



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIMICHE

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN CHIMICA

TESI DI LAUREA MAGISTRALE

**POLIOSSOMETALLATI IN DOMINI IBRIDI ORGANICI-
INORGANICI PER IL DISEGNO DI NANOSTRUTTURE
CATALITICHE**

RELATORE: DOTT.SSA BONCHIO MARCELLA

CONTRORELATORE: PROF. ZECCA MARCO

LAUREANDA: VILONA DEBORA

ANNO ACCADEMICO 2011/2012

Alla mia famiglia

e ad Alessandro

*La scienza è una disciplina nella quale
la sciocchezza di questa generazione
può oltrepassare il punto che ha raggiunto il
genio dell'ultima generazione.*

(Max Gluckman)

INDICE

1. INTRODUZIONE	1
1.1 Poliossometallati: una breve descrizione	
1.2 Derivati di poliossometallati	5
1.3 Uso di TMSP come sistemi biomimetici per attività di ossidasi e catalasi	6
1.4 Uso di macromolecole biogeniche come templanti	13
1.5 Interazione di POM con scaffold di natura proteica: Tobacco Mosaic Virus	14
1.6 Interazione con scaffold di natura polisaccaridica: assembly layer by layer di microcapsule	20
a) Chitosano	21
b) Destrano	22
1.7 Scopo della tesi	23
2. RISULTATI E DISCUSSIONE	27
2.1 Interazione tra POM e TMV	29
2.1.1. Interazione tra TMV e RuPOM a pH neutro.	30
2.1.2 Interazione tra TMV e RuPOM a pH 3.5	32
2.1.3 Interazione tra RuPOM e TMV ricoperto da metalli	37
Mediazione dello Zn^{2+} nel processo di aggregazione e decorazione di TMV	37
Mediazione del $Ru(bpy)_3^{2+}$ nel processo di aggregazione e decorazione di TMV	39
2.1.4 Prove di purificazione dei complessi del TMV	42
2.1.5 Interazione del RuPOM con TMV in presenza di additivi polimerici	43
2.1.6 Prospettive sull'uso di TMV come scaffold	45
2.2 Incapsulamento di POM	47
2.2.1 Utilizzo di $CaCO_3$	48
2.2.2 Uso di $CaCO_3$ e polisaccaridi come templanti	52
2.2.3 Uso di $CaCO_3$, destrano negativo e chitosano come templanti	53

2.2.4 Uso di Chitosano da solo e come template con CaCO ₃	55
2.2.5 Uso di destrano positivo	57
2.2.6 POM nella shell	58
2.2.7 POM nella shell associato ad un tag fluorescente	61
2.2.8 POM nella shell associato a sensibilizzatori	64
Ru(bpy) ₃ ²⁺ come foto sensibilizzatore	64
Meso-Tetra(N-metil-4-piridil)porfirina tetratosilata (TMPyP) come foto sensibilizzatore	68
2.8 Sommario dei risultati riguardanti la preparazione di capsule	74
2.9 Conclusioni	76
3. PARTE SPERIMENTALE	79
3.1 Strumentazione	79
3.2 Solventi, reagenti e loro purificazione	80
3.3 Metodologie	80
3.4 Sintesi del RuPOM	82
3.5 Sintesi e caratterizzazione dei composti non commerciali utilizzati	84
3.5.1 Sintesi degli addotti complessi di TMV con RuPOM	84
3.5.2 Sintesi dei polimeri non commerciali utilizzati	86
3.5.3 Sintesi di nanoparticelle di chitosano e RuPOM	88
3.5.4 Sintesi di microparticelle contenenti RuPOM nel core	89
3.5.5 Sintesi di microparticelle contenenti il RuPOM nella shell	93
3.5.6 Ossidazione dell'acqua catalizzata dalle microcapsule contenenti il RuPOM nella shell ed un foto attivatore	94
3.5.7 Decomposizione dell'acqua ossigenata ad opera delle microcapsule contenenti RuPOM nella shell e FITC-Destrano nel core	94
4. BIBLIOGRAFIA	95
5. APPENDICE	I

