzando una potenza del laser pari al 10% della potenza massima e con un tempo di acquisizione di 10 secondi.

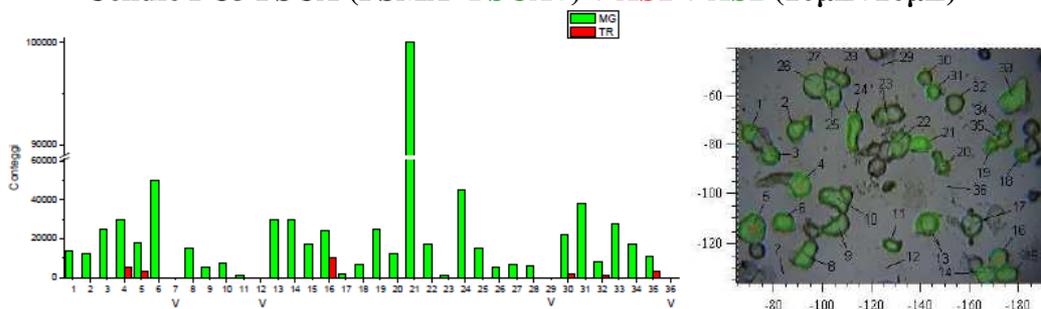
In un precedente lavoro di tesi [46] miscele delle preparazioni AS1 e AS2 sono state incubate con cellule di singole famiglie, che esprimevano o meno gli antigeni del cancro alla prostata e i risultati hanno mostrato buone capacità di *targeting* dei nanosistemi.

A titolo di esempio si riportano i risultati dell'*imaging* [46] con le linee cellulari singole LNCaP (PSMA+ PSCA-), PC3 PSCA (PSMA- PSCA+) e LNCaP PSCA (PSMA+ PSCA+) trattate con miscele di AS1+AS2:

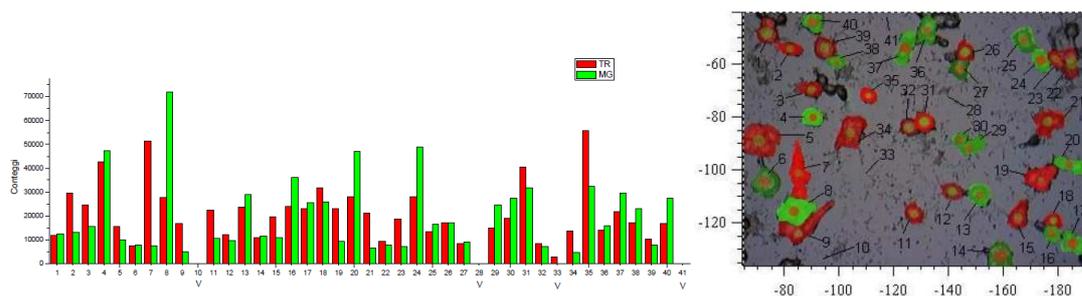
- **Cellule LNCaP (PSMA+ PSCA-) + AS1 + AS2 (10µL+10µL)**



- **Cellule PC3 PSCA (PSMA- PSCA+) + AS1 + AS2 (10 μ L+10 μ L)**



- **Cellule LNCaP PSCA (PSMA+ PSCA+) + AS1 + AS2 (10 μ L+10 μ L)**



Negli istogrammi in ascissa è riportato il numero della cellula su cui è stata fatta la misura mentre in ordinata è riportato il numero di conteggi dello spettro SERRS.

Si deduce che tranne alcuni casi di aspecificità, il *targeting* ha avuto un esito positivo e i segnali SERRS registrati erano intensi.[46]

4.1.2 Analisi dati e risultati

Sono stati raccolti gli spettri SERRS di un numero di cellule doppio o triplo rispetto a quelli registrati in precedenza e sono state valutate con cura le presenze di segnali anche poco intensi del Texas Red e della Malachite Green presenti nelle due nanostrutture AS1 e AS2.

In figura 3.60 si riporta un esempio di spettro registrato per una delle cellule dove si può vedere un segnale intenso della Malachite Green, ma anche i due picchi caratteristici del Texas Red, seppure poco intensi. La presenza dei due segnali mostra che nella cellula vi potevano essere state delle interazioni aspecifiche.

4 – RISULTATI E DISCUSSIONE

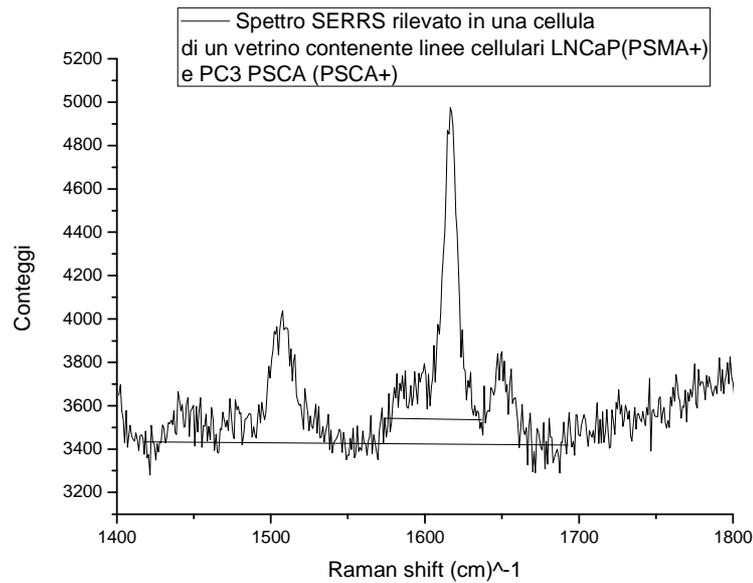


Figura 4.1: spettro SERRS rilevato in modalità *multiplexing*.

L'intensità prevalente di uno dei due segnali può comunque dipendere anche dal fatto che le cellule possono esprimere, secondo gli immunologi, uno dei due antigeni ma che in piccola quantità venga espresso anche il secondo antigene.

La prevalenza viene stimata sul rapporto tra il picco della Malachite Green a 1620cm^{-1} e il picco del Texas Red a 1510cm^{-1} . Un rapporto maggiore di tre è stato usato come criterio per decidere la prevalenza di uno dei due antigeni. In questo modo si ritiene di compensare anche il fatto che i segnali ottenuti inizialmente per i due nanosistemi sono risultati confrontabili, ma differenti. Con questo metodo sono stati elaborati più di 400 spettri SERRS provenienti da altrettante cellule.

