

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



**Nanoparticelle d'argento funzionalizzate con
ligandi peptidici come nanosistemi enzima-
mimetici per catalizzare le reazioni di idrolisi di
esteri**

Relatore: Prof. Alessandro Moretto
Dipartimento di Scienze Chimiche

Controrelatore: Prof. Luca Dell'Amico
Dipartimento di Scienze Chimiche

Laureando: Francesco Rigato

Anno Accademico 2022/2023

INDICE

ABBREVIAZIONI	IV
RIASSUNTO	VI
ABSTRACT	VIII
1. INTRODUZIONE	1
1.1 Nanoscienza e nanotecnologie	1
1.2 Nanoparticelle d'argento.....	4
1.2.1 Nanoparticelle d'argento – Proprietà ottiche	5
1.2.2 Nanoparticelle d'argento - Metodologie di sintesi	7
1.2.2.1 Nanoparticelle d'argento - Sintesi fisica	7
1.2.2.2 Nanoparticelle d'argento - Sintesi chimica	8
1.2.2.3 Nanoparticelle d'argento - Sintesi biologica	10
1.3 Nanoparticelle e nanoclusters	11
1.3.1 Nanoclusters d'argento ultrastabili	13
1.3.2 Nanoclusters d'argento come catalizzatori enzima-mimetici	14
1.4 Sintesi peptidica	16
1.4.1 Sintesi peptidica in soluzione.....	17
1.4.2 Sintesi peptidica in fase solida (SPPS).....	17
1.5 Idrolisi del legame estereo	19
1.5.1 Idrolisi chimica.....	20
1.5.1.1 Idrolisi acida	20
1.5.1.2 Idrolisi alcalina	21
1.5.2 Idrolisi enzimatica	22
1.5.2.1 Aspetti cinetici dell'idrolisi enzimatica	24
2. MATERIALI E METODI	28
2.1 Materiali.....	28
2.1.1 Solventi e reagenti	28
2.1.2 Strumentazione	28
2.2 Metodi.....	30
2.2.1 Sintesi di $M_4Ag_{44}(pMBA)_{30}$	30
2.2.2 Sintesi di Ag:GSH, Ag:Cys, Ag:NAC.....	31
2.2.3 Funzionalizzazione post-sintesi di $M_4Ag_{44}(pMBA)_{30}$ con 4-clorobenzilammina	32
2.2.4 Funzionalizzazione pre-sintesi di $M_4Ag_{44}(pMBA)_{30}$ con il metodo del ponte disolfuro	32

2.2.4.1 Sintesi di Ag:AcidoLipoico e Ag:AcidoLipoico-PheOMe	32
2.2.4.2 Sintesi del dimero di <i>p</i> MBA (d- <i>p</i> MBA), funzionalizzazione con 4-clorobenzilammina e sintesi dei nanoclusters.....	34
2.2.5 Funzionalizzazione pre-sintesi di $M_4Ag_{44}(pMBA)_{30}$ con il metodo della tritilazione del <i>p</i> MBA.....	35
2.2.5.1 Sintesi del batch TrtpMBA	35
2.2.5.2 Sintesi di Ag: <i>p</i> MBA-Aib-NHCH ₂ PhCl, Ag: <i>p</i> MBA-Aib ₂ -NHCH ₂ PhCl e Ag: <i>p</i> MBA-Aib ₃ -NHCH ₂ PhCl	35
2.2.5.3 Sintesi di Ag: <i>p</i> MBA-(Aib) _x -NHCH ₂ PhCl	39
2.2.5.3.1 <i>Size focusing</i> di (Aib) _x -NHCH ₂ PhCl.....	40
2.2.5.4 Sintesi di peptidi catalitici in fase solida.....	41
2.2.5.5 Sintesi di N-(2-etil-1-esil)lipammide (LPAM).....	44
2.2.5.6 Sintesi dei nanoclusters con leganti peptidici catalitici	44
3. RISULTATI E DISCUSSIONE	47
3.1 $M_4Ag_{44}(pMBA)_{30}$, la base di partenza per la sintesi di nanoclusters enzima mimetici.....	47
3.2 Screening di leganti in alternativa al <i>p</i> MBA	49
3.3 Funzionalizzazione del <i>p</i> MBA	50
3.3.1 Funzionalizzazione post-sintesi.....	51
3.3.2 Funzionalizzazione pre-sintesi	53
3.4 Dimerizzazione del <i>p</i> MBA come metodo di protezione del tiolo	54
3.4.1 Sintesi Ag:Acidolipoico e derivati	55
3.4.2 Sintesi del dimero di <i>p</i> MBA (d- <i>p</i> MBA) e derivati.....	58
3.5 Sintesi dei leganti mediante tritilazione del <i>p</i> MBA	60
3.5.1 Leganti a base di Aib	61
3.5.1.1 <i>p</i> MBA-Aib-NHCH ₂ PhCl ; <i>p</i> MBA-Aib ₂ -NHCH ₂ PhCl ; <i>p</i> MBA-Aib ₃ -NHCH ₂ PhCl.....	61
3.5.1.2 <i>p</i> MBA-(Aib) _x -NHCH ₂ PhCl.....	64
3.5.1.2.1 <i>Size focusing</i> della reazione di polimerizzazione.....	68
3.5.2 Leganti peptidici catalitici.....	72
3.5.2.1 Leganti peptidici catalitici - Procedura generale di sintesi	72
3.5.2.2 Legante <i>p</i> MBA-TRIADE-V-CONH ₂	75
3.5.2.3 Legante <i>p</i> MBA-SHD-OH	76
3.5.2.4 Legante <i>p</i> MBA-SHD-OH@30%LPAM.....	77
3.5.2.5 Legante <i>p</i> MBA-F(NH ₂)DHSL-CONH ₂	78
3.5.2.6 Legante <i>p</i> MBA-FSHV-CONH ₂	79
3.6 Analisi cinetiche.....	81
3.6.1 Cinetica di riferimento – Catalisi enzimatica.....	82

3.6.2	Analisi cinetica della catalisi operata da nanoclusters.....	83
3.6.3	Valutazione dell'effetto cooperativo del nanocluster Ag: <i>p</i> MBA-SHD-OH@30%LPAM.....	86
3.7	Caratterizzazione dei leganti peptidici catalitici	89
3.7.1	Legante <i>p</i> MBA-F(NH ₂)DHSL-CONH ₂	89
3.7.2	Legante <i>p</i> MBA-SHD-OH	94
3.8	Caratterizzazione dei nanoclusters sintetizzati con leganti peptidici catalitici	95
3.8.1	Ag: <i>p</i> MBA-F(NH ₂)DHSL-CONH ₂	95
3.8.2	Ag: <i>p</i> MBA-TRIADE-V-CONH ₂	98
3.8.3	Ag: <i>p</i> MBA-FSHV-CONH ₂	102
3.8.4	Ag: <i>p</i> MBA-SHD-OH.....	104
3.8.5	Ag: <i>p</i> MBA-SHD-OH@30 % LPAM	105
4.	CONCLUSIONI	107
5.	RIFERIMENTI	109

ABBREVIAZIONI

Abbreviazione	Corrispondenza
Ac ₂ O	Anidride acetica
ACN	Acetonitrile
AcOEt	Acetato di etile
Aib	Acido α -amminoisobutirrico
Boc	<i>ter</i> -butilossicarbonil
DCC	N,N'-dicicloesilcarbodiimmide
DCM	Diclorometano
DIC	N,N'-diisopropilcarbodiimmide
DIPEA	N,N'-diisopropiletilammina
DMF	N,N-dimetilformammide
DMSO	Dimetilsolfossido
DODT	2,2-(Ethylenedioxy)diethanethiol
EDC*HCl	N-(3-dimetilamminopropil)-N'-etilcarbodiimmide cloridrato
EtOH	Etanolo
Fmoc	Fluorenilmetilossicarbonil
GSH	Glutazione
H ₂ NCH ₂ PhCl	4-Clorobenzilammina
HATU	[Dimetilammino (triazolo [4,5-b] piridin-3-ilossi) metilidene] - dimethylazanium; esafluorofosfato
HOAt	1-Hydroxy-7-azabenzotriazole
HOBt	Hydroxybenzotriazole
HPLC	Cromatografia liquida ad alta prestazione
IR	Infrarossa
MeOH	Metanolo
NAC	N-acetilcisteina
NCA	N-carbossianidridi degli α -amminoacidi
NEt ₃	Trietilammina
NHS	N-idrossisucciinimmide
NMR	Risonanza magnetica nucleare
NPs	Nanoparticelle
<i>p</i> MBA	Acido <i>para</i> -mercaptobenzoico
T3P	Anidride propilfosfonica

TEM	Microscopia a trasmissione elettronica
TFA	Acido trifluoroacetico
TGA	Analisi termogravimetrica
THF	Tetraidrofurano
TIS	Triisopropilsilano
Trt	Tritile
Trt-Cl	Cloruro di tritile
UV-VIS	Ultravioletto-visibile

RIASSUNTO

Nel mondo naturale esistono molte strutture molecolari dotate di elevata complessità e che si formano seguendo un approccio gerarchico definito “bottom-up”. Tuttavia, se si esaminano in dettaglio i principali componenti dei sistemi biologici, come le proteine, gli acidi nucleici e le membrane, una caratteristica saliente che emerge è la loro semplicità intrinseca. Molto spesso, una selezione limitata di gruppi funzionali organici è sufficiente a costituire i componenti principali di quasi tutte le grandi entità biologiche, come nel caso delle proteine, composte da una ventina di amminoacidi o come negli acidi nucleici, composti solamente dalla ripetizione di quattro nucleotidi. Apparentemente, ciò che conta non è la complessità chimica, ma la capacità di controllare con precisione la disposizione spaziale e l'organizzazione di elementi costitutivi relativamente semplici. L'importanza di padroneggiare la disposizione spaziale dei gruppi funzionali appare in tutta la sua evidenza se si considerano gli sforzi di 50 anni dedicati alla chimica biomimetica. Gli enzimi derivano dall'assemblaggio di diversi amminoacidi in un processo che porta ad una struttura molto ben definita, responsabile di grande stabilità e proprietà catalitiche. Gli enzimi nativi possiedono tassi di turnover e selettività senza pari rispetto alle loro controparti non biologiche, inclusa la chemio-, enantio- e sito-selettività. Ad esempio, potrebbe sembrare abbastanza facile riprodurre la triade catalitica “Asp-His-Ser” presente in molti enzimi idrolitici, ma dopo vari tentativi, nessun sistema artificiale ha ancora mostrato una reattività che possa avvicinarsi a quella enzimatica. Emerge così, come la capacità di anticipare e controllare l'organizzazione strutturale e, di conseguenza il comportamento chimico di grandi strutture, sia ancora una sfida per i chimici. Ciò diventa particolarmente vero se, mediante la sintesi chimica, cercassimo di riprodurre grandi strutture tridimensionali come quelle di enzimi o complessi proteici più grandi. Per nostra fortuna, nel tentativo di riprodurre i meccanismi della natura, non ci limitiamo ad imitarla, ma possiamo utilizzare le nostre conoscenze chimiche per esplorare nuove strategie. In questo lavoro abbiamo progettato e realizzato un catalizzatore

multivalente ispirato agli enzimi, che è ottenuto da una messa a punto che coinvolge orientamento, idrofobicità locale e prossimità spaziale di corti ligandi peptidici, che vengono disposti sulla superficie di nanoparticelle d'argento, con l'obiettivo di raggiungere le prestazioni della triade catalitica per quanto riguarda l'attività chimica.

ABSTRACT

Many living and non-living molecular structures in the natural world are extremely complex and are formed following a hierarchical bottom-up approach. But if the main players in biological systems, such as proteins, nucleic acids, and membranes, are examined in detail, one salient feature that emerges is their intrinsic simplicity. Polymers composed of only two tens of amino acids, or of four nucleotides, with a limited selection of organic functional groups are in many cases the principal component of almost any large biological entity. Apparently, what matters is not chemical complexity but the ability to precisely control the spatial arrangement and organization of relatively simple building blocks. The importance of mastering spatial arrangement of functional groups appears in all its evidence when the 50-year efforts devoted to biomimetic chemistry are considered. Enzymes result from the assembly of different amino acids in a process that leads to a very well-defined structure responsible for great stability and catalytic properties. Native enzymes possess turnover rates and selectivity unparalleled by their non-biological counterparts, including chemo-, enantio- and site-selectivity. As an example, it may appear quite easy to reproduce the catalytic triad “Asp-His-Ser” present in many hydrolytic enzymes, but after several attempts, no artificial systems have yet shown a reactivity that may approach that of the enzyme. Thus, it emerges how the capacity to anticipate and control the structural organization, and consequently, the chemical behavior of large structures is still a challenge for chemists. This becomes particularly true if we sought to reproduce large tridimensional structures such as those of enzymes or larger protein complexes by chemical synthesis. On our luck, in the attempt to reproduce nature mechanisms, we are not limited to imitate it, but we can use our chemical knowledge to explore new strategies. With this project we designed and realized an enzyme-inspired multivalent catalyst that is obtained from a fine tuning involving orientation, local hydrophobicity and spatial proximity of short peptide ligands which are patterned on the surface of monolayer-protected silver

nanoparticles with the aim to reaching “catalytic triad” performance in chemical activity.

1. INTRODUZIONE

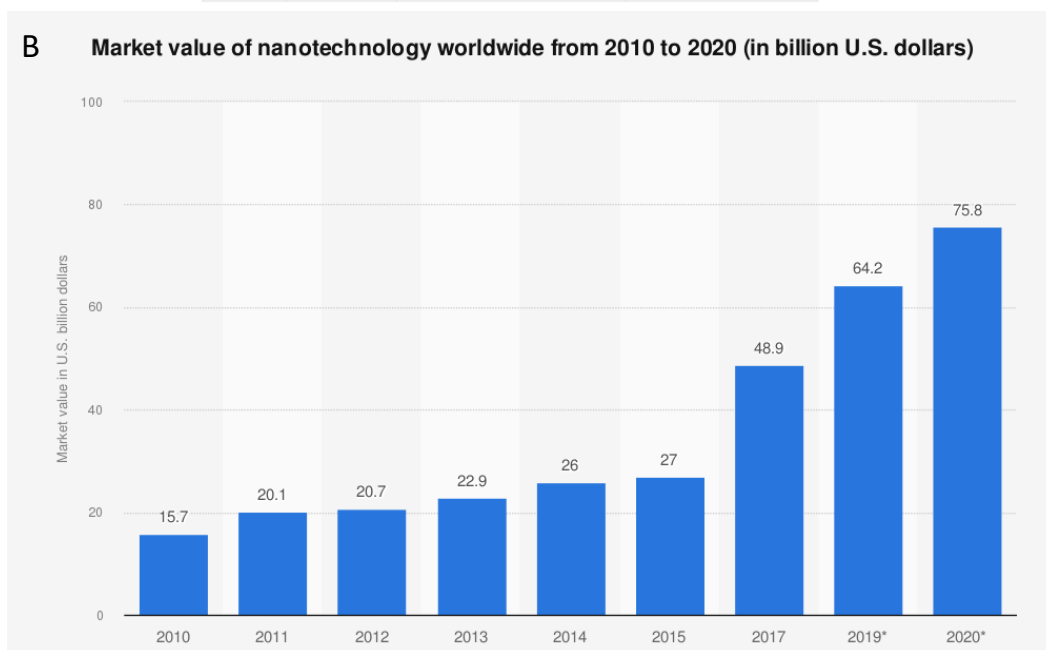
1.1 Nanoscienza e nanotecnologie

La nanoscienza si occupa dello studio di strutture e molecole con dimensioni che variano tra 1 nm e 100 nm, laddove la nanotecnologia sfrutta questi ultimi nanosistemi in applicazioni pratiche⁽¹⁾. Le nanotecnologie trovano largo impiego in diversi settori economici, ed il loro impatto nel mercato sta acquisendo via via sempre più importanza, a tal punto da essere considerate da numerosi esperti come la successiva rivoluzione industriale⁽²⁾. Vari governi a partire dal XXI secolo hanno compreso le potenzialità di questo nuovo settore economico, dedicando parte delle loro risorse economiche come fondi per la ricerca e lo sviluppo nell'ambito delle nanotecnologie. Tra questi paesi, gli USA hanno fin da subito ricoperto un ruolo da leader in questo contesto, istituendo nel 2000 “*the U.S. National Nanotechnology Initiative*”, il primo programma nanotecnologico nazionale nel mondo, arrivando ad investire tra il 2001 ed il 2014 circa 19.4 bilioni di dollari⁽³⁾. Non solo gli USA, ma anche la Cina ha trovato grande spazio in questo nuovo mercato, investendo unicamente nel 2009 1.6 bilioni di dollari, e facendo rientrare la nanotecnologia in una delle quattro maggiori aree di ricerca nel “*Medium and Long Term Development Plan 2006-2020 (MLD)*” approvato dal governo cinese⁽⁴⁾. Cina ed USA si pongono quindi al vertice del mercato e della ricerca in ambito nanotecnologico, ma anche altri paesi, soprattutto asiatici come India, Iran e Corea del Sud, stanno convergendo le loro ricerche su questo nuovo fronte tecnologico. Ciò può essere dedotto analizzando il numero di articoli scientifici legati al “nano mondo” pubblicati in ogni paese nel 2021, in cui compare anche l'Italia, la quale occupa un discreto quattordicesimo posto [Fig.1(A)]. Si evince quindi l'importanza che la Cina sta dando a questo settore, con più di 85'000 pubblicazioni e rappresentando più del 42% delle pubblicazioni totali⁽⁵⁾. Non si parla solo di pubblicazioni, ma anche a livello economico l'ambito delle nanotecnologie sta crescendo ed è caratterizzato da un mercato (quindi brevetti), che a partire dal 2010 fino al 2017, è passato da un valore di 15.7 bilioni

ad uno di 48.9 bilioni di dollari, e secondo le stime di esperti si arriverà ad un valore di mercato di circa 76 bilioni di \$ nel 2020⁽⁶⁾, come si può notare in [Fig.1(B)].

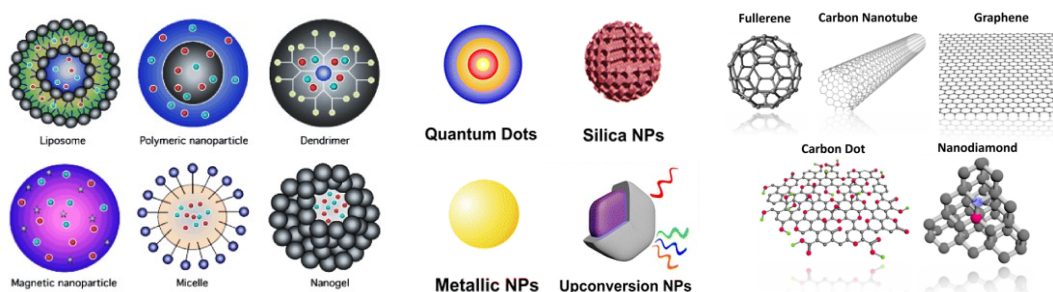
A

Ranking	Country	Total number of nano-articles published (2021)	Share of nano-article to total (%)
1	China	85,758	14.1
2	USA	23,225	4.5
3	India	19,041	13.9
4	Iran	11,196	18.7
5	South Korea	10,355	12.9
6	Germany	9,019	6.1
7	Japan	7,734	7.2
8	Saudi Arabia	6,923	17.4
9	UK	6,205	4.0
10	Russia	5,888	10.2
11	France	5,771	6.4
12	Spain	5,022	5.6
13	Australia	4,988	5.3
14	Italy	4,939	4.9
15	Egypt	4,757	16.0
16	Pakistan	4,144	13.8
17	Canada	4,140	4.3
18	Turkey	3,946	6.7
19	Brazil	3,876	5.2
20	Taiwan	3,870	10.7



[Fig.1] Classifica delle migliori venti nazioni per quanto riguarda il numero di pubblicazioni in ambito nanotecnologico nel 2021⁽⁵⁾ (A) e statistiche di mercato dal 2010 al 2017 con proiezioni per il 2019 e 2020⁽⁶⁾ (B).

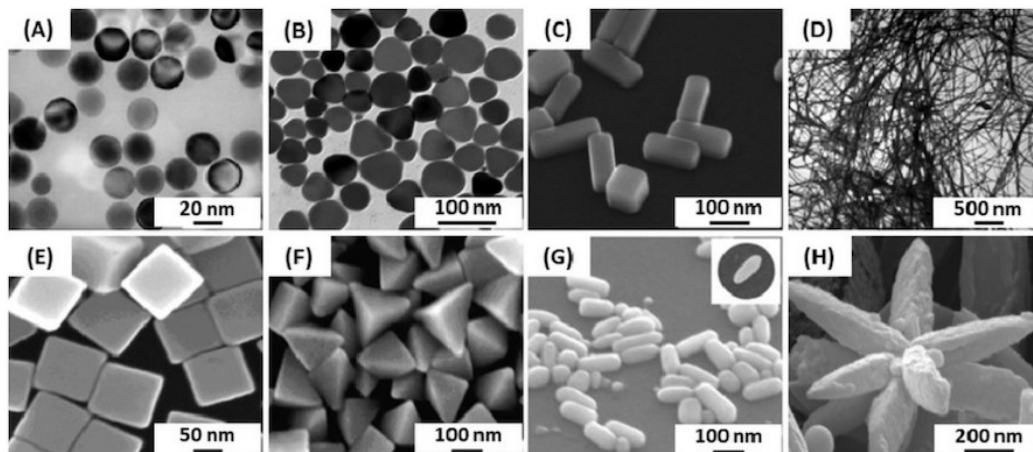
L'aumento del valore di mercato è sicuramente facilitato dal fatto che negli ultimi anni le nanotecnologie stanno trovando un ampio range di applicazione. Molti di questi nanosistemi vengono sfruttati nell'industria alimentare, agricola, cosmetica, chimica, ma anche nel settore medico, elettronico ed energetico⁽⁷⁾. Le proprietà di cui beneficia un oggetto con dimensioni nella nanoscala, la varietà di substrati che possono essere sfruttati per la sintesi e la possibilità di controllare con precisione la forma e le dimensioni del nanosistema sono alla base della loro versatilità. In [Fig.2] si distinguono nanomateriali a base organica come liposomi, nanoparticelle polimeriche, dendrimeri, micelle e nanogel, ma anche nanosistemi a base metallica con proprietà magnetiche, di fluorescenza e di *upconversion*. Strutture a base di carbonio (CN) come nanotubi, fullerene, grafene, nanodiamanti e carbon nanodots stanno acquisendo sempre più importanza grazie alle loro proprietà di elevata stabilità, conducibilità elettrica e versatile derivatizzazione, rendendoli ottimi strumenti, ad esempio, per applicazioni in *bio-imaging*, *bio-sensing* e *drug-delivery*⁽⁸⁾.



[Fig.2] Diverse nanostrutture a base organica, metallica e di carbonio.

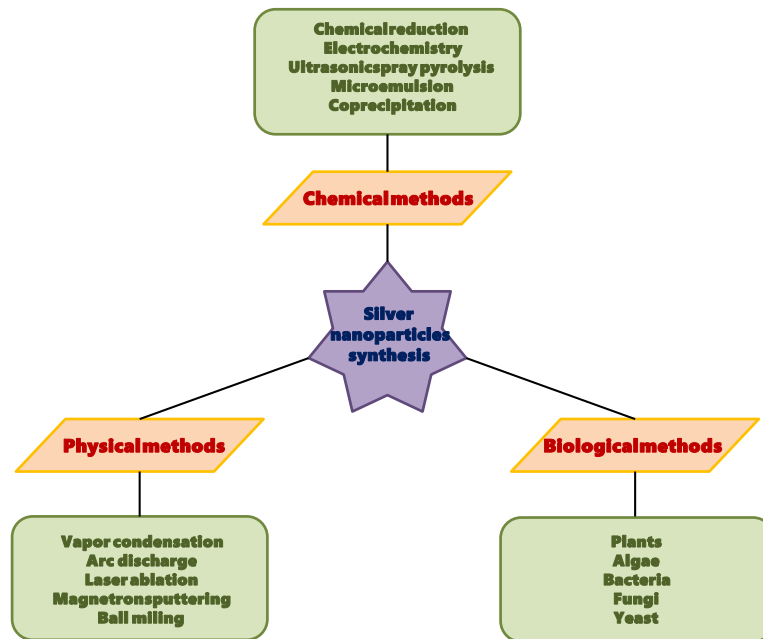
1.2 Nanoparticelle d'argento

Le nanoparticelle metalliche sono tra i nanosistemi più studiati al giorno d'oggi. Oltre al tipo di metallo, ad influenzare le proprietà chimico-fisiche e ottiche sono la forma e la dimensione, rendendoli vantaggiosi in diversi campi di applicazione come medicina, elettronica, ingegneria chimica, industria alimentare ed automobilistica⁽⁹⁾. Variando le condizioni di reazione, ad esempio, la temperatura, il pH, la concentrazione di reagenti, la forza ionica, il tempo di reazione, il solvente e la tipologia di agente stabilizzante e agente riducente, è possibile ottenere nanoparticelle di diversa forma e dimensione come rappresentato in [Fig.3].



[Fig.3] Immagini TEM di nanoparticelle d'argento di diversa forma e dimensione⁽¹⁰⁾.

Le nanoparticelle d'argento hanno attirato l'interesse della ricerca soprattutto per le loro proprietà ottiche (essendo dotate di uno spettro di assorbimento caratterizzato solitamente da una larga banda plasmonica) e per le loro efficienti attività antibatteriche e antitumorali, rendendole ottimi strumenti per la medicina⁽¹¹⁾. Esistono diverse metodologie per la sintesi di queste nanoparticelle, le quali si dividono in metodi chimici, fisici e biologici [Fig.4].



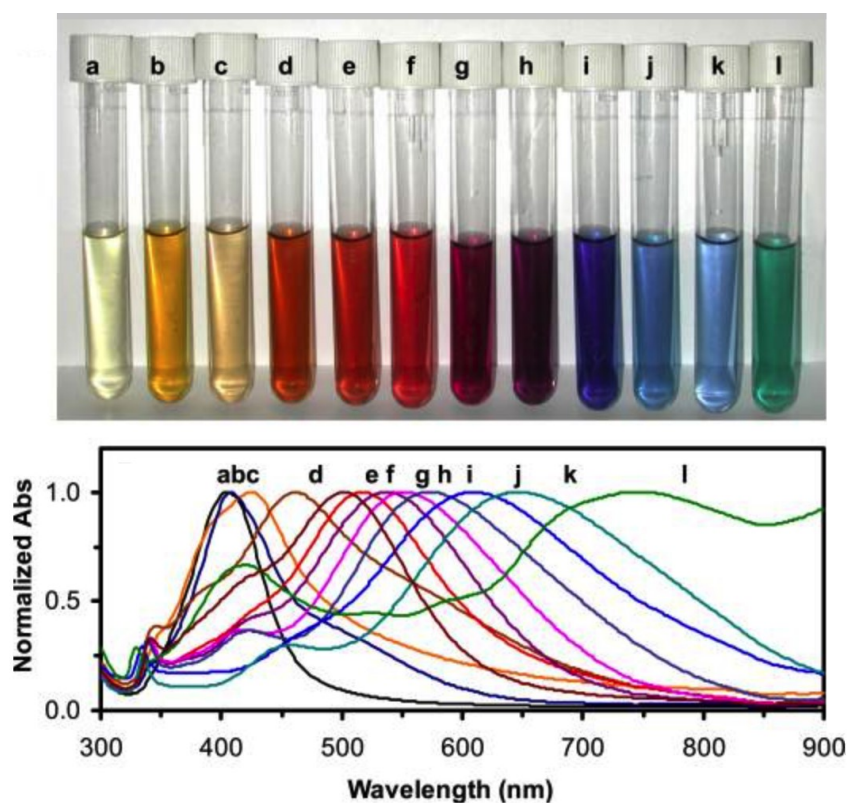
[Fig.4] Rappresentazione di alcune metodologie per la sintesi di nanoparticelle d'argento.

La metodologia largamente più seguita per la sintesi delle nanoparticelle d'argento sfrutta una riduzione chimica, in cui i protagonisti molecolari, come esempio generale, sono il sale d'argento (tipicamente AgNO_3), l'agente riducente che permette la riduzione $\text{Ag}^+ \rightarrow \text{Ag}^0$ (solitamente NaBH_4) ed un agente stabilizzante (o di *capping*) rappresentato molto spesso da polivinilpirrolidone (PVP), glicole polietilenico (PEG) o polimetilmetacrilato (PMMA)⁽¹²⁾.

1.2.1 Nanoparticelle d'argento – Proprietà ottiche

I nanomateriali presentano caratteristiche chimico-fisiche differenti rispetto a quelle che contraddistinguono un materiale *bulk*, poiché queste dipendono molto dal rapporto "area di superficie/volume". Mano a mano che le dimensioni diminuiscono, aumenta la percentuale di atomi in superficie rispetto alla totalità di atomi che occupano un determinato volume, andando ad influire sistematicamente sulle caratteristiche dell'oggetto in esame⁽¹³⁾. Le nanoparticelle metalliche presentano proprietà ottiche estremamente sensibili alla loro forma, dimensione, concentrazione e stato di agglomerazione, soprattutto nel caso di nanoparticelle d'oro e d'argento, le quali interagiscono fortemente con precise lunghezze d'onda,

rendendo la spettroscopia UV-VIS un ottimo strumento per la caratterizzazione di questi nanosistemi⁽¹⁴⁾. Nelle nanoparticelle d'argento la banda di conduzione e quella di valenza sono vicine tra loro, quindi gli elettroni sono molto liberi di muoversi. Se il materiale viene irradiato con l'adeguata lunghezza d'onda, questa entra in risonanza con gli elettroni di conduzione, i quali danno luogo ad un'oscillazione collettiva responsabile della caratteristica banda di assorbimento definita *local surface plasmon resonance (LSPR)*⁽¹⁵⁾. In uno studio hanno identificato come la diversa concentrazione di agente riducente utilizzata, in particolare NaBH_4 , avesse portato all'ottenimento di nanoparticelle colloidali di diverso colore, il che è dovuto ad una diversa LSPR, in correlazione alla variazione della dimensione e della forma del nanosistema [Fig.5]⁽¹⁶⁾.



[Fig.5] Proprietà di assorbimento plasmonico di diverse nanoparticelle colloidali d'argento⁽¹⁶⁾.

1.2.2 Nanoparticelle d'argento - Metodologie di sintesi

Negli anni diverse metodologie sono state adottate nella sintesi di nanoparticelle d'argento; si possono distinguere approcci *bottom-up*, in cui si sfrutta il *self-assembly* delle molecole in soluzione, e approcci *top-down*, in cui la sintesi avviene a partire dal materiale *bulk*. Oltre a questa distinzione, le metodologie possono essere di natura chimica o fisica, ma negli ultimi anni stanno acquisendo sempre più importanza i metodi biologici, sfruttando molto spesso microrganismi o loro estratti, ed in questi casi si parla di *green synthesis*.

1.2.2.1 Nanoparticelle d'argento - Sintesi fisica

L'evaporazione-condensazione e l'ablazione laser sono le principali tecniche fisiche utilizzate. La prima vede il riscaldamento in fornace di una soluzione di AgNO_3 e CH_3COONa , che viene inizialmente vaporizzata e dopo il successivo raffreddamento si ottengono le nanoparticelle desiderate⁽¹⁷⁾. Il metodo presenta però svantaggi come l'elevata richiesta energetica ed il troppo tempo necessario al raggiungimento della stabilità termica⁽¹⁷⁾.

Quando le nanoparticelle d'argento hanno la finalità di essere utilizzate, ad esempio, come un'alternativa agli antibiotici negli organismi viventi, è essenziale che esse non contengano contaminazioni o sostanze tossiche dovute alla loro sintesi. La tecnica fisica dell'ablazione laser permette di evitare le contaminazioni, e grazie alla possibilità di variare i parametri di processo è possibile ottenere nanoparticelle di diversa forma e dimensione⁽¹⁸⁾. In breve, la tecnica sfrutta un laser pulsato ad una precisa lunghezza d'onda, il quale va ad incidere sulla superficie del materiale *bulk*⁽¹⁹⁾. Il campo elettrico generato è in grado di far oscillare gli elettroni liberi sulla superficie del materiale, che si scalda e vaporizza divenendo plasma, il quale potrà nucleare e formare diverse nanostrutture⁽¹⁹⁾.

Il *magnetron sputtering* è un'altra metodologia fisica utilizzata per la sintesi di nanoparticelle d'argento. Essa sfrutta un *sputtering* gas che viene dapprima portato allo stato di plasma formando particelle estremamente energetiche, le quali

vengono accelerate e utilizzate per bombardare il materiale *bulk*, provocando la fuoriuscita di atomi che si andranno a depositare su un determinato supporto⁽²⁰⁾.

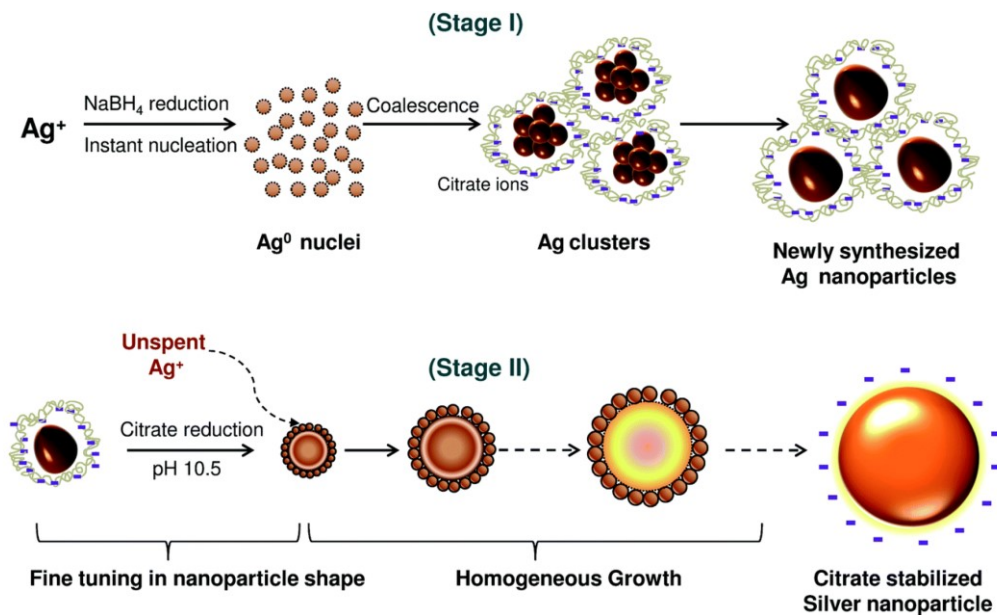
1.2.2.2 Nanoparticelle d'argento - Sintesi chimica

La sintesi chimica largamente più utilizzata sfrutta un meccanismo di riduzione, nel quale, i tre protagonisti molecolari, ovvero il sale d'argento, l'agente riducente e l'agente stabilizzante vengono utilizzati per controllare la crescita delle nanoparticelle. Come sale viene comunemente impiegato l'argento nitrato dati i suoi bassi costi e la sua stabilità chimica. Come riducente si possono utilizzare sodio boroidruro, citrato e ascorbato, ma il primo permette una rapida riduzione ed agisce parzialmente come stabilizzante evitando l'aggregazione delle nanoparticelle⁽²¹⁾. Come vere e proprie molecole stabilizzanti, spesso si trovano polivinilpirrolidone (PVP), glicole polietilenico (PEG), polimetilmetacrilato (PMMA) e acido polimetacrilico (PMAA), ma interessanti sono anche i polimeri termosensibili come la poli(N-isopropilacrilamide) (PNIPAM) ed il collagene⁽²¹⁾. Un esempio di questa metodologia di sintesi, in particolare si sfrutta un meccanismo di co-riduzione, è rappresentato in [Fig.6], in cui si hanno due processi di riduzione: il primo operato dal sodio boroidruro ed il secondo ad opera del trisodio citrato (TSC)⁽²²⁾. Dal punto di vista pratico, i due riducenti vengono mescolati insieme per 30 min al buio a 60 °C, dopodiché si aggiunge goccia a goccia il sale d'argento e si porta la temperatura a 90 °C, basificando in seguito con NaOH fino a pH 10.5⁽²²⁾. Nel primo stage di nucleazione NaBH₄ opera la riduzione $Ag^+ \rightarrow Ag^0$ comportando la formazione dei primi nuclei d'argento che parteciperanno nel processo di crescita del secondo stage in cui agisce il TSC⁽²²⁾. Alla fine si ottengono delle nanoparticelle d'argento stabilizzate sulla loro superficie con i citrati carichi negativamente, impedendo così l'aggregazione⁽²²⁾.

Una seconda tecnica di sintesi chimica è il metodo elettrochimico, in cui la densità di corrente che si utilizza può essere variata per ottenere nanoparticelle di forma e dimensioni differenti. In questa metodologia si può sfruttare, come nel lavoro del gruppo di Roldán⁽²³⁾, una semplice cella a due elettrodi, entrambi costituiti da

platino. Il medium di reazione è composto dal precursore metallico, ovvero AgNO_3 , e dal PEG, impiegato come agente stabilizzante⁽²³⁾.

Uno degli strumenti più innovativi per la sintesi chimica è l'*ultrasonic spray pyrolysis (USP)*, una tecnica molto potente che permette di ottenere in maniera conveniente delle nanoparticelle con una stretta distribuzione di dimensioni e purezza⁽²⁴⁾. Si parte da una soluzione diluita del sale metallico che viene prima atomizzato formando un aerosol, successivamente esso entra nel reattore di pirolisi ad una temperatura di circa 650°C ed infine le nanoparticelle vengono depositate sul substrato di interesse⁽²⁵⁾. L'atomizzatore spray è collegato ad un generatore ultrasonico e ciò permette di controllare la dimensione delle gocce di aerosol, la quale è correlata alla morfologia che avranno le nanostrutture finali⁽²⁵⁾.



[Fig.6] Sintesi di nanoparticelle d'argento mediante un approccio di co-riduzione⁽²²⁾.

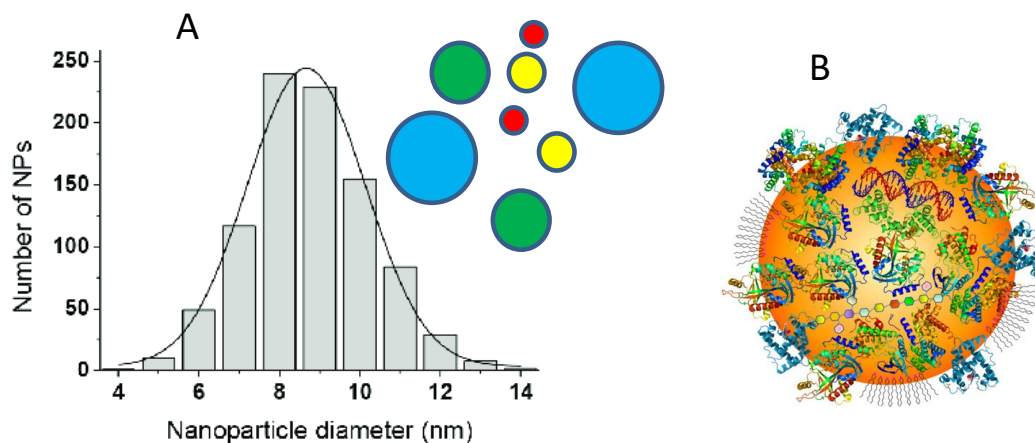
1.2.2.3 Nanoparticelle d'argento - Sintesi biologica

Sebbene negli ultimi anni gli sforzi implicati nella messa a punto di nuove metodologie per la sintesi di nanoparticelle siano stati enormi, il problema della contaminazione ambientale è una questione limitante per alcune di queste tecniche chimico-fisiche. La *green synthesis* è l'ambito in cui diverse industrie stanno puntando sempre più frequentemente per alleviare l'impatto ambientale che caratterizza molte delle tecniche ormai consolidate, ed essa racchiude in sé metodologie biologiche dotate di ripetibilità, facilità di *scale up* e non tossicità⁽²⁶⁾. La strategia biologica consiste nel sfruttare piante, alghe, batteri, funghi, lieviti e altri microrganismi come medium di reazione, fornendo molecole che possono agire da riducenti e stabilizzanti, le cui controparti adoperate nelle sintesi chimiche classiche costituiscono la maggior fonte di inquinamento⁽²⁷⁾. Gli estratti di piante sono diventati una risorsa eccellente grazie alla loro reperibilità e possibilità di essere sfruttati nella sintesi di nanoparticelle economicamente ed in sicurezza⁽²⁸⁾. Nello studio del gruppo di Al-Zahrani⁽²⁸⁾ sono riusciti a sintetizzare nanostrutture morfologicamente peculiari sfruttando metaboliti secondari delle piante (quercetina, β -carotene e catechine) come molecole riducenti. Il gruppo di Khodadadi⁽²⁹⁾ è invece riuscito ad ottenere delle nanoparticelle d'argento mescolando gli estratti di *Vaccinium arctostaphylos* con una soluzione di argento nitrato in presenza di luce solare.