1. INTRODUZIONE

1.1 Poliossometallati: una breve descrizione

I complessi poliossometallati (POM) costituiscono una classe di composti a base di ossidi polianionici discreti e nano dimensionali che presentano potenzialità di utilizzo in campi diversi, quali la catalisi, la sensoristica, la scienza dei materiali, la medicina.^{1,2,3,4}

I poliossometallati sono composti rappresentati da due formule generali:

- (i) $[M_mO_y]^{p-}$ isopolianioni
- (ii) $[X_xM_mO_y]^{q-}$ eteropolianioni

dove M è un metallo delle prime serie di transizione (solitamente V, Mo o W nel più alto stato d'ossidazione (d^0)) mentre X può essere un non metallo (P, Si, Ge, As, Sb, Te, etc.) o un diverso metallo di transizione (Co, Fe, Mn, Cu, etc.).

Sc	Ti	V	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn
Y	Zr	Nb	Mo	Tc	Ru	Rh	Pd	Ag	Cd
La	Hf	Ta	W	Re	Os	Ir	Pt	Au	Hg

Per la formazione di queste strutture, devono sussistere due condizioni fondamentali:

1. Raggio cationico adeguato ad ospitare un intorno di coordinazione ottaedrico
2. Orbitali d vuoti, disponibili per la formazione di doppi legami terminali metallo-ossigeno ($M=O$).

La struttura è composta solitamente da ottaedri MO_6 in cui uno o al massimo due ossigeni (principio di Lipscomb⁵) formano un doppio

legame con il metallo. Gli ossigeni terminali sono essenziali per la formazione di strutture discrete ed evitare così la formazione di strutture estese, come accade normalmente per gli ossidi di altri metalli. La struttura tridimensionale dei poliossometallati è definita dal numero di ponti ad ossigeno (μ_2 -oxo) che si formano tra gli atomi di metallo. Due ottaedri di solito hanno in comune uno o due atomi di ossigeno, risultando uniti rispettivamente attraverso un angolo o un spigolo (Figura 1.1). In rari casi, tre ponti ad ossigeno permettono la condivisione di una faccia tra due ottaedri.

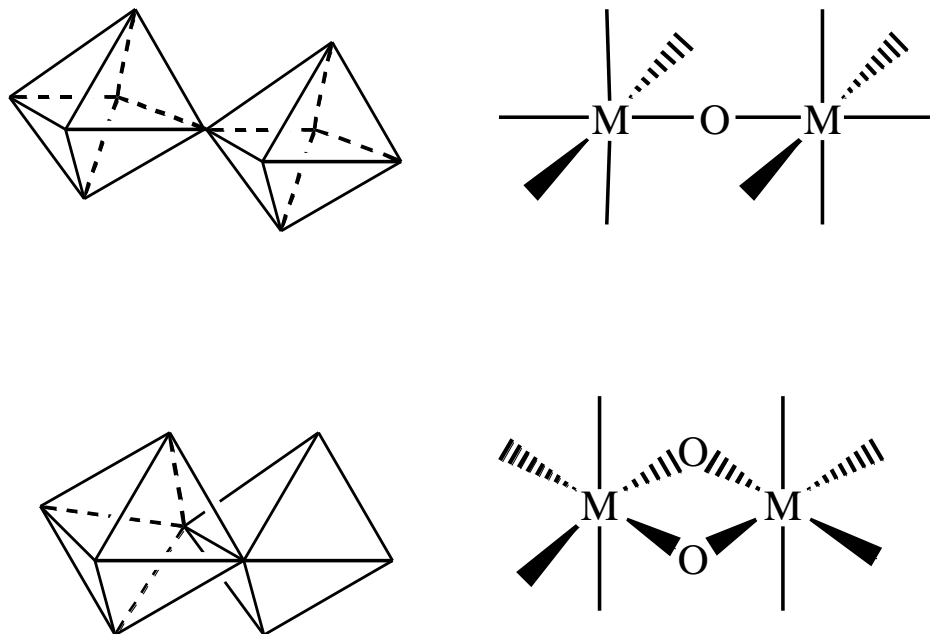


Figura 1.1- Rappresentazione dei più comuni ponti ad ossigeno.