Ovviamente, quando in uno spettro è stato rilevato solo uno dei due coloranti il *targeting* è stato attribuito direttamente al nanosistema funzionalizzato con quel colorante, anche se l'intensità era molto bassa.

In seguito si riportano i risultati ottenuti sulle miscele di diverse linee cellulari comprensivi di un grafico a torta con le percentuali dei segnali rilevati e una tabella con i valori attesi.

4 – RISULTATI E DISCUSSIONE

LNCaP (PSMA+ PSCA-) + PC3wt (PSMA- PSCA-) (rapporto 50:50) + AS1 + AS2 (5µL + 5µL)

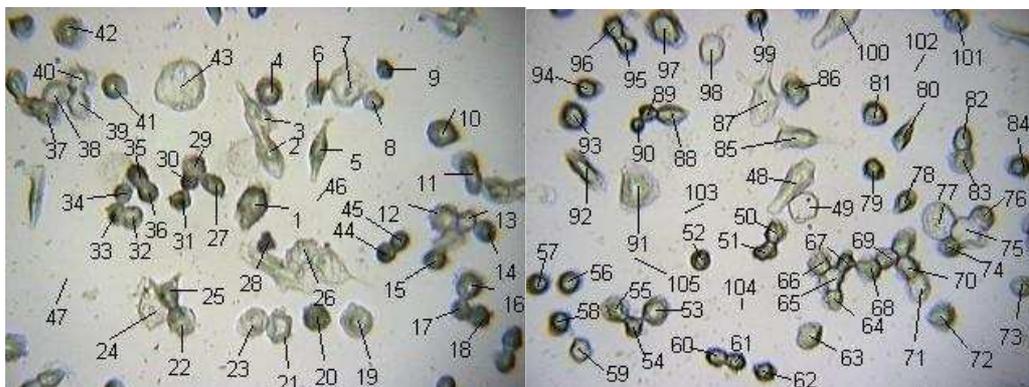


Figura 4.2: immagini delle cellule acquisite al microscopio ottico

Tabella con il riepilogo dei segnali rilevati:

		%	% Attese
Misure totali	106		
Segnali totali	23	22	50
TR	22	21	50
MG	1	1	0
Nessun segnale	83	78	50

Tabella 4.1

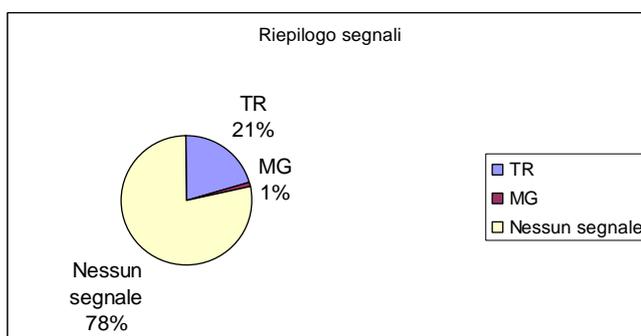


Figura 4.3: grafico a torta con le percentuali dei segnali rilevati.

In questo vetrino erano depositate cellule LNCaP che esprimono l'antigene PSMA (riconosciuto dall'anticorpo D2B della preparazione AS1) e cellule PC3wt che invece non esprimono alcun antigene del cancro alla prostata e quindi non sono riconosciute dai nanosistemi. Ci si sarebbe aspettato che nel 50% delle cellule si sarebbero dovuti registrare segnali del Texas Red, In realtà abbiamo verificato che solo il 21% di cellule mostrano questo segnale. Positivo è comunque il fatto che la Malachite Green sia stata rilevata solo nell'1% dei casi.

In questo vetrino non sono stati invece rilevati spettri con entrambi i coloranti, come ci si aspettava, e questo significa che il *targeting* è stato selettivo.

**PC3 PSCA (PSMA- PSCA+) + PC3wt (PSMA- PSCA-) (rapporto 50:50) + AS1
+ AS2 (5µL + 5µL)**

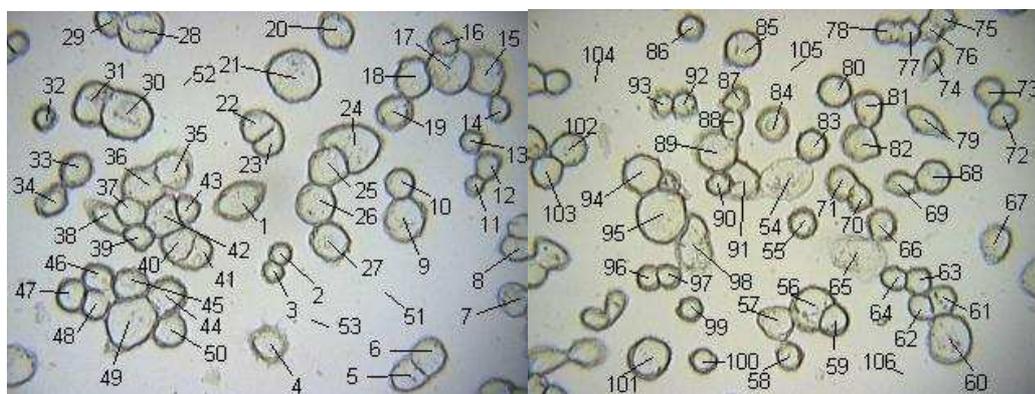


Figura 4.4: immagini delle cellule acquisite al microscopio ottico

Tabella con il riepilogo dei segnali rilevati:

		%	% Attese
Misure eseguite	106		
Segnali totali	32	30	50
Solo MG	14	13	50
Solo TR	16	15	0
Entrambi	2	2	0
Nessun segnale	74	70	50

Tabella 4.2

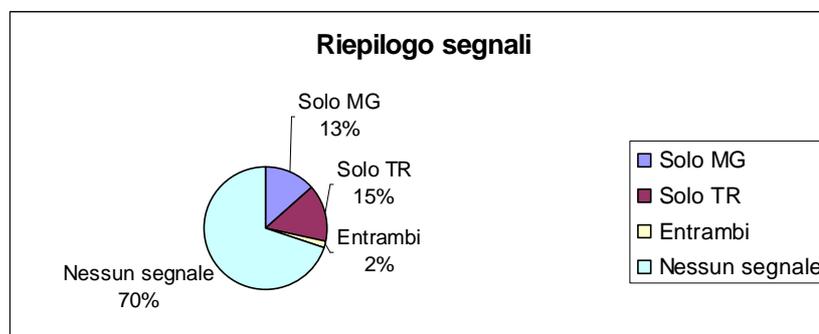


Figura 4.5: grafico a torta con le percentuali dei segnali rilevati.