La sintesi microbica segue molto spesso il metodo extracellulare, in cui, dopo il periodo di incubazione, la coltura cellulare viene centrifugata ed il supernatante viene addizionato con una soluzione di argento nitrato per la sintesi delle nanoparticelle⁽³⁰⁾. Seguendo questo approccio, il gruppo di Singh⁽³¹⁾ ha sintetizzato nanoparticelle d'argento sferiche e monodisperse di piccole dimensioni (8-12 nm) sfruttando *Acinetobacter calcoaceticus* LRVP54.

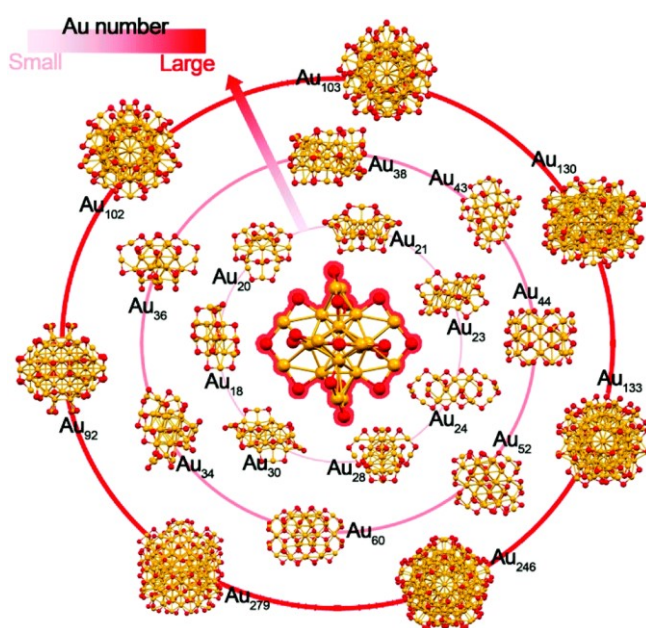
1.3 Nanoparticelle e nanoclusters

Uno dei principali difetti delle classiche procedure per la sintesi di nanoparticelle è quello di non riuscire ad ottenere sistemi unimolecolari, poiché nella maggioranza dei casi si ottiene una distribuzione nelle dimensioni della nanoparticella [Fig.7(A)]. Molto spesso le nanoparticelle d'interesse portano sulla loro superficie dei leganti, ovvero molecole organiche che possono avere diverse funzioni, dalla semplice stabilizzazione del sistema alla possibilità di sfruttarne le proprietà in ambiti come la catalisi o la diagnostica. Il fatto di avere una polidispersione nelle dimensioni comporta il problema di avere nanoparticelle composte da differenti, in numero, atomi metallici, variando di conseguenza anche la quantità di legante presente in ogni sistema. Inoltre, a mano a mano che le dimensioni della nanoparticella aumentano, la superficie di questa appare sempre più piatta agli occhi della molecola che costituisce il legante. Per esempio, se il legante fosse un peptide bioattivo, questo tenderebbe ad adsorbirsi ed a ricoprire più facilmente la nanoparticella grazie alle interazioni presenti tra gli orbitali dei legami ammidici e quelli del metallo, in un processo definito “effetto corona”, che causa il collasso della struttura secondaria peptidica e di conseguenza la perdita della sua funzionalità [Fig7(B)]. Risulta quindi chiaro come questi aspetti, nella loro sinergia, vadano a scontrarsi con l'idea di avere un sistema controllato, funzionale e di precisa conformazione.



[Fig.7] Polidispersione nella dimensione delle nanoparticelle in seguito ad una classica sintesi chimica (A) ed “effetto corona” su una nanoparticella (B).

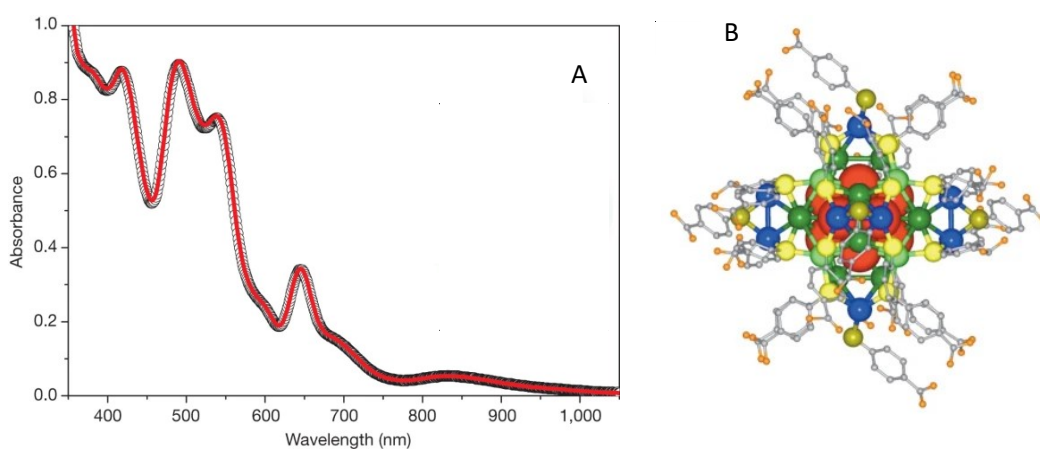
I nanoclusters rappresentano la soluzione ottimale ai problemi appena descritti. Questi sistemi, grazie alle loro proprietà, si collocano nello stato di mezzo tra molecole ben definite e nanoparticelle plasmoniche⁽³²⁾. I nanoclusters sono infatti costituiti da precise combinazioni di atomi metallici e leganti organici, che nell'insieme conducono alla formazione di sistemi di dimensioni veramente ridotte, in cui solitamente il diametro del core metallico non supera i 2 nm. Più le dimensioni diminuiscono e più le proprietà dei nanoclusters tendono ad assomigliare a quelle delle piccole molecole, e ciò fa di essi versatili strumenti molecolari impiegabili in diversi ambiti, tra i quali medicina e catalisi chimica. Tra la varietà di nanoclusters sintetizzabili, sicuramente più studiati sono quelli che si formano a seguito della combinazione di atomi metallici e leganti tiolici. In particolare, il cluster $Au_{25}(SR)_{18}$ è il più caratterizzato, definito dal gruppo di Kang⁽³²⁾ come “il capitano della nave dei nanoclusters”, a simboleggiare l'importanza che questo sistema ricopre in questo ambito di ricerca. In [Fig.8] sono riportati alcuni esempi di nanoclusters d'oro in cui si può notare il preciso arrangiamento spaziale presente tra i vari atomi, che nell'insieme va a definire una struttura ben precisa.



[Fig.8] Nanocluster d'oro, esempi di strutture⁽³²⁾.

1.3.1 Nanoclusters d'argento ultrastabili

Al fine di ottenere un sistema controllabile e di precisa composizione è necessario, per i motivi descritti precedentemente, spostarsi dal mondo delle nanoparticelle plasmoniche a quello dei nanoclusters. Vari gruppi di ricerca hanno riversato le loro attenzioni verso la sintesi di nanocluster d'argento, in particolare, il gruppo di Desireddy⁽³³⁾ è riuscito ad ottenere dei sistemi veramente caratteristici per la loro struttura e stabilità. Mediante un protocollo di sintesi che vede semplicemente la riduzione con sodio boroidruro di una soluzione semialcolica di nitrato d'argento e del legante tiolico (l'acido *para*-mercaptobenzoico), hanno sintetizzato dei nanocluster d'argento di precisa composizione, tali per cui ad essi può essere associata la formula molecolare $M_4Ag_{44}(pMBA)_{30}$. Il sistema presenta delle dimensioni veramente ridotte, con un diametro del core metallico di appena 1.2 nm. Tramite analisi di cristallografia a raggi X è stata ottenuta la precisa disposizione spaziale degli atomi d'argento e del legante [Fig.9(B)], risultando in una struttura complessa, ma allo stesso tempo compatta, che insieme al *monolayer* di *pMBA* è responsabile dell'elevata stabilità dei nanoclusters. Le dimensioni ridotte e la precisa composizione atomica fanno di questi sistemi delle vere entità molecolari, soprattutto dal punto di vista delle proprietà ottiche, avendo uno spettro di assorbimento UV-VIS caratterizzato da più bande definite [Fig.9(A)] e non da un'unica banda plasmonica caratteristica delle nanoparticelle.



[Fig.9] Spettro di assorbimento UV-VIS del nanocluster $M_4Ag_{44}(pMBA)_{30}$ (A) e risoluzione della sua struttura molecolare mediante cristallografia a raggi X (B)⁽³³⁾.

1.3.2 Nanoclusters d'argento come catalizzatori enzimamimetici

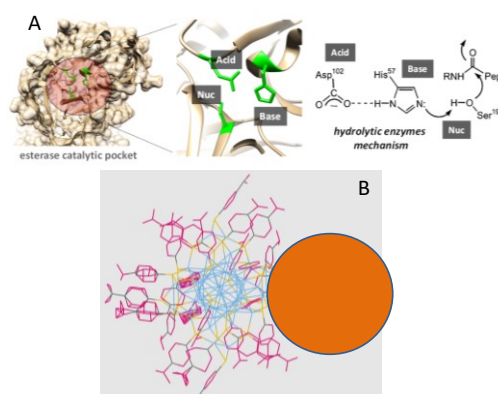
Un ambito di applicazione per sistemi di questo genere in cui si punta molto è la catalisi chimica. In letteratura sono numerosi gli articoli in cui, specialmente nanoclusters d'oro, sono testati come catalizzatori in diverse reazioni chimiche, ad esempio l'idroamminazione di alchini⁽³⁴⁾, l'ossidazione di alcheni⁽³⁵⁾ e la riduzione di gruppi nitrato⁽³⁶⁾. I nanoclusters sintetizzati dal gruppo di Desireddy⁽³³⁾ offrono un'ottima base di partenza per la realizzazione di sistemi più complessi, ma che basano i loro punti di forza sulle proprietà di stabilità e facile preparazione dei nanoclusters $M_4Ag_{44}(pMBA)_{30}$.

Scopo della Tesi. Il presente lavoro di Tesi si pone l'obiettivo di sintetizzare nanoclusters d'argento che abbiano delle proprietà catalitiche nei confronti dell'idrolisi del legame estereo, per mezzo dell'ingegnerizzazione dei nanoclusters $M_4Ag_{44}(pMBA)_{30}$. Tra la moltitudine di enzimi esistenti, le esterasi e le proteasi sono quelle che nel loro percorso evolutivo si sono specializzate in questa funzione catalitica, ottimizzando la loro conformazione tridimensionale per svolgere efficientemente questo genere di reazioni. L'evoluzione ha portato alla formazione di un sito catalitico interno molto conservato negli enzimi idrolitici, che presenta la cosiddetta "triade catalitica", ovvero tre residui (serina, istidina e aspartato) che cooperano nella catalisi del legame estereo/ammidico [Fig.10(A)]. L'elevata efficienza catalitica enzimatica non deriva esclusivamente dalla presenza della triade catalitica, ma essa è fortemente influenzata dall'intorno chimico che si viene a creare all'interno della tasca enzimatica in cui si va a posizionare il substrato e dall'orientazione specifica esistente tra i residui catalitici, che li porta in una determinata prossimità spaziale.

Da qui nasce l'idea di questo progetto, che mira a mimare le caratteristiche del sito catalitico enzimatico sulla superficie esterna dei nanoclusters, sfruttando particolari leganti peptidici che derivano dalla funzionalizzazione del *pMBA* [Fig.10(B)]. Al fine di ricreare questa situazione, gli elementi ritenuti indispensabili sono essenzialmente due:

- 1) La presenza dei residui della triade catalitica, quindi aspartato, serina ed istidina, per sfruttare la loro cooperatività, che è alla base della loro capacità catalitica all'interno del sito attivo. Non è importante solo la presenza, ma ovviamente è essenziale che questi vengano a trovarsi nella corretta disposizione spaziale reciproca.
- 2) La formazione di un ambiente favorevole alla reazione, ovvero la creazione di una “gabbia” idrofobica nel *monolayer*, che permetta l'alloggiamento del substrato e stabilisca le condizioni ottimali di reazione, come la costante dielettrica che va ad influenzare direttamente la pKa dei residui catalitici.

All'interno della tasca enzimatica infatti, la costante dielettrica è minore a causa dell'esclusione delle molecole d'acqua, risultando in valori di pKa dei residui maggiori rispetto alle condizioni standard, ma che sono essenziali affinché la catalisi possa avvenire. A questo scopo possono essere sfruttati sia leganti che presentano al loro interno, oltre ai residui catalitici, dei residui idrofobici, sia leganti definiti “controllori di idrofobicità”, caratterizzati da lunghe catene alifatiche e che vengono utilizzati in miscela con i leganti che portano i residui catalitici. Pertanto, nel design complessivo di questi sistemi enzima-mimetici si vuole sfruttare l'autoassemblamento di piccoli peptidi sulla superficie del nanocluster d'argento, in modo da ricreare ciò che naturalmente è presente nella tasca catalitica di un enzima.



[Fig.10] Schematizzazione del sito catalitico di un'esterasi e del meccanismo di catalisi idrolitica nei confronti di un legame peptidico (A). In (B) si osserva la struttura del nanocluster $M_4Ag_{44}(pMBA)_{30}$ e del legante *pMBA* modificato con piccoli peptidi.

1.4 Sintesi peptidica

Recentemente i piccoli peptidi hanno riscosso l'attenzione in varie realtà scientifiche, soprattutto in campo medico, chimico e biologico, valorizzando le loro proprietà dovute alla loro diversità strutturale, flessibile conformazione, facilità di funzionalizzazione, biodegradabilità e biocompatibilità⁽³⁷⁾. Per definizione, i peptidi vengono considerati come macromolecole composte da residui amminoacidici che solitamente non superano le 50-60 unità, anche se il limite della dimensione non è mai netto e dipende dal contesto di riferimento, ma i classici protocolli di sintesi portano all'ottenimento di peptidi di circa una cinquantina di residui, quindi questa lunghezza può essere considerata come una sorta di *cut-off* per la distinzione tra peptidi e "mini-proteine"⁽³⁸⁾. Essendo essi composti da amminoacidi, si può giocare con le caratteristiche di questi ultimi per ottenere peptidi con diverse proprietà: omopeptidi composti da Aib (acido 2-amminoisobutirrico) sono noti per la formazione di eliche 3_{10} ⁽³⁹⁾; peptidi di membrana con residui cationici provocano l'adsorbimento delle molecole su superfici di vetro e plastica⁽⁴⁰⁾; peptidi anfifilici (PA), cioè composti da una lunga "coda" di residui idrofobici e da una "testa" data da residui polari, sono in grado di associarsi in strutture dinamiche tubulari e vescicolari⁽⁴¹⁾; è possibile sintetizzare analoghi della galaxamide per ottenere peptidi ciclici impiegati nello sviluppo di farmaci antitumorali⁽⁴²⁾.

Per quanto riguarda la sintesi, la reazione di formazione del legame peptidico (*coupling*) prevede l'attacco nucleofilo dell'azoto amminico del primo amminoacido sul carbonio carbonilico del secondo residuo, con la concomitante fuoriuscita di una molecola d'acqua. Per evitare cross-reazioni che riguardano le funzionalità che non devono reagire si ha bisogno di gruppi protettori ortogonali (es. fluorenilmetilossicarbonil cloruro (Fmoc-Cl) per le ammine ed esterificazione di Fischer per il gruppo carbossilico). Affinché il *coupling* possa avvenire in maniera efficiente è indispensabile l'attivazione del gruppo carbossilico, che sfrutta nella maggior parte dei casi le carbodiimmidi come EDC, DIC e DCC, le quali fungono da attivatori. Esse portano alla formazione di un composto altamente reattivo, per cui è necessario che venga trasformato nell'estere attivo

mediante l'ausilio di additivi (solitamente HOAt, HOBt e Oxyma Pure), e solo ora il *coupling* può avvenire efficientemente ed in tempi brevi.

Le uniche due tecniche di sintesi peptidica disponibili sono quelle condotte in fase acquosa e quelle operate in fase solida (*Solid Phase Peptide Synthesis*, SPPS), che sfruttano entrambe gli stessi principi di *coupling*, ma differiscono per la modalità operativa⁽³⁷⁾.

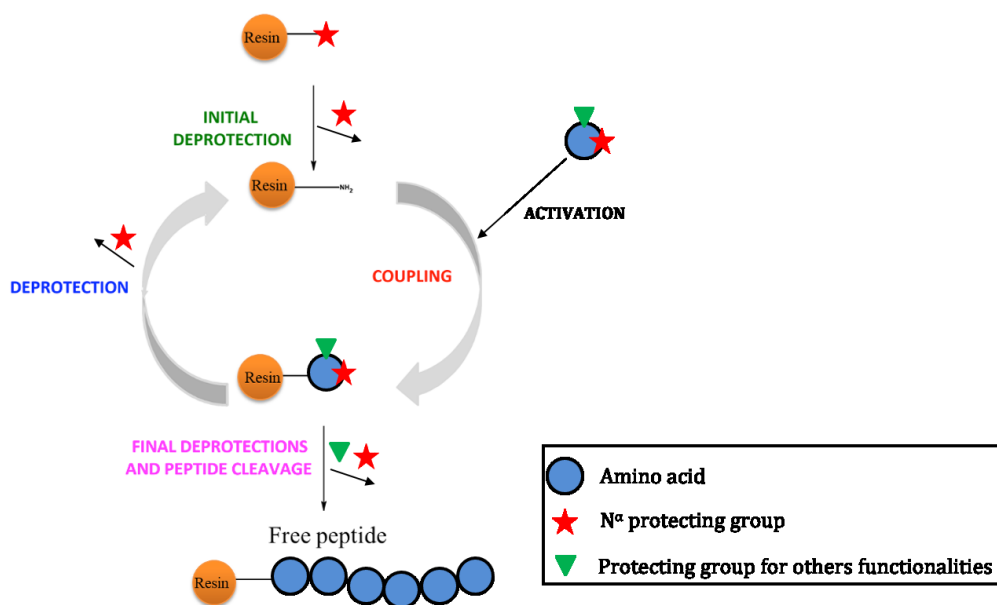
1.4.1 Sintesi peptidica in soluzione

La sintesi in soluzione è stato il primo metodo sviluppato per la creazione di peptidi prima dell'avvento della SPPS, ma sebbene quest'ultima sia una tecnica molto più efficiente, quando il peptide da sintetizzare è talmente corto da non giustificare i costi elevati della sintesi in fase solida, il metodo in soluzione rappresenta l'alternativa migliore, anche per quei peptidi che data la loro struttura chimica non possono sottostare al processo SPPS⁽⁴³⁾. Nonostante la sintesi in soluzione sia caratterizzata anche da un economico e facile *scale-up*, le difficoltà maggiori si ritrovano negli step di purificazione che vanno eseguiti al termine di ogni *coupling* e nell'impossibilità di sintetizzare peptidi a lunga catena, poiché spesso, a mano a mano che la dimensione aumenta, cala la solubilità della macromolecola⁽⁴³⁾.

1.4.2 Sintesi peptidica in fase solida (SPPS)

Nel 1963 Merrifield rivoluzionò il mondo scientifico andando a sintetizzare per la prima volta un tetrapeptide mediante una metodologia in fase solida, tecnica che è diventata negli anni il pilastro della sintesi peptidica e che valse per Merrifield il Nobel per la chimica nel 1984⁽⁴⁴⁾. L'SPPS è una sintesi in fase eterogenea poiché si ha un supporto solido costituito da una resina a base polimerica sulla quale crescerà la catena peptidica mediante successivi cicli di *coupling*. La resina deve essere insolubile in tutti i solventi utilizzati per la sintesi, deve possedere un ottimo ed uniforme *loading* (> 0.05 mmol/g), deve godere di buone proprietà di *swelling* per evitare che il trasporto di massa diventi un fenomeno limitante, deve essere meccanicamente stabile e permettere la filtrazione degli scarti di reazione e

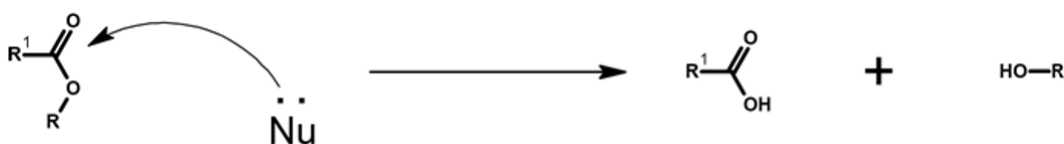
solvente⁽⁴⁵⁾. L'SPPS consiste in cicli di *coupling*, in cui il primo amminoacido della catena va a legarsi alla resina previa deprotezione della stessa, successivamente è necessaria la rimozione del gruppo protettore dall'amminoacido appena aggiunto per ottenere il gruppo amminico libero che andrà a formare il legame peptidico con l'unità successiva, sfruttando il gruppo carbossilico di quest'ultima precedentemente attivato [Fig.11]⁽⁴⁶⁾. Dopo ogni reazione di *coupling* e di sblocco è necessario lavare la resina per eliminare l'eccesso di reagenti rimasti in soluzione, che potrebbero compromettere i successivi cicli di *coupling*. Al termine della sintesi peptidica si opera una deprotezione totale, ovvero in grado di rimuovere tutti i gruppi protettori degli amminoacidi della catena. Infine, è necessario separare la catena peptidica dalla resina, operazione che può essere condotta in concomitanza alla deprotezione totale utilizzando reagenti opportuni.



[Fig.11] Schema generale di sintesi peptidica in fase solida (SPPS).

1.5 Idrolisi del legame estereo

L'idrolisi del legame estereo è una delle reazioni più studiate nella chimica organica. Nell'estere il carbonio carbonilico è impoverito di elettroni a causa della vicinanza dei due ossigeni, i quali, per mezzo della loro maggiore elettronegatività tendono a richiamare verso di loro gli elettroni di legame. Questa situazione rende il carbonio carbonilico elettrofilo e può quindi essere soggetto a reazioni di attacco nucleofilo [Fig.12], in cui si passa per un intermedio tetraedrico e l'uscita di un gruppo uscente, portando alla formazione di un alcol (nel caso il nucleofilo sia l'H₂O) e di un acido carbossilico o del suo sale. La reazione di idrolisi è cineticamente sfavorita in condizioni standard, per cui solitamente si segue un procedimento acido o base catalizzato. Le condizioni di elevata acidità o basicità potrebbero però creare criticità ad altri componenti molecolari presenti in soluzione oppure ad altri gruppi funzionali presenti nella molecola stessa, per cui si preferisce adottare delle strategie che operino in condizioni blande di temperatura e pH. Una delle alternative più soddisfacenti è la catalisi enzimatica sfruttando le esterasi, ma come tutti gli enzimi, la loro elevata efficienza e selettività è raggiungibile esclusivamente operando nelle condizioni opportune. Ecco che negli ultimi anni la ricerca sta puntando sempre di più sulla sintesi di nuovi catalizzatori definiti enzima-mimetici, andando a sfruttare molto spesso i principi della chimica supramolecolare, per andare a ricreare nel sistema di interesse ciò che naturalmente avviene all'interno della tasca catalitica enzimatica.



[Fig.12] Rappresentazione dell'attacco nucleofilo sul carbonio carbonilico dell'estere, portando alla formazione dell'acido carbossilico e dell'alcol.

1.5.1 Idrolisi chimica

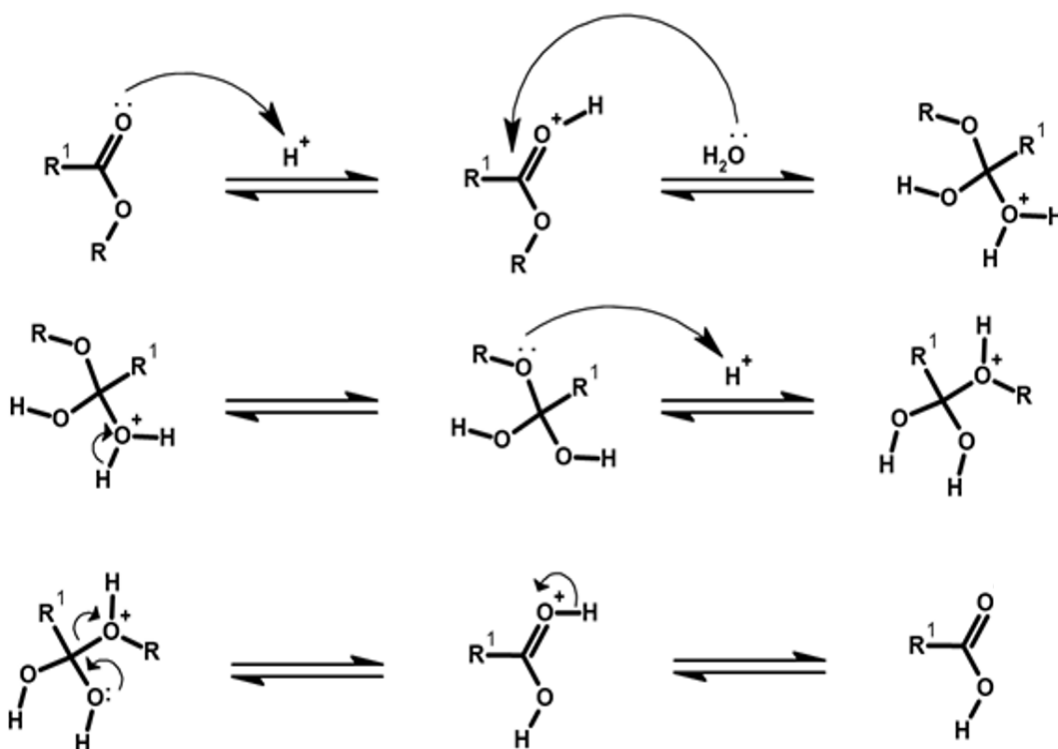
L'idrolisi chimica degli esteri è quella più comunemente utilizzata nei laboratori di sintesi organica, data la semplicità delle procedure e delle condizioni di reazione. Essa può avvenire sfruttando sia un catalizzatore acido sia un catalizzatore basico. Nel primo caso si verranno a formare un alcol ed un acido carbossilico, mentre nel secondo caso si formerà il medesimo alcol ed il sale dell'acido carbossilico. Tra le due catalisi, quella alcalina è quella che si preferisce poiché è irreversibile, mentre quella acida è data reazioni reversibili, quindi l'equilibrio dipende dalle concentrazioni di reagenti e prodotti in soluzione.

1.5.1.1 Idrolisi acida

L'idrolisi acido catalizzata degli esteri altro non è che la reazione opposta all'esterificazione di Fischer, un processo reversibile in cui in condizioni acide si ha l'attacco nucleofilo dell'alcol sul carbonio carbonilico dell'acido carbossilico, portando alla formazione dell'estere.

Dal punto di vista molecolare la reazione di idrolisi consiste in due stadi, ognuno dei quali costituito da tre passaggi distinti [Fig.13]. Per prima cosa il catalizzatore acido protona l'ossigeno carbonilico dell'estere, con un effetto di stabilizzazione apportato dalla risonanza elettronica, successivamente può avvenire l'attacco nucleofilo dell'acqua sul carbonio carbonilico, portando alla formazione dell'intermedio tetraedrico, che verrà deprotonato nel terzo step. Nei tre passaggi successivi si ha la protonazione dell'ossigeno alcossidico, la fuoriuscita dell'alcol e la deprotonazione dell'acido carbossilico.

Si tratta di una reazione di equilibrio ed a seconda della quantità di acqua presente è possibile spingere la reazione verso i prodotti o verso i reagenti. Quando si ha una limitazione di acqua la reazione favorita è la formazione dell'estere, mentre in condizioni di largo eccesso è favorita l'idrolisi.



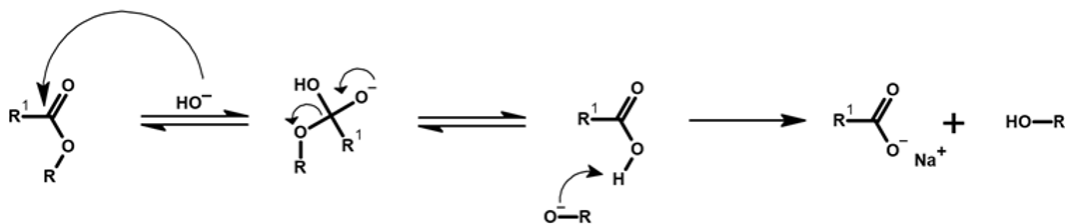
[Fig.13] Meccanismo di reazione dell'idrolisi acido catalizzata di un estere.

1.5.1.2 Idrolisi alcalina

L'idrolisi alcalina degli esteri è solitamente conosciuta come saponificazione, poiché è un processo che a partire dai trigliceridi porta alla formazione dei saponi, ovvero sali degli acidi grassi.

Dal punto di vista molecolare, l'idrolisi basica consiste in tre passaggi, due dei quali sono reversibili, mentre l'ultimo è irreversibile [Fig.14]. Il primo step è la formazione dell'intermedio tetraedrico per mezzo dell'attacco nucleofilo dello ione idrossido sul carbonio carbonilico, a cui segue la fuoriuscita dell'alcolossido, il quale nel terzo passaggio si protona strappando il protone dall'acido carbossilico precedentemente formatosi e che diventa ora uno ione carbossilato, stabilizzato per risonanza.

Lo ione carbossilato presenta un carbonio carbonilico molto meno elettrofilo, per cui non è soggetto all'attacco nucleofilo da parte dell'alcol, impedendo quindi che la reazione sia reversibile e rendendo il processo di idrolisi alcalina irreversibile.



[Fig.14] Meccanismo di reazione dell'idrolisi base catalizzata di un estere.

1.5.2 Idrolisi enzimatica

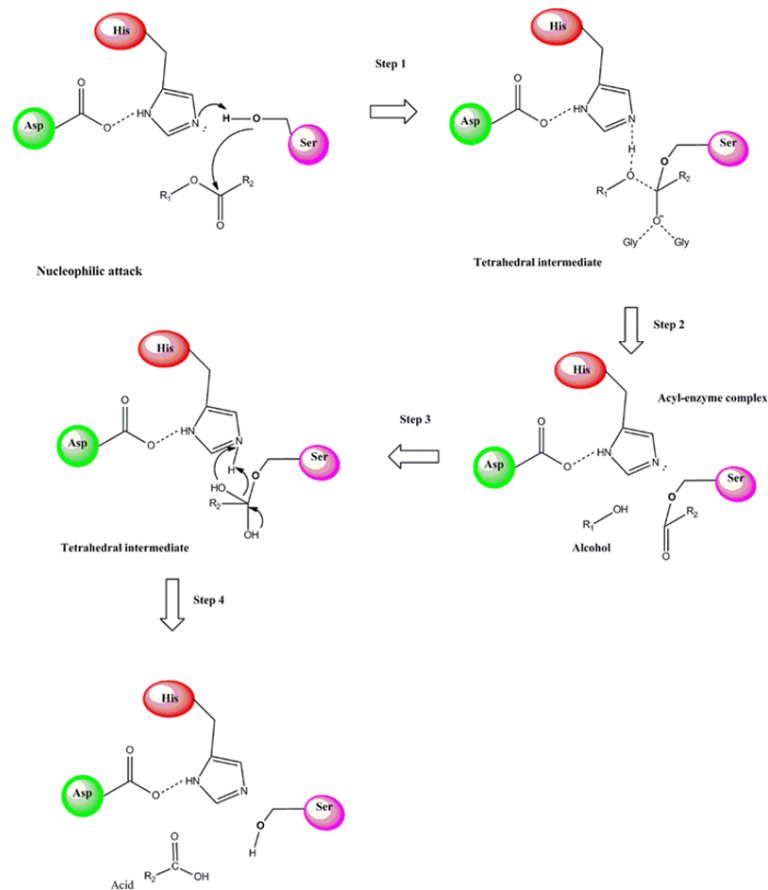
Nel loro percorso evolutivo gli enzimi sono stati selezionati per la loro selettività (chemio-, regio- ed enantio-selettività) e per la loro elevata efficienza catalitica in condizioni fisiologiche, di gran lunga maggiore rispetto a quella ottenibile con la catalisi chimica omogenea ed eterogenea nelle medesime condizioni di reazione (es. di pH). Nella classificazione EC (*Enzyme commission*) gli enzimi sono divisi in sette categorie sulla base della reazione chimica catalizzata. Nel gruppo EC 3 rientrano le idrolasi, ovvero enzimi che sfruttano una molecola d'acqua per rompere determinate molecole. Le esterasi, classificate come EC 3.1.1, sono enzimi idrolitici che agiscono sulla rottura del legame estereo e sono proteine espresse dalla maggior parte degli organismi, avendo un ruolo importante in diversi processi metabolici come digestione, detossificazione e meccanismi anti infiammatori.

Le interessanti proprietà catalitiche degli enzimi derivano dalla struttura tridimensionale che caratterizza la proteina, portando alla formazione di tasche catalitiche in cui il substrato è stabilizzato per mezzo di interazioni specifiche non covalenti con determinati residui proteici. Il sito catalitico presenta una buona affinità per il substrato, ma non troppa; al fine di ottenere un processo termodinamicamente favorito è necessario che lo stato a maggiore stabilizzazione sia quello di transizione. Nel caso della reazione di idrolisi esterea, essa è catalizzata dalla presenza all'interno del sito attivo di tre amminoacidi molto conservati negli enzimi idrolitici, che nell'insieme costituiscono la triade catalitica, data da aspartato, serina ed istidina. I tre residui non sono consecutivi

nella sequenza primaria della proteina, ma si ritrovano in prossimità spaziale quando l'enzima assume la sua conformazione tridimensionale nativa. Questa porta ad avere i tre residui nella distanza ed orientamento ottimali affinché, tramite meccanismi di catalisi acido-basica e covalente, possano, ad esempio, catalizzare l'idrolisi di un estere.

Dal punto di vista molecolare, l'idrolisi avviene in 4 step, passando per due intermedi tetraedrici ed un intermedio acil-enzima [Fig.15].

Inizialmente l'aspartato attiva l'istidina, la quale deprotona la serina e quest'ultima può dare attacco nucleofilo sul carbonio carbonilico dell'estere, portando alla formazione del primo intermedio tetraedrico. Successivamente il doppietto dell'ossigeno si divide nel legame carbonilico, provocando l'uscita dell'alcol che verrà protonato dall'istidina, e si avrà la formazione dell'intermedio acil-enzima. In seguito, l'istidina deprotona l'acqua rendendola un migliore nucleofilo per dare attacco sul carbonio carbonilico, con formazione del secondo intermedio tetraedrico. Come in precedenza, il doppietto dell'ossigeno va a formare il doppio legame C=O, con la concomitante rottura del legame covalente con la serina, la quale viene protonata dall'istidina. A questo punto l'idrolisi dell'estere è stata completata, ed il sito catalitico è pronto per un nuovo ciclo di catalisi.



[Fig.15] Classico meccanismo di reazione operato dalle esterasi⁽⁴⁷⁾.

1.5.2.1 Aspetti cinetici dell'idrolisi enzimatica

Dal punto di vista cinetico, una reazione catalizzata enzimaticamente è caratterizzata da due step fondamentali [Fig. 16]. Nel primo passaggio, il substrato (S) si deve allocare nel sito catalitico dell'enzima libero (E), portando alla formazione del complesso enzima-substrato (ES). A questo punto il substrato è perfettamente stabilizzato dai residui che compongono la tasca enzimatica e si trova nella corretta disposizione spaziale nei confronti dei residui della triade catalitica, che potranno operare nel modo più efficiente possibile la catalisi. Una volta catalizzata la reazione, lo step finale è il rilascio del prodotto (P) e dell'enzima libero (E), il quale potrà poi accomodare una nuova molecola di substrato, che potrà sottostare al processo catalitico.



[Fig.16] Schema di reazione della cinetica di Michaelis-Menten.

Dopo un certo lasso di tempo dall'inizio della reazione si instaura il cosiddetto "stato stazionario", in cui la concentrazione del complesso enzima-substrato ([ES]) è costante nel tempo. Ciò significa che la velocità di formazione del complesso enzima-substrato eguaglia la sua velocità di dissociazione [Fig.17].

$$k_1 [E] [S] = (k_{-1} + k_2) [ES]$$

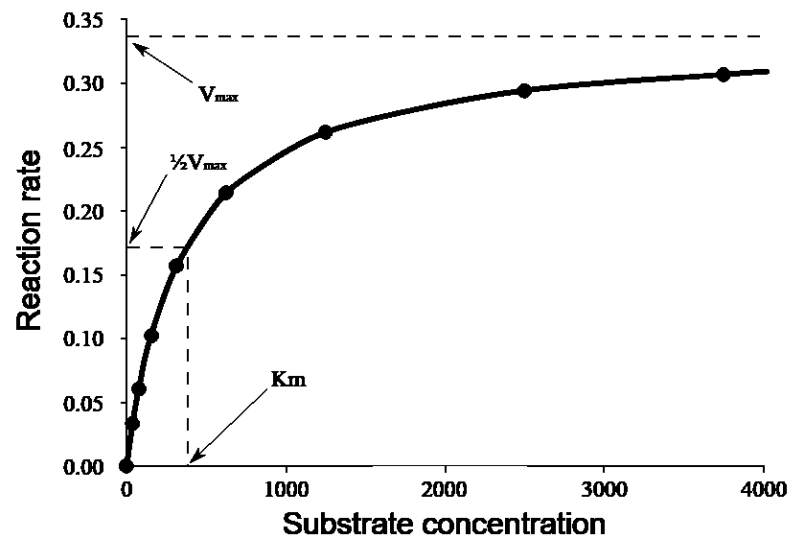
[Fig.17] Assunzione dello stato stazionario nella cinetica di Michaelis-Menten.

È possibile risolvere l'equazione dal punto di vista matematico, ottenendo così l'importantissima Equazione di Michaelis-Menten [Fig.18]. In quest'ultima, "v" rappresenta la velocità di reazione; "V_{max}" è la velocità massima raggiungibile (V_{max} = k₂ [E]₀), in cui [E]₀ rappresenta la concentrazione di enzima totale, data da ([E]₀ = [ES] + [E]); "K_M" è una costante data dal rapporto (k₋₁ + k₂) / k₁.

$$v = \frac{V_{\max} [S]}{K_M + [S]}$$

[Fig.18] Equazione di Michaelis-Menten.