Esistono svariati tipi di strutture di poliossoanioni (*Anderson, Lindqvist, Keggin, Wells-Dawson, Krebs*), ottenibili variando opportunamente i parametri di sintesi: concentrazione, rapporto stechiometrico dei reagenti, temperatura, acidità (Figura 1.2).

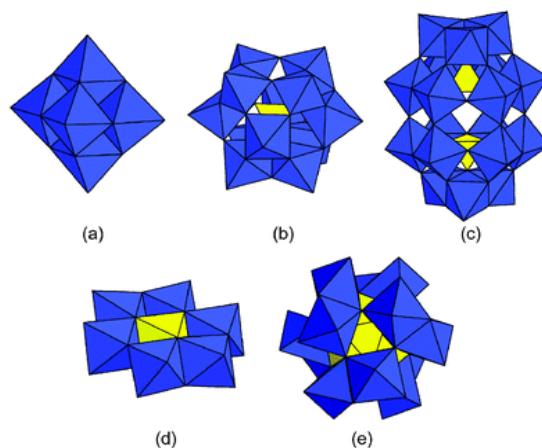


Figura 1.2 - Alcune rappresentazioni a poliedri di polioossometallati: a) struttura di Lindqvist $[M_6O_{19}]^{2-}$ ($M = Mo, W$); b) struttura α -Keggin $[XM_{12}O_{40}]^{n-}$ ($X = P, Si, B, Al, Ge; M = Mo, W$); c) struttura α -Well-Dawson $[X_2M_{18}O_{82}]^{n-}$ ($X = P, Si; M = W, Mo$); d) eteropolianione di Anderson-Evans $[XMo_6O_{24}]^{m-}$ ($X = P, As$); e) Struttura di Dexter, $XM_{12}O_{42}^{n-}$.

Tale diversità strutturale e di composizione si riflette in un ampio spettro di proprietà, controllabili a livello molecolare, che coinvolgono forma, potenziale redox, distribuzione della carica superficiale, acidità e solubilità.

La classe di composti polioossoanionici maggiormente studiata è quella di tipo *Keggin*, di formula generale $[XM_{12}O_{40}]^{n-}$ (dove solitamente $M = Mo^{VI}, W^{VI}$). La struttura contiene un eteroatomo centrale tetraedrico XO_4 circondato da dodici centri metallici ottaedrici MO_6 di molibdeno o tungsteno. A loro volta questi centri sono raggruppati in quattro triplette M_3O_{13} in cui i metalli condividono tra loro uno spigolo dell'unità ottaedrica. Le triplette, infine, sono unite tra loro attraverso i vertici degli ottaedri. Questa particolare disposizione risulta in una simmetria di tipo T_d del polioossometallato (Figura 1.3).

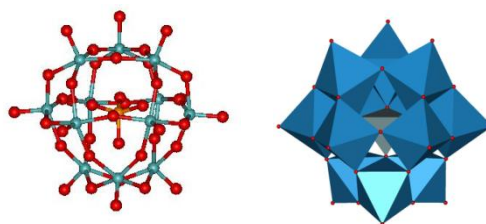


Figura 1.3- Struttura α -Keggin di eteropolianioni $[XW_{12}O_{40}]^{n-}$

a) Rappresentazione *ball-and-stick*: O (rosso), W (azzurro), P (arancione) ; b) Rappresentazione poliedrica: ottaedri centrati su atomi di W (azzurro), tetraedro centrato sull'atomo di Si (grigio).

La particolare disposizione descritta è quella termodinamicamente più stabile e viene indicata con la lettera α ; esistono anche isomeri strutturali meno stabili, dovuti alla rotazione di 60° di una (isomero β), due (isomero γ), tre (isomero δ) o quattro (isomero ϵ) triplette M_3O_{13} attorno ai loro assi di simmetria.⁶

Questi poliossometallati, data la ridotta carica anionica e l'elevata stabilità e simmetria, vengono definiti "saturi".