In questo caso il *targeting* non è risultato selettivo poichè avremmo dovuto ottenere il segnale della Malachite Green nel 50% della totalità delle misure e nel restante 50% nessun segnale. Inoltre il 15% delle misure presenta lo spettro del Texas Red. Alcuni spettri (2%) mostravano poi i picchi di entrambi i coloranti.

4 – RISULTATI E DISCUSSIONE

LNCaP PSCA (PSMA+ PSCA+) + PC3wt (PSMA- PSCA-) (rapporto 50:50) + ASI + AS2 (5µL + 5µL)

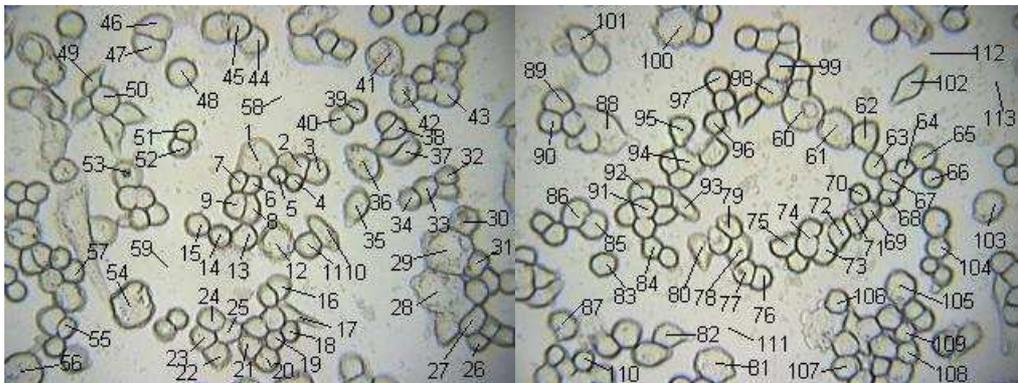


Figura 4.6: immagini delle cellule acquisite al microscopio ottico

Tabella con il riepilogo dei segnali rilevati:

		%	%Attese
Totale misure	113		
Totale segnali	88	78	50
Solo MG	7	6	0
Solo TR	11	10	0
Entrambi	70	62	50
Nessun segnale	25	22	50

Tabella 4.3

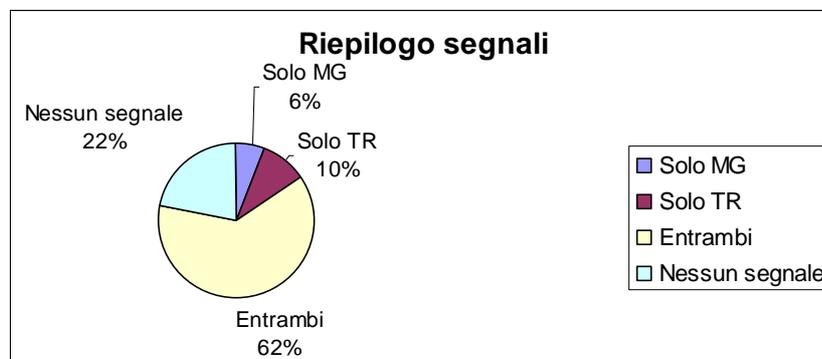


Figura 4.7: grafico a torta con le percentuali dei segnali rilevati.

In questo campione si nota che in più della metà delle misure sono state rilevate entrambe le preparazioni ASI e AS2.

Il dato è certamente in linea con quanto atteso perché significa che entrambi i nanosistemi hanno riconosciuto la presenza dei due tipi di antigeni. Inoltre in questo campione ci si aspettava un consistente numero di spettri in cui comparivano entrambi i coloranti e questo è stato il risultato osservato. Infine solo il 16% degli spettri presentava un solo colorante prevalente.

4 – RISULTATI E DISCUSSIONE

Bisogna notare che la percentuale di spettri che presentano entrambi i segnali era molto bassa nei precedenti campioni, mentre quella dei singoli coloranti era più alta. Questo dimostra come il riconoscimento di cellule che mostrano entrambi gli antigeni come le LNCaP (PSMA+, PSCA+) sia efficace.

LNCaP (PSMA+ PSCA-) + PC3 PSCA (PSMA- PSCA+) (rapporto 50:50) + AS1 + AS2 (5µL + 5µL)

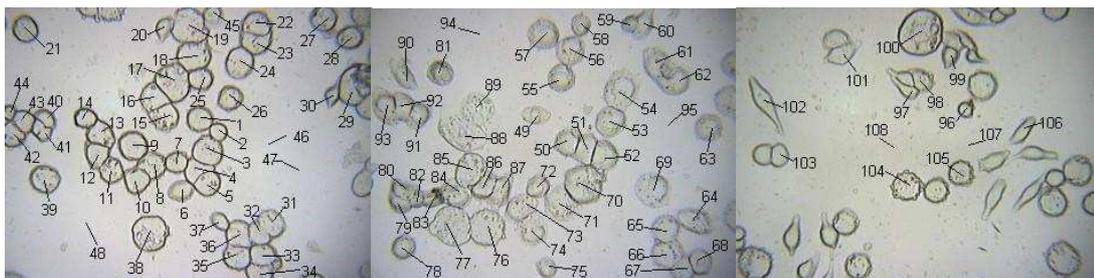


Figura 4.8: immagini delle cellule acquisite al microscopio ottico

Tabella con il riepilogo dei segnali rilevati:

		%	% Attese
Totale misure	108		
Totale segnali	78	72	100
Solo MG	34	31	50
Solo TR	31	29	50
Entrambi i coloranti	13	12	0
Nessun segnale	30	28	0

Tabella 4.4

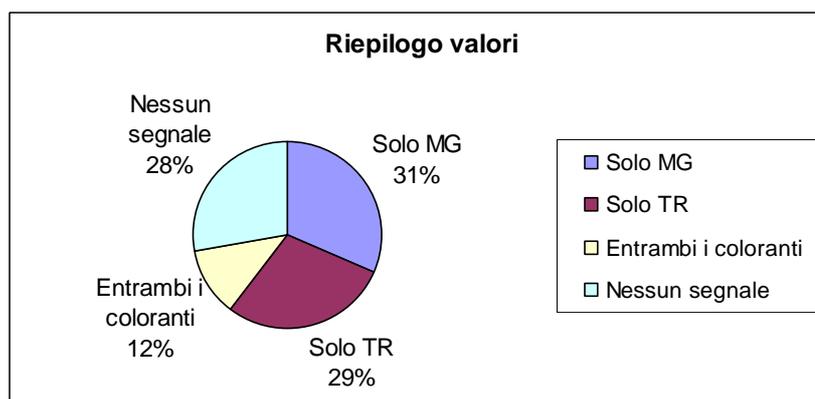


Figura 4.8: grafico a torta con le percentuali dei segnali rilevati.