L'equazione di Michaelis-Menten può essere rappresentata in un grafico che riporta in ordinata la velocità di reazione ed in ascissa la concentrazione di substrato [Fig.19]. A basse concentrazioni di substrato, la curva può essere semplificata da una retta crescente, che è l'andamento tipico di una cinetica di ordine 1, in cui la velocità di reazione dipende in maniera lineare dalla concentrazione di substrato. Quando invece la concentrazione di substrato è elevata, si ha che la curva può essere approssimata con una retta parallela all'asse x, tipica di una cinetica di ordine 0. Ciò significa che nonostante la concentrazione di substrato stia aumentando, la velocità di reazione rimane costante e uguale alla V_{max} . In questa situazione si ha che la concentrazione di substrato è talmente elevata da aver saturato completamente l'enzima disponibile, quindi la successiva aggiunta di altro substrato non porterebbe ad un incremento della velocità di reazione. K_M è la costante di Michaelis-Menten, e matematicamente rappresenta la concentrazione di substrato alla quale la velocità di reazione equivale alla metà della velocità massima raggiungibile. Dal punto di vista biologico, K_M è un indice dell'affinità che l'enzima ha per il suo substrato, quindi è un valore caratteristico di ogni enzima per un dato substrato. Più basso è il valore di K_M e più l'enzima sarà affine al substrato, poiché ne servirà di meno per raggiungere la $V_{max}/2$. Un'altra costante importante è la k_{cat} (o numero di *turnover*), la quale descrive la capacità catalitica di un enzima e corrisponde al numero di molecole di substrato convertite per secondo da una singola molecola di enzima quando è saturata con il substrato. Infine, l'efficienza di un enzima può essere rappresentata dal rapporto k_{cat} / K_M , tenendo conto in questa maniera sia dell'affinità sia dell'abilità catalitica dell'enzima. Il rapporto viene definito anche "costante di specificità", e maggiore è questo valore, migliore sarà la *performance* catalitica dell'enzima in esame con il dato substrato.



[Fig.19] Rappresentazione grafica dell'equazione di Michaelis-Menten.

2. MATERIALI E METODI

2.1 Materiali

2.1.1 Solventi e reagenti

- *Activotec*: Fmoc-His(Trt)-OH
- *Alfa Aesar*: NaBH₄
- *Carbosynth*: EDC*HCl
- *CARLO ERBA*: ACN per HPLC
- *Fluka*: HCl 3M in MeOH; 2,2,2-Trifluoroetano
- *GenScript*: HOAt
- *GL Biochem*: Fmoc-Phe-OH
- *Iris Biotech GmbH*: HATU; Resina Fmoc-(Rink Amide); Oxyma Pure; Fmoc-Leu-OH; Fmoc-Ser(tBu)-OH; Fmoc-Val-OH; Fmoc-Asp(tBu)-OH; Resina 2-clorotritil cloruro
- *Merck*: GSH
- *Sigma-Aldrich*: pMBA; AgNO₃; CsOH; DMF; MeOH; Cys; NAC; NaOH; 4-clorobenzilammina; ACN per sintesi; DIPEA; Acido Lipoico; AcOEt; NaHCO₃; NaCl; Na₂SO₄; THF; NEt₃; Trt-Cl; Aib-OH; Boc₂O; Dietiletere; Etere di petrolio; Esano; Toluene; DCM; TFA; TIS; T3P 50 % w/v in AcOEt; DIC; DODT; Esterase *Pseudomonas fluorescens*, recombinant, from *E. coli*; Anidride acetica; 2-etil-1-esilammina; Sephadex lipofilica; Sephadex G-50; EtOH, KHSO₄.

2.1.2 Strumentazione

Cromatografia liquida ad alta prestazione

Le misure HPLC sono state eseguite utilizzando un apparato Agilent 1200 (Palo Alto, CA), dotato di un rivelatore UV a varie lunghezze d'onda, una colonna Agilent extend-C18 (5 µm, 4.6 x 250 mm) ed una colonna Phenomenex Jupiter

10 μ C4 300A (250 x 4.6 mm). Eluenti: A = 9:1 H₂O/ACN, 0.05 % TFA; B = 1:9 H₂O/ACN, 0.05 % TFA.

Spettroscopia di massa

Le misure sono state acquisite con un Agilent 1200 HPLC accoppiato ad un Agilent 6120 quadrupolo singolo, con sistema di ionizzazione ESI (*electrospray ionization*). Come colonne sono state utilizzate un'Agilent EC-C18 (4 μ m, 4.6 x 100 mm) ed una Phenomenex Jupiter 5 μ C4 300A (250 x 4.60 mm 5 μ micron). Eluenti: A = 9:1 H₂O/ACN, 0.05 % TFA; B= 1:9 H₂O/ACN, 0.05 % TFA.

Spettroscopia UV-VIS

Gli spettri di assorbimento UV-VIS sono stati registrati con lo spettrofotometro Agilent Cary 100 UV-VIS. Si utilizzano cuvette in quarzo con cammino ottico di 1 cm.

Dicroismo circolare (DC)

Lo strumento utilizzato per le analisi al DC è Jasco J-1500. La cuvetta è in quarzo, con cammino ottico di 0.1 cm.

Risonanza magnetica nucleare

Gli spettri ¹H-NMR e ¹H-¹H-TOCSY sono stati registrati a 25 °C con lo strumento Bruker Avance400 MHz. La molteplicità dei segnali viene indicata con: s, singoletto; d, doppietto; t, tripletto; dd, doppietto di doppietti; m, multipletto.

Microscopia a trasmissione elettronica (Presso il Dipartimento di Biologia)

Le immagini acquisite mediante TEM sono state ottenute con la strumentazione FEI TECAI G12, che sfrutta un filamento di tungsteno come sorgente di elettroni per l'effetto termoionico. I campioni liquidi osservati al TEM sono stati preparati mettendo una goccia della soluzione in esame su uno schermo di rame da 400 *mesh* ricoperto da un film di carbonio, che funge da supporto.

Termogravimetria

Lo strumento utilizzato per l'analisi termogravimetrica del nanocluster Ag:*p*MBA-TRIADE-V è il modello SDT-2960 della *TA Instruments*.

Spettroscopia IR

Gli spettri di assorbimento FT-IR sono stati registrati con lo spettrofotometro Perkin-Elmer 1720X.

2.2 Metodi

2.2.1 Sintesi di $M_4Ag_{44}(pMBA)_{30}$

Si prepara una soluzione con 154.2 mg (1.0 mmol) di *p*MBA in 12 mL di EtOH e si pone all'interno di un pallone sotto costante agitazione a 1000 rpm. A questa viene aggiunta una soluzione costituita da 42.4 mg (0.25 mmol) di AgNO₃ in 21 mL di H₂O; a questo punto la soluzione diventa torbida, indice della formazione del precursore insolubile tra argento e *p*MBA. Si basifica fino ad ottenere un pH = 12 con CsOH (50% w/v) per solubilizzare il precursore e deprotonare l'etanolo al fine di stabilizzare il cluster. Successivamente si aggiunge goccia a goccia la soluzione riducente composta da 94.6 mg (2.5 mmol) di NaBH₄ in 9 mL di H₂O. Una volta iniziata la riduzione si noterà il cambiamento di colore della soluzione, che da giallina diventa prima grigia, poi marrone ed infine, dopo circa due ore di reazione, rosso scuro. I nanoclusters vengono purificati mediante una prima centrifugazione per eliminare eventuali solidi formati, successivamente si precipita con DMF per eliminare i sali e l'eccesso di *p*MBA. Il precipitato viene sciolto in una soluzione 1% (v/v) di acido acetico in DMF e precipitato con toluene; queste procedure vanno ripetute più volte affinché il precipitato diventi in grado di sciogliersi in DMF, rimanendo stabile senza il bisogno di acidificare⁽³³⁾.

2.2.2 Sintesi di Ag:GSH, Ag:Cys, Ag:NAC

Ag:GSH. Per la sintesi si fa riferimento alla procedura sperimentale messa a punto da Kumar e collaboratori⁽⁴⁸⁾. Sotto costante agitazione a 1100 rpm, 42.4 mg (0.25 mmol) di AgNO₃ vengono disciolti in un pallone con 50 mL di acqua a cui vengono aggiunti 307 mg (1 mmol) di GSH, portando alla formazione di una soluzione biancastra indice della formazione del precursore argento tiolato. Si pone la reazione in ghiaccio per 30 minuti, dopodiché si aggiunge goccia a goccia la soluzione riducente composta da 94.6 mg (2.5 mmol) di NaBH₄ in 12.5 mL di acqua. La reazione prosegue per circa un'ora fino all'ottenimento di un colore rosso scuro. La purificazione dei nanoclusters prevede una prima concentrazione al rotavapor e successivamente una serie di passaggi di precipitazione e centrifugazione in MeOH, al fine di eliminare i sali ed il GSH rimasto in soluzione. Il precipitato viene infine sciolto in acqua.

Ag:Cys. Inizialmente 121.2 mg (1 mmol) di Cys si sciolgono in 15 mL di H₂O e si pone sotto agitazione costante a 1000 rpm. Si aggiunge la soluzione di AgNO₃ (42.4 mg; 0.25 mmol in 10 mL di H₂O) e si nota la formazione del precursore insolubile e si lascia equilibrare per qualche minuto, dopodiché si basifica con CsOH fino ad ottenere una soluzione limpida. A questo punto si opera la riduzione mediante l'aggiunta goccia a goccia di una soluzione di NaBH₄ (94.6 mg; 2.5 mmol in 8 mL di H₂O) e si lascia reagire per circa due ore.

Ag:NAC. La sintesi prevede la preparazione di una soluzione composta da 163.2 mg (1.0 mmol) di NAC in 10 mL di H₂O, posta sotto agitazione a 1000 rpm. Si aggiungono successivamente 42.4 mg (0.25 mmol) di AgNO₃ in 20 mL di H₂O e si forma il precursore insolubile, si lascia equilibrare per qualche minuto e si basifica con NaOH finché la soluzione non torna limpida, indice dell'avvenuta solubilizzazione del complesso argento tiolato. Successivamente si aggiunge goccia a goccia la soluzione riducente composta da 94.6 mg (2.5 mmol) di NaBH₄ in 8 mL di H₂O e dopo due ore di reazione la soluzione presenta un colore viola scuro. Le nanoparticelle vengono purificate mediante lavaggi con MeOH per eliminare sali e leganti rimasti, infine esse vengono sciolte in H₂O. Quando i

nanoclusters vengono acidificati con acido acetico, essi precipitano in H₂O diventando solubili in solventi organici come MeOH.

2.2.3 Funzionalizzazione post-sintesi di M₄Ag₄₄(pMBA)₃₀ con 4-clorobenzilammina

30 mg (3.18 μmol) di M₄Ag₄₄(pMBA)₃₀ vengono disciolti in 2 mL di DMF. Si aggiungono 43.5 mg (0.114 mmol) di HATU per attivare i 30 acidi carbossilici presenti su ogni nanocluster. L'attivazione prosegue per 10 min, dopodiché si aggiungono 21 μL (0.171 mmol) di 4-clorobenzilammina e 60 μL (0.343 mmol) di DIPEA. Il *coupling* prosegue per un giorno. La purificazione prevede la precipitazione in ACN, con ripetuti lavaggi con ACN e H₂O, dopodiché il precipitato, ovvero i nanoclusters vengono solubilizzati in EtOH.

2.2.4 Funzionalizzazione pre-sintesi di M₄Ag₄₄(pMBA)₃₀ con il metodo del ponte disolfuro

2.2.4.1 Sintesi di Ag:AcidoLipoico e Ag:AcidoLipoico-PheOMe

Ag:AcidoLipoico. 206.3 mg (1 mmol) di acido lipoico vengono sciolti in 10 mL di EtOH in un pallone posto sotto agitazione costante a 1000 rpm. Per avere i carbossilati si basifica con due equivalenti di NaOH, quindi si prepara una soluzione di 10 mL di H₂O con 80 mg di NaOH. Si aggiunge la soluzione di argento nitrato (42.4 mg; 0.25 mmol in 21 mL di H₂O) e si raffredda la soluzione in ghiaccio per 15 min. Si riduce con una soluzione di NaBH₄ (94.6 mg; 2.5 mmol in 8 mL di H₂O) goccia a goccia e si mantiene la reazione in ghiaccio per 30 min, dopodiché si lascia proseguire a temperatura ambiente per un giorno. Alla fine si ottiene una soluzione di nanoclusters rossa, che viene precipitata in ACN per eliminare i composti che non hanno reagito. Il precipitato viene infine sciolto in H₂O.

AcidoLipoico-PheOMe. Il legante viene sintetizzato in laboratorio mediante il *coupling* tra acido lipoico e fenilalanina metilestere. Inizialmente 300 mg (1.45 mmol) di acido lipoico vengono sciolti in 20 mL di ACN e posti sotto agitazione a 1000 rpm in un pallone. L'acido viene attivato per 10 min aggiungendo nel seguente ordine: 198 mg (1.45 mmol) di HOAt e 278 mg (1.45 mmol) di EDC*HCl. Dopo l'attivazione si aggiungono 1.5 eq di fenilalanina metilestere (470 mg; 2.18 mmol) e si basifica con 4 eq di DIPEA rispetto all'ammina utilizzata, quindi si inseriscono 1.2 mL (8.7 mmol). La reazione di *coupling* prosegue per un weekend, dopodiché dalla reazione viene eliminato il solvente all'evaporatore rotante. Il residuo viene sciolto in AcOEt e per ottenere il prodotto puro privo di acqua vengono operati una serie di lavaggi in imbuto separatore, scartando ogni volta la fase acquosa. Si eseguono tre lavaggi acidi con $\text{KHSO}_4(\text{aq})$ 5 % w/v, tre lavaggi basici con $\text{NaHCO}_3(\text{aq})$ 5 % w/v e tre lavaggi con salamoia. La fase organica rimasta viene scaricata in una beuta e anidrificata con $\text{Na}_2\text{SO}_4(\text{s})$. La soluzione viene filtrata dal sale solido con del cotone e viene concentrata al rotavapor, ottenendo così il composto d'interesse AcidoLipoico-PheOMe.

Ag:AcidoLipoico-PheOMe. La sintesi prevede la solubilizzazione di 300 mg (0.82 mmol) di legante in 10 mL di THF sotto agitazione a 1000 rpm. Si aggiungono 34.8 mg (0.21 mmol) di AgNO_3 in 5 mL di H_2O e si lascia raffreddare in ghiaccio per 15 min. Si opera la riduzione goccia a goccia con una soluzione composta da 77.6 mg (2.05 mmol) di NaBH_4 in 6 mL di H_2O , si mantiene in ghiaccio 30 min, dopodiché si protrae la reazione a temperatura ambiente per un giorno. Alla fine, si ottiene una soluzione rossa che viene posta all'evaporatore rotante per eliminare il THF. I nanoclusters rimasti in acqua precipitano, quindi vengono centrifugati e sciolti in MeOH.

2.2.4.2 Sintesi del dimero di *p*MBA (d-*p*MBA), funzionalizzazione con 4-clorobenzilammina e sintesi dei nanoclusters

Sintesi d-*p*MBA. La dimerizzazione prevede la solubilizzazione in 15 mL di MeOH di 270 mg (1.75 mmol) di *p*MBA, a cui viene aggiunto un equivalente di NEt_3 , ovvero 243 μL (1.75 mmol). Alla soluzione viene fatto gorgogliare ossigeno e si protrae la reazione overnight. Dopodiché si evapora il solvente, si scioglie il residuo in AcOEt, e lo si purifica mediante estrazione utilizzando $\text{KHSO}_{4(\text{aq})}$ 5 % w/v, $\text{NaHCO}_{3(\text{aq})}$ 5 % w/v e salamoia. Le impurezze rimangono nella fase acquosa, mentre nella fase organica si ritrova il prodotto, che viene prima anidrificato con $\text{Na}_2\text{SO}_{4(\text{s})}$, successivamente posto al rotavapor, ed il residuo viene sciolto con pochi mL di AcOEt e subito precipitato con etere di petrolio. La soluzione viene filtrata sottovuoto e si recupera il d-*p*MBA solido.

Coupling d-*p*MBA con 4-clorobenzilammina. La funzionalizzazione del d-*p*MBA prevede il *coupling* con $\text{H}_2\text{NCH}_2\text{PhCl}$.

Si sciolgono 200 mg (0.65 mmol) di d-*p*MBA in 12 mL di DMF anidra, si pone sotto agitazione costante a 1000 rpm e si aggiungono in ordine 177 mg (1.3 mmol) di HOAt e 312 mg (1.63 mmol) di EDC*HCl. Si lascia attivare per 10 minuti, dopodiché si aggiungono 317 μL (2.6 mmol) di $\text{H}_2\text{NCH}_2\text{PhCl}$ e 680 μL (3.9 mmol) di DIPEA. La reazione di *coupling* prosegue per un giorno, dopodiché si elimina il solvente all'evaporatore rotante. Il residuo viene sciolto in AcOEt e per ottenere il prodotto puro privo di acqua vengono operati una serie di lavaggi in imbuto separatore, scartando ogni volta la fase acquosa. Si eseguono tre lavaggi acidi con $\text{KHSO}_{4(\text{aq})}$ 5% w/v, tre lavaggi basici con $\text{NaHCO}_{3(\text{aq})}$ 5% w/v e tre lavaggi con salamoia. La fase organica rimasta viene scaricata in una beuta e anidrificata con $\text{Na}_2\text{SO}_{4(\text{s})}$. La soluzione viene filtrata dal sale solido con del cotone e viene concentrata al rotavapor, ottenendo così il composto d'interesse d-*p*MBA- $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{PhCl}$.

Sintesi dei nanoclusters. Il residuo solido di d-*p*MBA- $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{PhCl}$ ottenuto dall'evaporatore rotante viene sciolto in 15 mL di EtOH e posto in un pallone sotto agitazione a 1000 rpm. A questo si aggiunge una soluzione di AgNO_3 (30

mg; 0.18 mmol in 10 mL di H₂O) e si lascia equilibrare. Si aggiunge goccia a goccia la soluzione riducente composta da 77 mg (1.8 mmol) in 6 mL di H₂O e si lascia reagire per circa 3 ore. Alla fine, si concentra la soluzione al rotavapor, si centrifuga in H₂O ed il precipitato viene sciolto in EtOH, ottenendo una soluzione di nanoclusters marrone scuro.

2.2.5 Funzionalizzazione pre-sintesi di M₄Ag₄₄(*p*MBA)₃₀ con il metodo della tritilazione del *p*MBA

2.2.5.1 Sintesi del batch Trt-*p*MBA

4.0 g (26 mmol) di *p*MBA e 7.2 g (26 mmol) di cloruro di tritile (Trt-Cl) vengono posti insieme in un pallone e sciolti in 40 mL di DMF, impostando un'agitazione costante di 1000 rpm. Si aggiungono 9 mL (52 mmol) di DIPEA e si lascia reagire per un giorno. Al termine della reazione essa viene evaporata al rotavapor per eliminare la DMF ed il residuo solido viene prima sciolto in circa 200 mL di AcOEt e successivamente purificato mediante lavaggi acidi (con KHSO_{4(aq)} 5 % w/v), basici (con NaHCO_{3(aq)} 5 % w/v) e salamoia (ogni lavaggio viene ripetuto 3 volte). La fase organica di AcOEt contiene il prodotto, per cui viene anidrificata con Na₂SO_{4(s)} per eliminare eventuale acqua rimasta e viene evaporata per eliminare l'AcOEt. Il residuo viene sciolto con qualche mL di AcOEt, precipitato con 200 mL di esano e lasciato in frigo una notte. Dopodiché si filtra sottovuoto la soluzione e si recupera il solido con una resa del 70 %.

2.2.5.2 Sintesi di Ag:*p*MBA-Aib-NHCH₂PhCl, Ag:*p*MBA-Aib₂-NHCH₂PhCl e Ag:*p*MBA-Aib₃-NHCH₂PhCl

Sintesi Boc-Aib-OH. In un pallone sotto agitazione costante a 1000 rpm si pesano 15 g (0.145 mol) di Aib-OH a cui si aggiunge una soluzione di NaOH 2M precedentemente preparata (5.82 g; 0.145 mol in 72.7 mL di H₂O). Si aggiungono poi 20 mL (0.145 mol) di Et₃N e 156 mL di una soluzione di diossano in cui sono stati sciolti 24.4 g (0.112 mol) di Boc₂O, e la reazione si protrae per 4 giorni. Una volta spenta la reazione, si evapora il diossano al rotavapor, si aggiungono 200

mL di H₂O e si estrae con dietiletere per due volte; la fase organica contiene le impurezze, mentre il prodotto Boc-Aib-COO⁻ rimane in fase acquosa data la carica negativa. Ora la fase acquosa viene posta a 0 °C e acidificata con KHSO_{4(aq)} 5 % w/v per protonare l'acido carbossilico rendendo solubile il composto in ambiente organico. Si estrae per due volte con AcOEt effettuando lavaggi acquosi, in maniera da eliminare tutte le impurezze solubili in H₂O. La fase organica contenente il prodotto viene anidrificata con Na₂SO_{4(s)} ed evaporata; il residuo viene precipitato con etere di petrolio e filtrato sottovuoto. Alla fine si ottengono circa 16.7 g di Boc-Aib-OH con una resa del 73.3%.

Sintesi Boc-Aib-NHCH₂PhCl e deprotezione dal Boc. In un pallone raffreddato in ghiaccio e sotto agitazione a 1000 rpm si aggiungono 2.00 g di Boc-Aib-OH (9.8 mmol), 1.34 g (9.8 mmol) di HOAt e 2.07 g (10.8 mmol) di EDC*HCl, il tutto in 30 mL di DCM. Con questo mix si attiva l'acido carbossilico per 15 min, dopodiché al pallone si aggiungono 1.6 mL (11.3 mmol) di 4-clorobenzilammina e 1.7 mL (9.8 mmol) di DIPEA. La reazione prosegue per tre ore, al termine si evapora il solvente, si scioglie il solido in 150 mL di AcOEt e si effettuano lavaggi (vedi sintesi precedente), anidificazione con Na₂SO_{4(s)} e rotoevaporazione. Il residuo viene sciolto con qualche mL di AcOEt, precipitato in etere di petrolio e filtrato sottovuoto per recuperare il prodotto di interesse, ovvero Boc-Aib-NHCH₂PhCl. Si recuperano 2.120 g con una resa quindi del 66%. Per la deprotezione dal Boc, 1.702 g (5.2 mmol) di Boc-Aib-NHCH₂PhCl sono trattati con 15 mL di HCl 3M in MeOH per circa un'ora. Al termine della deprotezione il solvente viene eliminato al rotavapor aggiungendo dietiletere più volte affinché non rimanga alcuna traccia di acido.

Sintesi pMBA-Aib-NHCH₂PhCl. In un pallone sotto agitazione a 1000 rpm si introducono 377 mg (0.95 mmol) di Trt-pMBA che vengono attivati con 130 mg (0.95 mmol) di HOAt e 218 mg (1.14 mmol) di EDC*HCl, il tutto in 15 mL di ACN. Si lascia attivare l'acido per 15 min, dopodiché si aggiungono 300 mg (1.14 mmol) di Cl⁻H₃N⁺Aib-NHCH₂PhCl e 0.5 mL (2.85 mmol) di DIPEA. Il *coupling* prosegue per un giorno, al termine della reazione, si evapora il solvente, si scioglie il solido in 150 mL di AcOEt, si effettuano i lavaggi, si anidrifca, si

evapora, il residuo viene addizionato con qualche mL di AcOEt e filtrato sottovuoto. Si ottengono circa 300 mg di Trt-*p*MBA-Aib-NHCH₂PhCl. 208 mg (0.34 mmol) del prodotto vengono deprotetti dal tritile con il mix: 3 mL DCM; 3 mL TFA; 100 µL TIS. La deprotezione avviene per due ore, dopodiché si evapora il solvente addizionando più volte dietilere per eliminare completamente il TFA. A questo punto si è ottenuto il primo legante, ovvero il *p*MBA-Aib-NHCH₂PhCl.

Sintesi *p*MBA-Aib₂-NHCH₂PhCl. Per prima cosa si esegue il *coupling* tra Boc-Aib-OH e Aib-NHCH₂PhCl. Per far ciò, 689 mg (3.39 mmol) di Boc-Aib-OH vengono attivati per 15 min con 589 mg (4.33 mmol) di HOAt e 993 mg (5.20 mmol) di EDC*HCl in un volume totale di 30 mL di ACN. Successivamente si aggiungono 1.071 g (4.07 mmol) di Cl⁻H₃N⁺Aib-NHCH₂PhCl e 2.3 mL (13.2 mmol) di DIPEA. Il *coupling* avviene per un giorno, dopodiché si evapora il solvente, si scioglie il residuo in circa 150 mL di AcOEt, si effettuano i lavaggi, si anidrifica, si evapora il solvente, il residuo si scioglie con qualche mL di AcOEt, si precipita con n-esano e si filtra sottovuoto per ottenere il solido. Si recuperano circa 590 mg di Boc-Aib₂-NHCH₂PhCl. 560 mg (1.36 mmol) del prodotto vengono deprotetti dal Boc con 10 mL di HCl 3M in MeOH per un'ora. Terminata la deprotezione si evapora il solvente addizionando più volte dietilere.

Per effettuare il *coupling* tra Trt-*p*MBA e Cl⁻H₃N⁺Aib₂-NHCH₂PhCl si segue la solita metodologia con le seguenti quantità: 377 mg (0.95 mmol) di Trt-*p*MBA; 130 mg (0.95 mmol) di HOAt; 218 mg (1.14 mmol) di EDC*HCl; 397 mg (1.14 mmol) di Cl⁻H₃N⁺Aib₂-NHCH₂PhCl; 0.5 mL (2.85 mmol) di DIPEA, il tutto in un volume finale di 20 mL di ACN. La reazione prosegue per un giorno dopodiché si evapora il solvente, il residuo si scioglie in 150 mL di AcOEt, si effettuano i lavaggi, si anidrifica, si evapora il solvente, si scioglie il residuo con qualche mL di AcOEt, si precipita con n-esano e si filtra sottovuoto per ottenere il prodotto, ovvero Trt-*p*MBA-Aib₂-NHCH₂PhCl. Questi vengono deprotetti dal tritile con il mix: 3 mL DCM; 3 mL TFA; 100 µL TIS. La deprotezione avviene per due ore, dopodiché si evapora il solvente addizionando più volte dietilere per eliminare completamente il TFA. A questo punto si è ottenuto il secondo legante, ovvero il *p*MBA-Aib₂-NHCH₂PhCl.

Sintesi *p*MBA-Aib₃-NHCH₂PhCl. Il primo passo è eseguire il *coupling* tra Boc-Aib-OH e Cl⁻H₃N⁺Aib₂-NHCH₂PhCl secondo il protocollo visto nelle precedenti sintesi. Quindi 331.7 mg (1.63 mmol) di Boc-Aib-OH si attivano per 15 min con 222.1 mg (1.63 mmol) di HOAt e 374.1 mg (1.96 mmol) di EDC*HCl, il tutto in 20 mL di ACN. Dopodiché si aggiungono 473.6 mg (1.36 mmol) di Cl⁻H₃N⁺Aib₂-NHCH₂PhCl, 850 µL (4.89 mmol) di DIPEA e si lascia reagire per un giorno. Al termine della reazione si evapora il solvente, si scioglie il residuo solido in 150 mL di AcOEt, si effettuano i lavaggi, si anidrifca, si evapora il solvente, si scioglie il solido in pochi mL di AcOEt, si precipita con un mix 1:1 di n-esano ed etere di petrolio e si filtra sottovuoto per recuperare il prodotto. Si ottengono circa 353.9 mg di Boc-Aib₃-NHCH₂PhCl; 301.5 mg (0.61 mmol) di questi vengono deprotetti dal Boc con 7.5 mL di HCl 3M in MeOH per circa un'ora, dopodiché si evapora il solvente addizionando più volte dietilere per eliminare ogni traccia di acido.

A questo punto si può procedere con il *coupling* tra Trt-*p*MBA e Cl⁻H₃N⁺Aib₃-NHCH₂PhCl, attivando 214.1 mg (0.54 mmol) di acido con 73.5 mg (0.54 mmol) di HOAt e 124.2 mg (0.65 mmol) di EDC*HCl, in un volume totale di 10 mL di ACN per 10 min. Dopo l'attivazione si aggiungono 282.8 mg (0.65 mmol) di ammina e 290 µL (1.62 mmol) di DIPEA. Il *coupling* si protrae per un giorno e si osserva la formazione di un precipitato, il quale viene recuperato mediante filtrazione sottovuoto ed il solido ottenuto (circa 228.1 mg) rappresenta il prodotto di interesse, ovvero il Trt-*p*MBA-Aib₃-NHCH₂PhCl.

200 mg (0.26 mmol) di prodotto vengono deprotetti dal tritile con il mix di deprotezione composto da: 3 mL DCM; 3 mL TFA; 100 µL TIS. Si deprotegge per circa due ore, dopodiché si elimina il solvente al rotavapor addizionando più volte dietilere per eliminare ogni traccia di acido. A questo punto si è ottenuto il terzo legante, ovvero il *p*MBA-Aib₃-NHCH₂PhCl.

Sintesi Ag:*p*MBA-Aib-NHCH₂PhCl. 123.4 mg (0.34 mmol) di legante *p*MBA-Aib-NHCH₂PhCl vengono sciolti in 24 mL di EtOH e posti in un pallone sotto agitazione a 1000 rpm. Si aggiunge una soluzione di AgNO₃ (42.8 mg; 0.25 mmol in 6 mL di H₂O), si lascia equilibrare, dopodiché si basifica con CsOH fino a pH 10. Si addiziona goccia a goccia la soluzione riducente composta da 95.3 mg (2.5

mmol) di NaBH₄ in 5 mL di H₂O. Si lascia che la formazione dei nanoclusters perduri un giorno, dopodiché vengono purificati mediante centrifugazioni in H₂O dato che in questo solvente precipitano.

Sintesi Ag:pMBA-Aib₂-NHCH₂PhCl. La sintesi e la purificazione seguono esattamente le stesse procedure per quanto visto con Ag:pMBA-Aib-NHCH₂PhCl. Si pesano sempre 0.34 mmol di legante Ag:pMBA-Aib₂-NHCH₂PhCl, che però corrispondono a 152.3 mg.

Sintesi Ag:pMBA-Aib₃-NHCH₂PhCl. La sintesi e la purificazione seguono esattamente le stesse procedure per quanto visto con Ag:pMBA-Aib-NHCH₂PhCl, ma variano le quantità. Si hanno 138.6 mg (0.26 mmol) di legante Ag:pMBA-Aib₃-NHCH₂PhCl in 18 mL di EtOH, 21.4 mg (0.13 mmol) di AgNO₃ in 5 mL di H₂O e 47.7 mg (1.26 mmol) di NaBH₄ in 3 mL di H₂O.

2.2.5.3 Sintesi di Ag:pMBA-(Aib)_x-NHCH₂PhCl

Sintesi Aib-NCA. 5g (24.6 mmol) di Boc-Aib-OH vengono sciolti in 135 mL di AcOEt ai quali vengono aggiunti 2 mL (24.7 mmol) di piridina. Successivamente si aggiungono 17.4 mL di una soluzione di T3P (quindi 29.2 mmol di T3P) e la reazione prosegue per 3 ore. Al termine della sintesi, al pallone di reazione viene aggiunto del ghiaccio, una volta sciolto si separa la miscela in imbuto separatore, scaricando la fase acquosa che contiene le impurezze. Si ripete il lavaggio con ghiaccio un'altra volta e successivamente se ne eseguono altri due con salamoia. La fase organica finale viene anidrificata con Na₂SO_{4(s)}, evaporata e filtrata sotto vuoto per recuperare l'Aib-NCA solido. Se ne ottengono 2 g, quindi una resa di reazione del 63 %.

Sintesi di pMBA-(Aib)_x-NHCH₂PhCl. 1.5 g (11.6 mmol) di Aib-NCA vengono sciolti in 10 mL di ACN anidro. Si prepara una soluzione composta da 150 mg (1.05 mmol) di 4-clorobenzilammina in 2 mL di ACN anidro, e si aggiunge il tutto alla soluzione di Aib-NCA. La reazione prosegue overnight, a 90 °C e con un refrigerante a bolle. Successivamente è il momento del *coupling* con il MeO-

Trt-*p*MBA, quindi 1.12 g (2.6 mmol) di questo composto vengono inizialmente attivati con 393.0 mg (2.9 mmol) di HOAt, 533.6 mg (2.8 mmol) di EDC*HCl in 8 mL di ACN per 10 min. Successivamente, l'acido attivato viene aggiunto al pallone di reazione in cui è avvenuta la sintesi di (Aib)_x-NHCH₂PhCl e si aggiungono 1.37 mL (7.9 mmol) di DIPEA. La reazione prosegue per due ore, a 40 °C e con un refrigerante a bolle.

Al termine del *coupling* si aggiungono 20 mL di AcOEt e si effettuano lavaggi acidi con KHSO_{4(aq)} 5 % w/v, basici con NaHCO_{3(aq)} 5 % w/v e con salamoia. Tutte le fasi acquose vengono scartate, mentre la fase organica finale viene anidrificata con Na₂SO_{4(s)} e successivamente evaporata. Si aggiunge qualche mL di AcOEt per sciogliere il residuo solido, dopodiché si precipita con esano e si filtra sottovuoto per recuperare il prodotto solido, ovvero il MeOTrt-*p*MBA-(Aib)_x-NHCH₂PhCl. Il composto viene deprotetto dal Meo-Trt con il mix costituito da 20 mL di DCM, 3 mL di TFA e 200 µL di TIS, per un'ora e mezza. Il prodotto, ovvero il *p*MBA-(Aib)_xNHCH₂PhCl, viene purificato nella stessa maniera per quanto si è già visto nella purificazione del MeOTrt-*p*MBA-(Aib)_xNHCH₂PhCl.

Sintesi Ag:*p*MBA-(Aib)_x-NHCH₂PhCl. Il legante *p*MBA-(Aib)_xNHCH₂PhCl ottenuto dalla filtrazione sottovuoto (si stimano circa 0.89 mmol, considerando una resa della reazione di polimerizzazione del 100 %) viene sciolto in 25 mL di EtOH, ai quali viene successivamente aggiunta una soluzione di AgNO₃ (50 mg; 0.29 mmol in 5 mL di H₂O). Si lascia equilibrare per qualche minuto il sistema, dopodiché si aggiunge goccia a goccia una soluzione di NaBH₄ (110 mg; 2.9 mmol in 10 mL di H₂O). La sintesi dei nanoclusters perdura un'ora, dopodiché si evapora l'etanolo al rotavapor e si precipita la soluzione rimanente con DCM. Il precipitato, ovvero i nanoclusters di interesse, vengono infine sciolti in MeOH.

2.2.5.3.1 *Size focusing* di (Aib)_x-NHCH₂PhCl

Una volta sintetizzato l'Aib-NCA, la sua polimerizzazione sfruttando la 4-clorobenzilammina come iniziatore, avviene in maniera leggermente diversa rispetto a quanto visto nel paragrafo precedente. In pratica, 500 mg (3.87 mmol) di Aib-NCA vengono sciolti in 20 mL di ACN anidro e posti a raffreddare in

ghiaccio per circa 20 min. Si prepara una soluzione composta da 150 mg (1.05 mmol) di 4-clorobenzilammina in 2 mL di ACN anidro, si aggiunge il tutto alla soluzione di Aib-NCA e si toglie il ghiaccio. Si termostata inizialmente a 40 °C, ma la temperatura viene aumentata di circa 10 °C all'ora fino ad un massimo di 90 °C, e si usa un refrigerante a bolle per evitare che il solvente evapori. Dopo 2.5 ore dall'inizio della reazione si aggiungono altri 250 mg di Aib-NCA, precedentemente sciolti in 2 mL di ACN anidro. La medesima aggiunta di Aib-NCA viene ripetuta anche dopo 5 e 7.5 ore dall'inizio della reazione. Nella sua interezza la reazione perdura 52 ore. Al termine, si noterà la formazione di un precipitato associabile ai polimeri più lunghi e insolubili. La miscela di reazione viene quindi lavata tramite centrifugazione, 2 volte con 20 mL di ACN e 2 volte con 20 mL di MeOH per eliminare i polimeri a basso peso molecolare. Il precipitato ottenuto da queste centrifugazioni, che contiene i polimeri a maggior peso molecolare, viene sciolto in trifluoroetano.

2.2.5.4 Sintesi di peptidi catalitici in fase solida

Sintesi di *p*MBA-F(NH₂)DHSL-CONH₂. 4 g di resina Fmoc-(Rink Amide) (*loading* = 0.64 mmol/g) vengono inizialmente rigonfiati con DMF all'interno del reattore, successivamente si sblocca la resina con 25 mL di piperidina 20 % v/v in DMF per 20 min, per due volte. Separatamente si attiva l'amminoacido da introdurre, quindi in una falcon si introducono 3 equivalenti (rispetto alla resina) di amminoacido, 1 equivalente (rispetto all'acido) di Oxyma Pure, 1.2 equivalenti (rispetto all'acido) di DIC, il tutto in 20 mL di DMF e si lascia attivare per 15 min, dopodiché si riversa il contenuto della falcon nel reattore ed il *coupling* prosegue per circa 2.5 ore. Si acetila la resina con il mix: 4 mL di Ac₂O, 36 mL di DMF e 1 mL di DIPEA per 20 min. Si ripetono i passaggi di deprotezione, *coupling* e acetilazione per ogni amminoacido (e Trt-*p*MBA) da introdurre, osservando le medesime quantità stechiometriche; l'unica differenza sta nel fatto che il *coupling* che coinvolge il Trt-*p*MBA prosegue per un giorno. I *couplings* coinvolgono nel seguente ordine: Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-His(Trt)-OH, Fmoc-Asp(tBu)-OH, Fmoc-Phe-[NH(Boc)]-OH e Trt-*p*MBA. Dopo

ogni reazione (*coupling*, acetilazione, sblocco) vengono effettuati lavaggi con DMF e DCM per eliminare ogni traccia di reagenti rimasti in soluzione.

Al termine dei *couplings*, si rimuovono i vari gruppi protettori e si stacca la catena peptidica dalla resina con il mix: 14.25 mL di TFA, 375 μ L di H₂O e 375 μ L di TIS, per circa 1.5 h. La soluzione che si ottiene viene precipitata con dietiletere in ghiaccio e si centrifuga; il surnatante contiene le impurezze, mentre il precipitato costituisce il peptide di interesse. Il precipitato viene lavato più volte con dietiletere al fine di rimuovere il più possibile i contaminanti. Al termine dei lavaggi il solido viene lasciato seccare dal dietiletere, sciolto in H₂O e liofilizzato.

Sintesi di pMBA-TRIADE-V-CONH₂. Si preparano due reattori di reazione in ognuno dei quali vengono effettuati i seguenti passaggi. Dopo ogni reazione, si lava con DCM e DMF per rimuovere al meglio possibile i reagenti rimasti in soluzione. Si inseriscono 3.5 g di resina Rink Amide (*loading* = 0.64 mmol/g), che vengono rigonfiati con DMF. Si sblocca la resina dal gruppo Fmoc con 20 mL di una soluzione di piperidina 20 % v/v in DMF, per 20 min, per 2 volte. 3 equivalenti (rispetto alla resina) di Fmoc-Val-OH vengono attivati separatamente con 1 equivalente (rispetto all'amminoacido) di Oxyma Pure e 1.2 equivalenti (rispetto all'amminoacido) di DIC, in 20 mL di DMF, per 15 min. Dopodiché si aggiunge il mix di attivazione al reattore e si lascia andare il *coupling* per 2.5 ore. Si acetila la resina con il mix: 4 mL di Ac₂O, 36 mL di DMF e 1 mL di DIPEA per 20 min. Si secca la resina sotto il flusso di azoto e di quello che si ottiene solo 1.5 g verranno sfruttati per il completamento della sintesi del legante. 1.5 g di resina-Val-Fmoc vengono quindi inseriti in nuovo reattore e si sblocca il gruppo Fmoc con piperidina nella stessa maniera con cui è stato fatto precedentemente. Si acetila come in precedenza, e si è pronti per il prossimo *coupling*. Si prepara un mix di attivazione costituito da Fmoc-Ser(tBu)-OH (1 equivalente rispetto alla resina), Fmoc-His(Trt)-OH (2 equivalenti rispetto alla resina), Fmoc-Asp(tBu)-OH (1 equivalente rispetto alla resina), Oxyma Pure (4 equivalenti rispetto alla resina), DIC (4.8 equivalenti rispetto alla resina), in 20 mL di DMF e si attiva per 10 min. Si aggiunge il mix di attivazione al reattore e si protrae il *coupling* per 2.5 ore. L'istidina è stata utilizzata con il doppio degli equivalenti rispetto agli altri amminoacidi poiché essa è una molecola più ingombrata stericamente, quindi

rispetto agli altri residui presenta una cinetica di reazione più lenta. Successivamente si acetila la resina, si sbloccano i gruppi Fmoc, e si prepara l'ultimo *coupling* con il Trt-*p*MBA. Si osservano gli stessi rapporti di equivalenti visti in precedenza. Al termine dell'ultimo *coupling* si sbloccano i gruppi protettori e si stacca il peptide dalla resina con il mix di sblocco: 14.25 mL di TFA, 375 μ L di H₂O e 375 μ L di TIS, per circa 1.5 h. Una volta sbloccati tutti i gruppi protettori e rimossa la catena peptidica dalla resina si precipita la soluzione in dietilere in ghiaccio e si elimina il surnatante tramite centrifugazione per più volte, ottenendo così il legante di interesse.