Una caratteristica interessante di questi polianioni di Keggin è la possibilità di sintetizzare derivati in cui vengono formalmente rimosse una o più unità MO^{4+} dalla struttura saturata. Si formano così dei complessi "vacanti" (detti anche "lacunari") che, a seconda delle condizioni utilizzate nella sintesi, possono essere monovacanti ($XM_{11}O_{39}$), divacanti ($XM_{10}O_{36}$) o trivacanti (XM_9O_{34}).⁷ I composti trivacanti sono ulteriormente classificati in base alla posizione delle unità MO^{4+} rimosse. Vengono definiti A se le tre unità sono rimosse da tre triplette M_3O_{13} diverse (Figura 1.4), mentre sono definiti B, termodinamicamente più stabili, se le tre unità appartengono alla stessa tripletta.⁸

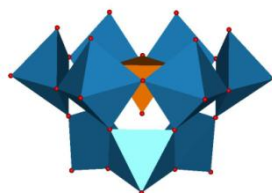


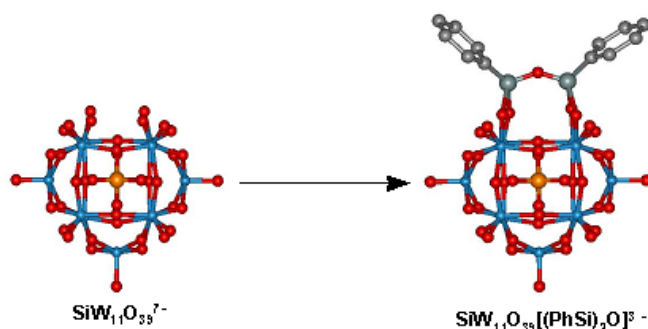
Figura 1.4- Rappresentazione poliedrica dell'eteropolianione trivacante [α -A- PW_9O_{34}]⁹⁻. In blu ottaedri centrati su atomi di W, in arancione tetraedro centrato sull'atomo di P.

Gran parte dei poliossometallati saturi o lacunari sono stabili all'aria e caratterizzabili allo stato solido (FT-IR, raggi X).

Una caratteristica interessante dei poliossoanioni è la possibilità di renderli altamente solubili (grammi/ml) in diversi solventi (acqua, acetonitrile, acetone, alcoli fluorurati, liquidi ionici), variando la natura del controcatione, solitamente un metallo alcalino o un catione organico (tetraalchil ammonio/fosfonio).⁹ In questi casi è possibile la caratterizzazione in soluzione, mediante NMR etero nucleare e tecniche di spettroscopia di massa (ESI-MS, MALDI).^{10,11,12,13}

1.2 Derivati di poliossometallati

La funzionalizzazione di poliossometallati passa attraverso la preparazione di complessi lacunari, in cui si rimuovono formalmente uno o più ottaedri. In corrispondenza di tali difetti strutturali sono presenti atomi di ossigeno, con elevata densità di carica e in grado di esibire reattività nucleofila. I poliossoanioni lacunari sono quindi degli utili intermedi che possono essere sfruttati per preparare *complessi ibridi organici-inorganici*, in cui questi atomi di ossigeno vengono funzionalizzati per dare legami O-X-R, dove X = As, P, Si, Sn, e R = residuo organico (Schema 1.1).^{14,15,16}



Schema 1.1- Formazione di complessi ibridi organici-inorganici tramite reazione di funzionalizzazione degli ossigeni lacunari

Inoltre, i poliossometallati lacunari possono fungere da leganti per altri centri metallici. Nel caso in cui un metallo di transizione sia incorporato nella struttura del poliossometallato si parla di "Transition Metal-Substituted Polyoxometalates", o TMSP. Lo ione metallico, aggiunto

sottoforma di precursore reattivo (solitamente contiene leganti come il cloruro), viene coordinato dagli atomi di ossigeno che si affacciano sul sito lacunare, e che costituiscono quindi un legante polidentato. In modo analogo si possono inserire anche altri non metalli oppure dei lantanidi (Figura 1.5).^{8,17}