In questo caso, anche se le percentuali trovate non sono quelle aspettate ci si può ritenere soddisfatti del *targeting* perché i segnali del solo Texas Red e della sola Malachite Green sono stati rilevati in proporzioni quasi equivalenti mentre la percentuale di misure in cui sono stati rilevati entrambi è significativamente più bassa.

Conclusioni sulle misure Raman in modalità *multiplexing* per la verifica del *targeting* su cellule tumorali

Sono stati analizzati quattro campioni contenenti ognuno due famiglie cellulari diverse le quali esprimevano almeno uno degli antigeni del cancro alla prostata, PSMA o PSCA. Questi ultimi vengono riconosciuti da due anticorpi, D2B e 4C4 rispettivamente; il primo si trovava nella preparazione AS1 sulla quale era presente anche il colorante TR-cys-SH mentre il secondo nella preparazione AS2 assieme al colorante MG-cys-SH.

Effettuando misure Raman-SERRS sulle singole cellule è stato possibile raccogliere gli spettri dei coloranti attribuendo il *targeting* alla preparazione AS1 o AS2 o ad entrambe.

Sebbene i risultati ottenuti non coincidano esattamente con quelli attesi è stato dimostrato che i nanosistemi creati sono in grado di effettuare *targeting* perché i segnali rilevati corrispondevano prevalentemente a quelli aspettati.

Le cause delle differenze rispetto a quanto atteso sono state in parte già prima ricordate e possono essere riassunte nei seguenti punti:

- Le cellule esprimono a volte entrambi gli antigeni pur se uno dei due dovrebbe essere quello prevalente in un tipo di cellule;
- Le cellule che dovrebbero mostrare entrambi gli antigeni usualmente non mostrano la stessa quantità dei due tipi di antigeni;
- Le nanoparticelle possono mostrare una adesione aspecifica alle cellule indipendente dalla presenza di uno specifico antigene. Questo può derivare sia dalla incapacità degli anticorpi di riconoscere gli antigeni sia dal fatto che le particelle stesse possono interagire in modo aspecifico con le cellule;

Inoltre vi sono altri fattori estrinseci che possono influenzare i risultati ottenuti. Fra questi si possono ricordare i seguenti:

- Il numero di cellule che gli immunologi avevano mescolate non erano nella proporzione dichiarata cioè non erano 50:50. Questo controllo sembra essere infatti abbastanza difficile.
- I lavaggi, durante la preparazione dei vetrini, non sono state efficaci e alcuni nanosistemi sono risultati essere presenti anche se non avevano aderito alle cellule. Questa considerazione deriva dal fatto che in alcuni casi si sono rivelati segnali SERRS anche dove non c'erano delle cellule;

4 – RISULTATI E DISCUSSIONE

- La statistica ottenuta su un centinaio di cellule potrebbe non essere sufficiente dato che il modo in cui si distribuivano le cellule sul vetrino non rispettavano le proporzioni di quelle inizialmente mescolate. Bisogna infatti ricordare che gli immunologi eseguono statistiche usando circa un milione di cellule poiché gli strumenti, come i citofluorimetri, operano in modo automatico, mentre gli strumenti Raman ancora non sono stati pensati per questo tipo di misure.

Un'ultima annotazione riguarda il fatto che l'analisi è stata fatta dopo alcuni mesi che le cellule erano state incubate e fissate sui vetrini. Questa situazione potrebbe essere causa di una evoluzione degli aggregati di particelle all'interno dei sistemi cellulari per esempio con disaggregazioni o diffusioni che possono causare incertezze sull'identificazione dei segnali stessi.

Il risultato complessivo sembra comunque incoraggiante poiché quanto atteso è anche parzialmente quanto è stato osservato, a parte il caso della seconda preparazione in cui entrambi i segnali sono stati riconosciuti con pari peso mentre solo uno de due doveva essere quello prevalente.

4.2 Misure Raman sui campioni del test ELISA

Come già descritto nel paragrafo 3.6.2 il test ELISA è stato condotto diminuendo la quantità di lisato cellulare nei vari pozzetti (diluizione del 50% ad ogni passaggio) mentre la quantità di preparazione FB1 è stata mantenuta costante. Per ogni concentrazione di lisato sono state effettuate due prove in due diversi pozzetti.

In tabella 4.5 sono riportate le quantità di lisato su ogni pozzetto.

Numero pozzetto		Quantità di lisato cellulare PC3 PIP (PSMA+) µg/pozzetto	FB1 µL/pozzetto	TBST-BSA µL/pozzetto
1	1 bis	20,00	5	95
2	2 bis	10,00	5	95
3	3 bis	5,00	5	95
4	4 bis	2,50	5	95
5	5 bis	1,25	5	95
6	6 bis	0,63	5	95
7	7 bis	0,31	5	95
8	8 bis	0,16	5	95
9	9 bis	0,08	5	95
10	10 bis	0,04	5	95
11	11 bis	0,02	5	95
12	12 bis	0,01	5	95
Controllo neg. 1		0,00	5	95
Controllo neg. 2		0,00	5	95
Controllo neg. 3		0,00	5	95
Controllo neg. 4		0,00	5	95

Tabella 4.5: dati sul test ELISA

Il contenuto dei diversi pozzetti è stato poi filtrato su una membrana di nitrocellulosa sulla quale, dopo l'asciugatura, era possibile vedere ad occhio nudo la serie di *spot* corrispondenti ai pozzetti della piastra per il test ELISA (vedi figura 4.9).