Sintesi di *p*MBA-FSHV-CONH₂. Anche in questo caso le procedure di sintesi e purificazione sono le medesime per quanto visto con i precedenti due leganti. In questo caso si parte da 4.760 g di resina Rink Amide e la sequenza di amminoacidi introdotti è la seguente: Fmoc-Val-OH, Fmoc-His(Trt)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Phe-OH e Trt-*p*MBA.

Sintesi di *p*MBA-SHD-OH. 2 g di resina 2-clorotritil cloruro (*loading* = 1 mmol/g) vengono inseriti nel reattore e rigonfiati con DMF. Separatamente si prepara una soluzione di 20 mL di DMF con Fmoc-Asp(tBu)-OH (2 equivalenti rispetto alla resina) e DIPEA (1 equivalente rispetto all'amminoacido), la si aggiunge al reattore e si protrae il *coupling* per 2 ore. Ora si effettua il *capping* dei siti che non hanno reagito con 30 mL del mix DCM / MeOH / DIPEA (85 : 15 : 5), reazione che prosegue per 30 min. Si sblocca il gruppo Fmoc con 20 mL di una soluzione di piperidina 20 % v/v in DMF, per 20 min, per 2 volte. Si attiva il secondo amminoacido, ovvero l'Fmoc-His(Trt)-OH (2 equivalenti rispetto alla resina) con Oxyma Pure (1.2 equivalenti rispetto all'amminoacido) e DIC (1.2 equivalenti), in 12 mL di DMF, per 15 min, dopodiché lo si aggiunge al reattore, in cui il *coupling* prosegue per 2.5 ore. Successivamente si sblocca il gruppo Fmoc come in precedenza e si ripete il ciclo di *coupling* e deprotezione per l'aggiunta di Fmoc-Ser(tBu)-OH e Trt-*p*MBA. Al termine della sintesi peptidica, il peptide viene distaccato dalla resina e sbloccato da tutti i suoi gruppi protettori con 20 mL del mix TFA / DODT / H₂O / TIS (93.5 : 1.5 : 2.5 : 2.5). La soluzione ottenuta dallo sblocco viene precipitata in dietilere in ghiaccio e si elimina il

surnatante tramite centrifugazione per più volte, ottenendo così il legante di interesse.

2.2.5.5 Sintesi di N-(2-etil-1-esil)lipammide (LPAM)

400 mg (1.9 mmol) di acido lipoico vengono sciolti in 15 mL di ACN e vengono attivati con 259 mg (1.9 mmol) di HOAt, 435 mg (2.3 mmol) di EDC*HCl per 10 min. Dopodiché si aggiungono 0.8 mL (4.9 mmol) di 2-etil-1-esilammina e 0.5 mL (3.6 mmol) di NEt₃, protraendo il *coupling* per un giorno. Durante la reazione si formano delle sospensioni solide, che vengono in parte eliminate con l'aggiunta di qualche mL di DCM. Il prodotto viene purificato mediante una prima evaporazione del solvente al rotavapor, alla quale segue lo scioglimento del residuo solido in 50 mL di AcOEt. Si effettuano i lavaggi acidi con KHSO_{4(aq)} 5 % w/v, basici con NaHCO_{3(aq)} 5 % w/v e con salamoia. La fase organica che contiene il prodotto viene evaporata, il residuo si scioglie in DCM e si lascia andare a secco in un vial per ottenere la LPAM solida.

2.2.5.6 Sintesi dei nanoclusters con leganti peptidici catalitici

Per quanto riguarda la sintesi delle nanoparticelle sfruttando come leganti questi peptidi catalitici, la procedura segue quella del gruppo di Desireddy⁽³³⁾, variando opportunamente volumi e concentrazioni.

Sintesi di Ag:pMBA-F(NH₂)DHSL-CONH₂. 200 mg (0.26 mmol) di legante si sciolgono in 10 mL di H₂O/EtOH 1 : 1. Si aggiunge la soluzione di AgNO₃ composta da 40 mg (0.24 mmol) in 10 mL di H₂O. Si porta a pH di circa 10 con CsOH e si riduce goccia a goccia con una soluzione di NaBH₄ (100 mg; 2.6 mmol in 5 mL di H₂O) e la reazione prosegue per 4 ore. La purificazione dei nanoclusters prevede la precipitazione in ACN ed una successiva centrifugazione; il surnatante contiene le impurezze quindi si scarta, mentre il precipitato costituisce i nanoclusters, i quali vengono sciolti in H₂O ed acidificati con qualche goccia di acido acetico. Infine, la soluzione di nanoclusters ottenuta viene ulteriormente purificata mediante gel filtrazione in colonna sfruttando Sephadex G-50 come fase stazionaria e H₂O come solvente. Le frazioni vengono analizzate

allo spettrofotometro e mostrano lo stesso spettro di assorbimento UV-VIS. Le frazioni più concentrate sono state riunite e liofilizzate.

Sintesi di Ag:pMBA-TRIADE-V-CONH₂. Il legante non è più un'unica specie molecolare, ma la combinazione di tre peptidi differenti che si stimano essere in rapporto 1 : 1 : 1, per cui viene considerato un peso molecolare medio tra quello dei leganti *pMBA-His-Val-CONH₂*, *pMBA-Ser-Val-CONH₂* e *pMBA-Asp-Val-CONH₂*. Quindi, 301.1 mg (0.82 mmol) di legante si sciolgono in 10 mL di EtOH, ai quali si aggiungono 102.6 mg (0.60 mmol) di AgNO₃ in 51 mL di H₂O. Si basifica fino a pH 10 con CsOH e si effettua la riduzione aggiungendo goccia a goccia la soluzione di NaBH₄ composta da 228.5 mg (6.04 mmol) in 22 mL di H₂O. La sintesi dei nanoclusters avviene per 2 ore, dopodiché si elimina l'EtOH al rotavapor. I nanoclusters vengono purificati dall'eccesso di sali mediante dialisi utilizzando una membrana ad esclusione molecolare di 12 kDa all'interno di una bacinella riempita d'acqua. La dialisi avviene per qualche giorno cambiando di tanto in tanto l'acqua all'interno della bacinella. Al termine del processo si recuperano i nanoclusters, che verranno in seguito liofilizzati.

Sintesi di Ag:pMBA-FSHV-CONH₂. 500 mg (0.80 mmol) di legante vengono sciolti in 25 mL di EtOH/H₂O 3 : 2, ai quali si aggiungono 45 mg (0.26 mmol) in 15 mL di H₂O. Si utilizza CsOH per portare la soluzione a pH 10, dopodiché si effettua la riduzione goccia a goccia con una soluzione di NaBH₄ (100 mg; 2.6 mmol) in 10 mL di H₂O. La sintesi perdura 4 ore, dopodiché si concentra la soluzione al rotavapor, si centrifuga ed il surnatante, che contiene i nanoclusters viene ulteriormente posto all'evaporatore rotante per eliminare l'EtOH. I nanoclusters rimasti in soluzione acquosa vengono frazionati mediante gel filtrazione utilizzando Sephadex G-50 come fase stazionaria e H₂O come solvente. Le frazioni vengono analizzate allo spettrofotometro e mostrano lo stesso spettro di assorbimento UV-VIS. Le frazioni più concentrate sono state riunite e liofilizzate.

Sintesi di Ag:pMBA-SHD-OH. 183 mg (0.37 mmol) di *p*MBA-SHD-OH vengono sciolti in 12 mL di EtOH, ai quali viene addizionata una soluzione di AgNO₃ (17 mg; 0.1 mmol in 15 mL di H₂O). Si lascia equilibrare, dopodiché si basifica fino a pH = 12 con CsOH. Si opera la riduzione goccia a goccia con una soluzione composta da 38 mg (1 mmol) di NaBH₄ in 7 mL di H₂O. La reazione di formazione dei nanoclusters perdura un giorno, dopodiché i prodotti vengono purificati mediante gel permeazione in colonna, sfruttando Sephadex G-50 come fase stazionaria.

Sintesi di Ag:pMBA-SHD-OH@30%LPAM. Si prepara una soluzione in 15 mL di EtOH con 183 mg (0.37 mmol) di *p*MBA-SHD-OH e 35 mg (0.11 mmol) di LPAM. A questa soluzione ne viene aggiunta un'altra composta da 20 mg (0.12 mmol) di AgNO₃ in 10 mL di H₂O. Si lascia equilibrare, dopodiché si basifica fino a pH = 12 con CsOH. Si opera la riduzione goccia a goccia con una soluzione composta da 45 mg (1.2 mmol) di NaBH₄ in 7 mL di H₂O. La reazione di formazione dei nanoclusters perdura un giorno, dopodiché i prodotti vengono purificati mediante gel permeazione in colonna, sfruttando Sephadex G-50 come fase stazionaria.

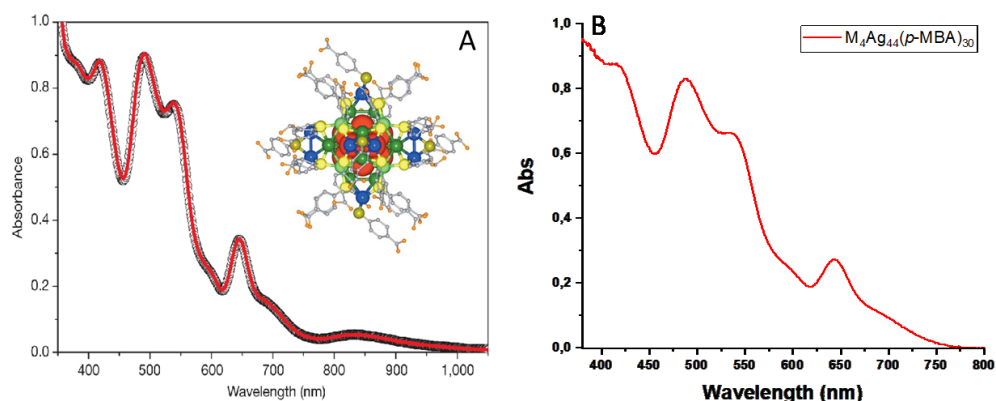
3. RISULTATI E DISCUSSIONE

3.1 $M_4Ag_{44}(pMBA)_{30}$, la base di partenza per la sintesi di nanoclusters enzima mimetici

Come anticipato nel capitolo 1.3.2, il presente progetto si pone l'obiettivo di sintetizzare nanoclusters formati dalla combinazione di atomi di argento metallico e piccoli peptidi, che nel loro insieme portino alla formazione di strutture dotate di proprietà catalitiche nei confronti dell'idrolisi del legame estereo. Lo scopo è quello di ottenere delle strutture unimolecolari ben definite, caratterizzate da un ridotto grado di polidispersione, al fine di conoscere e controllare esattamente la composizione del nanosistema che si vuole sfruttare.

A tal proposito si è deciso di basare i nostri studi sui nanoclusters d'argento sintetizzati secondo la procedura ideata dal gruppo di Desireddy⁽³³⁾, data l'ottima stabilità e la facile procedura di sintesi. Si vuole sfruttare la precisa disposizione spaziale che caratterizza gli atomi d'argento e le molecole di *pMBA* all'interno della struttura finale del nanocluster, ma con l'intento di riuscire a ricreare una medesima situazione ben definita, impiegando però dei leganti costituiti dal *pMBA* funzionalizzato con piccoli peptidi.

Quindi, nella prima parte di questo studio è stata replicata la sintesi dei nanoclusters d'argento "ultrastabili" seguendo l'approccio di Desireddy⁽³³⁾, in cui argento nitrato e *pMBA* vengono inizialmente sciolti in un solvente costituito dalla miscela acqua/etanolo, in cui si avrà la complessazione dei due protagonisti molecolari. La successiva basificazione e riduzione porterà alla formazione di nanoclusters di colorazione rosso scuro. Questi sono stati analizzati mediante assorbimento UV-VIS per confrontare il loro spettro [Fig.20(B)] con quello ottenuto dal gruppo di Desireddy [Fig.20(A)]⁽³³⁾, il quale viene considerato come un riferimento per le nostre analisi.



[Fig.20] Confronto degli spettri di assorbimento UV-VIS dei nanoclusters $M_4Ag_{44}(pMBA)_{30}$ ottenuti dal gruppo di Desireddy⁽³³⁾ (A) e nel nostro laboratorio (B).

Entrambi gli spettri mostrano essenzialmente quattro picchi definiti e non una banda plasmonica che spesso caratterizza le sintesi di nanoparticelle, indice del fatto che i nanoclusters composti da argento e *pMBA* vanno a comporre un sistema con caratteristiche di confinamento elettronico molecolari, tali da poter descriverli con la formula $M_4Ag_{44}(pMBA)_{30}$.

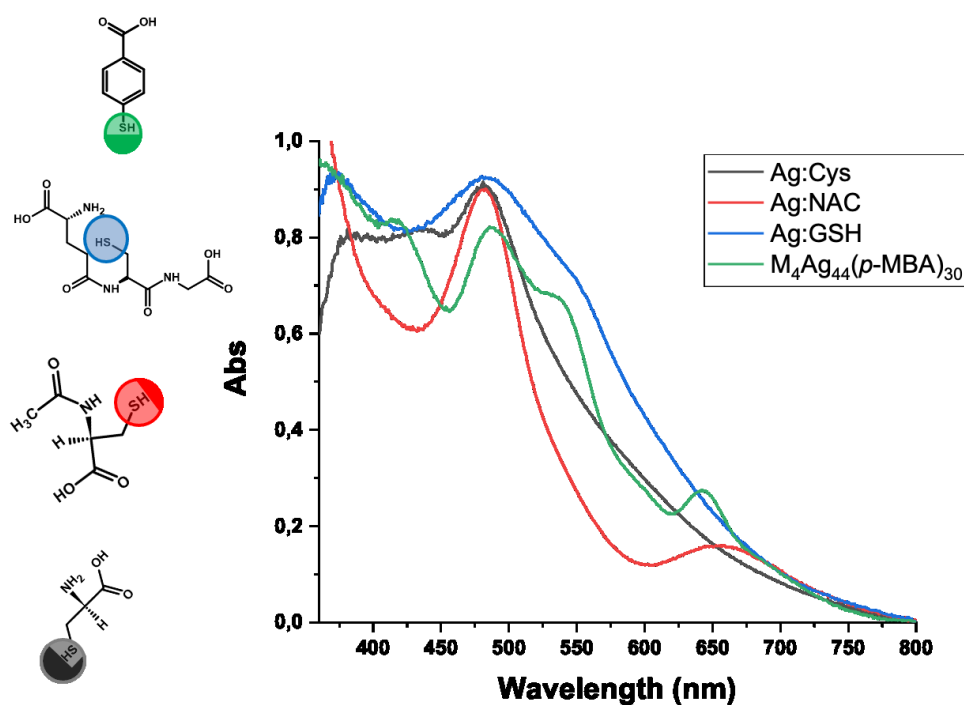
Lo spettro da noi ottenuto mostra i medesimi quattro picchi ben definiti (a circa 415 nm ; 490 nm ; 540 nm ; 645 nm) e picchi meno definiti (595 nm ; 695 nm), indici della corretta sintesi della struttura molecolare ricercata. Purtroppo non è stato possibile identificare anche la banda di assorbimento a circa 850 nm a causa delle limitazioni del nostro spettrofotometro.

Uno spettro di assorbimento di questo genere è caratteristico di piccoli nanoclusters composti da pochi atomi d'argento, i quali sono caratterizzati da transizioni ottiche simili a quelle molecolari, esibendo uno o più massimi di assorbimento. Ciò è valido fintanto che le dimensioni del cluster sono ridotte, poiché, a mano a mano che le dimensioni aumentano, il nanosistema inizia a sviluppare una banda di assorbimento plasmonica⁽⁴⁹⁾.

3.2 Screening di leganti in alternativa al *p*MBA

Si vuole investigare se altre piccole molecole come glutatione, cisteina e N-acetilcisteina (NAC), sono in grado, sfruttando l'interazione tra il loro gruppo solfuro e l'argento, di formare nanoclusters di precisa composizione come nel caso del *p*MBA. Ciò amplierebbe la gamma di substrati impiegabili nella sintesi dei nanoclusters d'argento, magari scoprendo nanostrutture con nuove organizzazioni tridimensionali e proprietà.

Il tentativo di sintesi di questi nanoclusters segue, per quanto riguarda il glutatione, la metodologia di sintesi adoperata dal gruppo di Kumar⁽⁴⁸⁾, mentre nel caso della cisteina e della NAC, si segue la procedura del gruppo di Desireddy⁽³³⁾ cambiando la molecola organica che si complessa all'argento e variando opportunamente le condizioni di reazione. Al fine di verificare se le sintesi abbiano portato alla formazione di piccoli nanoclusters o semplici nanoparticelle plasmoniche, i prodotti vengono analizzati secondo il loro spettro di assorbimento UV-VIS [Fig.21].



[Fig.21] Confronto degli spettri di assorbimento dei nanoclusters Ag:Cys, Ag:NAC, Ag:GSH e $M_4Ag_{44}(p\text{MBA})_{30}$.

Non è difficile notare come nessuno dei nanoclusters sintetizzati presenti uno spettro di assorbimento perfettamente sovrapponibile con quello dei nanoclusters $M_4Ag_{44}(pMBA)_{30}$. Ag:Cys presenta un picco a 480 nm, una leggera gobba a 605 nm ed un'altra banda meno definita a 435 nm. Ag:NAC possiede un picco stretto a 480 nm, una leggera gobba a 535 nm ed una banda allargata centrata a 655 nm, che ricorda il picco presente nei nanoclusters di riferimento che presentano *pMBA* come legante. Nel range 450-600 nm l'andamento delle Ag:GSH ricorda quello dei nanoclusters $M_4Ag_{44}(pMBA)_{30}$ con i due picchi molto meno pronunciati e con l'assenza del picco a 650 nm.

Sebbene gli spettri siano differenti tra loro non è detto che questi facciano riferimento a diverse strutture del core metallico d'argento, poiché anche la diversa natura del legante che costituisce il guscio dei nanoclusters/nanoparticelle potrebbe influenzare la posizione, la larghezza e l'altezza dei picchi di assorbimento⁽⁴⁸⁾.

Nonostante queste diversità, l'esperimento ha permesso di capire come anche cambiando la natura del legante, nanoclusters di discrete dimensioni siano in grado di formarsi grazie all'interazione tra l'argento ed il tiolo.

3.3 Funzionalizzazione del *pMBA*

I leganti Cys, NAC e GSH precedentemente impiegati nella sintesi dei nanoclusters presentano vari aspetti di cui è necessario tenere conto. Innanzitutto, la presenza di gruppi amminici è un problema dal punto di vista della sintesi dei nanoclusters, poiché gli atomi di azoto potrebbero anch'essi coordinarsi all'argento in alternativa al tiolo, formando strutture differenti ed eterogenee. Inoltre, un'ipotetica funzionalizzazione di queste molecole sarebbe resa complicata dalla presenza di più gruppi funzionali.

L'analisi è quindi proseguita focalizzando l'interesse sul *pMBA*, dato che presenta esclusivamente un tiolo che servirà per coordinarsi all'argento ed una funziona carbossilica, che potrà essere funzionalizzata, provando a sintetizzare dei derivati del *pMBA*, per utilizzarli come leganti nella sintesi dei nanoclusters. L'idea è quella di ottenere un nanocluster con un core metallico identico a quello

dei $M_4Ag_{44}(pMBA)_{30}$, in cui varia unicamente la tipologia e ovviamente la disposizione spaziale delle molecole che vanno a comporre lo *shell* di questo sistema.

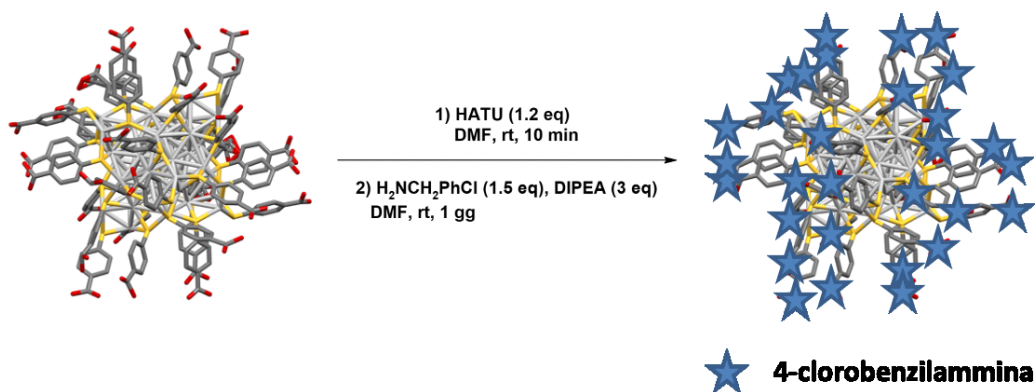
A tal proposito le opzioni sono due: 1) Funzionalizzare il *pMBA* dopo aver sintetizzato i $M_4Ag_{44}(pMBA)_{30}$ sfruttando i gruppi carbossilici esterni 2) Sintetizzare il legante di interesse e utilizzarlo insieme all'argento nitrato nella sintesi dei nanoclusters. Sono stati testati entrambi gli approcci, ma ci si è focalizzati maggiormente sul secondo.

3.3.1 Funzionalizzazione post-sintesi

L'idea alla base della funzionalizzazione post-sintesi è quella di sfruttare un nanocluster di cui si conosce la struttura tridimensionale come base di partenza per la sintesi di sistemi più complessi. Si presuppone che la disposizione spaziale degli atomi d'argento e delle molecole di *pMBA* rimanga inalterata, con l'unica variante di avere un legante che può essere allungato mediante cicli di *coupling*. Secondo questa ipotesi ci si aspetta di ottenere un sistema finale composto dai 44 atomi d'argento e dalle 30 molecole del nuovo legante, potendo descrivere questo nuovo complesso con la formula molecolare $M_4Ag_{44}(pMBA-X)_{30}$, in cui la X rappresenta la nuova unità aggiunta mediante il *coupling* [Fig.22].

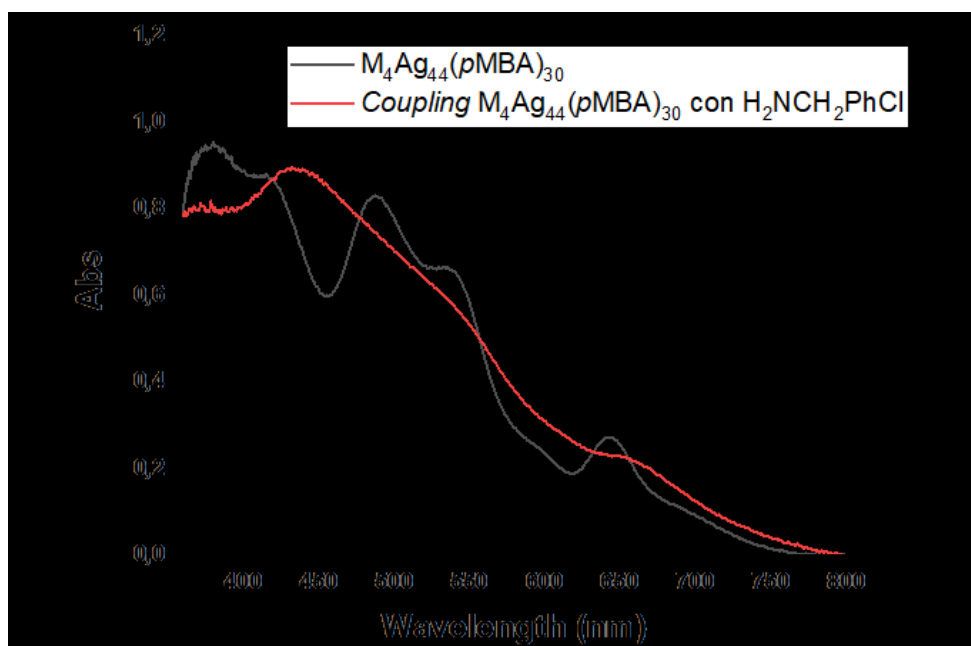
Dal punto di vista sperimentale, la soluzione di $M_4Ag_{44}(pMBA)_{30}$ viene attivata con HATU, dopodiché viene eseguito il *coupling* con la 4-clorobenzilammina in DMF. HATU è una molecola attivatrice dell'acido carbossilico che può essere utilizzata nella sintesi peptidica in alternativa alla coppia attivatore-additivo, spesso rappresentata da EDC/DIC/DCC-HOAt/HOBt/OxymaPure. Il vantaggio di utilizzare HATU è quello di avere all'interno della stessa molecola una porzione che funge da attivatore dell'acido carbossilico ed una porzione che permette la formazione dell'estere attivo. In breve, HATU reagisce inizialmente con l'acido carbossilico, producendo un intermedio instabile e liberando l'anione (OAt)⁻. L'anione che si forma procede con l'attacco nucleofilo sull'acido attivato, portando alla formazione dell'estere attivo, il quale potrà poi essere impiegato

nella reazione di *coupling* con la 4-clorobenzilammina. In questo modo, si utilizzano meno *chemicals* e la purificazione del prodotto è facilitata.



[Fig.22] Schema di reazione della funzionalizzazione del nanocluster $M_4Ag_{44}(pMBA)_{30}$ con la 4-clorobenzilammina, rappresentata in figura dalla stella azzurra.

La reazione di *coupling* perdura un giorno, poiché i sistemi reagenti sono alquanto ingombrati stericamente, per cui è importante fornire un tempo adeguato alla reazione. Al termine, i nanoclusters vengono precipitati in ACN, e lavati più volte con ACN e H₂O, infine il solido viene sciolto in EtOH e si acquisisce lo spettro di assorbimento UV-VIS [Fig.23].



[Fig.23] Confronto degli spettri di assorbimento dei nanoclusters $M_4Ag_{44}(pMBA)_{30}$ e dei nanoclusters ottenuti dal *coupling* con la 4-clorobenzilammina.

La curva di assorbimento dei nanoclusters ottenuti dal *coupling* non è perfettamente sovrapponibile a quella dei nanoclusters $M_4Ag_{44}(pMBA)_{30}$, ma il suo andamento ricorda in parte i picchi presenti nello spettro di riferimento. Le bande non sono bene definite e sono molto larghe. L'ipotesi è quella di avere una popolazione di nanoclusters in cui il *coupling* abbia interessato solo alcuni dei 30 leganti presenti in ogni nanocluster, ed ognuno in maniera diversa rispetto agli altri. Ciò sembra plausibile dato l'ingombro sterico sia dei leganti *pMBA* sia delle clorobenzilammine. Nella struttura tridimensionale del nanocluster infatti, si riescono a distinguere dei "grappoli" composti da tre leganti ciascuno e risulta difficile immaginare come tre molecole ingombranti come le clorobenzilammine riescano a funzionalizzare tutti e tre i siti carbossilici. È molto probabile che il *coupling* interessi solo uno o due dei tre *pMBA* che compongono il "grappolo", e questo potrà avvenire in maniera diversa su ogni nanocluster, portando alla formazione di nanosistemi eterogenei nella struttura tridimensionale. È chiaro che una differente composizione e struttura del nanocluster corrisponda ad un diverso spettro di assorbimento UV-VIS. L'insieme eterogeneo di nanoclusters potrebbe quindi essere caratterizzato da uno spettro di assorbimento che rappresenta una sorta di media delle proprietà ottiche dei nanosistemi che si hanno in soluzione, e che quindi plausibilmente possa essere dato da bande allargate e poco definite come quelle rappresentate in [Fig.23].

3.3.2 Funzionalizzazione pre-sintesi

In questo approccio si vuole sintetizzare il legante costituito dal *pMBA* funzionalizzato con un piccolo peptide, mediante tecniche di sintesi peptidica in soluzione ed in fase solida, per poi sfruttare la molecola finale nella procedura del gruppo di Desireddy⁽³³⁾ per ottenere i nanoclusters di interesse. La speranza è quella di sfruttare l'interazione tra il *pMBA* e l'argento per formare gli stessi nanoclusters di riferimento, quindi con la stessa disposizione spaziale degli atomi che formano il core metallico, ma che portino all'esterno una catena peptidica. Risulta evidente come in queste circostanze la formazione della medesima struttura tridimensionale sia resa difficoltosa dall'aver un legante più grande,

quindi caratterizzato da un ingombro sterico maggiore, che potrebbe modificare il numero e la disposizione delle molecole che compongono lo *shell* del sistema.

Affinché questo processo di funzionalizzazione del *pMBA* pre-sintesi abbia successo, bisogna tenere conto della reattività di questa molecola. La sua derivatizzazione è resa infatti complicata dalla presenza del gruppo tiolico, anch'esso un centro reattivo, ma che è necessario rimanga inalterato affinché si possa coordinare agli atomi d'argento.

La prima strategia consiste in una pre-dimerizzazione del *pMBA* tramite la formazione di un ponte disolfuro tra due molecole di *pMBA*, lasciando libere due funzionalità carbossiliche esterne che possono essere funzionalizzate mediante *coupling* con un'ammina. Il ponte disolfuro verrà poi ridotto durante la sintesi dei nanoclusters ad opera del NaBH_4 .

Il secondo metodo prevede la tritolazione del gruppo solfuro del *pMBA*, che verrà infine rimosso con trattamento acido dopo aver eseguito tutte le funzionalizzazioni necessarie alla sintesi del legante. Questo è il metodo su cui ci si è focalizzati maggiormente.

3.4 Dimerizzazione del *pMBA* come metodo di protezione del tiolo

Il primo metodo di protezione del gruppo solfuro del *pMBA* prevede la dimerizzazione di questa molecola, andando quindi a formare un dimero per mezzo di un ponte disolfuro, e lasciando libere le estremità carbossiliche da funzionalizzare. Una volta sintetizzato il legante di interesse, questo verrà utilizzato nella sua forma ossidata nella sintesi dei nanoclusters, poiché la riduzione del ponte disolfuro avverrà nello step di aggiunta del NaBH_4 .

3.4.1 Sintesi Ag:Acidolipoico e derivati

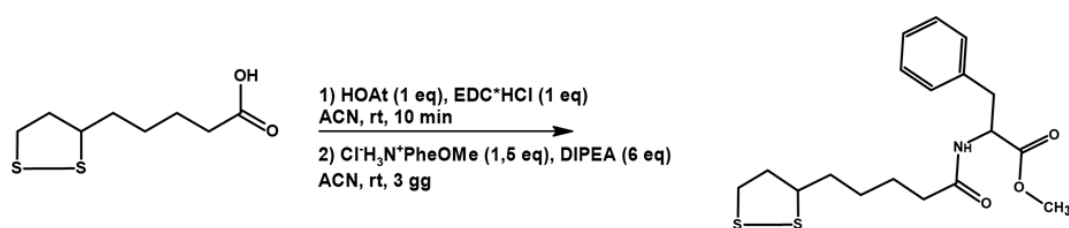
L'idea di voler sfruttare un legante che presenta il ponte disolfuro nella sintesi dei nanoclusters non tiene conto dell'influenza che questo potrebbe avere sulla reazione. L'ipotesi è quella di avere la concomitante riduzione del ponte disolfuro e dell'argento, con la successiva formazione di una struttura tridimensionale data dalla combinazione degli atomi metallici e del tiolo. Per verificare ciò si è deciso di testare la sintesi dei nanoclusters utilizzando l'acido lipoico come legante, data la presenza di un ponte disolfuro interno su questa molecola.

Dal punto di vista sperimentale, i passaggi operativi sono gli stessi della procedura ideata dal gruppo di Desireddy⁽³³⁾, ma con qualche piccolo accorgimento descritto più approfonditamente nella sezione "MATERIALI E METODI".

Alla fine si ottiene una soluzione di nanoclusters di un colore rosso vivo, che viene purificata mediante precipitazione in ACN. Il precipitato viene infine sciolto in H₂O e caratterizzato allo spettrofotometro. Già dal punto di vista visivo si può quindi ipotizzare che le nanoparticelle di acido lipoico presentino una struttura tridimensionale differente rispetto a quella dei nanoclusters M₄Ag₄₄(pMBA)₃₀.

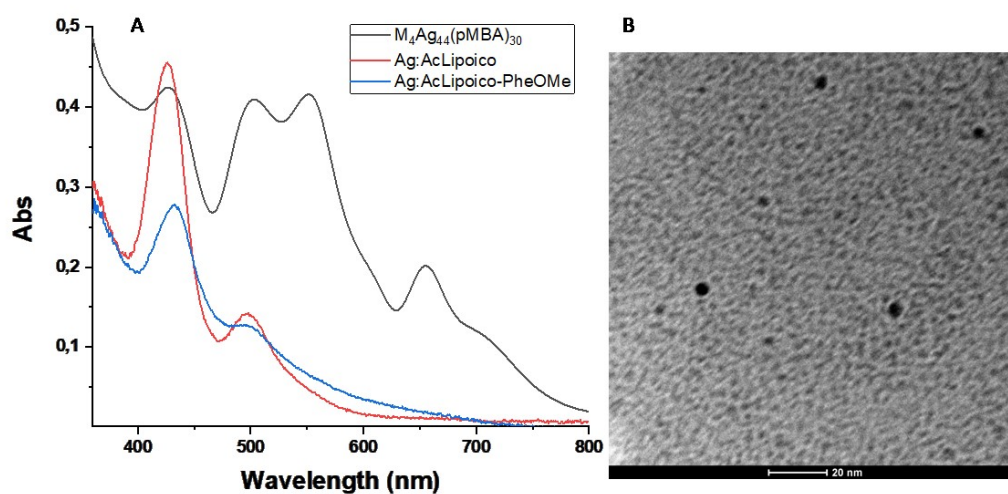
Inizialmente i nanoclusters Ag:AcidoLipoico sono stati sintetizzati omettendo il passaggio di basificazione con NaOH, portando alla formazione di nanoclusters rossi, ma che dopo qualche ora si imbrunivano, a causa probabilmente di un fenomeno di aggregazione. Per evitare ciò è stato introdotto lo step di basificazione con NaOH, in modo da avere sull'esterno dei nanosistemi le funzioni carbossiliche deprotonate, sperando in una stabilizzazione apportata dalla forza repulsiva elettrostatica operata dalle cariche negative, come spesso viene sfruttata dalle comuni sintesi di nanoparticelle d'oro stabilizzate con citrato⁽⁵⁰⁾. Effettivamente la basificazione ha portato alla formazione di nanoclusters che mantenevano la colorazione rossa per più ore, ma anch'essi alla fine mostravano un inscurimento dato presumibilmente dall'aggregazione. La situazione è stata risolta conservando la soluzione di nanoclusters in frigo a 4 °C, rimanendo di un colore rosso vivo anche dopo settimane dalla sintesi.

Una volta sintetizzati i Ag:AcidoLipoico ci si è chiesti se fosse possibile ottenere un risultato simile andando a modificare la struttura del legante, andando ad esempio a formare un legame peptidico sfruttando la funzionalità carbossilica dell'acido lipoico ed il gruppo amminico della fenilalanina metilestere. In breve, l'acido lipoico viene attivato in ACN con EDC*HCl/HOAt, dopodiché, l'estere attivo appena formato può sottostare alla reazione di *coupling* con la fenilalanina metilestere in ambiente basico, grazie all'aggiunta di DIPEA [Fig.24].



[Fig.24] *Coupling* tra acido lipoico e fenilalanina metilestere.

Questo nuovo legante è stato quindi sfruttato per la formazione dei nanoclusters (con lo stesso protocollo di sintesi)⁽³³⁾, le quali mostrano la medesima colorazione rossa ed uno spettro di assorbimento UV-VIS altamente sovrapponibile a quello delle Ag:AcidoLipoico [Fig.25].



[Fig.25] Confronto degli spettri di assorbimento UV-VIS di Ag:AcidoLipoico, Ag:AcidoLipoico-PheOMe e $M_4Ag_{44}(pMBA)_{30}$ (A) e immagine TEM delle Ag:AcidoLipoico (B).

I nanoclusters costituiti dall'acido lipoico e dal suo derivato presentano uno spettro di assorbimento molto simile tra loro, con una banda intorno a 430 nm più stretta ed una banda più larga a circa 500 nm, più pronunciata nel caso dei Ag:AcidoLipoico. Le bande cadono all'altezza di quelle presenti nello spettro dei nanoclusters costituiti da *p*MBA, ma non sono presenti tutte le successive bande dai 500 agli 800 nm. Sicuramente c'era da aspettarsi che gli spettri non fossero totalmente sovrapponibili con quello dei nanoclusters $M_4Ag_{44}(pMBA)_{30}$, poiché l'acido lipoico, una volta ridotto, presenta due gruppi solfuro, i quali possono coordinarsi in maniera diversa con gli atomi d'argento rispetto a quanto accade per il *p*MBA, che presenta un unico solfuro. La geometria della struttura, e quindi la disposizione relativa degli atomi di argento e le molecole di legante influenza in particolar modo la forma finale del nanocluster e la sua dimensione, portando ad avere determinate transizioni elettroniche, che si rispecchiano in uno spettro di assorbimento di vario genere. Nonostante questo, gli spettri di Ag:AcidoLipoico e Ag:AcidoLipoico-PheOMe non presentano un'unica larga banda plasmonica, ma sono caratterizzati da due bande ben definite, situazione che spesso si ritrova quando si ha a che fare con nanoclusters.

La ridotta dimensione dei nanoclusters costituiti da acido lipoico è confermata dalle immagini ricavate al TEM, in cui si nota che il diametro dei nanosistemi è di circa 5 nm [Fig.25(B)].

L'ipotesi è che i leganti costituiti dall'acido lipoico e derivati, siano in grado di formare dei nanoclusters di piccole dimensioni e precisa geometria, grazie alla maniera con cui gli atomi d'argento si combinano ai solfuri liberi. Questo modo di associarsi sarà sicuramente diverso da quello del *p*MBA, poiché nel caso dell'acido lipoico si avrà che la stessa molecola di legante si può coordinare a più atomi d'argento, data la presenza dei due solfuri.

3.4.2 Sintesi del dimero di *p*MBA (d-*p*MBA) e derivati

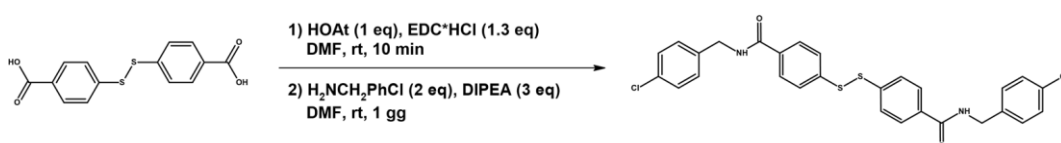
Una volta provato che la presenza di un ponte disolfuro sul legante non va ad inficiare in maniera negativa sulla sintesi dei nanoclusters, il passo successivo è stato quello di dimerizzare il *p*MBA per poi funzionalizzarlo, senza il rischio di avere cross-reazioni indesiderate dei gruppi tiolici. Rispetto a quanto visto per l'acido lipico, ovvero la probabile formazione di strutture molecolari differenti dalle classiche $M_4Ag_{44}(pMBA)_{30}$, nel caso della dimerizzazione del *p*MBA ciò dovrebbe portare ad una medesima organizzazione spaziale, dato che nello step di riduzione il ponte disolfuro viene ridotto e quindi ogni molecola di legante presenta un unico gruppo tiolico che può coordinarsi all'argento.