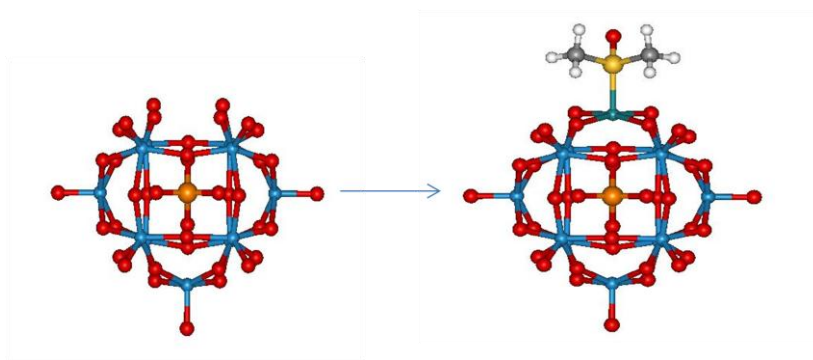


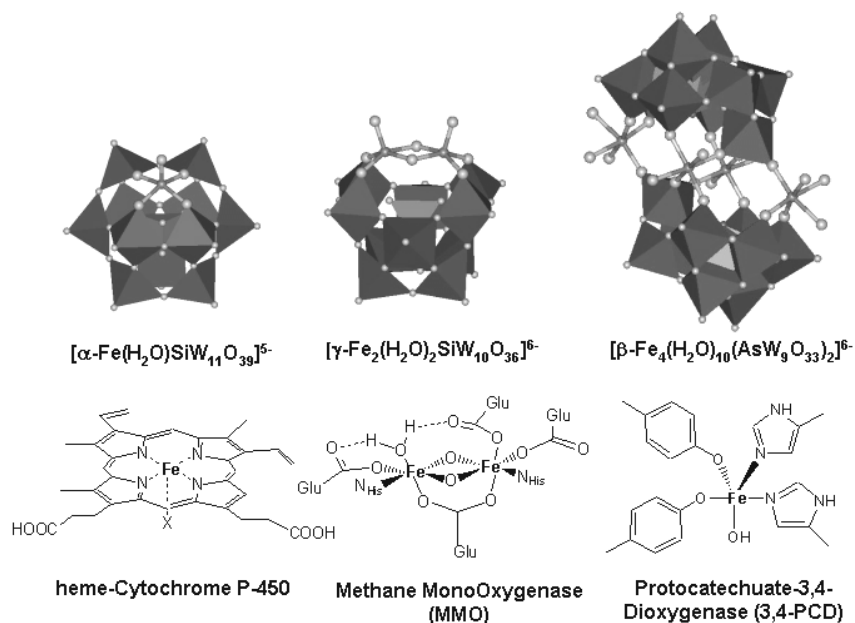
Figura 1.5- Esempio di inserimento di un metallo (M=Ru, a cui è legata una molecola di DMSO) in una lacuna di un poliossometallato monovacante $[XW_{11}O_{39}]^{n-}$.

E' facile intuire come le strutture risultanti siano molto stabili in condizioni ossidanti, in quanto il legante risulta costituito solo da ioni di metalli di transizione d^0 e ossigeno. I TMSP costituiscono pertanto delle interessanti alternative ai più comuni complessi organometallici (porfirine, ftalocianine, etc..), che presentano minore stabilità in condizioni ossidanti anche blande. POM contenenti ioni metallici con attività redox sono quindi ampiamente sfruttati per l'attivazione catalitica di piccole molecole quali l'ossigeno e l'acqua ossigenata, per reazioni di ossidazione, incluse le autoossidazioni radicaliche di substrati organici.

1.3 Uso di TMSP come sistemi biomimetici per attività di ossidasi e catalasi

Per alcuni TMSP è stata evidenziata un'attività biomimetica di tipo mono e di- ossigenasi.¹⁸ Le analogie strutturali tra TMSP contenenti

Ferro e sistemi enzimatici sono infatti particolarmente evidenti (Schema 1.2).



Schema 1.2- TMSP contenenti ioni Fe(III) paragonati con il sito catalitico di metalloenzimi.