4 – RISULTATI E DISCUSSIONE

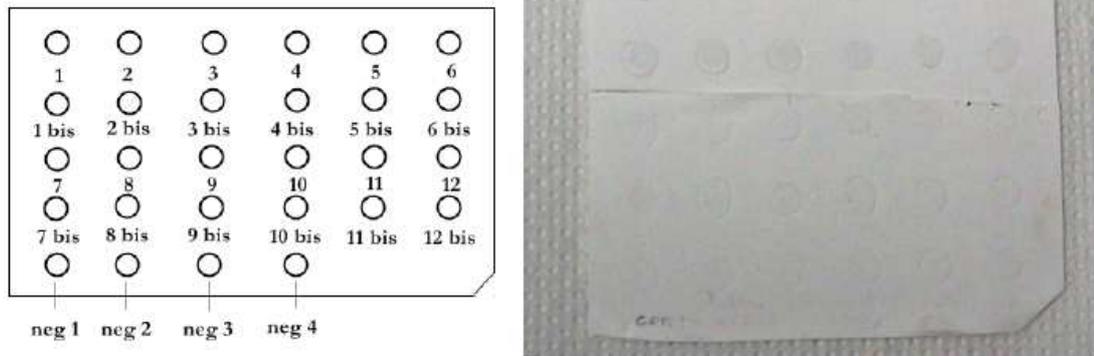


Figura 4.9: a sinistra lo schema degli *spot* sulla membrana di nitrocellulosa con il numero che ne indica il rispettivo pozzetto di provenienza. A destra una foto della membrana, alcuni degli *spot* sono visibili ad occhio nudo.

Contemporaneamente è stato condotto anche il test ELISA classico: in figura 4.10 si è cercato di riprodurre come appariva la piastra del test una volta terminato lo sviluppo del colore. Si osserva che l'intensità del colore diminuisce progressivamente diminuendo la quantità del lisato fino a non essere più visibile ad occhio nudo.

Spot 1 20.00 µg lisato/pozzetto	Spot 2 10.00 µg lisato/pozzetto	Spot 3 5.00 µg lisato/pozzetto	Spot 4 2.50 µg lisato/pozzetto	Spot 5 1.25 µg lisato/pozzetto	Spot 6 0.63 µg lisato/pozzetto
Spot 1 bis 20.00 µg lisato/pozzetto	Spot 2 bis 10.00 µg lisato/pozzetto	Spot 3 bis 5.00 µg lisato/pozzetto	Spot 4 2.50 µg lisato/pozzetto	Spot 5 bis 1.25 µg lisato/pozzetto	Spot 6 0.63 µg lisato/pozzetto
Spot 7 0.31 µg lisato/pozzetto	Spot 8 0.16 µg lisato/pozzetto	Spot 9 0.08 µg lisato/pozzetto	Spot 10 0.04 µg lisato/pozzetto	Spot 11 0.02 µg lisato/pozzetto	Spot 12 0.01 µg lisato/pozzetto
Spot 7 bis 0.31 µg lisato/pozzetto	Spot 8 bis 0.16 µg lisato/pozzetto	Spot 9 0.08 µg lisato/pozzetto	Spot 10 bis 0.04 µg lisato/pozzetto	Spot 11 bis 0.02 µg lisato/pozzetto	Spot 12 bis 0.01 µg lisato/pozzetto
Controllo Negativo 1	Controllo Negativo 2	Controllo Negativo 3	Controllo Negativo 4		

Figura 4.10: riproduzione a colori della piastra del test ELISA classico dopo lo sviluppo.

4 – RISULTATI E DISCUSSIONE

Le misure Raman-SERRS sulla membrana di nitrocellulosa sono state condotte raccogliendo sei spettri per ogni *spot* focalizzando il laser sempre in punti diversi (a differenza delle cellule, il lisato cellulare non è osservabile al microscopio).

Tutti gli spettri sono stati raccolti utilizzando la lunghezza d'onda a 632.8nm con una potenza del laser pari al 10% di quella massima, un tempo di acquisizione di 10 secondi e obiettivo 20x.

I conteggi riportati si riferiscono al picco a 1507cm^{-1} del Texas Red.

Nel grafico seguente (fig. 4.11) si riportano in ordinata i conteggi rilevati facendo la media dei sei spettri registrati per ogni *spot* e in ascissa la quantità di lisato corrispondente.

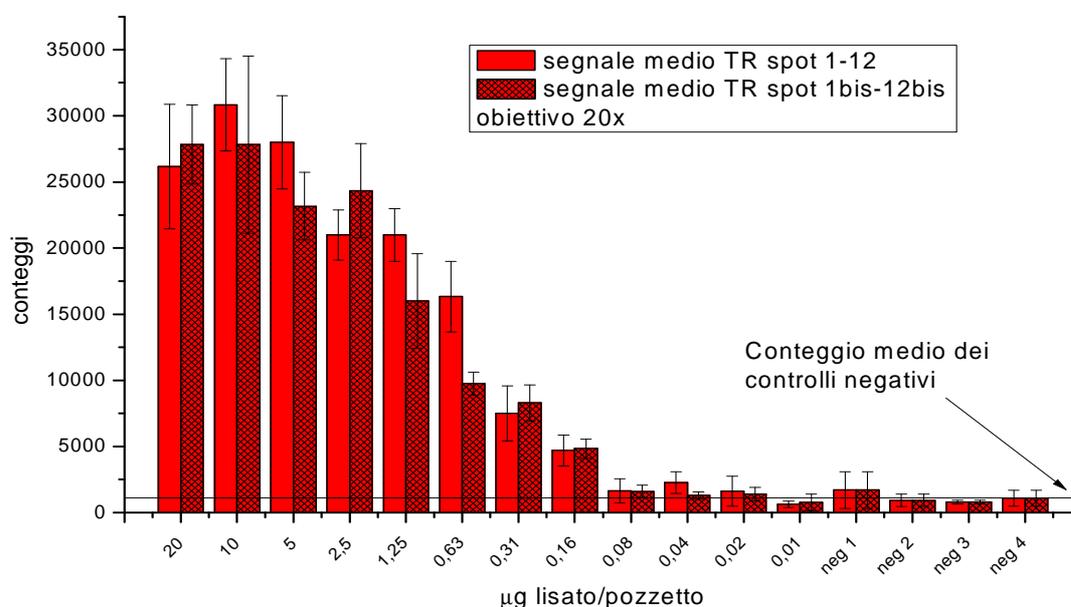


Figura 4.11: confronto tra i segnali SERRS negli *spot* 1-12 e 1bis-12bis.

Nel grafico in figura 4.12 invece viene riportato l'andamento globale dei conteggi medi rispetto alla concentrazione di lisato. In pratica è stata calcolata la media dell'intensità dei segnali registrati per ogni coppia di *spot* avente la stessa concentrazione.