Per sintetizzare il d-*p*MBA, una soluzione alcolica di *p*MBA in MeOH viene trattata con NEt_3 sotto atmosfera di ossigeno [Fig.26].

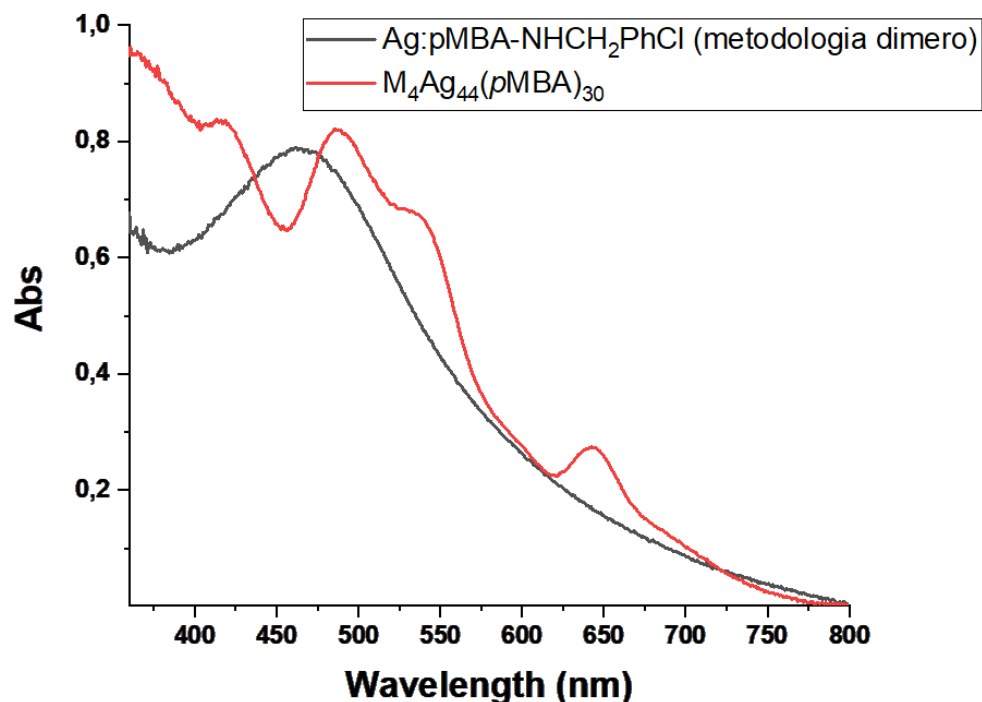


[Fig.26] Schema di reazione della dimerizzazione del *p*MBA.

Una volta sintetizzato il d-*p*MBA, le sue due funzioni carbossiliche sono state attivate con $EDC^*HCl/HOAt$ per essere funzionalizzate con la 4-clorobenzilammina in DMF [Fig.27]. La molecola così ottenuta è stata utilizzata come legante nella sintesi dei nanoclusters, portando alla formazione di sistemi caratterizzati da uno spettro di assorbimento plasmonico [Fig.28].



[Fig.27] Schema di reazione del *coupling* tra d-*p*MBA e 4-clorobenzilammina.



[Fig.28] Confronto degli spettri di assorbimento UV-VIS dei nanoclusters $M_4Ag_{44}(pMBA)_{30}$ e dei nanoclusters $Ag:pMBA-NHCH_2PhCl$ sintetizzati sfruttando la metodologia del dimero di $pMBA$.

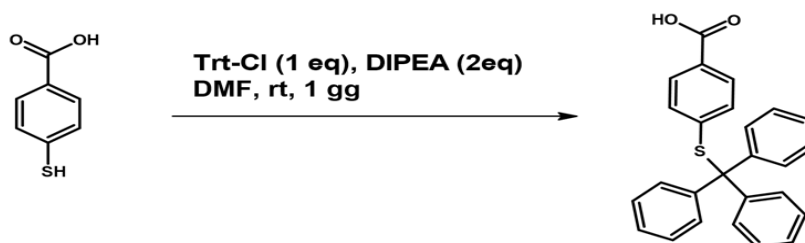
Come si nota in [Fig.28] lo spettro di assorbimento delle nuove nanoparticelle esibisce una banda plasmonica centrata a circa 465 nm. Un assorbimento di tipo plasmonico può manifestarsi sia quando le dimensioni della nanoparticella sono elevate sia quando sono presenti fenomeni di aggregazione. Nel caso dell'aggregazione, questa potrebbe essere dovuta ad un fenomeno di *stacking* degli anelli aromatici delle clorobenzilammine presenti sullo *shell* delle nanoparticelle. Dal punto di vista delle dimensioni, è plausibile che questi sistemi siano più grandi rispetto ai piccoli nanoclusters di riferimento, poiché il nuovo legante è molto più ingombrato e potrebbe trovare maggiori difficoltà nel formare strutture tridimensionali piccole e precise come quelle delle $M_4Ag_{44}(pMBA)_{30}$.

3.5 Sintesi dei leganti mediante tritilazione del *p*MBA

Il tritile è uno dei più comuni gruppi protettori utilizzati nelle sintesi organiche, data la sua stabilità in condizioni neutre e basiche, caratteristica che gli consente di essere ortogonale agli altri gruppi protettori spesso impiegati nelle sintesi peptidiche (es. Acetammide e *t*Bu). Solitamente il tritile viene sfruttato per la protezione dei gruppi alcolici, ad esempio di carboidrati⁽⁵¹⁾, ma viene adoperato anche per la protezione dei gruppi tiolici, ad esempio delle cisteine nei processi di SPPS⁽⁵²⁾.

Nel presente progetto si sfrutta la tritilazione del *p*MBA per ottenere una molecola che come unico centro reattivo presenta l'acido carbossilico, che può quindi essere attivato, per poi essere impiegato in reazioni di *coupling* con ammine libere, al fine di formare dei leganti per la sintesi dei nanoclusters.

Dal punto di vista sperimentale, l'acido *para*-mercaptobenzoico reagisce con il cloruro di tritile in ambiente basico in DMF, con successiva formazione del Trt-*p*MBA [Fig.29]. Una volta sintetizzato il legante completo è necessario rimuovere il tritile al fine di rendere il tiolo disponibile all'interazione con gli atomi d'argento durante la sintesi dei nanoclusters. La rimozione prevede il trattamento acido con TFA in presenza di *scavengers*, ovvero molecole come il TIS, che servono a catturare i carbocationi che si formano durante la deprotezione, impedendo loro di reagire con i gruppi nucleofili presenti nel legante finale.



[Fig.29] Schema di reazione della tritilazione del *p*MBA.

La natura del legante è ciò che possiamo controllare affinché si formino delle nanoparticelle/nanoclusters con precise proprietà.

3.5.1 Leganti a base di Aib

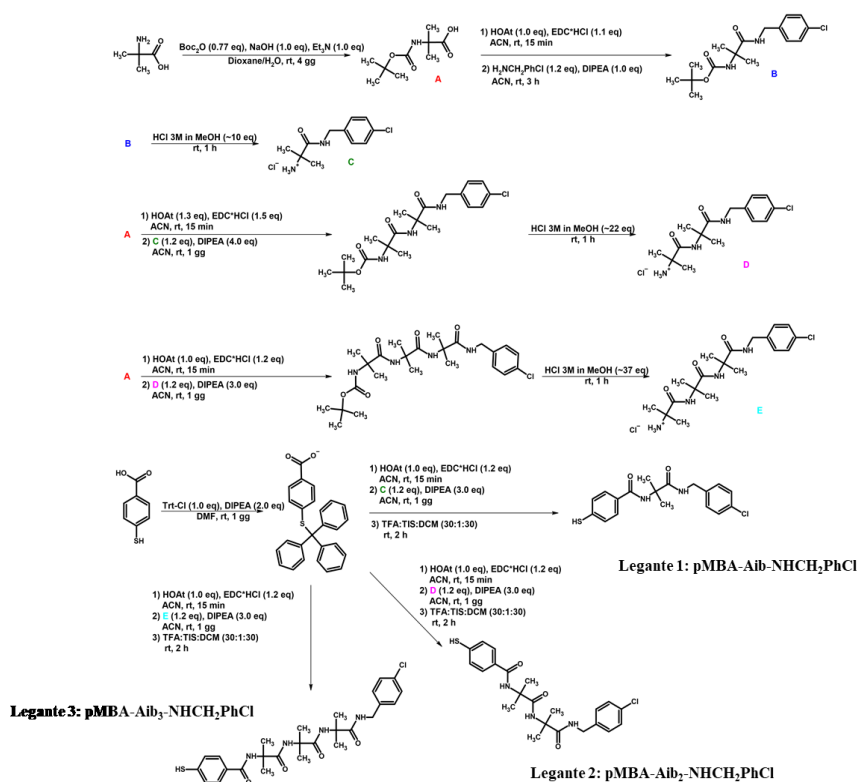
3.5.1.1 *p*MBA-Aib-NHCH₂PhCl ; *p*MBA-Aib₂-NHCH₂PhCl ; *p*MBA-Aib₃-NHCH₂PhCl

Il primo passo è stato quello di sfruttare la sintesi peptidica in soluzione per formare dei leganti composti da *p*MBA-peptide e verificare che essi siano in grado di formare nanoclusters con la classica metodologia del gruppo di Desireddy⁽³³⁾. A questo scopo i leganti in questione sono tre: *p*MBA-Aib-NHCH₂PhCl; *p*MBA-Aib₂-NHCH₂PhCl; *p*MBA-Aib₃-NHCH₂PhCl. Questi presentano un peptide che varia a seconda del numero di unità di Aib presenti, a cui è stato legato ad un'estremità il *p*MBA per avere il sito di coordinamento all'argento e dall'altra la 4-clorobenzilammina, molecola non interessante per le funzioni catalitiche in sé, ma utile per seguire l'andamento delle reazioni di *coupling*. Si vuole indagare se aumentando gradualmente la lunghezza del legante, questo possa in qualche modo compromettere la sintesi dei nanosistemi.

I leganti necessari alla sintesi dei nanoclusters vengono sintetizzati sfruttando la tecnica della sintesi peptidica in soluzione [Fig.30]. Per prima cosa viene effettuato il *coupling* tra Boc-Aib-OH e 4-clorobenzilammina, formando così l'unità di partenza dalla quale deriveranno i successivi leganti. Questa molecola verrà poi allungata con altre unità di Boc-Aib-OH fino ad un massimo di tre, ed il *coupling* finale di ogni legante coinvolgerà il Trt-*p*MBA. I *couplings* coinvolgono la stessa procedura, ovvero l'attivazione dell'acido carbossilico con EDC*HCl/HOAt e formazione del legame peptidico con l'ammina dell'unità precedente in presenza di DIPEA in ACN. Dopo ogni *coupling* è necessario rimuovere il gruppo Boc mediante catalisi acida con HCl per ottenere l'ammina libera. Al termine della sintesi, il tritile viene eliminato con il mix di deprotezione composto da DCM : TFA : TIS (30 : 30 : 1). La purificazione di ogni prodotto di *coupling* consiste in nove lavaggi: tre acidi con KHSO₄, tre basici con NaHCO₃ e tre con salamoia. Dopodiché si anidrifca con Na₂SO₄, si elimina il solvente al rotavapor, si scioglie il residuo in pochi mL di AcOEt e si precipita con n-esano/dietilere/etere di petrolio. La soluzione viene infine filtrata sottovuoto ed

il solido rimasto dovrebbe contenere il legante puro, il quale verrà sfruttato nella sintesi dei nanoclusters.

Per la sintesi dei tre diversi nanoclusters si segue la procedura di Desireddy⁽³³⁾, variando opportunamente gli equivalenti di reazione ed i volumi, a seconda della solubilità che caratterizza il legante in questione, essendo quest'ultimo più idrofobico rispetto al *p*MBA. La reazione viene condotta in una miscela H₂O/EtOH all'interno del pallone in cui il legante è stato deproteggato dal tritile, per cui quest'ultimo sarà presente nella sintesi, ma senza recare criticità al processo. Il tritile verrà poi eliminato durante la purificazione dei nanoclusters, la quale prevede la precipitazione in H₂O, la successiva solubilizzazione in MeOH ed infine una gel filtrazione in colonna, sfruttando come fase stazionaria Sephadex lipofila e utilizzando MeOH come solvente. Le frazioni che si raccolgono vengono caratterizzate osservando il loro spettro di assorbimento UV-VIS, per cui frazioni con spettri sovrapponibili vengono riunite in un unico vial.



[Fig.30] Schemi di reazione che portano alla formazione dei tre leganti per la sintesi dei nanoclusters Ag:*p*MBA-Aib-NHCH₂PhCl ; Ag:*p*MBA-Aib₂-NHCH₂PhCl ; Ag:*p*MBA-Aib₃-NHCH₂PhCl.

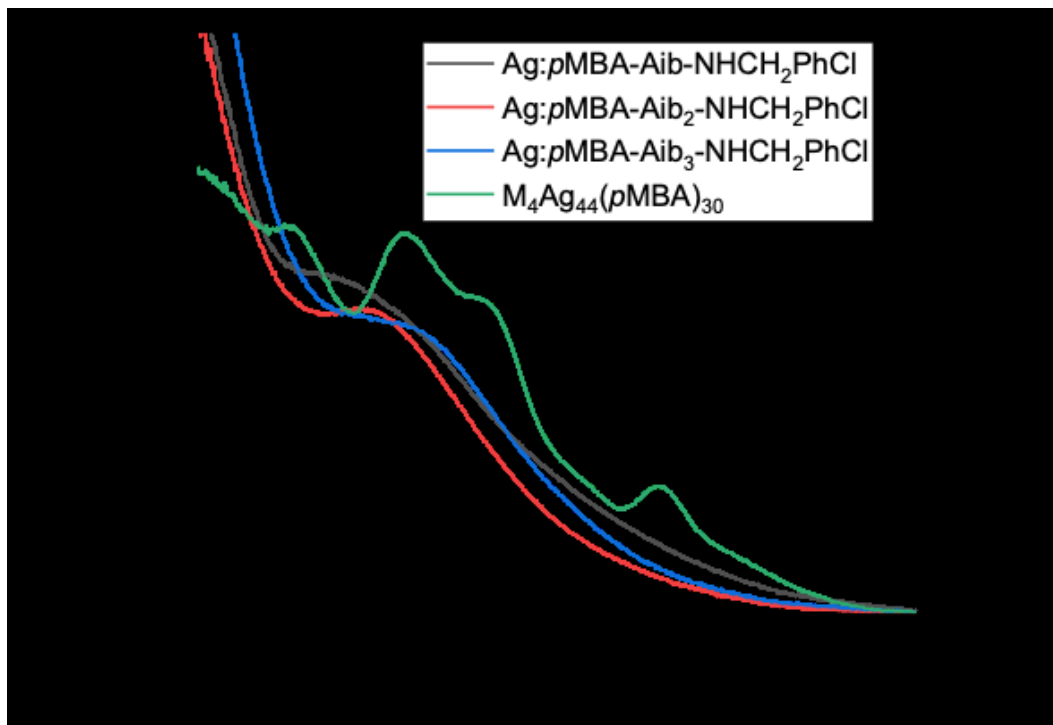
I nanoclusters d'argento sintetizzati con i leganti *p*MBA-Aib-NHCH₂PhCl, *p*MBA-Aib₂-NHCH₂PhCl e *p*MBA-Aib₃-NHCH₂PhCl presentano caratteristiche differenti da quelle delle classiche M₄Ag₄₄(*p*MBA)₃₀. I nanosistemi a base di Aib sono caratterizzati da una colorazione marrone e sono insolubili in H₂O data l'apolarietà delle molecole di legante, ma si dimostrano stabili in ambiente organico, ad esempio in MeOH o CHCl₃. A variare è anche lo spettro di assorbimento UV-VIS come si può notare in [Fig.31]. In tutti e tre gli spettri si ha un'unica larga banda plasmonica tra i 440 ed i 500 nm (più precisamente a 440 nm per Ag:*p*MBA-Aib-NHCH₂PhCl, a 460 nm per Ag:*p*MBA-Aib₂-NHCH₂PhCl ed a 490 nm per Ag:*p*MBA-Aib₃-NHCH₂PhCl). I sistemi assorbono molto anche sotto i 440 nm al di fuori della banda plasmonica, probabilmente perché nonostante i processi di purificazione, molecole di scarto sono rimaste in soluzione e contribuiscono all'assorbimento a basse lunghezze d'onda.

Non si ritrova più quindi la molteplicità di bande che caratterizzano sistemi con un confinamento elettronico molecolare come accade nei nanoclusters M₄Ag₄₄(*p*MBA)₃₀. Indubbiamente ciò porta a pensare che i nanosistemi a base di Aib siano dimensionalmente più grandi, essendo quindi caratterizzati da una SPR il cui massimo di assorbimento è in relazione alla dimensione dell'oggetto. Si nota infatti che aumentando la lunghezza del legante, la banda plasmonica subisce un *red-shift* di circa 20-30 nm ogni volta che viene incorporata una nuova unità di Aib. Quanto appena detto è in accordo con i risultati ottenuti dal gruppo di Amirjani⁽⁵³⁾, in cui hanno provato che a mano a mano che la dimensione della nanoparticella sferica d'argento aumenta, la banda di assorbimento plasmonica subisce un *red-shift* ed un allargamento.

Un'altra ipotesi potrebbe essere l'aggregazione dei nanosistemi, che non è da escludere data l'apolarietà dei leganti, i quali potrebbero interagire tra loro per mezzo di interazioni idrofobiche, tra cui lo *stacking* degli anelli aromatici delle clorobenzilammine.

L'esperimento ha quindi permesso di comprendere come la formazione delle nanoparticelle/nanoclusters avvenga con successo nonostante sia stato utilizzato

un derivato del *p*MBA come legante, ovviamente portando alla sintesi di nanostrutture con diverse caratteristiche.



[Fig.31] Confronto degli spettri di assorbimento UV-VIS di Ag:pMBA-Aib-NHCH₂PhCl ; Ag:pMBA-Aib₂-NHCH₂PhCl ; Ag:pMBA-Aib₃-NHCH₂PhCl e dei nanoclusters M₄Ag₄₄(pMBA)₃₀.

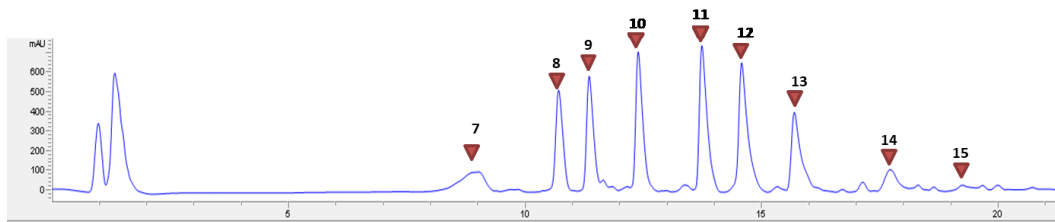
3.5.1.2 *p*MBA-(Aib)_x-NHCH₂PhCl

L'utilizzo di leganti costituiti dal *p*MBA funzionalizzato con piccoli peptidi a base di Aib ha evidenziato come la natura delle molecole che costituiscono lo *shell* del nanosistema non impedisce la formazione di nanoparticelle/nanoclusters. A variare è la tipologia di struttura formata, infatti, data la presenza di una banda plasmonica nel loro spettro di assorbimento, risulta difficile poter pensare alla presenza di sistemi di precisa composizione tipica dei nanoclusters, quindi è più intuitivo parlare di nanoparticelle in generale.

Lo step successivo è stato quello di voler sintetizzare nanoclusters sfruttando leganti sempre più lunghi, per verificare se la lunghezza di questi diventasse ad un certo punto un fattore limitante. La sintesi di queste lunghe molecole prevede una

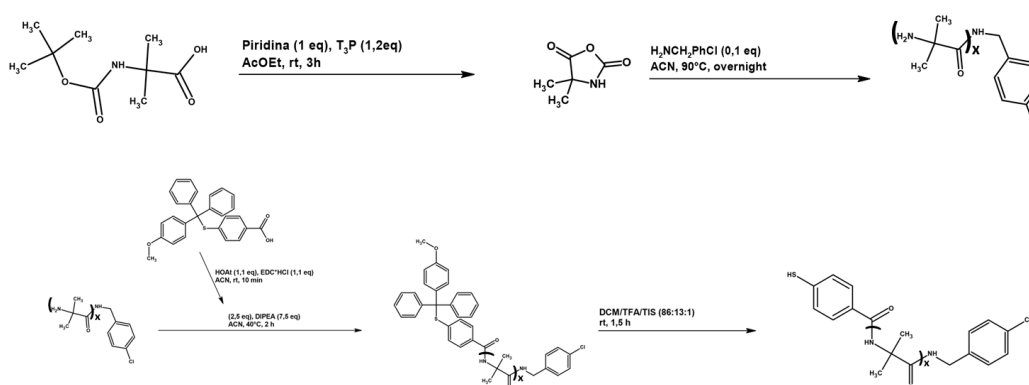
reazione di polimerizzazione in cui si sfruttano gli amminoacidi N-carbossianidridi (NCAs). Gli NCAs sono amminoacidi ciclici molto reattivi nei confronti di nucleofili, proprietà che viene sfruttata per la preparazione di lunghi polimeri peptidici che possono essere impiegati in ambito medico e farmaceutico⁽⁵⁴⁾.

La reazione di polimerizzazione da noi effettuata si basa sullo studio del gruppo di Laconde⁽⁵⁴⁾, nel quale si sfrutta una procedura di sintesi semplice e caratterizzata da una buona resa e purezza del prodotto. Dal punto di vista sperimentale, il Boc-Aib-OH viene trasformato in Aib-NCA ad opera della T3P in presenza di piridina, che funge da catalizzatore basico in una soluzione di AcOEt. Una volta purificato l'Aib-NCA tramite lavaggi in H₂O e salamoia, questo viene impiegato nella reazione di polimerizzazione, in cui la 4-clorobenzilammina rappresenta l'iniziatore nucleofilo. L'ammina dell'iniziatore compie un attacco nucleofilo sul carbonio carbonilico dell'Aib-NCA, provocando l'apertura del ciclo e l'esposizione dell'ammina, la quale potrà eseguire un attacco nucleofilo su un'altra unità di Aib-NCA, andando a creare così lunghe catene peptidiche di (Aib)_x-NHCH₂PhCl. La "x" rappresenta il fatto che le catene polimeriche che si formano non hanno la medesima lunghezza, ma esse differiscono tra loro per il numero di unità di Aib presenti. Ciò rappresenta una polidispersione nei pesi molecolari dei peptidi, che viene testimoniata anche dalle analisi condotte all'HPLC-MASSA [Fig.32]. I picchi del cromatogramma rappresentano polimeri con diverso numero di Aib incorporati, i quali sono caratterizzati da un andamento a gaussiana centrato intorno alle 10-11 unità. I polimeri a pesi molecolari maggiori sono presenti in percentuale minore, molto probabilmente perché, avendo più unità di Aib sono molto più idrofobici ed hanno un limite di solubilità in ACN, nel quale dopo una certa soglia di concentrazione precipitano e non sono rilevabili nel cromatogramma.



[Fig.32] Cromatogramma HPLC della reazione di polimerizzazione di Aib-NCA che sfrutta 4-clorobenzilammina come iniziatore. I picchi rappresentano quindi i polimeri $(Aib)_x-NHCH_2PhCl$, in cui la "x" definisce il numero di unità Aib presenti. Il numero di unità è stato dedotto mediante l'analisi degli spettri di HPLC-MASSA, e viene riportato con il numero sopra il triangolino rosso, che si riferisce ad ogni picco. La corsa cromatografica sfrutta una fase stazionaria C4 ed il seguente gradiente di eluente B : 10% per 3 min, 10-100% in 15 min, 100% per 3.5 min.

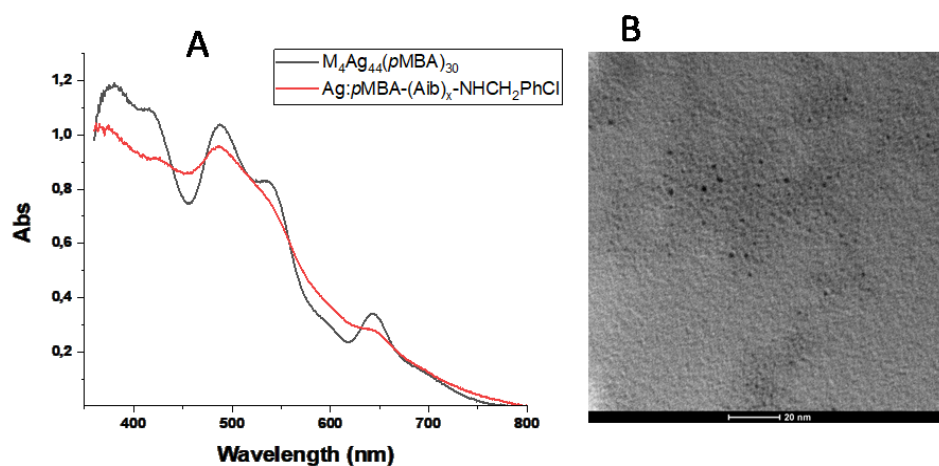
Dopo aver sintetizzato il polimero di Aib è necessario effettuare il *coupling* con il *pMBA* per ottenere il legante completo. A questo scopo si attiva l'acido carbossilico del MeOTrt-*pMBA* con EDC*HCl/HOAt e si conduce il *coupling* con i polimeri $(Aib)_x-NHCH_2PhCl$ in ACN. Si utilizza il MeOTrt-*pMBA* e non il solito Trt-*pMBA* poiché il primo presenta un gruppo metossi su uno degli anelli aromatici del tritile, il che permette una più facile rimozione del gruppo protettore tramite trattamento acido con TFA. Il prodotto del *coupling* viene successivamente purificato mediante estrazione, per poi essere deprotetto dal tritile utilizzando il mix DCM/TFA/TIS. Lo schema di reazione che a partire dal Boc-Aib-OH si raggiunge il legante finale è rappresentato in [Fig.33].



[Fig.33] Schema di reazione per la sintesi dei leganti $pMBA-(Aib)_x-NHCH_2PhCl$.

Il legante è pronto per essere impiegato nella sintesi dei nanoclusters, che viene condotta all'interno del pallone di deprotezione seguendo la procedura del gruppo di Desireddy⁽³³⁾, ma variando i parametri operativi sulla base della maggiore idrofobicità del polimero $pMBA-(Aib)_x-NHCH_2PhCl$. Al termine della sintesi si ottiene una soluzione di un colore rosso violaceo, a cui segue una purificazione mediante precipitazione in DCM.

Il loro spettro di assorbimento è molto sovrapponibile con quello dei nanoclusters di riferimento, con l'unico difetto di non avere i picchi ben risolti, ma è chiaramente distinguibile l'assorbimento dato dalle due bande intorno ai 500 nm e del picco intorno ai 650 nm [Fig.34(A)]. Il sistema non mostra un assorbimento plasmonico, quindi si potrebbe pensare di essere in presenza della formazione di piccoli nanoclusters di struttura riconducibile a quella dei $M_4Ag_{44}(pMBA)_{30}$, data la somiglianza degli spettri UV-VIS. Si ha un insieme di nanosistemi molto probabilmente diversi tra loro, a causa del casuale modo in cui i leganti possono disporsi sulla superficie del sistema, data la diversa lunghezza dei polimeri, e ciò potrebbe essere il motivo della non perfetta risoluzione delle bande. Sono state acquisite le immagini al TEM di queste nanostrutture [Fig.34(B)], le quali sembrano avere un diametro del core metallico intorno ai 2 nm, quindi dimensioni davvero ridotte, che trovano compatibilità con il loro spettro di assorbimento e che portano ad ipotizzare la loro struttura a nanoclusters piuttosto che a nanoparticella.



[Fig.34] Spettro di assorbimento UV-VIS di $Ag:pMBA-(Aib)_x-NHCH_2PhCl$ confrontato con quello dei nanoclusters $M_4Ag_{44}(pMBA)_{30}$ (A) e immagini TEM di $Ag:pMBA-(Aib)_x-NHCH_2PhCl$ (B).

La sintesi di questo genere di nanosistemi ha permesso di comprendere come anche utilizzando dei leganti molto lunghi e idrofobici, sia possibile ottenere delle strutture stabili, con caratteristiche che ricordano quelle dei nanoclusters, e che quindi andrebbero caratterizzate più approfonditamente per verificare questa ipotesi.

3.5.1.2.1 *Size focusing della reazione di polimerizzazione*

Nel precedente paragrafo è possibile notare come la reazione di polimerizzazione degli Aib-NCA ha portato ad una distribuzione dei pesi molecolari non indifferente. Se l'obiettivo è quello di avere un sistema controllato e riproducibile, ovvero, riuscire a sintetizzare dei nanoclusters che abbiano una precisa composizione e struttura tridimensionale, il problema della polidispersione nella lunghezza dei polimeri va limitato il più possibile.

A questo scopo si è deciso di procedere con una polimerizzazione in cui l'Aib-NCA viene addizionato alla miscela di reazione in piccole aggiunte, a distanza di ore l'una dall'altra. Si vuole evitare che la clorobenzilammina provochi l'apertura contemporanea di molti Aib-NCA e che questi vadano ad allungarsi con velocità diverse, portando alla sintesi di polimeri composti da un differente numero di Aib. L'effetto delle progressive aggiunte di Aib-NCA dovrebbe essere quello di avere poche catene in allungamento contemporaneamente, che quindi abbiano una medesima velocità di incorporamento delle unità di Aib.

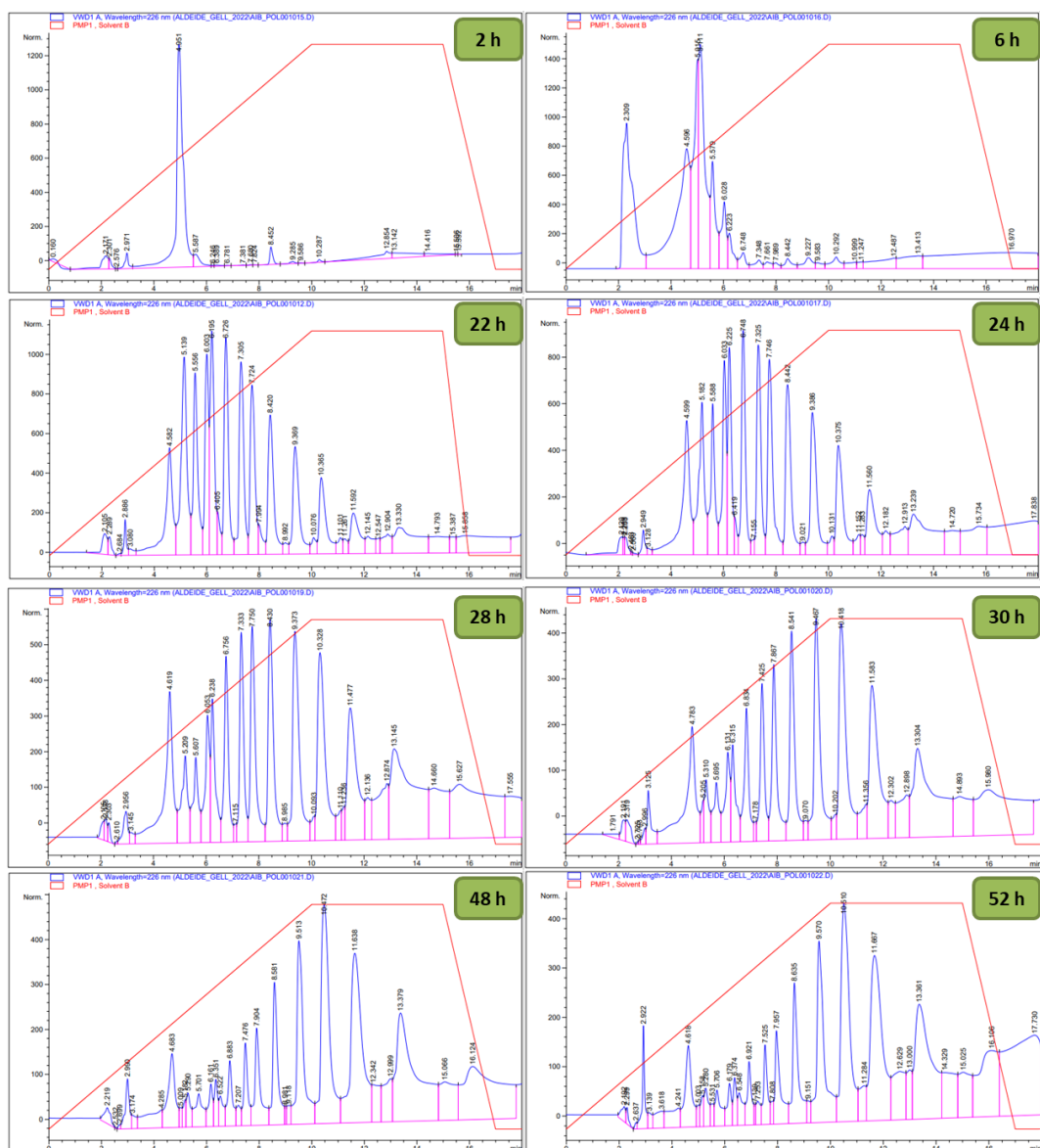
La reazione viene monitorata prelevando piccole aliquote a distanza di ore l'una dall'altra, le quali vengono analizzate all'HPLC [Fig.35]. Si utilizza una fase stazionaria C18, per cui le molecole più idrofobiche escono più tardi nel cromatogramma, quindi a mano a mano che il tempo di ritenzione dei picchi aumenta, il numero di Aib incorporati nel polimero aumenta di conseguenza.

Si nota come all'inizio della reazione siano presenti solo i polimeri a bassi pesi molecolari, ma a distanza di 6 ore iniziano ad apparire piccoli picchi che si riferiscono a molecole più lunghe. Dalle 22 ore in poi si ha una distribuzione a gaussiana dei picchi e quindi dei polimeri che si stanno formando. Inizialmente questa è centrata sui picchi che escono a circa 6 min, ma dopo due giorni di reazione la distribuzione è ampiamente spostata verso i picchi che escono a 10

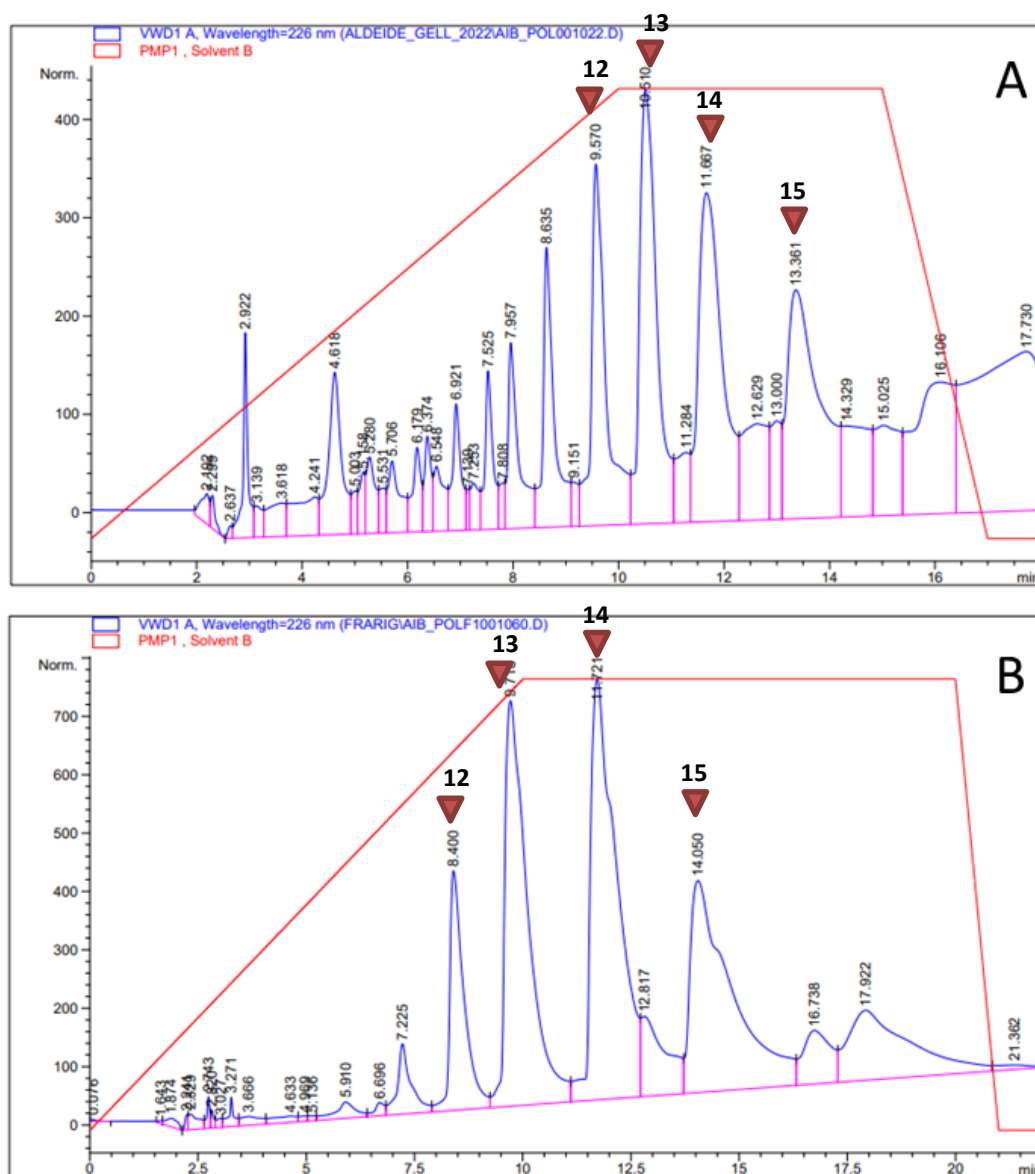
min. Ciò significa che nel tempo, è la popolazione a più alti pesi molecolari che si sta arricchendo maggiormente.

Sembra quindi che la strategia di procedere con piccole aggiunte di Aib-NCA alla volta possa essere in parte la soluzione al problema della polidispersione dimensionale dei polimeri.

Per ottenere una composizione ancora più ristretta, la reazione è stata centrifugata più volte con ACN e MeOH. In questi solventi riescono a sciogliersi solo i polimeri $(\text{Aib})_x\text{-NHCH}_2\text{PhCl}$ a più basso peso molecolare, mentre quelli con numerose unità di Aib rimangono sul fondo come precipitato, a causa della loro bassa solubilità in solventi polari. I polimeri ad unità maggiori si sciolgono bene in trifluoroetanolo (TFE), e le analisi cromatografiche all'HPLC mostrano come di tutti i picchi presenti inizialmente prima dei lavaggi con ACN e MeOH, ne siano rimasti principalmente solo quattro [Fig.36]. Questa operazione ha quindi permesso di restringere ancora di più il campo dimensionale dei polimeri in soluzione, raggiungendo una situazione molto più monodispersa e controllabile.



[Fig.35] Evoluzione della reazione di polimerizzazione di Aib-NCA in cui la 4-clorobenzilammina funge da iniziatore. In questo esperimento l'Aib-NCA è stato aggiunto all'inizio (500 mg), a 2.5 ore (250 mg), a 5 ore (250 mg) ed a 7.5 ore (250 mg). La reazione è monitorata prelevando aliquote a diversi tempi, le quali vengono analizzate tramite cromatografia HPLC, utilizzando una fase stazionaria C18 ed il successivo gradiente di B: 10-100% in 10 min, 100% per 5 min.