Nel gruppo di ricerca in cui è stato svolto l'internato di tesi è stato preparato un complesso sostituito con quattro ioni Ru(IV): il $\{\text{Ru}_4(\mu\text{-OH})_2(\mu\text{-O})_4(\text{H}_2\text{O})_4[\gamma\text{-SiW}_{10}\text{O}_{36}]\}^{10-}$ (RuPOM) (figura 1.6). Tale complesso è stato parallelamente preparato e studiato anche dal gruppo del prof. C. L. Hill.^{19,20}

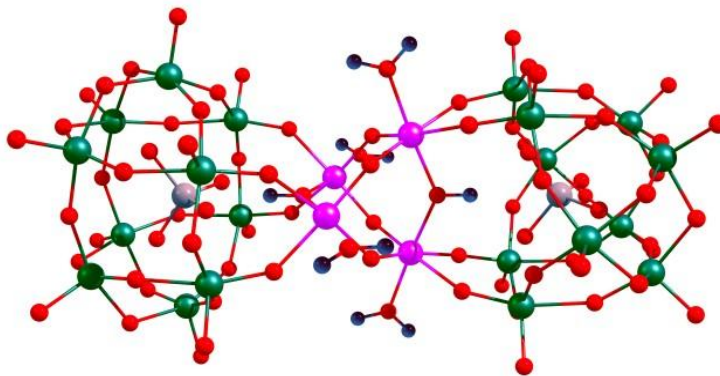
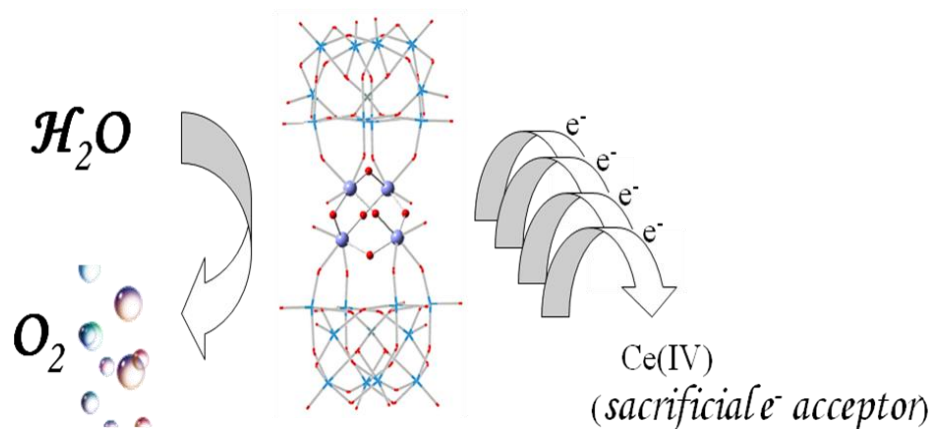


Figura 1.6-Struttura balls and sticks di $\{\text{Ru}_4(\mu\text{-OH})_2(\mu\text{-O})_4(\text{H}_2\text{O})_4[\mu\text{-SiW}_{10}\text{O}_{36}]\}^{10-}$.

Nel RuPOM, riportato in Fig. 1.6, due unità di $\text{SiW}_{10}\text{O}_{36}$ coordinano un *core* tetrarutenato di tipo adamantanoide. In questo caso sono riconoscibili analogie strutturali con il sito catalitico del fotosistema II (PSII), che è caratterizzato dalla presenza di un cluster polinucleare contenente quattro atomi di manganese e un atomo di calcio, tenuti insieme da ponti ossigeno (CaMn_4O_x). Tale centro catalitico risulta essere efficiente per l'evoluzione di ossigeno mediante ossidazione dell'acqua, un processo ossidativo complesso che coinvolge quattro elettroni e quattro protoni.

In questo contesto, anche il RuPOM dispone di diversi stati di ossidazione accessibili, dispone di siti per coordinare molecole di acqua, permette di agevolare trasferimenti protonici attraverso la formazione di legami ad idrogeno, ed è in grado di formare specie alto valenti di Ru-oxo-, ritenute responsabili della formazione del legame ossigeno-ossigeno.

L'attività catalitica del complesso RuPOM per l'ossidazione dell'acqua è stata studiata in presenza di ossidanti sacrificali quali Ce (IV) e $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{3+}$.^{19,21} In presenza di un eccesso di Ce (IV), si ottengono fino a 500 cicli catalitici (calcolati come moli di ossigeno per mole di catalizzatore impiegato), con una frequenza di turnover iniziale di $0,125 \text{ s}^{-1}$.²²



Schema 1. 3- Schema di ossidazione dell' H_2O ad opera del RuPOM in presenza di un accettore sacrificiale di elettroni.