4 – RISULTATI E DISCUSSIONE

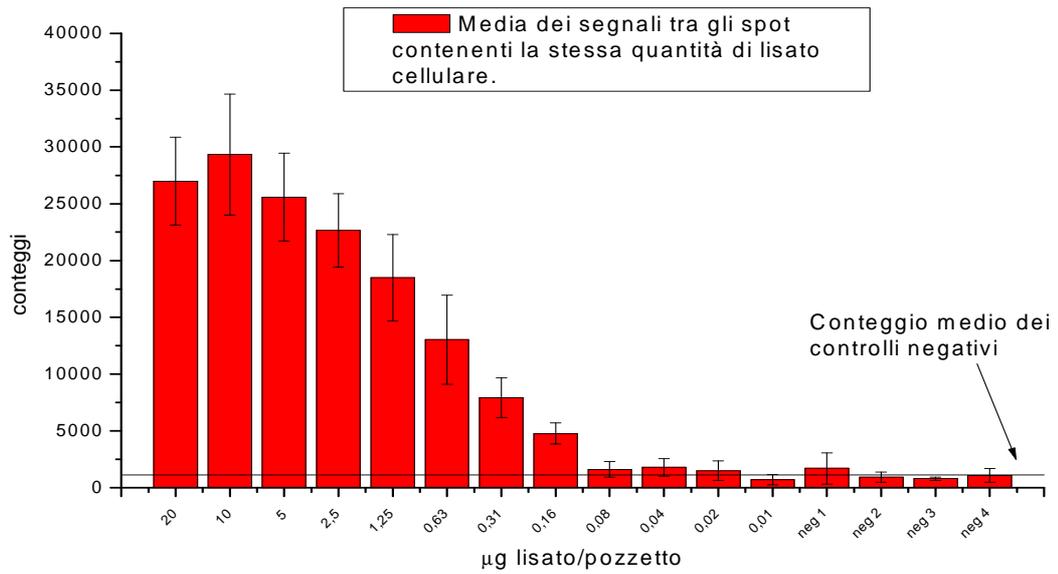


Figura 4.12: andamento globale dei conteggi medi rispetto alla quantità di lisato cellulare.

Da entrambi i grafici in figura 4.11 e 4.12 è possibile osservare che la quantità più bassa di lisato per la quale è stato rilevato un conteggio al di sopra del limite di sensibilità (rappresentato dalla retta nera orizzontale, di ordinata pari al conteggio medio dei controlli negativi) è pari a $0.16\mu\text{g}$.

In figura 4.13 invece si riporta lo stesso tipo di grafico delle figura 4.12 ma con i dati provenienti dal test ELISA classico per un confronto.



Figura 4.13: istogramma con i dati del test ELISA classico.

Nell'istogramma in figura 4.13 l'andamento dei valori di assorbanza è simile a quello dei conteggi di figura 4.12 ma la sensibilità del test sembra essere più bassa perché l'assorbanza più bassa al di sopra di tale limite corrisponde a $0.31\mu\text{g}$ di lisato, un valore quasi 2 volte superiore.

4 – RISULTATI E DISCUSSIONE

Una migliore confronto tra i dati raccolti si può ottenere riportando in un grafico in ascissa i valori delle quantità di lisato in scala logaritmica mentre in ordinata i punti corrispondenti ai conteggi o alle assorbanze rilevati (fig. 4.14 e 4.15).

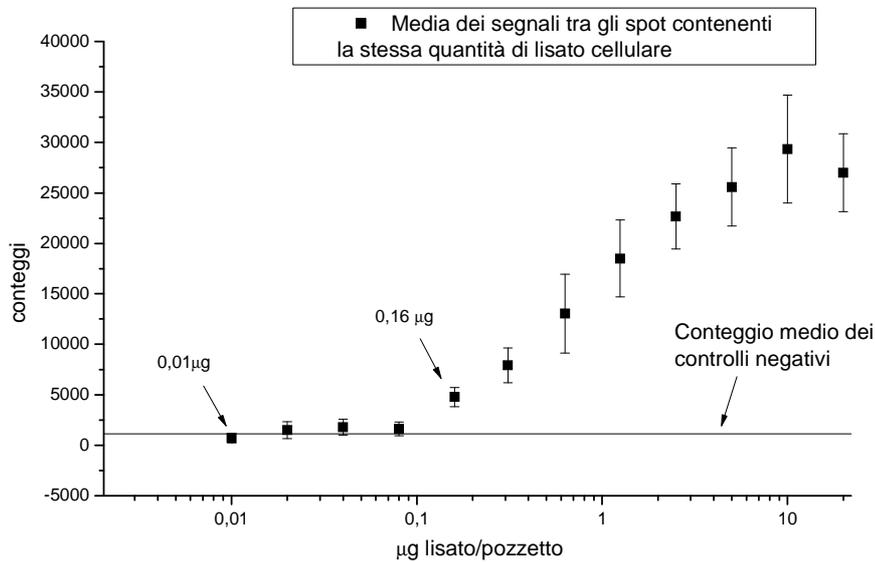


Figura 4.14: grafico che riporta in ascissa la quantità di lisato in scala logaritmica e in ordinata i conteggi medi dei segnali tra gli *spot* contenenti la stessa quantità di lisato cellulare.

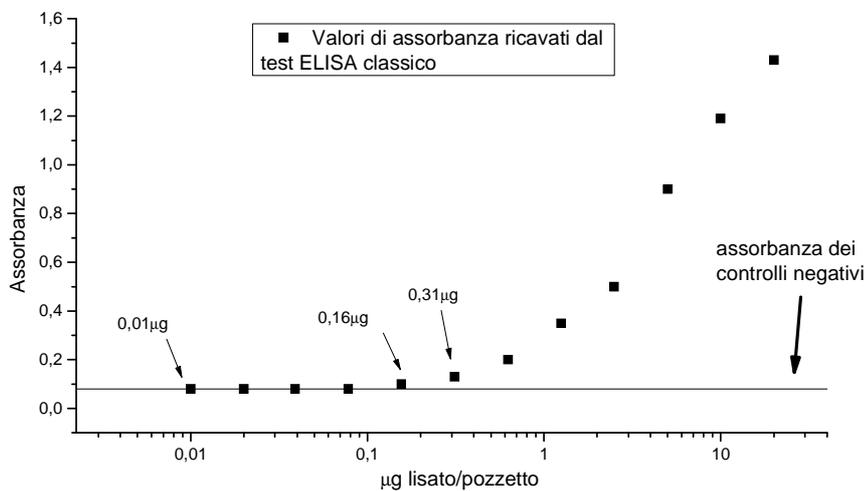


Figura 4.15: grafico che riporta in ascissa la quantità di lisato in scala logaritmica e in ordinata l'assorbanza medie tra i pozzetti contenenti la stessa quantità di lisato cellulare.