[Fig.36] Confronto dei cromatogrammi HPLC al termine della reazione di polimerizzazione di Aib-NCA prima dei lavaggi con ACN e MeOH (A) e dopo i lavaggi con solubilizzazione del precipitato in TFE (B). La colonna cromatografica presenta una fase stazionaria C18 e si sfrutta il seguente gradiente di B: 10-100% in 10 min, 100% per 5 min (A) mentre 100% per 10 min (B). Il numero di unità è stato dedotto mediante l'analisi degli spettri di HPLC-MASSA, e viene riportato con il numero sopra il triangolino rosso, che si riferisce ad ogni picco

3.5.2 Leganti peptidici catalitici

Una volta appurato che la formazione dei nanoclusters avvenisse anche con leganti peptidici modello costituiti da derivati del *pMBA*, ci si è focalizzati sulla sintesi di peptidi che potessero esplicare una funzione catalitica. L'obiettivo è creare sulla superficie dei nanosistemi un ambiente favorevole alla reazione di idrolisi degli esteri, andando a mimare l'organizzazione strutturale che contraddistingue la tasca catalitica enzimatica. È necessario che siano presenti i residui catalitici (aspartato, serina ed istidina), e che essi abbiano una precisa disposizione spaziale tale per cui la catalisi possa avvenire. Altresì importante è il carattere idrofobico del sistema, che deve permettere la stabilizzazione del substrato da idrolizzare ed innalzare la *pKa* dei residui catalitici, al fine di avere le corrette proprietà di catalisi acida e basica.

Tramite la sintesi peptidica in fase solida sono state quindi sintetizzate le successive molecole di legante: *pMBA-F(NH₂)DHSL-CONH₂* ; *pMBA-TRIADE-V-CONH₂* ; *pMBA-FSHV-CONH₂* ; *pMBA-SHD-OH* e *pMBA-SHD-OH@30%LPAM*.

3.5.2.1 Leganti peptidici catalitici - Procedura generale di sintesi

La sintesi dei leganti peptidici avviene in fase solida sfruttando la resina Rink Amide (per i leganti *pMBA-F(NH₂)-DHSL-CONH₂*, *pMBA-TRIADE-V-CONH₂* e *pMBA-FSHV-CONH₂*) [Fig.37] e la resina 2-clorotritil cloruro (per il legante *pMBA-SHD-OH*) [Fig.38] come supporto sulla quale crescerà la catena peptidica. Il solvente della reazione è DMF e gli aminoacidi impiegati presentano tutti il gruppo amminico protetto con Fmoc.

La resina Rink Amide presenta anch'essa il gruppo amminico protetto con Fmoc, per cui prima di tutto bisogna sbloccare l'ammina con una soluzione di piperidina al 20 % v/v in DMF. A questo punto si può procedere con il primo *coupling*, quindi l'amminoacido da inserire viene attivato sfruttando DIC come attivatore e Oxyma Pure come additivo, e si aggiunge il mix di attivazione al reattore contenente la resina. Terminato il *coupling* si effettua un passaggio di acetilazione

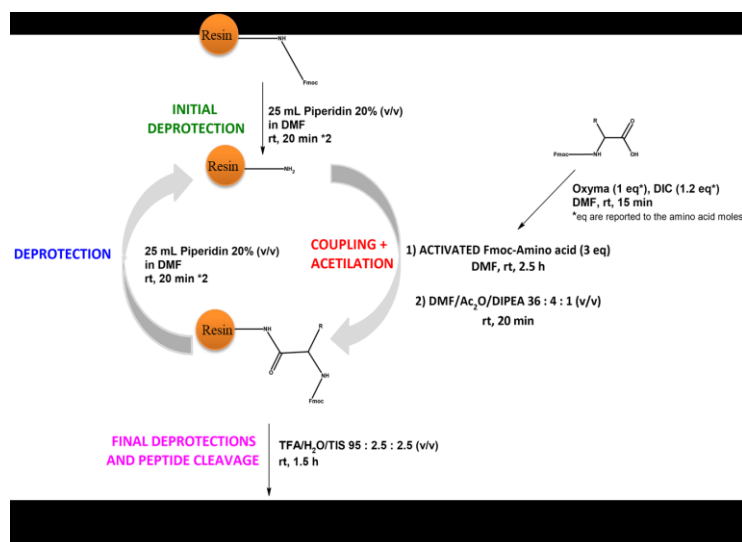
con il mix $\text{Ac}_2\text{O}/\text{DMF}/\text{DIPEA}$ (4 : 36 : 1). Questa procedura è essenziale per evitare che le eventuali ammine della resina che non hanno reagito vadano ad allungarsi con i successivi *couplings*, portando alla formazione di catene peptidiche differenti.

L'amminoacido appena introdotto viene sbloccato dal gruppo Fmoc con la stessa soluzione di piperidina impiegata nello sblocco della resina, successivamente può essere effettuato il *coupling* con il secondo amminoacido.

Il ciclo costituito da deprotezione, *coupling* e acetilazione viene quindi ripetuto fino alla sintesi completa della catena peptidica. Dopo ogni reazione vengono effettuati lavaggi con DMF e DCM per eliminare ogni traccia di reagenti rimasti in soluzione.

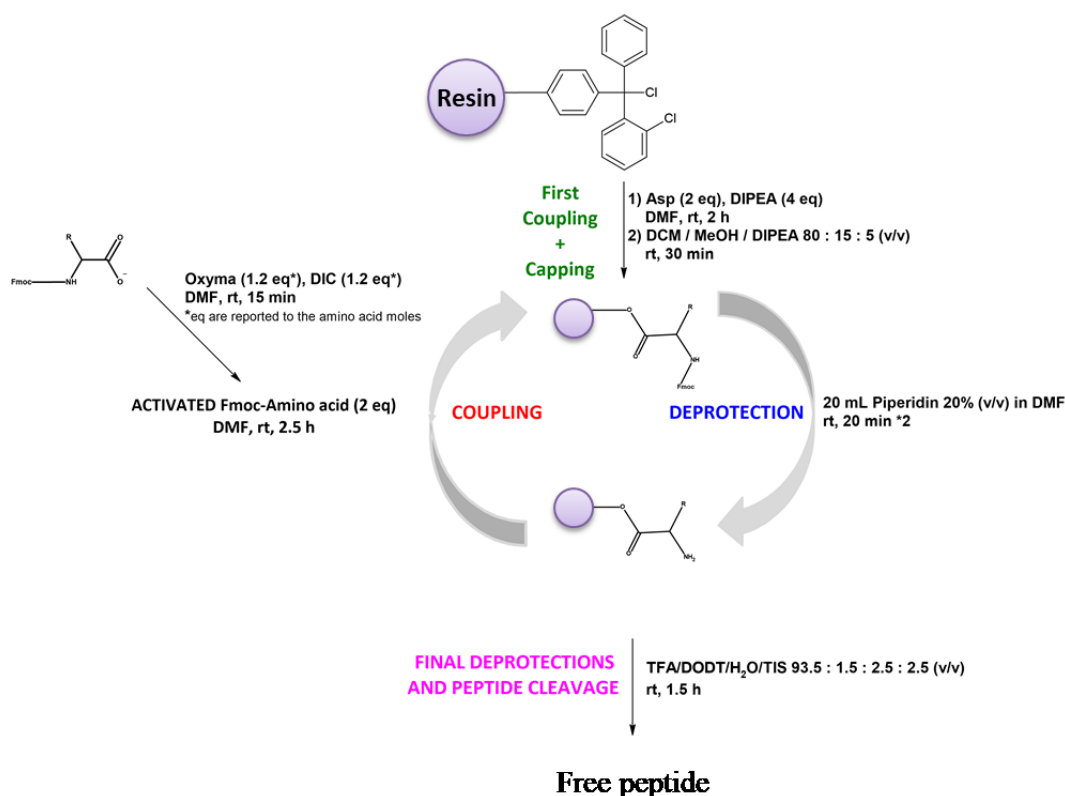
Il *coupling* finale coinvolge il Trt-*pMBA* e l'ultimo sblocco permette la rimozione di tutti i gruppi protettori (tBu, Boc e Trt) ed il distacco della catena peptidica dalla resina, lasciando un gruppo ammidico terminale. Il mix di sblocco è costituito da TFA/ H_2O /TIS (95 : 2.5 : 2.5).

Il peptide viene infine purificato mediante precipitazione e centrifugazione con dietilere in ghiaccio.



[Fig.37] Schema generale di SPPS con resina Rink Amide adottata nel presente progetto di tesi. La procedura per la sintesi dei diversi leganti differisce solamente per la tipologia di amminoacidi aggiunti in ogni ciclo di *coupling*. Per la sintesi di *pMBA*-F(NH₂)DHSL-CONH₂ gli amminoacidi sono stati introdotti nel seguente ordine: Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-His(Trt)-OH, Fmoc-Asp(tBu)-OH, Fmoc-Phe(NH-Boc)-OH ed infine l'ultima unità è data dal Trt-*pMBA*. Per la sintesi di *pMBA*-TRIADE-V-CONH₂ gli amminoacidi sono stati introdotti nel seguente ordine: Fmoc-Val-OH, Fmoc-His(Trt)-OH/Fmoc-Ser(tBu)-OH/Fmoc-Asp(tBu)-OH, ed infine Trt-*pMBA*. Per la sintesi di *pMBA*-FSHV-CONH₂ le unità introdotte sono le seguenti: Fmoc-Val-OH, Fmoc-His(Trt)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Phe-OH e Trt-*pMBA*.

Per quanto riguarda la sintesi peptidica sfruttando la resina 2-clorotritil cloruro, non è necessario lo sblocco della resina, ma il primo amminoacido può essere aggiunto direttamente al reattore in presenza di DIPEA ed avverrà una reazione di sostituzione nucleofila sul tritile. Si effettua il *capping* dei siti della resina che non hanno reagito con il mix costituito da DCM/MeOH/DIPEA (80 : 15 : 5). Dopodiché si sblocca il gruppo Fmoc con piperidina 20 % v/v in DMF e potrà poi essere aggiunto l'amminoacido successivo, precedentemente attivato con DIC e Oxyma Pure. Il ciclo costituito da deprotezione e *coupling* viene ripetuto anche per l'ultimo amminoacido da introdurre e per il Trt-*p*MBA. Infine, la catena peptidica viene deprotetta dai gruppi protettori e viene staccata dalla resina con il mix costituito da TFA/DODT/H₂O/TIS (93.5 : 1.5 : 2.5 : 2.5), lasciando un gruppo carbossilico terminale. Il peptide viene infine purificato mediante precipitazione e centrifugazione con dietilere in ghiaccio.



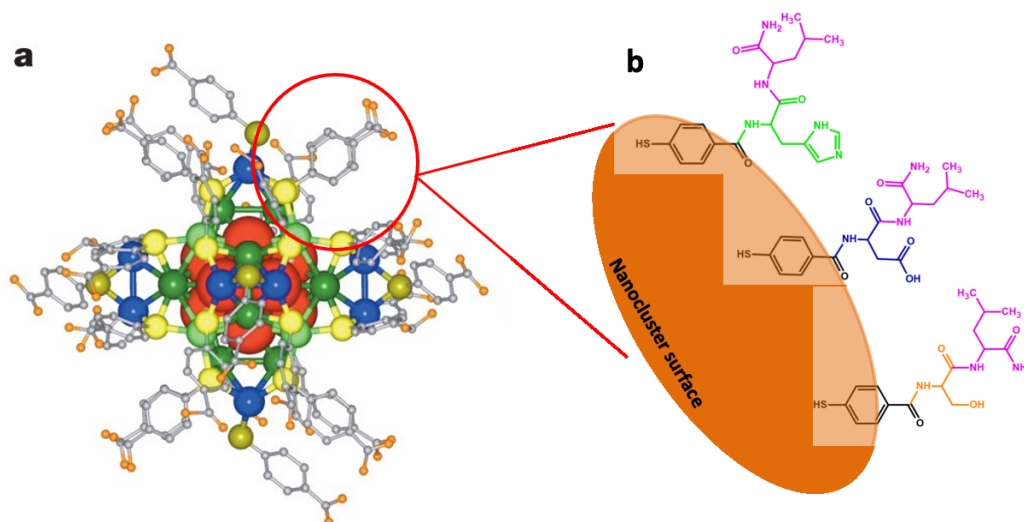
[Fig.38] Schema generale di SPPS con resina 2-clorotritil cloruro adottata nel presente progetto di tesi. Gli amminoacidi vengono introdotti nel seguente ordine: Fmoc-Asp(*t*Bu)-OH, Fmoc-His(Trt)-OH, Fmoc-Ser(*t*Bu)-OH. Infine, l'ultimo *coupling* interessa il Trt-*p*MBA.

3.5.2.2 Legante *p*MBA-TRIADE-V-CONH₂

Come anticipato più volte negli scorsi paragrafi, al fine di ottenere un sistema in grado di mimare le proprietà catalitiche del sito attivo delle esterasi è opportuno avere la presenza dei residui catalitici in una precisa disposizione spaziale, ed in un ambiente idrofobico. L'apolarità del sito attivo è necessaria affinché la pKa dei residui catalitici possa essere tale da permettere le catalisi acide e basiche, ovvero gli step fondamentali dell'idrolisi enzimatica di un estere.

Il primo legante sintetizzato, il *p*MBA-TRIADE-V-CONH₂, è in realtà un miscuglio di tre diverse molecole, che portano tutte una valina esterna per conferire un'idrofobicità locale al sistema. Su ogni singolo legante è presente solo uno dei tre residui della triade catalitica, quindi tra il *p*MBA e la valina potrà essere presente solo o un'istidina o una serina o un'aspartato [Fig.39]. Con questo mix di leganti si sintetizzano i nanoclusters, per cui si avranno sistemi diversi tra loro in cui sullo stesso nanocluster potranno essere presenti tre tipi di leganti, ma che ognuno porta con sé solo uno dei tre residui catalitici.

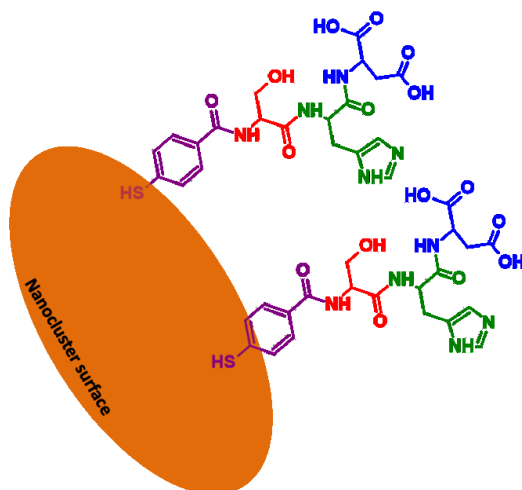
I nanoclusters di riferimento M₄Ag₄₄(*p*MBA)₃₀ si organizzano in una struttura tridimensionale in cui le molecole di legante sporgono all'esterno in gruppi di tre. Nel caso in cui la sintesi dei nanoclusters avvenisse in presenza del legante *p*MBA-TRIADE-V-CONH₂, la speranza sarebbe quella di ottenere una medesima disposizione spaziale degli atomi d'argento e del *p*MBA. In questo ipotetico caso, in modo totalmente casuale, potrebbe esserci la creazione di una struttura ternaria composta dai tre diversi leganti, ovvero *p*MBA-SV-CONH₂, *p*MBA-DV-CONH₂ e *p*MBA-HV-CONH₂. La formazione di un sito di questo genere porterebbe, presumibilmente, vicini tra loro i residui catalitici, che vengono parzialmente schermati dal solvente tramite le valine che seguono loro in sequenza, apportando un certo grado di apolarità alla tasca che si è creata. Ecco che questa situazione sembra ricordare in un certo senso, il sito attivo enzimatico delle esterasi.



[Fig.39] Rappresentazione della struttura tridimensionale del nanocluster $M_4Ag_{44}(pMBA)_{30}$ (A) e dell'ipotetica superficie del nanocluster quando la sintesi avviene in presenza del legante *pMBA-TRIAD-V-CONH₂* (B).

3.5.2.3 Legante *pMBA-SHD-OH*

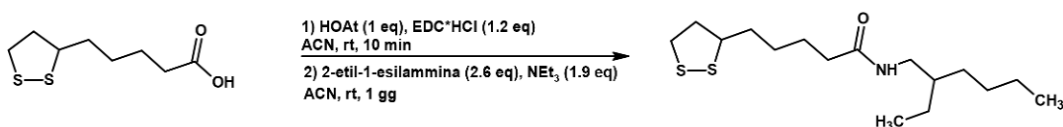
Il secondo legante ipotizzato, ovvero il *pMBA-SHD-OH*, a differenza del primo presenta tutti e tre i residui della triade catalitica sullo stesso peptide. Non viene aggiunto nessun residuo idrofobico, allo scopo di osservare come il sistema si comporta dal punto di vista catalitico anche senza la creazione di un ambiente apolare vicino al sito catalitico. Si ipotizza che le proprietà catalitiche di questo sistema non siano dovute alla cooperatività dei residui presenti sullo stesso peptide, ma molto probabilmente l'effetto sinergico comprenderà gli amminoacidi su leganti differenti, ma che si trovano spazialmente vicini sulla superficie del nanocluster [Fig.40].



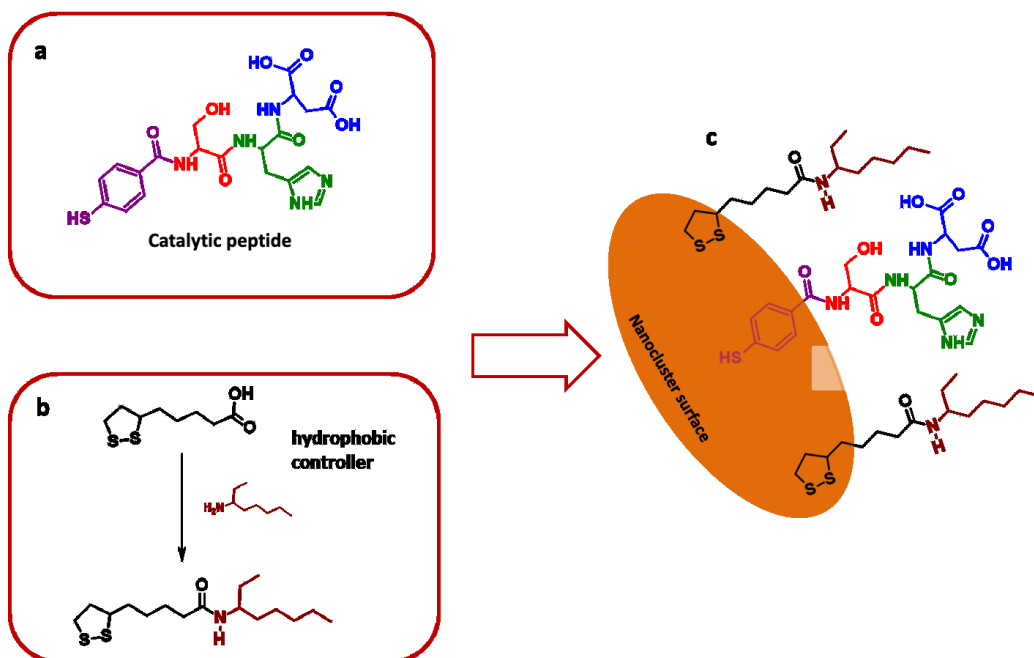
[Fig.40] Rappresentazione dell'ipotetica superficie del nanocluster quando la sua sintesi avviene in presenza del legante *pMBA-SHD-OH*.

3.5.2.4 Legante *pMBA-SHD-OH@30%LPAM*

Nel design del legante, il passo successivo è stato quello di mantenere i tre residui catalitici sullo stesso peptide, ma introducendo un carattere di apolarità al sistema. Ciò viene inizialmente inserito mediante l'aggiunta di un controllore idrofobico durante la sintesi dei nanoclusters. La molecola in questione deriva dalla funzionalizzazione dell'acido lipico con la 2-etil-1-esilammina, portando alla formazione di una struttura che ad un'estremità presenta due tioli per coordinarsi all'argento, mentre dall'altra si ha una catena alifatica, quindi apolare [Fig.41]. La sintesi dei nanoclusters avviene mescolando inizialmente il legante catalitico *pMBA-SHD-OH* con il controllore idrofobico LPAM. Si testano diversi rapporti molari tra le due molecole, e ci si accorge che a mano a mano che la percentuale di legante apolare aumenta, il sistema diventa sempre più insolubile. Di conseguenza, il rapporto ottimale individuato presenta il 30 % in moli di LPAM rispetto al *pMBA-SHD-OH* [Fig.42].



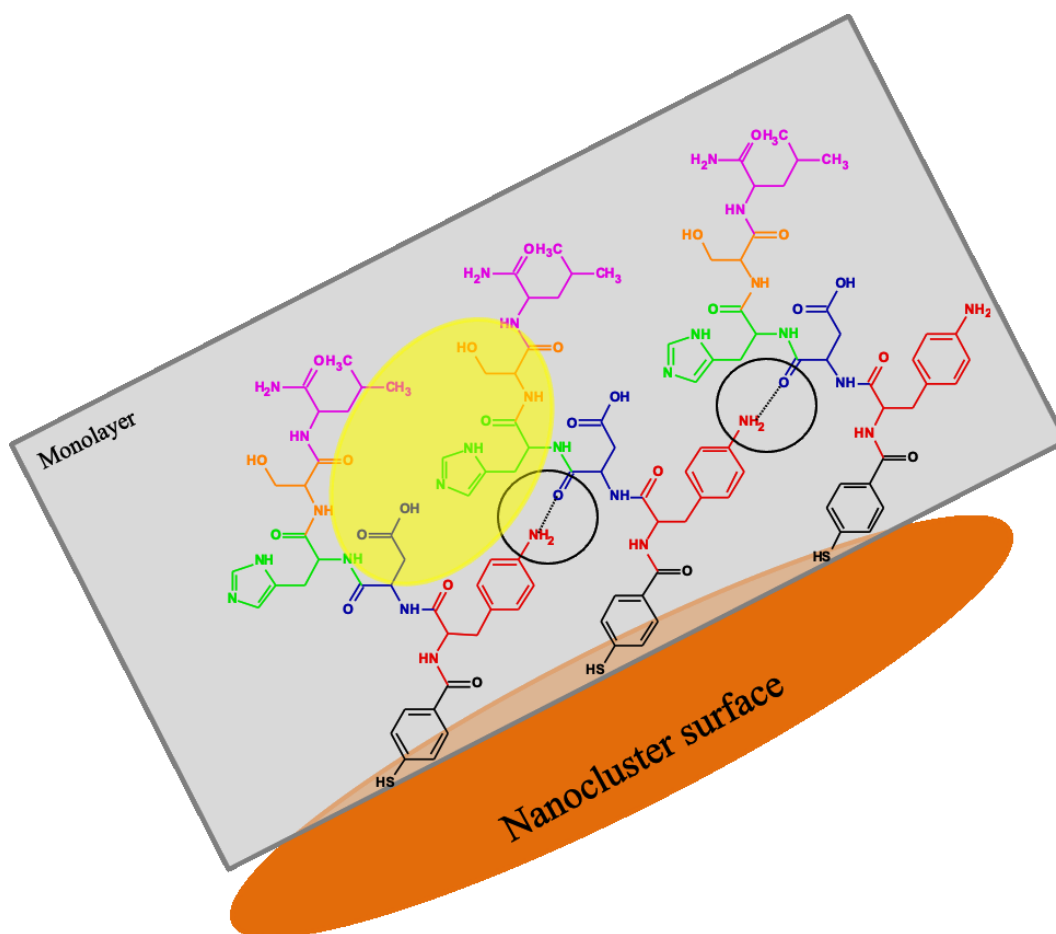
[Fig.41] Schema di reazione del *coupling* tra acido lipico e 2-etil-1-esilammina.



[Fig.42] Struttura molecolare del legante peptidico catalitico *p*MBA-SHD-OH (a), del controllore idrofobico LPAM (b) e dell'ipotetica superficie del nanocluster quando la sua sintesi avviene in presenza delle due molecole precedenti (c).

3.5.2.5 Legante *p*MBA-F(NH₂)DHSL-CONH₂

Al fine di ottenere un sistema più controllato e riproducibile, i requisiti catalitici e idrofobici sono stati introdotti in unico legante, il *p*MBA-F(NH₂)DHSL-CONH₂. Il contributo apolare viene apportato dai residui di fenilalanina e leucina, i quali si pongono ai margini dei residui catalitici, con l'obiettivo di, metaforicamente parlando, rinchiuderli all'interno di una gabbia idrofobica. La fenilalanina presenta un gruppo amminico in *para* sull'anello per favorire la formazione di legami idrogeno con i carbonili delle altre catene peptidiche, provocando l'avvicinamento di queste e quindi dei residui che compongono la triade catalica [Fig.43].



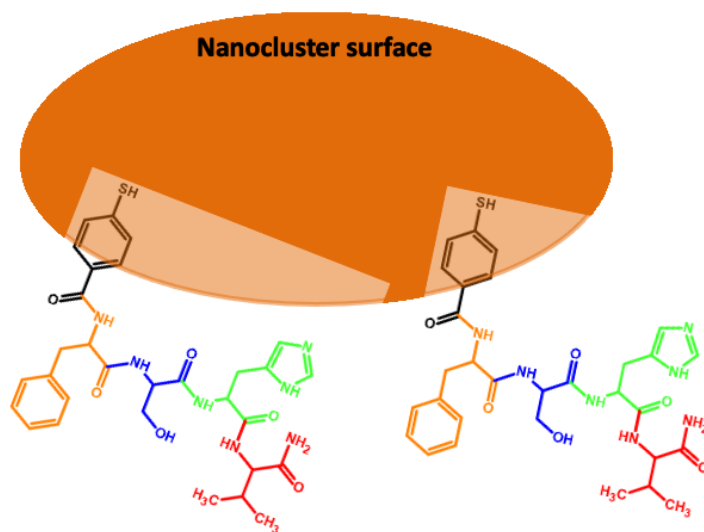
[Fig.43] Rappresentazione del legante *p*MBA-F(NH₂)DHSL-CONH₂, il quale costituisce il monolayer del nanocluster. I cerchi neri evidenziano il legame ad idrogeno che può formarsi tra l'ammina della fenilalanina ed il carbonile di una catena peptidica adiacente. In giallo è evidenziato il sito composto dai residui della triade catalitica.

3.5.2.6 Legante *p*MBA-FSHV-CONH₂

*p*MBA-FSHV-CONH₂ è un legante che presenta solo due dei residui catalitici (S e H) circondati da due residui idrofobici (F e V) [Fig.44]. Nello studio del gruppo di Li⁽⁵⁵⁾ è stato dimostrato come la sola presenza del dipeptide Ser-His sia sufficiente per avere proprietà catalitiche nei confronti dell'idrolisi del DNA e degli esteri, in particolare sul *p*NPA.

Si vuole verificare se la presenza o meno dell'aspartato abbia una reale influenza sulle proprietà catalitiche della nanoparticella. Il ruolo dell'aspartato nella catalisi enzimatica è quello di attivare mediante un legame idrogeno il residuo di istidina, che in questo modo potrà operare la catalisi basica sulla serina. La sintesi dei nanoclusters sfruttando il legante senza l'aspartato ha l'obiettivo di analizzare come varia l'efficienza catalitica del sistema, tramite il confronto con la

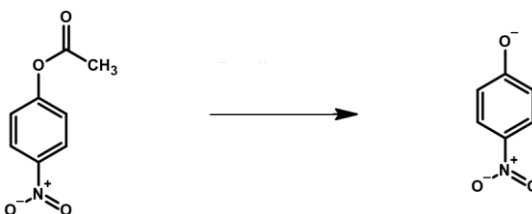
performance ottenuta con il legante *p*MBA-F(NH₂)DHSL-CONH₂, il quale presenta tutti e tre i residui della triade catalitica.



[Fig.44] Rappresentazione dell'ipotetica superficie del nanocluster quando la sua sintesi avviene in presenza del legante *p*MBA-FSHV-CONH₂.

3.6 Analisi cinetiche

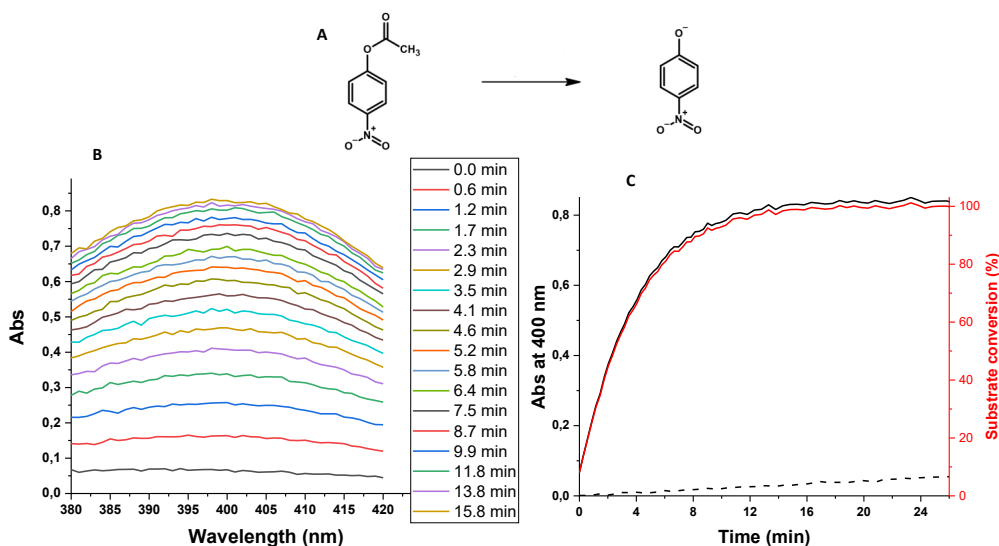
L'obiettivo di questo progetto di tesi è quello di riuscire a sintetizzare dei nanosistemi, in particolare dei nanoclusters, con proprietà catalitiche nei confronti dell'idrolisi del legame estereo. I nanoclusters nascono dalla combinazione di argento metallico e leganti peptidici. Il design del legante è stato studiato in maniera approfondita, in maniera tale creare sulla superficie del nanocluster una sorta di sito idrofobico, provando a mimare l'organizzazione della tasca catalitica enzimatica. Il raggiungimento di una conformazione stabile e ottimizzata del sito catalitico del nanocluster dovrebbe condurre all'acquisizione di una efficienza catalitica più o meno elevata, a seconda della disposizione spaziale reciproca dei residui e dell'ambiente idrofobico che verranno a crearsi sul sistema. Le proprietà catalitiche dei nanoclusters sintetizzati con le diverse molecole di legante vengono quindi analizzate sulla reazione di idrolisi del 4-nitrofenilacetato (*p*NPA) [Fig.45]. Dalla reazione si produce lo ione 4-nitrofenato, la cui formazione è facilmente seguibile andando a misurare l'assorbanza a 400 nm, cioè la lunghezza d'onda alla quale si assiste al massimo di assorbimento. Dal punto di vista sperimentale, i catalizzatori vengono sciolti in un tampone PBS a pH 7.8, al quale verrà in seguito aggiunto il substrato da idrolizzare. Appena il *p*NPA viene introdotto, si misura l'assorbanza a 400 nm, ripetendo la misura a tempi diversi in maniera costante, a mano a mano che la reazione prosegue. Se il sistema fosse veramente in grado di catalizzare la reazione si dovrebbe assistere ad un aumento dell'assorbanza a 400 nm nel tempo, nettamente distinguibile dalla semplice degradazione del substrato nel tampone di analisi.



[Fig.45] Schema di reazione dell'idrolisi del 4-nitrofenilacetato.

3.6.1 Cinetica di riferimento – Catalisi enzimatica

In questo progetto si aspira a sintetizzare dei sistemi catalitici ad immagine e somiglianza degli enzimi, ovvero macromolecole biologiche che l'evoluzione ha selezionato appositamente per la loro capacità nel catalizzare determinate reazioni chimiche. Per attribuire un valore significativo alle proprietà catalitiche dei nanoclusters che verranno analizzati, risulta necessario avere un riferimento, quindi un modello cinetico basato sulla performance di un enzima. L'esterasi di *Pseudomonas fluorescens* ricombinante in *Escherichia coli* è il nostro riferimento e la sua efficienza catalitica è stata analizzata sulla reazione di idrolisi del pNPA [Fig.46].



[Fig.46] Reazione di idrolisi da catalizzare (A), evoluzione dello spettro di assorbimento della reazione catalizzata dall'esterasi nel tempo, misurato tra i 380 ed i 420 nm (B), evoluzione dell'assorbanza a 400 nm (in nero, reazione catalizzata dall'esterasi), della conversione di substrato (in rosso, reazione catalizzata dall'esterasi) e dell'assorbanza a 400 nm (in nero tratteggiato, reazione non catalizzata) nel tempo (C).

Il grafico [Fig.46(B)] mostra come varia lo spettro di assorbimento della reazione tra i 380 ed i 420 nm, quando questa è catalizzata dall'esterasi. Si nota come nei primi 8 minuti l'assorbanza aumenti molto velocemente, mentre verso la fine dell'esperimento l'assorbanza aumenta più lentamente fino a rimanere ad un valore costante intorno ad $abs = 0.84$. Nel grafico [Fig.46(C)] questo concetto è ancora meglio visibile: dopo circa 15 minuti di reazione, l'assorbanza arriva a *plateau*, il che significa che tutto il substrato è stato idrolizzato, infatti la

conversione di *p*NPA dopo i primi 15 minuti è già al 98 %. Sempre nel secondo grafico si può notare come la velocità di idrolisi sia ampiamente maggiore quando la reazione è catalizzata dall'enzima piuttosto che nel caso in cui questa non venga catalizzata (in questo caso l'assorbanza che aumenta è esclusivamente data dalla degradazione del substrato nel tampone di analisi). Dopo 18 minuti l'enzima ha raggiunto una conversione del 100 %, mentre nel medesimo intervallo di tempo, il substrato si è degradato solo al 5 %, circa, nel tampone.

Questi sono grafici di riferimento, che verranno utilizzati per il confronto con le proprietà catalitiche dei nanoclusters sintetizzati. Ci si aspetta che la loro performance sia ovviamente più bassa di quella enzimatica, ma ci si augura che questa sia maggiore rispetto alla semplice degradazione nel buffer di analisi.

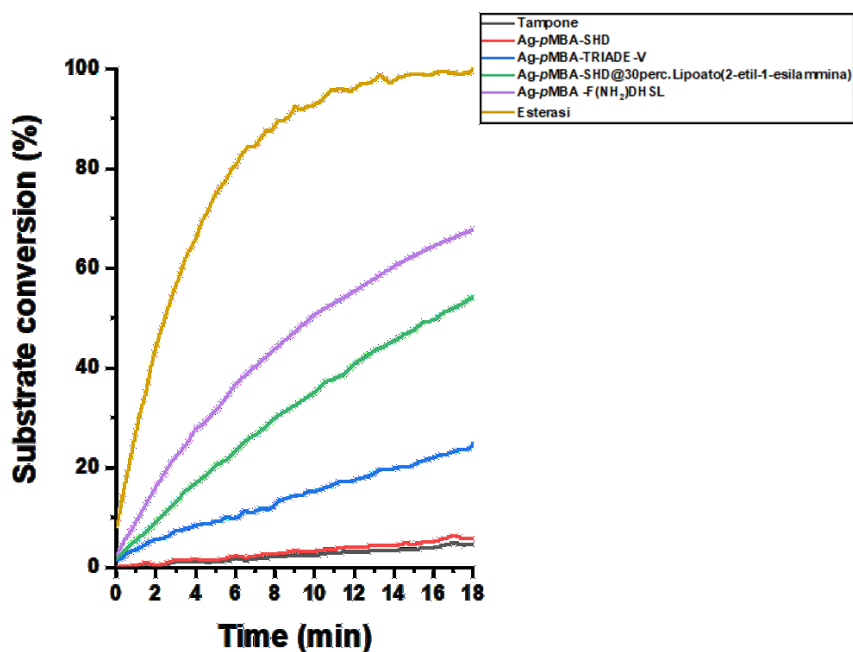
3.6.2 Analisi cinetica della catalisi operata da nanoclusters

I nanoclusters sintetizzati sfruttando i leganti peptidici annunciati nel capitolo 3.5.2, sono stati testati come catalizzatori nella reazione di idrolisi del *p*NPA. Purtroppo il nanocluster Ag:*p*MBA-FSHV-CONH₂ non è stato possibile analizzarlo a causa della sua totale insolubilità nel tampone di analisi. Le cinetiche dei nanoclusters sono state confrontate tra di loro e con un controllo positivo dato dalla catalisi enzimatica ad opera dell'esterasi di *P. fluorescens* ed un controllo negativo rappresentato dalla reazione condotta nel tampone di analisi con l'assenza di catalizzatori.

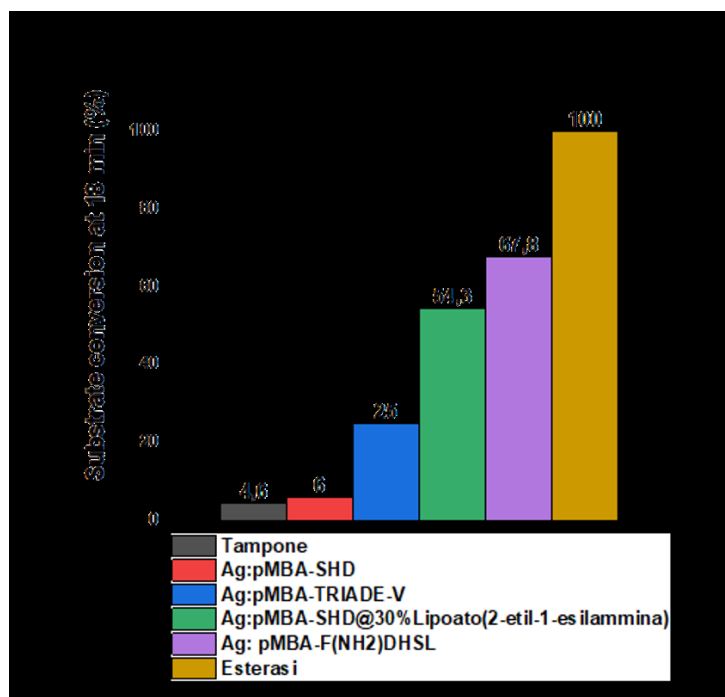
In [Fig.47] viene riportato il confronto tra le efficienze catalitiche dei vari sistemi, in cui si analizza come varia la conversione del substrato nel tempo di reazione. I nanoclusters Ag:*p*MBA-SHD-OH sono quelli che presentano la cinetica più sfavorevole, infatti questa è di poco superiore alla degradazione del substrato che normalmente avverrebbe nel solo buffer di reazione. Con cinetiche via via maggiori si presentano i nanoclusters Ag:*p*MBA-TRIADE-V-CONH₂ ed i Ag:*p*MBA-SHD-OH@30%LPAM. Il sistema più promettente sembra quindi

essere quello costituito dal nanocluster $\text{Ag:pMBA-F(NH}_2\text{)-DHSL-CONH}_2$, il quale, tra tutti i sistemi ideati, è quello che più si avvicina alle prestazioni dell'esterasi.

Quantitativamente, l'efficienza nel catalizzare l'idrolisi del substrato può essere osservata in [Fig.48], in cui viene riportata la conversione del *p*NPA dopo 18 minuti di reazione. Il valore basale è dato dalla degradazione nel tampone, che dopo il tempo limite fissato risulta essere il 4.6 %. Rispetto alla prestazione enzimatica, il nanocluster con il controllore idrofobico presenta circa la metà della conversione, mentre il nanocluster $\text{Ag:pMBA-F(NH}_2\text{)-DHSL-CONH}_2$ raggiunge circa il 70 %.



[Fig.47] Confronto delle prestazioni catalitiche dei catalizzatori composti da argento e leganti peptidici, mediante la comparazione della conversione di *p*NPA nel tempo. Le misure sono state effettuate utilizzando i catalizzatori in concentrazione 0.2 mg/mL, mentre il *p*NPA è presente in concentrazione 44 μM . Per ogni reazione viene registrato uno spettro di assorbimento tra i 380 ed i 420 nm ogni 30 secondi. Il valore a 400 nm per ogni tempo registrato viene quindi trasformato in percentuale di conversione, ottenendo così il grafico in figura.