Il meccanismo di reazione prevede il trasferimento sequenziale di 4 elettroni all'acceptore terminale, per formare una specie di rutenio alto valente in grado di ossidare l'acqua in un unico stadio, svolgendo ossigeno e ripristinando lo stato iniziale (Schema 1.3).²³**Errore. Il segnalibro non è definito.**

Tale catalizzatore può agire anche in sistemi fotoattivati, in presenza di sensibilizzatori organici a base di polipiridine di rutenio (II).²⁴

Questi risultati sono di considerevole importanza per l'obiettivo finale della preparazione di fotoanodi da utilizzare in celle fotoelettrocatalitiche (PEC) in grado di utilizzare il potenziale della luce solare per la scissione della molecola di acqua nei suoi componenti ad alta energia ovvero: ossigeno, e idrogeno.

A tale scopo, è fondamentale lo studio di materiali nano-strutturati per costruire l'interfaccia tra i catalizzatori molecolari e la superficie elettrodica. L'obiettivo è di ottenere materiali nanoassemblati, che esibiscono una vasta distribuzione di siti catalitici (array catalitici) ad elevata area superficiale. Questo approccio consente di massimizzare l'efficienza, utilizzando la minore quantità possibile di materiali relativamente costosi.

Nanotubi di carbonio, decorati con dendroni policationici a base di poli(ammidoammina) (PAMAM) sono stati usati con successo come materiali templanti e di supporto per questo catalizzatore molecolare.^{25,22}

Mentre i nanotubi a parete singola di carbonio (SWCNTs) sono stati a lungo considerati come componenti promettenti di fotoanodi in dispositivi fotovoltaici,^{26,27} per la loro eccellente mobilità elettronica e forma unidimensionale,²⁸ l'utilizzo di MWCNT (multiwalled carbon nanotubes) permette di conservare le proprietà di conducibilità anche dopo funzionalizzazione delle pareti esterne.

Questo approccio, utilizzato dal gruppo di ricerca di Padova, ha permesso quindi di migliorare il contatto elettrico tra il centro multi-redox (RuPOM) e la superficie dell'elettrodo utilizzando MWCNT, come mostrato in figura 1.7. I MWCNT, in questo materiale composito, svolgono una molteplice funzione:

- forniscono un supporto eterogeneo al catalizzatore;
- controllano la morfologia del materiale;
- aumentano la superficie;²⁹
- favoriscono e direzionano il trasferimento di elettroni

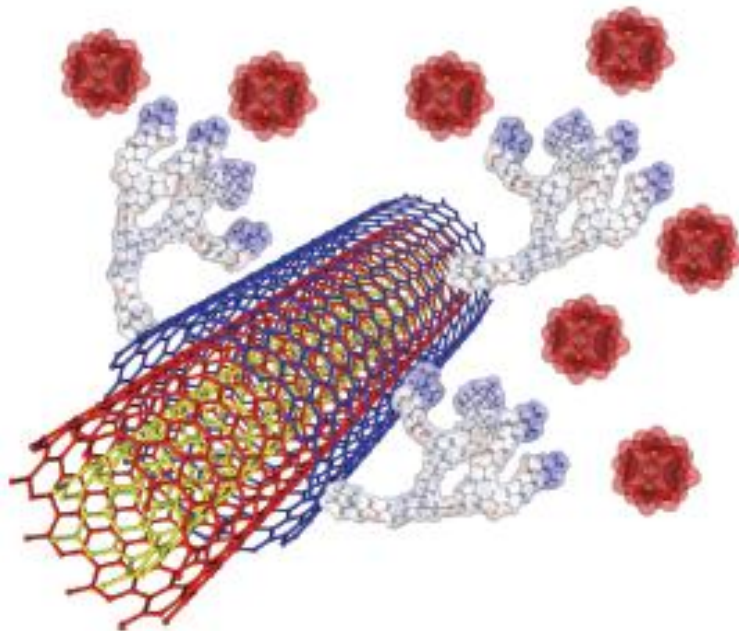
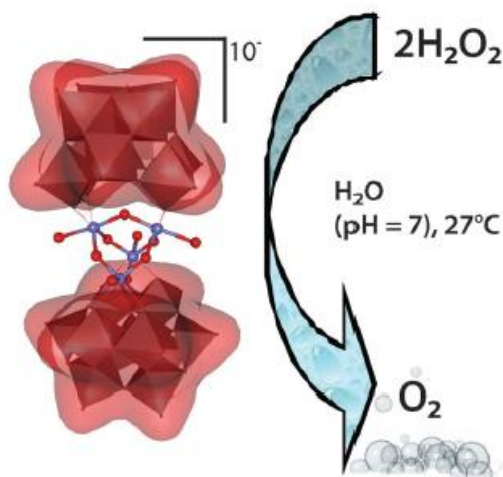