Anche tra i grafici in figura 4.14 e 4.15 si nota lo stesso andamento di risposta all'aumentare della quantità di lisato cellulare, inoltre si osserva chiaramente che nel test ELISA condotto con le nanostrutture il primo punto al di sopra dei conteggi medi dei controlli negativi corrisponde a 0,16 µg di lisato mentre per l'ELISA classico il

primo punto al di sopra dell'assorbanza media dei controlli negativi corrisponde a 0.31 μ g.

Conclusioni sul test ELISA condotto con la preparazione FB1 in confronto con il test ELISA classico

Il test ha portato risultati soddisfacenti poiché l'ELISA condotto con le nanostrutture (in questo caso solo FB1) ha portato ad un'aumento della sensibilità di circa 2 volte rispetto al test classico ed è inoltre stata dimostrata la capacità di *targeting* delle nanostrutture.

Miglioramenti del risultato possono certamente essere previsti.

Alcuni dei problemi riscontrati riguardano gli *spot* sulla membrana di nitrocellulosa, che sono troppo grandi rispetto al fuoco del laser. Questo comporta che debbano essere effettuati più spettri Raman-SERRS in punti diversi dello stesso *spot*. Capita spesso infatti che spostandosi da un punto all'altro il segnale sia diverso poiché le particelle sono presenti in modo non omogeneo e anche un solo aggregato di particelle può generare segnali significativi. Inoltre una dimensione minore degli *spot* favorirebbe una maggiore concentrazione degli aggregati e quindi un aumento di segnale e maggiore sensibilità.

Al momento in cui è stata scritta questa tesi l'unica preparazione che è stata utilizzata nel test ELISA è la FB1 e ha fornito risultati molto incoraggianti. In futuro saranno testate anche tutte le altre preparazioni mentre il problema degli *spot* troppo grandi è al momento in via di risoluzione.

I nanosistemi come quelli visti potrebbero quindi essere una valida alternativa all'attuale procedura di esecuzione del test classico in quanto grazie all'effetto SERRS la sensibilità viene aumentata. Inoltre non bisogna dimenticare che il vero punto di forza consisterebbe nella possibilità di eseguire l'ELISA in modalità *multiplexing* in modo da poter rilevare più antigeni in un unico saggio, cosa attualmente molto difficile nel test classico.

5. CONCLUSIONI

In questa tesi sono stati progettati e creati nanostrutture a base d'oro adatte al riconoscimento specifico di antigeni che vengono sovraespressi dalle cellule tumorali del cancro alla prostata.

Nanoparticelle d'oro con un diametro di circa 20nm sono state ottenute da un dischetto massivo con un metodo *top-down*: l'ablazione laser in soluzione.

Le nanoparticelle così create, disperse in acqua e prive di molecole tensioattive sulla loro superficie, sono state poi fatte aggregare. Tali aggregati, utilizzati come substrato, sono stati poi funzionalizzati con un anticorpo e un colorante per poter svolgere contemporaneamente attività di *targeting* e *imaging*.

Durante la descrizione del procedimento per la sintesi dei nanosistemi sono stati esposti anche degli esperimenti utili per ottimizzare l'aggregazione e l'intensità del segnale Raman-SERRS.

Sono state quindi realizzate cinque preparazioni destinate all'utilizzo nel test immunologico ELISA di tipo *sandwich* allo scopo di aumentarne la sensibilità.

Nel presente progetto sono riportati i risultati di una di queste cinque preparazioni sulla quale è stato impiegato l'anticorpo per il riconoscimento dell'antigene PSMA.

Dopo aver effettuato il test ELISA con un procedimento del tutto simile a quello classico, il contenuto dei vari pozzetti è stato filtrato su una membrana sopra la quale successivamente, usando la spettroscopia SERRS, sono stati registrati gli spettri del colorante con cui era funzionalizzata la preparazione.

I dati ottenuti hanno mostrato un andamento simile a quelli del test classico e ciò dimostra che le nanostrutture create possiedono buone capacità di *targeting*, inoltre la sensibilità è stata incrementata di 2 volte.

Risultati incoraggianti sono stati ottenuti anche nell'*imaging* in modalità *multiplexing* di cellule tumorali del cancro alla prostata. Le due preparazioni utilizzate, differenti per il tipo di anticorpo e per il colorante con cui erano funzionalizzate, hanno mostrato una buona capacità di *targeting* e i segnali SERRS registrati erano intensi e adatti all'*imaging* in modalità *multiplexing*.

6. BIBLIOGRAFIA

- [1] Murphy C. J. et al. *Acc. Chem. Res.*, **2008**, 41, 1721.
- [2] Daniel M. C.; Astruc D. *Chem. Rev.*, **2004**, 104, 293.
- [3] Dykman L. A.; Bogatyrev V. A. *Russ. Chem. Rev.*, **2007**, 76(2), 181.
- [4] Faraday M. *Philos. Trans. R. Soc. London* **1857**, 147, 145.
- [5] Mie G. *Annalen Phys* **1908**, 25, 377.
- [6] Ghosh S. K.; Pal T. *Chem. Rev.*, **2007**, 107, 4797.
- [7] Jain P.K. et al. *J. Phys. Chem. B* **2006**, 110, 7328.
- [8] Greenwood N.N.; Earnshaw, A., *Chemistry of the elements*, Elsevier science, Oxford, **2007**.
- [9] Katz E.; Willner I., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2004**, 43, 6042.
- [10] Zsigmondy R., *Das Kolloide Gold*, Leipzig: Akademische Verlags-gesellschaft, **1925**.
- [11] Svedberg T., *Colloid Chemistry* Chem. Catalog. Co, **1924**.
- [12] Turkevitch, J.; Stevenson, P. C.; Hillier, J. *Discuss. Faraday Soc.* **1951**, 11, 55.
- [13] Frens G., *Nature: Phys. Sci.* **1973**, 241, 20.
- [14] Brust M.; Walker M.; Bethell D.; Schiffrin D. J.; Whyman R. J., *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1994**, 801.
- [15] Chen, F.; Xu, G.-Q.; Hor, T. S. A., *Mater. Lett.* **2003**, 57, 3282.
- [16] Busbee B. D.; Obare S. O.; Murphy C. J., *Adv. Mater.* **2003**, 15, 414.
- [17] Meltzer S.; Resch R.; Koel B. E.; Thompson M. E.; Madhukar A.; Requicha A. A. G.; Will P., *Langmuir* **2001**, 17, 1713.
- [18] Wilcoxon J. P.; Provencio P.P., *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, 126, 6402.
- [19] Corma A.; Garcia H., *Chem. Soc. Rev.*, **2008**, 37, 2096.
- [20] Merga G.; Cass L. C.; Chipman D. M.; Meisel D., *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, 130, 7067.
- [21] Pernodet N.; Fang X.; Sun Y.; Bakhtina A.; Ramakrishnan A.; Sokolov J.; Ulman A.; Rafailovich M., *Small*, **2006**, 2, 766.
- [22]. Goodman C. M.; McCusker C. D.; Yilmaz T.; Rotello V. M., *Bioconjug. Chem.*, **2004**, 15, 897.
- [23] Aubin-Tam M. E.; Hamad-Schifferli K.; *Biomed. Mater.*, **2008**, 3, 17.