[Fig.48] Confronto delle prestazioni catalitiche dei catalizzatori composti da argento e leganti peptidici, mediante la comparazione della conversione di *p*NPA dopo 18 minuti di reazione.

Per ottenere un altro dato quantitativo, il primo tratto lineare delle curve di conversione di substrato nel tempo è stato approssimato con una retta, la cui pendenza è indice della velocità iniziale di idrolisi del substrato. I valori sono riportati in [Tab.1]. Il coefficiente R^2 è un valore che indica quanto l'approssimazione lineare è fedele alla curva di partenza che è stata approssimata. Il massimo valore di R^2 è 1, indicando una perfetta approssimazione lineare, e nel nostro caso questo coefficiente è maggiore di 0.8 per ogni approssimazione, in particolare, quando la catalisi è operata dai nanoclusters più promettenti, il valore sale al di sopra di 0.99. Ciò ci permette di operare dei confronti dotati di significatività.

La velocità di catalisi operata dal nanocluster Ag:*p*MBA-F(NH₂)-DHSL-CONH₂, che è quello più interessante, è circa un terzo rispetto a quella dell'enzima, il quale rappresenta l'obiettivo da raggiungere. Per tutti gli altri nanoclusters la velocità di idrolisi è molto minore rispetto a quella enzimatica, che raggiunge al massimo 3/4 della velocità del nanocluster Ag:*p*MBA-F(NH₂)-DHSL-CONH₂.

Catalizzatore	Pendenza	R ²
Tampone	0.299	0.829
Ag:pMBA-SHD	0.389	0.829
Ag:pMBA-TRIADE-V	1.719	0.984
Ag:pMBA-SHD@30%L2E1E	3.851	0.999
Ag:pMBA-F(NH ₂)DHSL	6.311	0.997
Esterasi	18.000	0.998

[Tab.1] Confronto della pendenza della curva di conversione del substrato nel tempo, nel tratto lineare che va dai 0 ai 2 minuti. Il dato viene ricavato mediante l'operazione di *fitting* del software *Origin*.

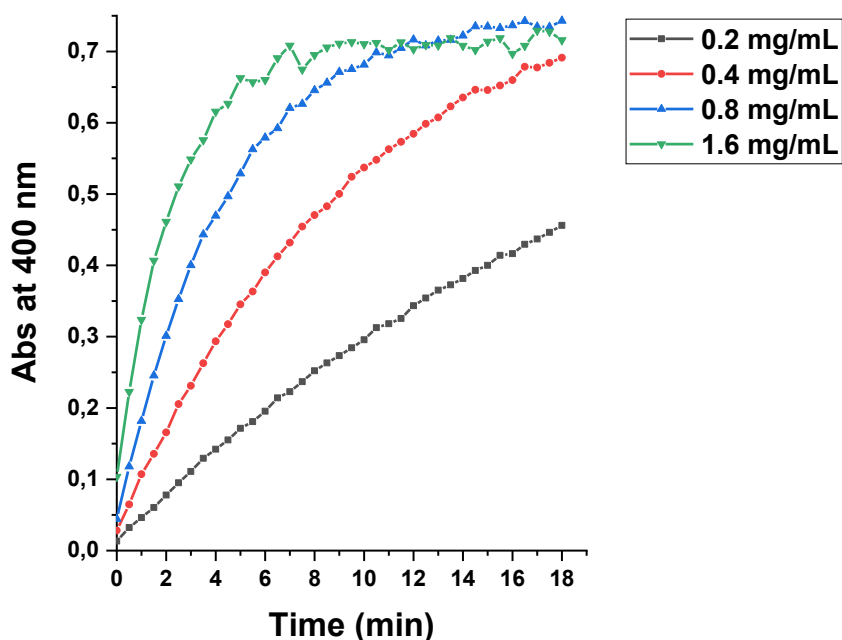
3.6.3 Valutazione dell'effetto cooperativo del nanocluster Ag:pMBA-SHD-OH@30%LPAM

La cooperatività è uno degli elementi che può caratterizzare la catalisi enzimatica. In natura, a volte, il precedente legame dell'enzima con una determinata molecola può influenzare in maniera positiva o negativa la costante di *binding* con il suo substrato. Nel caso positivo, la formazione dei legami precedenti porta a piccoli cambiamenti conformazionali della proteina, traducendosi nella formazione di un sito attivo molto più ottimizzato per il substrato. In questo modo aumenta la costante di *binding*, quindi l'enzima potrà lavorare più velocemente, poiché lega il substrato in maniera più rapida.

Nel contesto di questo progetto, la cooperatività vuole essere identificata andando ad analizzare come varia la velocità di conversione del *pNPA* quando la concentrazione del catalizzatore viene aumentata progressivamente. L'analisi vede come protagonista il nanocluster Ag:pMBA-SHD-OH@30%LPAM e si presuppone che l'aumento della sua concentrazione catalitica all'interno della reazione possa portare ad aumento della velocità di conversione. L'ipotesi si basa sulla possibile formazione di più siti catalitici sulla superficie del nanocluster quando la concentrazione aumenta, sfruttando in parte un effetto di aggregazione. Le catene alifatiche dei controllori idrofobici di diversi nanosistemi potrebbero interagire tra loro mediante interazione idrofobica, portando quindi

all'agglomerazione dei nanoclusters, in maniera direttamente proporzionale alla concentrazione di catalizzatore in soluzione. L'aggregazione spesso è un aspetto che si vuole evitare, ma in questo caso, l'avvicinamento dei vari sistemi potrebbe creare un ambiente ancora più idrofobico tra di essi, facilitando quindi il legame del substrato e l'aumento delle pKa dei residui catalitici. Nell'insieme ciò potrebbe portare ad un aumento della velocità di reazione dal punto di vista cooperativo, cioè, se la concentrazione di catalizzatore dovesse raddoppiare, ci si aspetterebbe un aumento della velocità, ma in maniera maggiore rispetto al doppio della velocità iniziale.

Dal punto di vista sperimentale, il nanocluster viene utilizzato come catalizzatore in concentrazione 0.2 mg/mL, 0.4 mg/mL, 0.8 mg/mL e 1.6 mg/mL, quindi si raddoppia la concentrazione ad ogni step. Le curve di assorbanza a 400 nm nel tempo vengono riportate in [Fig.49], e la pendenza del tratto iniziale che va da 0 a 2 minuti viene riportata in [Tab.2].



[Fig.49] Comparazione cinetica della catalisi operata dal nanocluster Ag:pMBA-SHD-OH@30%LPAM a diverse concentrazioni del catalizzatore. Per ogni reazione viene registrato uno spettro di assorbimento tra i 380 ed i 420 nm ogni 30 secondi. Il grafico mostra l'andamento dell'assorbanza a 400 nm con il proseguire della reazione. Il substrato è presente in soluzione in concentrazione 39 μ M.

Concentrazione	Pendenza	R ²
0.2 mg/mL	0.031	0.997
0.4 mg/mL	0.069	0.994
0.8 mg/mL	0.128	0.998
1.6 mg/mL	0.180	0.981

[Tab.2] | Confronto della pendenza della curva di assorbanza a 400 nm nel tempo, nel tratto lineare che va dai 0 ai 2 minuti. Il dato viene ricavato mediante l'operazione di *fitting* del software *Origin*.

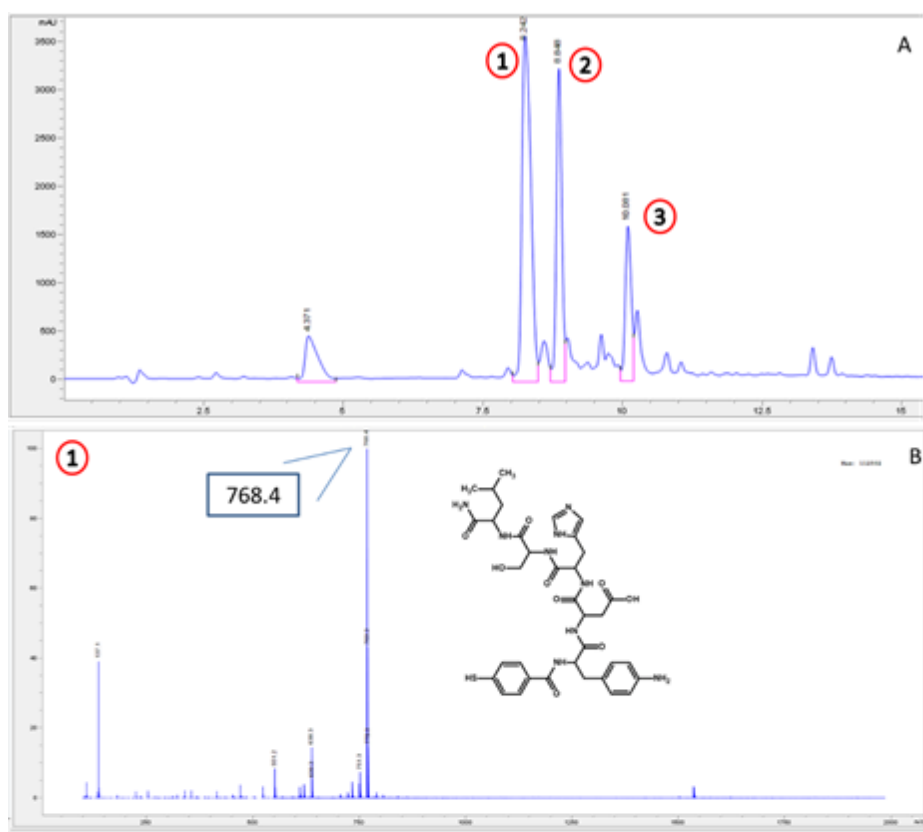
I valori di R² sono tutti maggiori allo 0.99, quindi si può considerare un'ottima approssimazione lineare del primo tratto delle curve. Le velocità di idrolisi iniziali di ogni campione, associabili alla pendenza della retta calcolata, non sembrano mostrare alcuna presenza di un effetto cooperativo. Quando la concentrazione di catalizzatore raddoppia, anche la velocità di idrolisi raddoppia, senza mostrare nessun significativo incremento di velocità eventualmente apportato dalla cooperatività. Anzi, quando la concentrazione viene raddoppiata da 0.8 a 1.6 mg/mL ci si aspetterebbe di ottenere una pendenza di circa 0.25, ma il valore misurato è solamente 0.18. Contrariamente alle previsioni, l'aumento eccessivo della concentrazione potrebbe influenzare negativamente la velocità di idrolisi, a causa magari di un'aggregazione sostanziale dei nanosistemi. L'agglomerazione potrebbe essere così elevata da rendere più difficoltoso l'alloggiamento del substrato nel sito catalitico. È plausibile che nel sistema che viene a formarsi, i siti catalitici sull'esterno dell'agglomerato rimangano attivi, mentre quelli sempre più interni potrebbero risultare inattivi a causa del mancato legame con il *pNPA*.

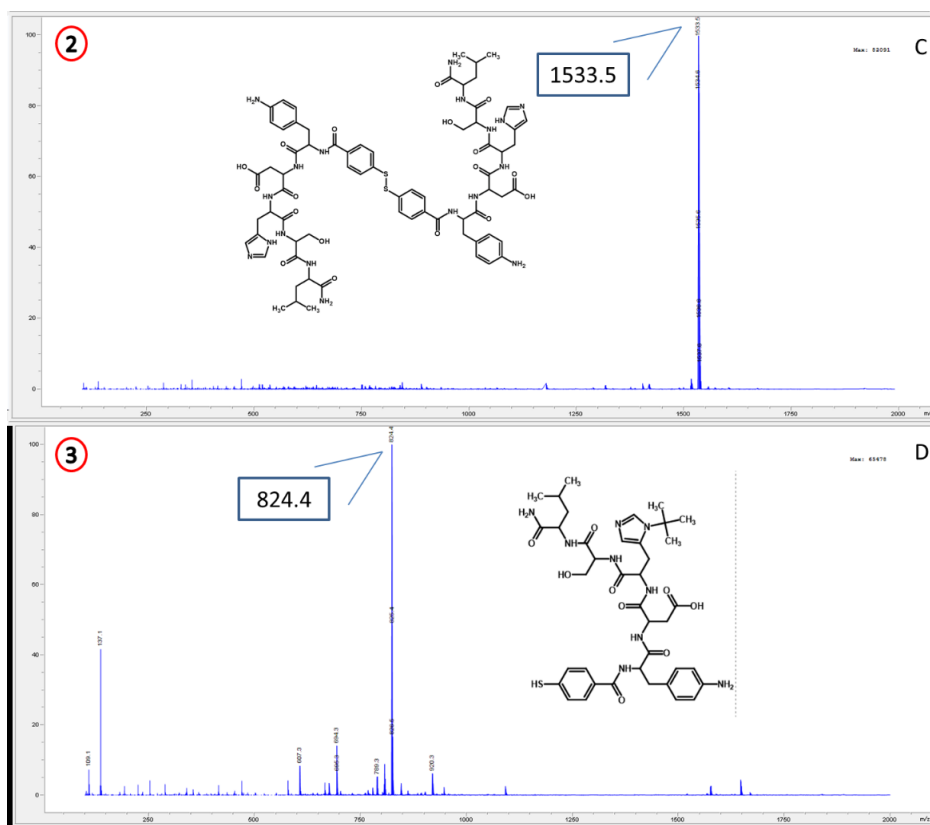
3.7 Caratterizzazione dei leganti peptidici catalitici

3.7.1 Legante $p\text{MBA-F(NH}_2\text{)DHSL-CONH}_2$

Analisi HPLC-MASSA

La purezza del legante è stata inizialmente valutata analizzando il cromatogramma ottenuto all'HPLC [Fig.50]. Questo presenta tre picchi principali, che tramite analisi di HPLC-MASSA sono stati facilmente ricondotti a tre molecole differenti. Il picco a 8.24 rappresenta il legante corretto, ovvero $p\text{MBA-F(NH}_2\text{)DHSL-CONH}_2$, il picco a 8.85 è dato dalla dimerizzazione del legante per formazione del ponte disolfuro tra le due unità di $p\text{MBA}$, ed infine il picco a 10.08 corrisponde al legante $p\text{MBA-F(NH}_2\text{)DHSL-CONH}_2$ in cui l'istidina è stata *ter*-butilata.





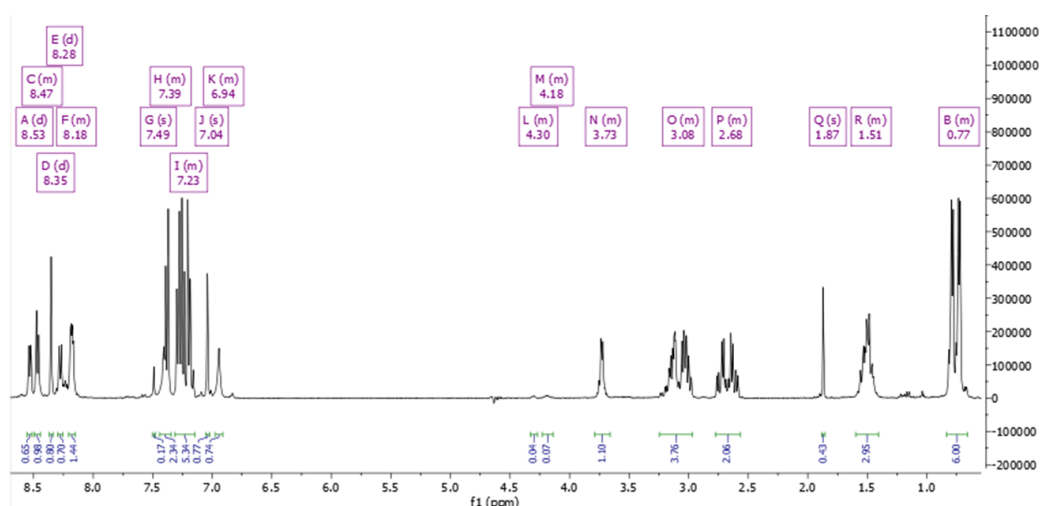
[Fig.50] Cromatogramma HPLC del solido ottenuto dalla sintesi del legante *p*MBA-F(NH₂)DHSL-CONH₂ in cui sono presenti tre picchi principali (A) e spettri di massa del picco a 8.24 (B), del picco a 8.85 (C) e di quello a 10.08 (D). Il primo composto (picco a 8.24) ha uno spettro di massa in cui la riga più intensa corrisponde a $m/z = 768.4$, valore molto simile alla MM del *p*MBA-F(NH₂)DHSL-CONH₂ (767.9 g/mol). Nello spettro di massa del secondo composto la riga più intensa cade ad un valore $m/z = 1533.5$, valore simile alla MM del dimero H₂NCO-LSHDF(NH₂)-*p*MBA-S-S-*p*MBA-F(NH₂)DHSL-CONH₂ (1533.7 g/mol). Il terzo composto è caratterizzato da uno spettro di massa in cui la riga più intensa si trova a $m/z = 824.4$, quindi simile alla MM del monomero *p*MBA-F(NH₂)DHSL-CONH₂ in cui l'istidina è alchilata (824.0 g/mol).

La *ter*-butilazione purtroppo può avvenire durante la fase di deprotezione totale e sblocco dalla resina, in cui seppur avendo utilizzato TIS come *scavenger* in eccesso, alcuni carbocationi *ter*-butilici potrebbero aver subito l'attacco nucleofilo da parte dell'istidina presente sul legante. Il legame che si forma è molto stabile, perciò la soluzione finale sarà contaminata da questo composto, che va ad influire negativamente sulle possibili proprietà catalitiche del peptide. Entrambi gli azoti dell'istidina sono importanti per il meccanismo catalitico che si vuole ricercare, poiché uno è coinvolto nella formazione del legame idrogeno dell'aspartato, aumentando in questo modo la nucleofilicità del secondo azoto che può deprotonare la serina. Se il primo azoto viene alchilato, molto probabilmente il secondo non sarà abbastanza nucleofilo per operare la catalisi.

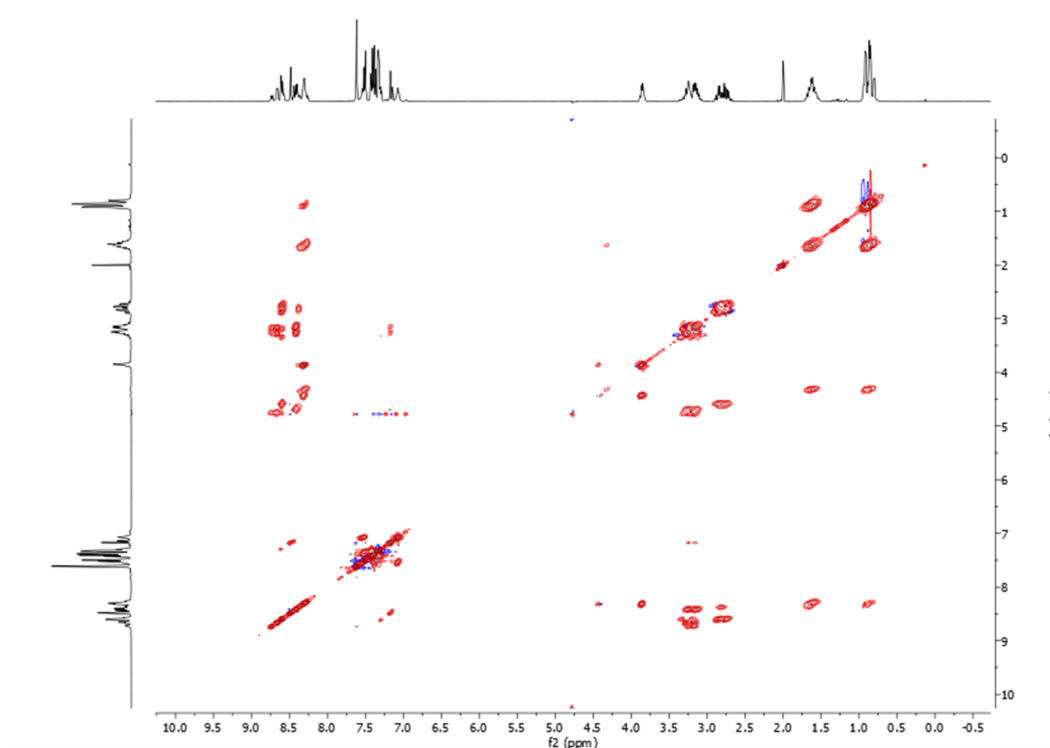
La dimerizzazione del legante invece non rappresenta un problema rilevante nella sintesi dei nanoclusters, poiché il ponte disolfuro verrà ridotto durante l'aggiunta del NaBH₄.

Analisi NMR

Il legante *p*MBA-F(NH₂)DHSL-CONH₂ viene caratterizzato ulteriormente con la spettroscopia NMR. In [Fig.51] è riportato lo spettro ¹H-NMR, in cui l'assegnamento manuale dei picchi è stato facilitato dall'analisi dello spettro bidimensionale ¹H-¹H-TOCSY [Fig.52]. Il segnale degli idrogeni α o non si vede o si vede lievemente, a causa della soppressione del segnale che è necessario effettuare quando si eseguono le misure NMR in D₂O. L'assegnazione dei segnali è resa difficoltosa dalla loro sovrapposizione, inoltre, anche il valore delle aree dei picchi, che è correlato al numero di protoni che li generano, non è preciso e non corrisponde esattamente al valore atteso per la determinata molecola in esame. Molto probabilmente è presente qualche traccia di impurezze e solvente che falsano il valore dell'area di ciascun picco. Nonostante questo, la maggior parte dei segnali sono stati attribuiti e si riescono a scorgere i segnali caratteristici di ogni amminoacido impiegato nella sintesi del legante, per cui, con un certo grado di confidenza, si può essere sicuri di avere tra le mani il peptide corretto.



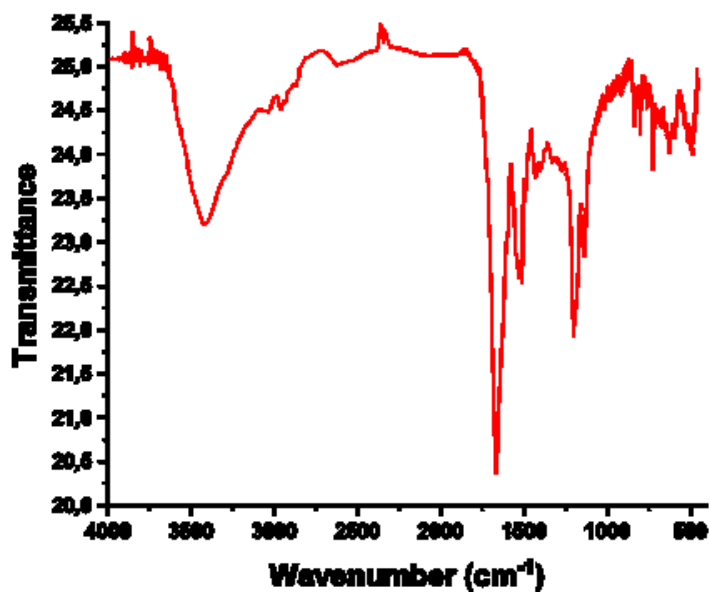
[Fig.51] Spettro ¹H-NMR (400 MHz, H₂O + 10 % v/v D₂O) del legante *p*MBA-F(NH₂)DHSL-CONH₂. δ 8.53 (d, J = 6.6 Hz, His-H^N), 8.49 – 8.44 (m, Asp-H^N), 8.35 (d, J = 1.4 Hz, His-H^{aromatico}), 8.28 (d, J = 7.5 Hz, Phe-H^N), 8.21 – 8.15 (m, Leu-H^N + Ser-H^N), 7.49 (s, probabile impurezza), 7.44 – 7.35 (m, Leu-H^{ammidico} + *p*MBA/Phe-H^{aromatici}), 7.31 – 7.15 (m, *p*MBA/Phe-H^{aromatici}), 7.04 (s, His-H^{aromatico}), 6.97 – 6.92 (m, Leu-H^{ammidico}), 4.33 – 4.27 (m, Ser-H^α), 4.24 – 4.14 (m, Leu-H^α), 3.79 – 3.66 (m, Ser-H^β), 3.24 – 2.97 (m, Phe-H^β + His-H^β), 2.78 – 2.57 (m, Asp-H^β), 1.87 (s, Phe-H^{ammidico}), 1.59 – 1.41 (m, Leu-H^β + Leu-H^γ), 0.84 – 0.66 (m, Leu-H^δ).



[Fig.52] Spettro ^1H - ^1H -TOCSY (400 MHz, $\text{H}_2\text{O} + 10\% \text{ v/v D}_2\text{O}$) del legante $p\text{MBA-F(NH}_2\text{)DHSL-CONH}_2$.

Analisi IR

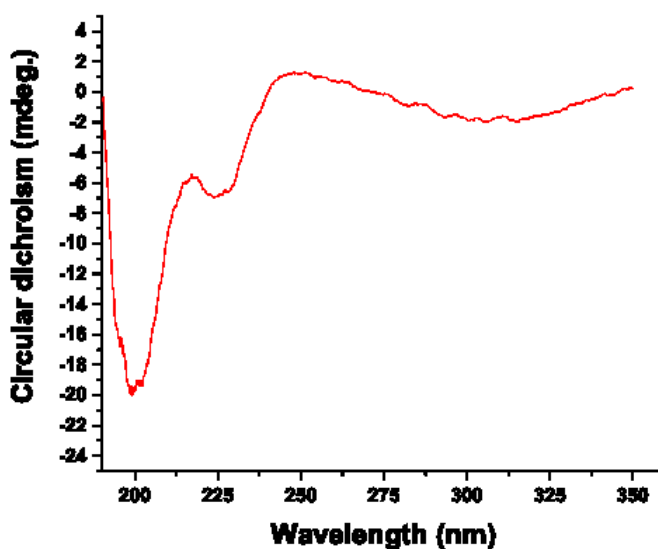
Nello spettro FT-IR del legante $p\text{MBA-F(NH}_2\text{)DHSL-CONH}_2$ sono visibili alcune bande ben definite, attribuibili a determinati gruppi funzionali [Fig.53]. Nel picco largo a circa 3420 cm^{-1} cadono gli stretching N-H (presumibilmente della fenilalanina) e gli stretching O-H, associabili al gruppo alcolico della serina e al gruppo alcolico dell'acido carbossilico dell'aspartico, con l'eventuale presenza di H_2O . A circa 2900 cm^{-1} si notano piccoli segnali attribuibili allo stretching C-H degli alcani. A 1660 cm^{-1} cadono gli stretching C=O dei carbonili e purtroppo nello spettro non si riescono a distinguere quelli ammidici da quelli dell'acido carbossilico dell'aspartico.



[Fig.53] Spettro FT-IR del legante *pMBA-F(NH₂)DHSL-CONH₂*.

Analisi al dicroismo circolare

Lo spettro di dicroismo circolare del legante *pMBA-F(NH₂)DHSL* mostra tre assorbimenti negativi a 200 nm, a 225 nm ed una banda più debole e larga a circa 310 nm [Fig.54]. La banda a 200 nm si può attribuire alla transizione $\pi \rightarrow \pi^*$ del legame peptidico, mentre quella a 225 nm è associabile alla transizione $n \rightarrow \pi^*$ sempre del legame peptidico.

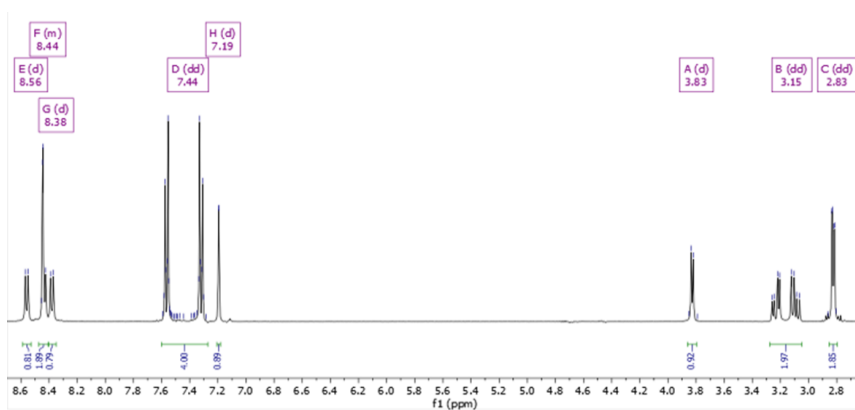


[Fig.54] Spettro di dicroismo circolare del legante *pMBA-F(NH₂)DHSL-CONH₂*.

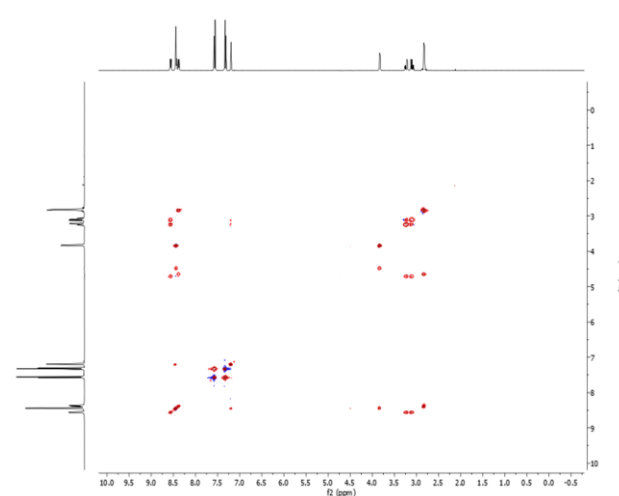
3.7.2 Legante *p*MBA-SHD-OH

Analisi NMR

Il legante *p*MBA-SHD-OH viene caratterizzato con la spettroscopia NMR. In [Fig.55] è riportato lo spettro ^1H -NMR, in cui l'assegnamento manuale dei picchi è stato facilitato dall'analisi dello spettro bidimensionale ^1H - ^1H -TOCSY [Fig.56]. Il segnale degli idrogeni α o non si vede o si vede lievemente, a causa della soppressione del segnale che è necessario effettuare quando si eseguono le misure NMR in D_2O . Si riescono a scorgere molto bene i segnali caratteristici di ogni amminoacido impiegato nella sintesi del legante, per cui, con un certo grado di confidenza, si può essere sicuri di avere tra le mani il peptide corretto.



[Fig.55] ^1H NMR (400 MHz, $\text{H}_2\text{O} + 10\% \text{ v/v } \text{D}_2\text{O}$) del legante *p*MBA-SHD-OH. δ 8.56 (d, $J = 7.9$ Hz, His- H^{N}), 8.47 – 8.41 (m, Ser- H^{N} + His- $\text{H}^{\text{aromatico}}$), 8.38 (d, $J = 8.0$ Hz, Asp- H^{N}), 7.44 (dd, *p*MBA- $\text{H}^{\text{aromatico}}$), 7.19 (d, $J = 1.4$ Hz, His- $\text{H}^{\text{aromatico}}$), 3.83 (d, $J = 5.8$ Hz, Ser- H^{β}), 3.15 (dd, His- H^{β}), 2.83 (dd, $J = 6.0, 2.0$ Hz, Asp- H^{β}).



[Fig.56] Spettro ^1H - ^1H -TOCSY (400 MHz, $\text{H}_2\text{O} + 10\% \text{ v/v } \text{D}_2\text{O}$) del legante *p*MBA-SHD-OH.

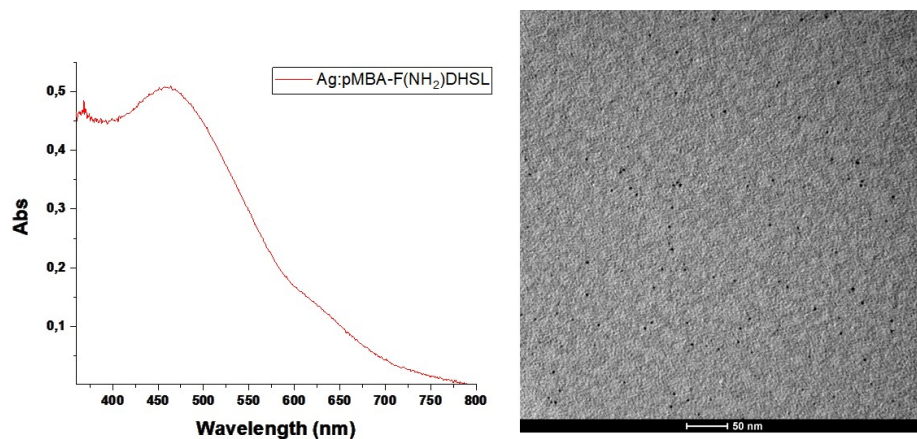
3.8 Caratterizzazione dei nanoclusters sintetizzati con leganti peptidici catalitici

3.8.1 Ag:pMBA-F(NH₂)DHSL-CONH₂

Si sfrutta *p*MBA-F(NH₂)DHSL-CONH₂ come legante nella sintesi dei nanoclusters secondo la procedura descritta dal gruppo di Desireddy⁽³³⁾, con piccole variazioni riguardo concentrazioni e volumi. Al termine del processo di riduzione si ottiene una soluzione di colore marrone scuro, che viene precipitata in ACN per eliminare i reagenti rimasti in soluzione. Una volta precipitati, i nanoclusters rimangono perfettamente stabili e solubili in H₂O, dopodiché vengono ulteriormente purificati mediante gel filtrazione in colonna utilizzando SephadexG-50 come fase stazionaria. Le frazioni che si ottengono vengono inizialmente caratterizzate con spettroscopia di assorbimento UV-VIS.

Analisi di assorbimento UV-VIS e TEM

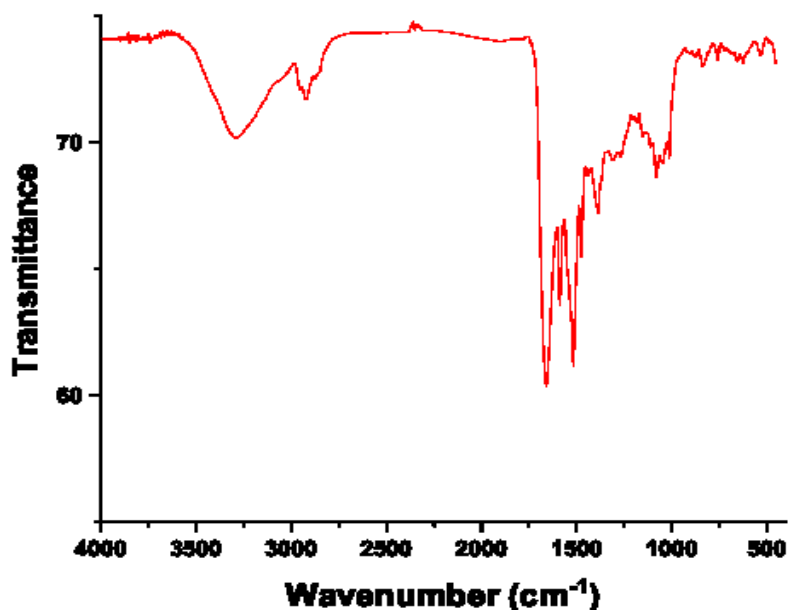
Le frazioni che si ottengono presentano tutte il medesimo spettro di assorbimento [Fig.57], caratterizzato da una banda plasmonica centrata a circa 460 nm. Si riesce a scorgere anche una lieve banda a circa 635 nm. L'assorbimento plasmonico porta a pensare di essere in presenza di nanosistemi di dimensioni maggiori rispetto a quelle dei nanoclusters, infatti dalle immagini ricavate al TEM [Fig.] si nota come le nanoparticelle abbiano una forma rotondeggiante con un diametro di circa 5 nm.



[Fig.57] Spettro di assorbimento UV-VIS del nanocluster Ag:pMBA-F(NH₂)DHSL-CONH₂.

Analisi IR

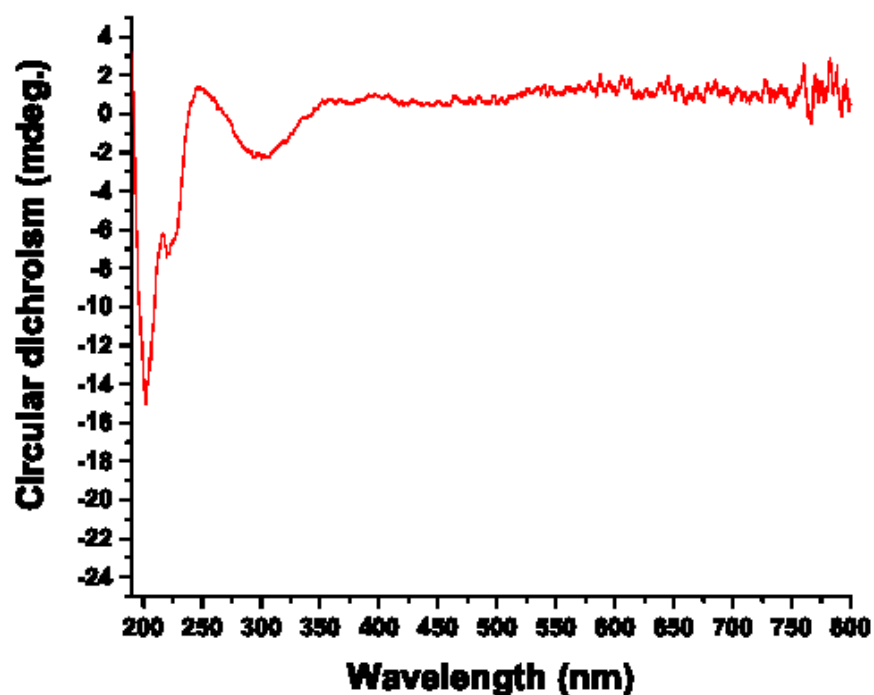
Nello spettro FT-IR del nanocluster Ag:pMBA-F(NH₂)DHSL-CONH₂ si riescono a distinguere i picchi attribuibili allo stretching O-H ed N-H (a circa 3400 cm⁻¹), allo stretching C-H delle porzioni alifatiche (a circa 2900 cm⁻¹) ed allo stretching del carbonile C=O delle ammidi e dell'aspartico (a circa 1600 cm⁻¹) [Fig.58].



[Fig.58] Spettro FT-IR del nanocluster Ag:pMBA-F(NH₂)DHSL-CONH₂.

Analisi al dicroismo circolare

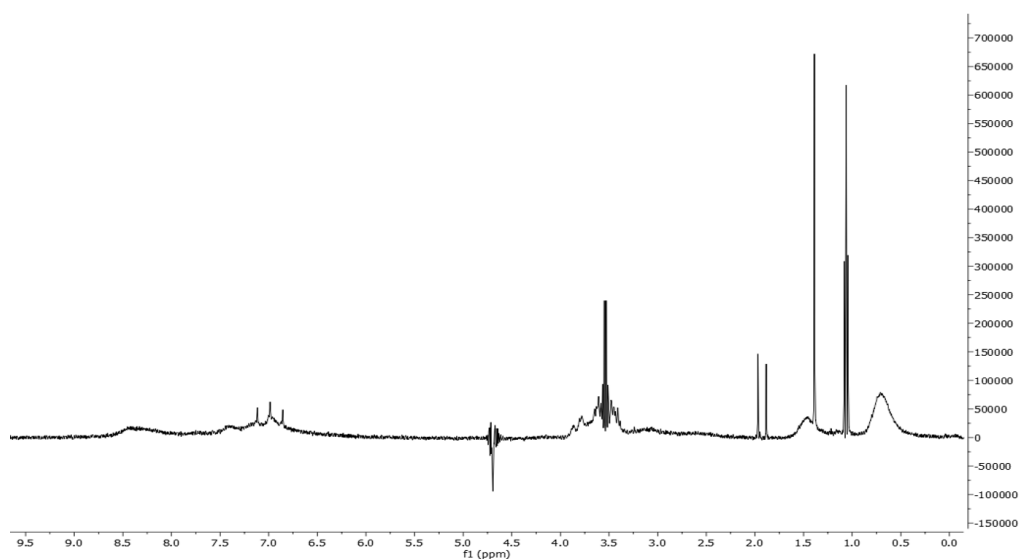
Lo spettro di dicroismo circolare del nanocluster Ag:pMBA-F(NH₂)DHSL-CONH₂ mostra tre assorbimenti negativi a 200 nm, a 225 nm ed una banda meno intensa a circa 300 nm [Fig.59]. La banda a 200 nm si può attribuire alla transizione $\pi \rightarrow \pi^*$ del legame peptidico, mentre quella a 225 nm è associabile alla transizione $n \rightarrow \pi^*$ sempre del legame peptidico. Si intravede un leggero assorbimento negativo intorno ai 450 nm, ovvero la regione di assorbimento del nanocluster. Purtroppo in questa zona il segnale è molto disturbato e la banda non è chiaramente identificabile.