- [24] Brewer S. H.; Glomm W. R.; Johnson M. C.; Knag M. K.; Franzen S., *Langmuir*, **2005**, 21, 9303.
- [25] Caragheorgheopol A.; Chechik V.; *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2008**, 10, 5029.
- [26] Amendola V., Meneghetti M., *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2009**, 11, 3805.
- [27] Amendola V., Polizzi S., Meneghetti M., *J. Phys. Chem. B* **2006**, 110, 7232.
- [28] Jeanmaire D. L.; Van Duyne R. P., *J. Electroanal. Chem.* **1977**, 84,1.
- [29] Kneipp K.; Wang Y.; Kneipp H.; Perelman L. T.; Itzkan I.; Dasari R. R.; Feld M., *Phys. Rev. Lett.*, **1997**, 78, 1667.
- [30] Kneipp K., *Physics Today*, **2007** 60, (11), 40.
- [31] Campion A.; Kambhampati P., *Chem. Soc Rev.* **1998**, 27, 241.
- [32] Amendola V.; Meneghetti M., *Adv. Funct. Mater.* **2012**, 22, 353.
- [33] Stockman M. I., *Physics today*, **2011**, 64, (2), 39.
- [34] Moskovits M., *J. Raman Spectrosc.* **2005**, 36, 485.
- [35] Thomas K.G.; Kamat P.V., *Acc. Chem. Res.* **2003**, 36, 888.
- [36] Bantz et al, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2011**, 13, 11551.
- [37] Van Duyne et al.; *Anal. Chem.* **2006**, 78, 7211.
- [38] Abbas A.; Lichtman A.H.; *Immunologia: funzioni e alterazioni del sistema immunitario*, Piccin, **1994**.
- [39] Knowles M.A.; Selby P.J., *Introduction to the Cellular and Molecular Biology of the Cancer* 4th ed.; Oxford University Press, **2005**.
- [40] Gabriel J., *The Biology of Cancer* 2nd ed.; John Wiley & Sons, **2007**.
- [41] E&P, anno 33, (4-5) luglio-ottobre **2009**, supplemento 1, pp. 72-73.
- [42] El-Sayed I. H. et al., *Nano Lett.* **2005**, 5, 829.
- [43] Qian X. et al., *Nat. Biotechnol.* **2008**, 26, 83.
- [44] Grubisha et al., *Anal. Chem.*, **2003**, 75, 5936-
- [45] Amendola V.; Meneghetti M., *J. Phys. Chem. C*, **2009**, 113, 4277.
- [46] A. Scarsi, Nanoparticelle di oro funzionalizzate con anticorpi e SERS reporters per targeting e imaging di cellule tumorali in modalità multiplexing ; Tesi di Laurea in Scienze dei Materiali; Relatore: Prof. Moreno Meneghetti; Università degli Studi di Padova, A.A. 2010-2011.
- [47] Amadio L., Ingegnerizzazione di nano compositi con particelle d'oro e anticorpi per imaging e targeting di cellule tumorali; Tesi di laurea in Scienze dei Materiali; Relatore: Prof. Moreno Meneghetti; Università degli Studi di Padova, A.A. 2009-2010.

6 – BIBLIOGRAFIA

[48] N.-h. Ho et al., *Tetrahedron* ,**2006**, 62, 578.

[49]: D. Hazafy et al., *Dyes and Pigments*, **2011**, 88, 315.

7. RINGRAZIAMENTI

Non posso di certo iniziare questa pagina senza prima ringraziare la mia famiglia senza la quale, ovviamente, non mi troverei qui a scrivere queste parole e che mi ha dato il sostegno morale e il supporto necessario in ogni momento della mia vita.

Tutto il periodo di tesi l'ho affrontato con molto entusiasmo e le pagine di questo elaborato sono state scritte sì con fatica, ma con piacere e questo lo devo soprattutto al Prof. Meneghetti. Dare le direttive per il lavoro da fare, correggere eventuali errori e dare consigli sugli esperimenti sono cose che ogni bravo professore è in grado di fare, molto più difficile è invece trasmettere ad una persona la passione per un determinato argomento, come è successo in questo caso.

Restando in argomento “periodo di tesi” non posso non spendere due parole per Alessia e il mio amico di vecchia data Lucio che hanno dato un contributo fondamentale al mio lavoro, tenendomi anche compagnia in laboratorio.

Un grazie va anche a Vincenzo per alcune dritte sperimentali e per le immagini al TEM, ma soprattutto per le divertenti battute e la compagnia in ufficio, insieme a Stefano, nell'ultimo periodo.

Il mio saggio professore di chimica generale, al primo anno di università una volta disse che gli amici che ci saremmo fatti all'università sarebbero stati tali per tutta la vita. Per ora è stato così e a questo punto penso proprio che sarà così e per tutti questi anni trascorsi insieme volevo ringraziare Andrea, Massa, Claudia, Alice, Valentina, Bianca, Lucio (per la seconda volta), Ale e tutti i chimici industriali del mio anno.

Un ringraziamento particolare va ad Angela per i bei momenti trascorsi e da trascorrere insieme.

Le ultime frasi invece le dedico a tutti i miei più vecchi amici da Limena (Fabio, Jessica, Enrico, Baby, Ale, Planz, Ruben, Fute, Dani, Pier, Mirco...) per tutte le divertenti serate passate al Greenwich (e non solo).

Probabilmente mi sono dimenticato qualcuno, spero che non me ne voglia perché non l'ho fatto apposta, ma ora devo chiudere il file e andare a stampare per cui grazie a tutti.