[Fig.59] Spettro di dicroismo circolare del nanocluster Ag:pMBA-F(NH₂)DHSL-CONH₂.

Analisi NMR

Lo spettro ¹H-NMR del nanocluster Ag:pMBA-F(NH₂)DHSL-CONH₂ presenta dei segnali molto larghi e risulta difficile l'attribuzione di ogni picco al determinato gruppo di protoni che l'ha generato [Fig.60]. L'allargamento dei segnali molto probabilmente è dovuto al fatto che i leganti peptidici si trovano disposti sulla superficie di un oggetto di dimensioni maggiori. Tuttavia si riescono a scorgere in maniera indicativa i segnali dei protoni aromatici e ammidici intorno ai 7 ppm, dei protoni β intorno ai 3.5 ppm e dei protoni α intorno a 1 ppm.



[Fig.60] Spettro $^1\text{H-NMR}$ del nanocluster $\text{Ag:pMBA-F(NH}_2\text{)DHSL-CONH}$. Lo spettro è registrato in H_2O con 10 % v/v di D_2O .

3.8.2 $\text{Ag:pMBA-TRIADE-V-CONH}_2$

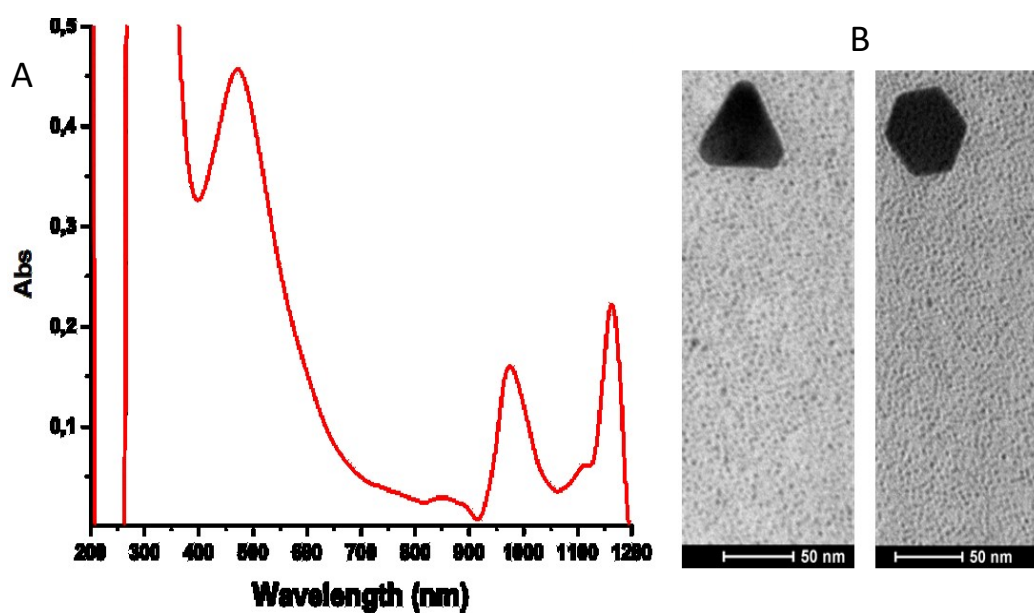
Seguendo la procedura di sintesi del gruppo di Desireddy⁽³³⁾, il mix di leganti $p\text{MBA-HV-CONH}_2$ / $p\text{MBA-SV-CONH}_2$ / $p\text{MBA-DV-CONH}_2$ (che nel loro insieme costituiscono il legante $p\text{MBA-TRIADE-V-CONH}_2$) viene sfruttato per la sintesi dei nanoclusters. Questi, al termine della reazione, presentano una colorazione rossa violacea, e vengono purificati dai sali e reagenti rimasti in soluzione tramite dialisi. I nanoclusters risultano ben solubili in H_2O dopo essere state acidificati con acido acetico.

Analisi di assorbimento UV-VIS e TEM

Lo spettro di assorbimento è peculiare poiché mostra una banda plasmonica centrata a circa 470 nm, ma sono presenti altre due bande a 970 nm ed a 1160 nm, in aggiunta ad una lieve banda intorno agli 850 nm e ad uno *spike* a circa 1120 nm [Fig.61(A)]. L'assorbimento plasmonico suggerisce che i sistemi siano di dimensioni maggiori rispetto ai nanoclusters di riferimento del gruppo di Desireddy⁽³³⁾. Ciò è confermato dalle immagini TEM in cui si nota come dimensionalmente si è intorno ai 50 nm [Fig.61(B)]. Ma ciò che sorprende

maggiormente è la forma geometrica di questi sistemi, riuscendo a scorgere nanoparticelle di forma esagonale e triangolari ad angoli tagliati. Proprio queste forme peculiari potrebbero essere responsabili della presenza dello spettro di assorbimento dei picchi al di sopra dei 1000 nm.

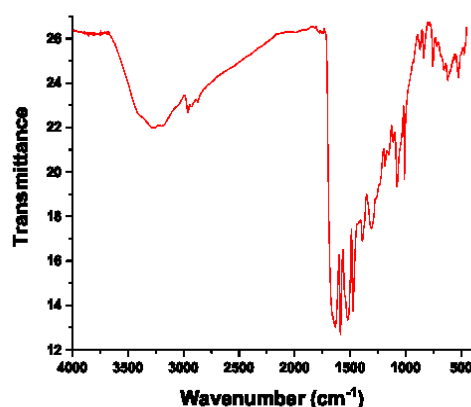
Le nanoparticelle sferiche mostrano un'unica banda plasmonica poiché l'oscillazione collettiva degli elettroni interessa una dimensione che è costante. Quando invece si ha a che fare, ad esempio, con strutture bastoncellari (*rods*), la risonanza plasmonica di superficie può avvenire in due dimensioni diverse tra loro (una longitudinale ed una trasversale), ed ognuna di esse è responsabile di un'unica banda plasmonica, che sarà tanto più differente in frequenza dall'altra, quanto più le dimensioni lungo le quali avviene l'oscillazione elettronica sono diverse⁽⁵⁶⁾.



[Fig.61] Spettro di assorbimento UV-VIS del nanocluster Ag:pMBA-TRIADE-V-CONH₂ (A) ed immagini TEM del medesimo nanocluster (B).

Analisi IR

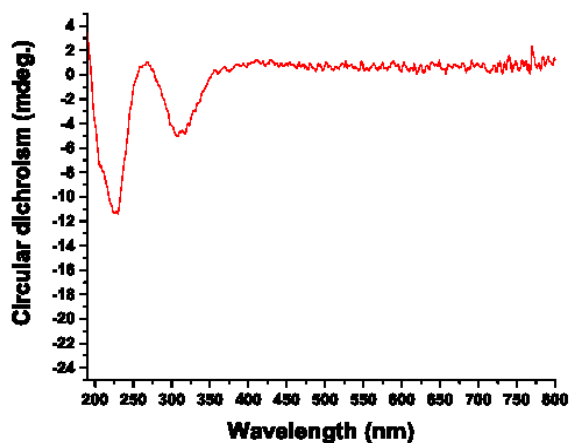
Lo spettro FT-IR del nanocluster Ag:pMBA-TRIADE-V-CONH₂ mostra una banda larga a 3400 cm⁻¹ circa, rappresentativa dello stretching O-H. Poco più a destra, a circa 2900 cm⁻¹ si hanno i segnali dello stretching C-H degli alifatici. Tra i 1750 ed i 1500 cm⁻¹ sono presenti diversi picchi, i quali si possono attribuire allo stretching C=O di ammidi e dell'acido carbossilico dell'aspartico [Fig.62].



[Fig.62] Spettro FT-IR del nanocluster Ag:pMBA-TRIADE-V.

Analisi al dicroismo circolare

Nello spettro di dicroismo circolare del nanocluster Ag:pMBA-TRIADE-V si distinguono due bande di assorbimento negative [Fig.63]. La prima abbastanza simmetrica si trova a 300 nm, mentre la seconda, che risulta essere leggermente asimmetrica, è presente a 225 nm.



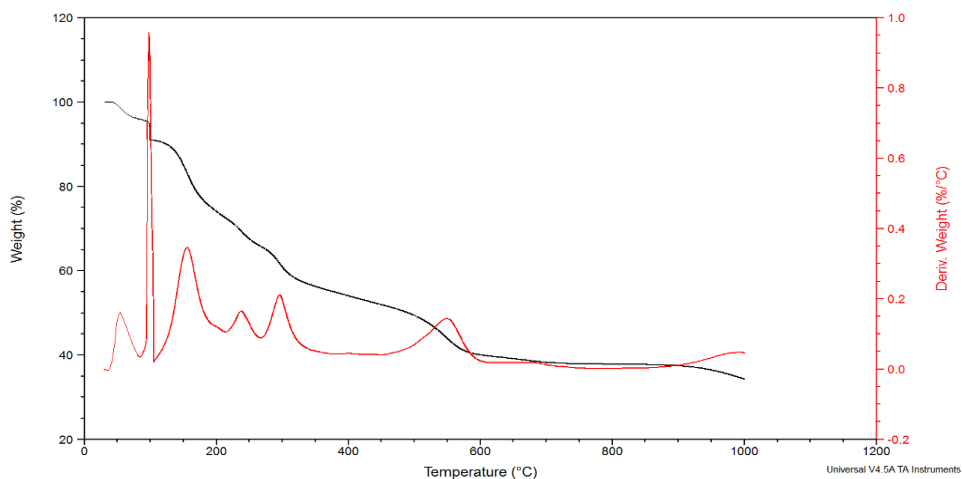
[Fig.63] Spettro di dicroismo circolare del nanocluster Ag:pMBA-TRIADE-V-CONH₂.

Analisi TGA

L'analisi termogravimetrica è un ottimo strumento per cominciare a scovare le informazioni riguardo la composizione molecolare del sistema in esame. Dal grafico [Fig.64] si nota come al raggiungimento dei 100 °C la nanoparticella abbia perso il 10% del suo peso, che è imputabile all'evaporazione delle molecole di solvatazione. Dopodiché, la combustione porta ad un valore di peso residuo di circa 38 %, che rimane costante dai 700 ai 900 °C. Quindi, dai 100 ai 700 °C è stato perso il 52% in peso, che è attribuibile alla combustione della frazione organica che costituisce lo *shell* della nanoparticella, mentre il 38 % si riferisce alla porzione inorganica rimasta, che rappresenta il *core* d'argento della NP. Escludendo la percentuale di massa apportata dal solvente, il sistema sembra essere composto dal 57.8 % e 42.2 % in peso, rispettivamente di frazione organica (quindi il legante) e frazione inorganica (quindi il *core* d'argento). Considerando un peso molecolare medio tra quello delle tre molecole che compongono il legante *p*MBA-TRIADE-V-CONH₂, (367.2 g/mol) ed il peso molecolare dell'argento (107.9 g/mol), si evince che la nanoparticella sia composta dal 28.7 % in moli di legante e 71.3 % in moli di argento. Ciò significa che in una nanoparticella, il rapporto tra atomi d'argento e molecole di legante è circa 2.5.

I calcoli potrebbero assumere un valore veritiero se si fosse in presenza di un sistema di nanoparticelle omogeneo, ma come dimostrano le immagini TEM in Fig.61(B)], le NPs sintetizzate presentano forme geometriche differenti.

Risulta quindi evidente come i dati ricavati dall'analisi TGA rappresentino solo una media delle proprietà delle NPs in esame, e non indicano con precisione la composizione delle nanoparticelle sintetizzate.



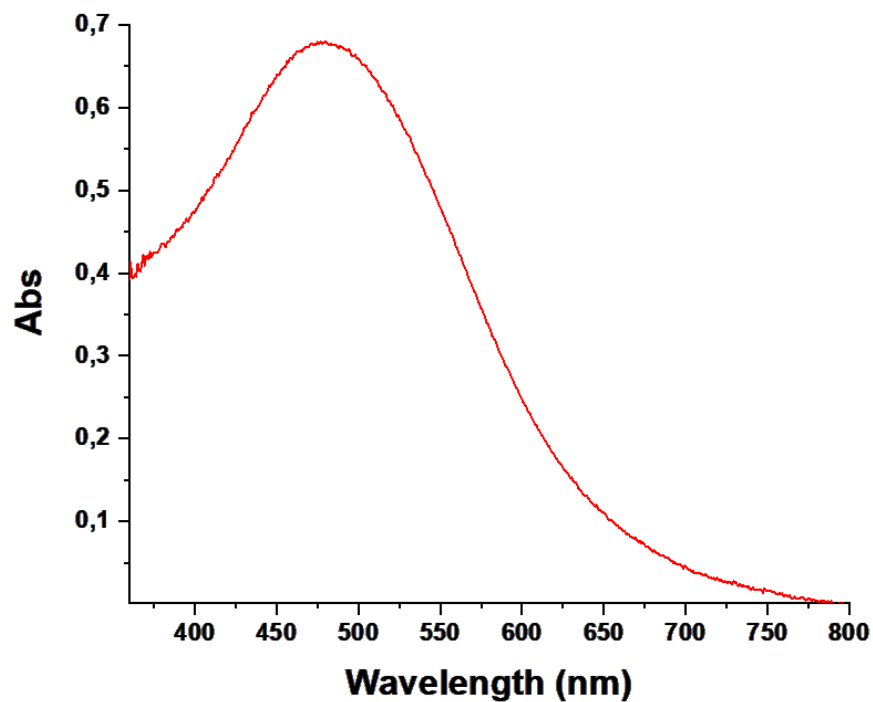
[Fig.64] Analisi TGA del nanocluster Ag:pMBA-TRIADE-V-CONH₂.

3.8.3 Ag:pMBA-FSHV-CONH₂

La procedura di sintesi dei nanoclusters ideata dal gruppo di Desireddy⁽³³⁾ viene seguita anche in questo caso, ma sfruttando il legante *p*MBA-FSHV-CONH₂ e variando opportunamente volumi e concentrazioni. Al termine della sintesi si ottiene una soluzione rossa violacea di nanoclusters, i quali vengono purificati mediante centrifugazione e gel filtrazione in colonna, sfruttando una fase stazionaria composta da Sephadex G-50. Le frazioni ottenute, mostrando il medesimo spettro UV-VIS vengono riunite e lasciate seccare sotto flusso di azoto, per ottenere il nanosistema solido. Una volta seccati, i nanoclusters sono solubili in ambiente acquoso acido.

Analisi di assorbimento UV-VIS

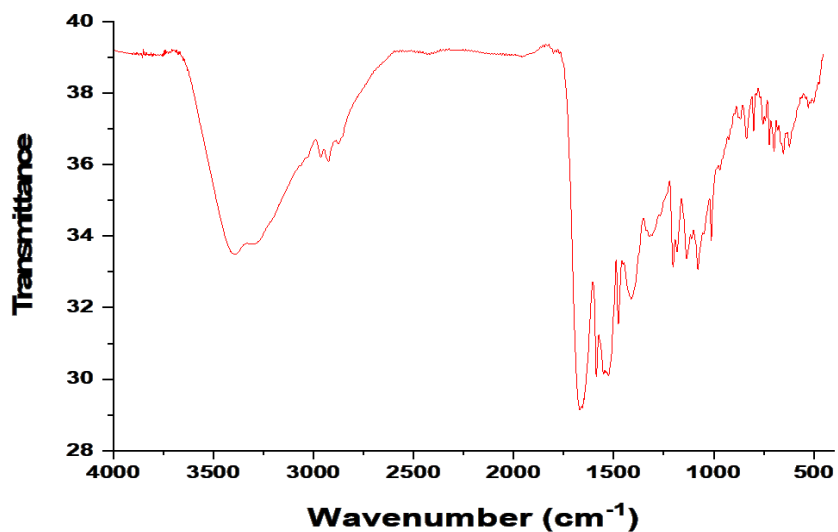
Le soluzioni ottenute dalla gel filtrazione in colonna vengono caratterizzate inizialmente secondo il loro spettro di assorbimento UV-VIS, che risulta essere il medesimo per tutte le frazioni [Fig.65]. Questo mostra una banda plasmonica centrata a circa a 480 nm, quindi l'ipotesi è quella di avere delle nanoparticelle di dimensioni superiori a quella dei nanoclusters, altrimenti sarebbero visibili dei picchi ben definiti.



[Fig.65] Spettro di assorbimento UV-VIS del nanocluster Ag:pMBA-FSHV-CONH₂.

Analisi IR

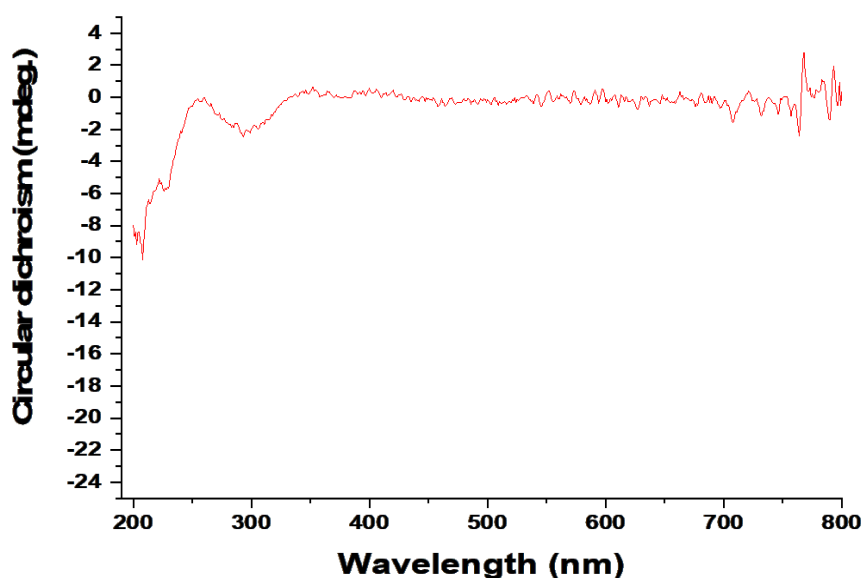
Nello spettro FT-IR del nanocluster Ag:pMBA-FSHV-CONH₂ sono chiaramente distinguibili le bande attribuibili allo stretching O-H a 3400 cm⁻¹ e allo stretching C=O delle ammidi a circa 1600 cm⁻¹ [Fig.66].



[Fig.66] Spettro FT-IR del nanocluster Ag:pMBA-FSHV-CONH₂.

Analisi al dicroismo circolare

Lo spettro di dicroismo circolare del nanocluster Ag:pMBA-FSHV-CONH₂ mostra due picchi a 210 e 230 nm, ed una banda un po' più larga a circa 290 nm. Tutti e tre i segnali assorbono in negativo [Fig.67].



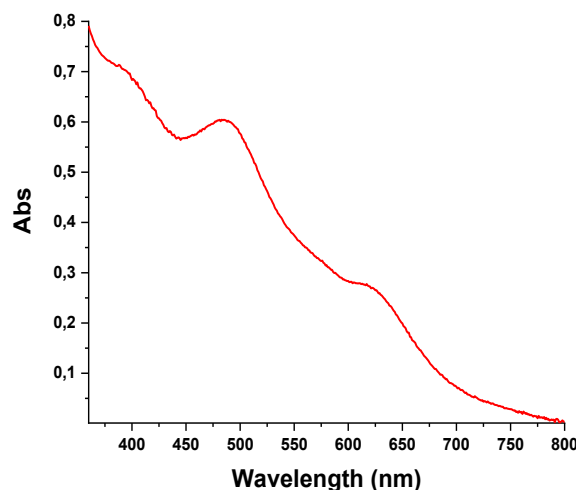
[Fig.67] Spettro di dicroismo circolare del nanocluster Ag:pMBA-FSHV-CONH₂.

3.8.4 Ag:pMBA-SHD-OH

Similarmente a quanto visto precedentemente, il nuovo legante pMBA-SHD-OH viene impiegato nella sintesi dei nanoclusters, seguendo la procedura del gruppo di Desireddy⁽³³⁾, opportunamente modificata. La purificazione prevede una SEC(*size-exclusion chromatography*) in colonna.

Analisi di assorbimento UV-VIS

Le frazioni ottenute dalla gel permeazione in colonna sono state confrontate mediante l'analisi del loro spettro di assorbimento UV-VIS [Fig.68]. Lo spettro mostra due picchi ben riconoscibili a circa 485 e 618 nm, ma si nota un assorbimento anche intorno ai 560 nm.



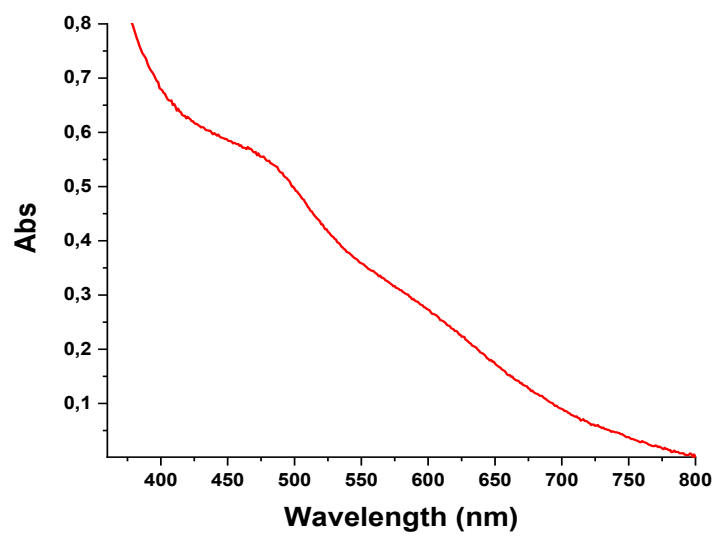
[Fig.68] Spettro di assorbimento UV-VIS del nanocluster Ag:pMBA-SHD-OH.

3.8.5 Ag:pMBA-SHD-OH@30 % LPAM

La sintesi di questi nanoclusters prevede la preparazione iniziale di una soluzione alcolica del legante *p*MBA-SHD-OH e del controllore idrofobico LPAM, in cui il secondo rappresenta il 30 % in moli rispetto al primo. Gli step successivi sono l'aggiunta di nitrato d'argento, la basificazione con CsOH e la riduzione con boroidruro di sodio. Al termine della sintesi, i nanoclusters vengono purificati mediante gel permeazione in colonna.

Analisi di assorbimento UV-VIS

Tutte le frazioni ottenute dalla gel permeazione in colonna mostrano il medesimo spettro di assorbimento UV-VIS. Questo è caratterizzato da due bande di assorbimento molto larghe e poco definite, centrate intorno ai 475 e 595 nm [Fig.69].



[Fig.69] Spettro di assorbimento UV-VIS del nanocluster Ag:pMBA-SHD-OH@30%LPAM.

4. CONCLUSIONI

La biomimetica è un campo di ricerca in cui diversi gruppi scientifici spendono le loro forze e risorse. Analizzando la struttura delle macromolecole biologiche ci si accorge che la loro composizione è data dall'assemblaggio di un ridotto numero di piccole molecole. Come noto, la varietà di macrosistemi molecolari esistenti non è data unicamente dalla natura degli elementi costituenti, ma anche dalla loro relativa e precisa disposizione spaziale. Ciò sembra ancora più evidente quando ci si rende conto che con solo venti amminoacidi diversi è possibile ottenere migliaia di strutture proteiche, ognuna caratterizzata da una certa struttura e funzionalità. Tra le proteine, gli enzimi sono stati selezionati per le loro proprietà di catalisi nei confronti di specifiche reazioni chimiche, assumendo un ruolo essenziale nel sistema biologico in cui operano. In condizioni fisiologiche la catalisi idrolitica enzimatica è molto più efficiente della catalisi chimica omogenea o eterogenea, inoltre, gli enzimi sono dotati di una maggiore selettività. Il cuore pulsante della catalisi idrolitica enzimatica è rappresentato dalla triade catalitica, ovvero l'insieme di tre amminoacidi molto conservati (aspartato, serina ed istidina), che cooperano all'interno del sito catalitico enzimatico per catalizzare una specifica reazione.

In questo studio abbiamo cercato riprodurre un ambiente che mimasse la tasca catalitica enzimatica, grazie alla formazione di un monolayer peptidico sulla superficie di un nanocluster d'argento. In particolare, ci siamo concentrati sulla scelta della molecola che potesse complessarsi all'argento. A discapito di molecole tioliche naturali quali GSH, NAC e Cys, la nostra scelta è andata per l'acido *para*-mercaptobenzoico (*p*MBA), che abbiamo ritenuto più versatile come *building-block*. Il *p*MBA è stato funzionalizzato sulla porzione N-terminale di corte sequenze peptidiche costituite dai residui della triade catalitica. Le prime prove di funzionalizzazione sono state condotte con piccoli peptidi modello non catalitici, sfruttando metodologie di funzionalizzazione pre- e post-sintesi dei nanoclusters. Entrambi i metodi hanno portato alla formazione di piccoli

nanoclusters, che sono stati caratterizzati con la spettroscopia di assorbimento UV-VIS.

Successivamente, i leganti peptidici catalitici sono stati sintetizzati mediante la sintesi peptidica in fase solida, ed una volta purificati sono stati impiegati nella formazione dei nanoclusters d'argento. Sono stati ideati cinque leganti catalitici, quattro dei quali riportano nella loro sequenza i residui della triade catalitica enzimatica. Ciò che contraddistingue le quattro molecole è la disposizione spaziale dei residui e la strategia utilizzata per ricreare un ambiente idrofobico accanto al sito catalitico, essenziale per avere delle pKa dei residui ottimali per indurre un processo idrolitico di tipo catalitico. Le proprietà catalitiche dei nanosistemi sintetizzati sono state testate sulla reazione di idrolisi del *para*-nitrofenilacetato in PBS (pH = 7.8), confrontando le loro prestazioni con quelle dell'esterasi di *Pseudomonas fluorescens*. Dal confronto dell'andamento della conversione di substrato nel tempo e della velocità iniziale di idrolisi si evince che il nanocluster più promettente, e che più si avvicina alle prestazioni di un enzima è quello composto da Ag:*p*MBA-F(NH₂)DHSL-CONH₂. La sua velocità iniziale di idrolisi iniziale è pari a circa un terzo di quella enzimatica, raggiungendo circa il 70 % di conversione del *p*NPA nel momento in cui l'enzima l'ha convertito completamente. I nanoclusters sintetizzati sono stati caratterizzati mediante spettroscopia UV-VIS, IR, e dicroismo circolare, mentre i leganti peptidici sono stati analizzati all'NMR e all'HPLC-MASSA.

Infine, nel presente studio è stata dimostrata la fattibilità di ricreare il sito catalitico enzimatico sulla superficie di nanoclusters d'argento, sfruttando l'autoassemblaggio di piccoli peptidi in grado di coordinarsi all'argento. Variando la disposizione spaziale dei residui catalitici e la tipologia di residui idrofobici presenti nella sequenza del legante, sarà possibile puntare all'ottenimento di una maggiore capacità catalitica, auspicabilmente il più simile possibile a quella enzimatica.

5. RIFERIMENTI

- 1) Bayda S. *et al.* The History of Nanoscience and Nanotechnology: From Chemical–Physical Applications to Nanomedicine. *Molecules*, 25(1), 112. doi:10.3390/molecules25010112
- 2) Rambaran T. *et al.* Nanotechnology from lab to industry - a look at current trends. *Nanoscale Adv.* 2022 Aug 1;4(18):3664-3675. doi: 10.1039/d2na00439a
- 3) Gao Y. *et al.* China and the United States--Global partners, competitors and collaborators in nanotechnology development. *Nanomedicine*. 2016 Jan;12(1):13-9. doi: 10.1016/j.nano.2015.09.007
- 4) Jia L. *et al.* Fast evolving nanotechnology and relevant programs and entities in China, *Nano Today*, Volume 6, Issue 1, 2011, Pages 6-11, ISSN 1748-0132. doi:10.1016/j.nantod.2010.11.003
- 5) Statnano, NBIC+, Top 20 Countries in Publishing Nano Articles in 2021
- 6) Statista.com
- 7) Malik S. *et al.* Nanotechnology: A Revolution in Modern Industry. *Molecules*. 2023 Jan 9;28(2):661. doi: 10.3390/molecules28020661
- 8) Curcio M. *et al.* Functionalized Carbon Nanostructures Versus Drug Resistance: Promising Scenarios in Cancer Treatment. *Molecules*. 2020 Apr 30;25(9):2102. doi: 10.3390/molecules25092102
- 9) Nicolae-Maranciuc A. *et al.* Ag Nanoparticles for Biomedical Applications-Synthesis and Characterization-A Review. *Int J Mol Sci*. 2022 May 21;23(10):5778. doi: 10.3390/ijms23105778
- 10) Loiseau A. *et al.* Silver-Based Plasmonic Nanoparticles for and Their Use in Biosensing. *Biosensors (Basel)*. 2019 Jun 10;9(2):78. doi: 10.3390/bios9020078
- 11) Xu L. *et al.* Silver nanoparticles: Synthesis, medical applications and biosafety. *Theranostics*. 2020 Jul 11;10(20):8996-9031. doi: 10.7150/thno.45413

- 12) Ullah Khan S. *et al.* Nanosilver: new ageless and versatile biomedical therapeutic scaffold. *Int J Nanomedicine*. 2018 Feb 2;13:733-762. doi: 10.2147/IJN.S153167
- 13) Proposito P. *et al.* Silver Nanoparticles as Colorimetric Sensors for Water Pollutants. *Chemosensors*. 8. 26. doi:10.3390/chemosensors8020026.
- 14) UV/VIS/IR Spectroscopy Analysis of Nanoparticles, 2012. [(accessed on 5 March 2016)]. Available online: <http://50.87.149.212/sites/default/files/nanoComposix%20Guidelines%20for%20UV-vis%20Analysis.pdf>
- 15) Zhang XF. *et al.* Silver Nanoparticles: Synthesis, Characterization, Properties, Applications, and Therapeutic Approaches. *Int J Mol Sci*. 2016 Sep 13;17(9):1534. doi: 10.3390/ijms17091534
- 16) Huang T. *et al.* Synthesis and Characterization of Tunable Rainbow Colored Colloidal Silver Nanoparticles Using Single-Nanoparticle Plasmonic Microscopy and Spectroscopy. *J Mater Chem*. 2010 Jan 1;20(44):9867-9876. doi: 10.1039/C0JM01990A
- 17) Mughal S. *et al.* Role of Silver Nanoparticles in Colorimetric Detection of Biomolecules. doi: 10.7537/marsbnj050419.04
- 18) Pérez-Tanoira R. *et al.* Silver Nanoparticles Produced by Laser Ablation and Re-Irradiation Are Effective Preventing Peri-Implantitis Multispecies Biofilm Formation. *Int J Mol Sci*. 2022 Oct 10;23(19):12027. doi: 10.3390/ijms231912027
- 19) Zeng H. *et al.* Nanomaterials via Laser Ablation/Irradiation in Liquid: A Review. *Adv. Funct. Mater*. 2012;22:1333–1353. doi: 10.1002/adfm.201102295
- 20) Behera A. *et al.* Magnetron sputtering for development of nanostructured materials. Design, Fabrication, and Characterization of Multifunctional Nanomaterials. 2022;177-199. doi:10.1016/B978-0-12-820558-7.00002-9
- 21) Ge L. *et al.* Nanosilver particles in medical applications: synthesis, performance, and toxicity. *Int J Nanomedicine*. 2014;9(1):2399-2407 doi: 10.2147/IJN.S55015
- 22) Agnihotri S. *et al.* *RSC Adv.*, 2014, 4, 3974. doi: 10.1039/C3RA44507K

- 23) Roldán MV. *et al.* "Electrochemical Method for Ag-PEG Nanoparticles Synthesis", *Journal of Nanoparticles*, vol. 2013, Article ID 524150, 7 pages, 2013. doi: 10.1155/2013/524150
- 24) Yusuf M. Silver Nanoparticles: Synthesis and Applications. *Handbook of Ecomaterials*. 2018 Nov 30:2343–56. doi: 10.1007/978-3-319-68255-6_16. PMID: PMC7122521.
- 25) Pingali KC. *et al.* Silver Nanoparticles from Ultrasonic Spray Pyrolysis of Aqueous Silver Nitrate, *Aerosol Science and Technology*, 39:10, 1010-1014. doi: 10.1080/02786820500380255
- 26) Chopra H. *et al.* Green Metallic Nanoparticles: Biosynthesis to Applications. *Front Bioeng Biotechnol.* 2022 Apr 6;10:874742. doi: 10.3389/fbioe.2022.874742
- 27) Jain AS. *et al.* Bionanofactories for Green Synthesis of Silver Nanoparticles: Toward Antimicrobial Applications. *Int J Mol Sci.* 2021 Nov 5;22(21):11993. doi: 10.3390/ijms222111993
- 28) Al-Zahrani S. *et al.* Role of Synthetic Plant Extracts on the Production of Silver-Derived Nanoparticles. *Plants (Basel)*. 2021 Aug 13;10(8):1671. doi: 10.3390/plants10081671
- 29) Khodadadi S. *et al.* Investigating the Possibility of Green Synthesis of Silver Nanoparticles Using *Vaccinium arctostaphylos* Extract and Evaluating Its Antibacterial Properties. *Biomed Res Int.* 2021 Apr 30;2021:5572252. doi: 10.1155/2021/5572252
- 30) Kalishwaralal K. *et al.* Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles by the culture supernatant of *Bacillus licheniformis*, *Materials Letters*, Volume 62, Issue 29, 2008, Pages 4411-4413, ISSN 0167-577X. doi: 10.1016/j.matlet.2008.06.051
- 31) Singh R. *et al.* Synthesis, optimization, and characterization of silver nanoparticles from *Acinetobacter calcoaceticus* and their enhanced antibacterial activity when combined with antibiotics. *Int J Nanomedicine.* 2013;8(1):4277-4290. doi: 10.2147/IJN.S48913
- 32) Kang X. *et al.* Au₂₅(SR)₁₈: the captain of the great nanocluster ship. *Nanoscale*, 10(23), 10758–10834. doi:10.1039/c8nr02973c

- 33) Desireddy A. *et al.* Ultrastable silver nanoparticles. *Nature* 501, 399–402 (2013). doi: 10.1038/nature12523
- 34) Shen H. *et al.* N-Heterocyclic Carbene-Stabilized Gold Nanoclusters with Organometallic Motifs for Promoting Catalysis. *Journal of the American Chemical Society* 2022 144 (24), 10844-10853. doi: 10.1021/jacs.2c02669
- 35) Li G. *et al.* Atomically Precise Gold Nanoclusters as New Model Catalysts. *Accounts of Chemical Research* 2013 46 (8), 1749-1758. doi: 10.1021/ar300213z
- 36) Zhu Q. *et al.* Controllable synthesis and electrocatalytic applications of atomically precise gold nanoclusters. *Nanoscale Adv.*, 2021,3, 6330-6341. doi: 10.1039/D1NA00514F
- 37) Apostolopoulos V. *et al.* A Global Review on Short Peptides: Frontiers and Perspectives. *Molecules*. 2021 Jan 15;26(2):430. doi: 10.3390/molecules26020430
- 38) Hamley IW. *Introduction to Peptide Science*. Wiley; Weinheim, Germany: 2020.
- 39) Toniolo C. *et al.* Control of peptide conformation by the Thorpe–Ingold effect (C α - tetrasubstitution). *Biopolymers (Pept. Sci.)* 2001;60(6):396-419. doi: 10.1002/1097-0282(2001)60:6<396::AID-BIP10184>3.0.CO;2-7
- 40) Kristensen K. *et al.* Adsorption of cationic peptides to solid surfaces of glass and plastic. *PLoS One*. 2015 May 1;10(5):e0122419. doi: 10.1371/journal.pone.0122419.
- 41) d'Orlyé F. *et al.* Synthesis, Characterization and Evaluation of Peptide Nanostructures for Biomedical Applications. *Molecules*. 2021 Jul 29;26(15):4587. doi: 10.3390/molecules26154587
- 42) Li D. *et al.* Synthesis of Marine Cyclopeptide Galaxamide Analogues as Potential Anticancer Agents. *Mar Drugs*. 2022 Feb 22;20(3):158. doi: 10.3390/md20030158
- 43) Tymecka D. *et al.* Solution Phase Peptide Synthesis: The Case of Biphalin. *Methods Mol Biol*. 2020;2103:1-11. doi: 10.1007/978-1-0716-0227-0_1
- 44) Merrifield RB. Solid phase peptide synthesis. i. the synthesis of a tetrapeptide. *J. Am. Chem. Soc.* 1963;85:2149–2154. doi: 10.1021/ja00897a025

- 45) Akintayo DC. *et al.* Practical Peptide Synthesis Workflow Using Amino-Li-Resin. *MethodsProtoc.*2022,5,72. doi: 10.3390/mps5050072
- 46) Wang L. *et al.* Therapeutic peptides: current applications and future directions. *Signal Transduct Target Ther.* 2022 Feb 14;7(1):48. doi: 10.1038/s41392-022-00904-4
- 47) Barzkar N. *et al.* Marine Bacterial Esterases: Emerging Biocatalysts for Industrial Applications. *Appl Biochem Biotechnol* 193, 1187–1214 (2021). doi: 10.1007/s12010-020-03483-8
- 48) Kumar S. *et al.* Glutathione-stabilized magic-number silver cluster compounds. *Am. Chem. Soc.* 2010, 132, 13141. doi: 10.1021/ja105836b
- 49) Bakr OM. *et al.* Silver nanoparticles with broad multiband linear optical absorption. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2009;48(32):5921-6. doi: 10.1002/anie.200900298
- 50) Khalkho BR. *et al.* Citrate functionalized gold nanoparticles assisted micro extraction of L-cysteine in milk and water samples using Fourier transform infrared spectroscopy, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, Volume 267, Part 2, 2022, 120523, ISSN 1386-1425. doi: 10.1016/j.saa.2021.120523
- 51) Helferich B. *et al.* Tertiary Ethers of Carbohydrates, Editor(s): W.W. Pigman, M.L. Wolfrom, Stanley Peat, *Advances in Carbohydrate Chemistry*, Academic Press, Volume 3, 1948, Pages 79-111, ISSN 0096-5332, ISBN 9780120072033. doi: 10.1016/S0096-5332(08)60027-2
- 52) Spears RJ. *et al.* Cysteine protecting groups: applications in peptide and protein science. *Chemical Society Reviews* 2021,50, 11098-11155. doi: 10.1039/D1CS00271F
- 53) Amirjani A. *et al.* Predicting the Size of Silver Nanoparticles from Their Optical Properties. *Plasmonics* 15, 1077–1082 (2020). Doi: 10.1007/s11468-020-01121-x
- 54) Laconde G. *et al.* Synthesis of α -Amino Acid N-Carboxyanhydrides *Org. Lett.* 2021, 23, 16, 6412–6416 Publication Date: August 9, 2021. doi: 10.1021/acs.orglett.1c02224

- 55) Li Y. *et al.* Dipeptide seryl-histidine and related oligopeptides cleave DNA, protein, and a carboxyl ester. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 8(12), 2675–2680. doi:10.1016/s0968-0896(00)00208-x
- 56) Pietrobon B. *et al.* Synthesis of Size-Controlled Faceted Pentagonal Silver Nanorods with Tunable Plasmonic Properties and Self-Assembly of These Nanorods. 3(1), 21–26. doi:10.1021/mn800591y