Figura 1.7- Immobilizzazione elettrostatica del RuPOM da parte dei dendroni policationici (PAMAM) presenti sulla superficie del MWCNT.

L'approccio globale imita la fotosintesi naturale (PSII), in quanto l'obiettivo finale consiste nella fabbricazione di efficienti elettrodi nanostrutturati per la produzione in continuo di H₂ e O₂ dall'acqua tramite elettrocatalisi. Infatti mentre la semi-reazione di riduzione nella

scissione dell'acqua è noto che procede facilmente in presenza di colloidali di platino, la controparte ossidativa ($2\text{H}_2\text{O} \rightarrow 4\text{H}^+ + \text{O}_2 + 4\text{e}^-$) pone le maggiori difficoltà in termini di endotermicità, e complessità meccanicistiche e molecolari. Solo pochi catalizzatori omogenei sono noti in grado di effettuare l'ossidazione dell'acqua con alte prestazioni e con molti cicli catalitici.

Il RuPOM presenta anche un'attività biomimetica come catalasi, cioè decomposizione di acqua ossigenata ad acqua e ossigeno, con attività di due ordini di grandezza superiore rispetto a POM sostituiti con altri metalli di transizione.³⁰ Quando H_2O_2 viene aggiunta ad una soluzione acquosa di RuPOM in tampone fosfato a $\text{pH} = 7$, si osserva una vigorosa evoluzione di ossigeno, con decomposizione quantitativa del perossido. Il processo di evoluzione di ossigeno continua almeno per 3000 turnover, definiti come le moli di H_2O_2 decomposte per mole di catalizzatore.³⁰



Schema 1. 4-Schema di decomposizione dell'acqua ossigenata ad opera del RuPOM.

Questo tipo di attività ha permesso la realizzazione di semplici materiali (POM associato a nanotubi o a polimeri cationici) in grado di muoversi sfruttando l'acqua ossigenata come propulsore chimico, grazie allo sviluppo di bollicine di ossigeno.³⁰

Inoltre, è in corso di studio nei nostri laboratori, la possibilità di sfruttare questa reattività per lo smaltimento di specie ossigenate reattive (ROS) presenti nei sistemi biologici.

Le ROS normalmente presenti nelle cellule sono l'anione superossido, il radicale idrossido e l'acqua ossigenata.³¹ Diversi fattori possono comportarne l'aumento incontrollato, con effetti distruttivi per le cellule.

Il perossido di idrogeno si forma a partire dalla dismutazione del superossido. Normalmente non è tossico, in quanto viene rapidamente neutralizzato dagli enzimi come la catalasi e glutatione perossidasi. Il rischio ad esso associato è dovuto alla capacità di attraversare velocemente le membrane cellulari, diffondendo in altri distretti dove può attivare processi perossidativi. Può inoltre reagire con ferro o rame ridotti (reazione di Fenton) e portare alla produzione del radicale ossidrilico, che provoca danni alla membrana plasmatica, alle proteine e agli acidi nucleici.

Sistemi molecolari basati su POMs hanno un potenziale interesse in medicina:³²

- (i) come antivirali, grazie all'inibizione selettiva, in vitro, di enzimi (trascriptasi inversa; polimerasi) o delle proteine di superficie di diversi virus, inclusi quelli dell' HIV-1, HIV-2, dell'herpes e del citomegalovirus e della Flaviviridae (che comprende febbre gialla, dengue, ed epatite C) come antitumorali, attraverso l'inibizione della crescita di diverse cellule tumorali.^{33,34} Il meccanismo di azione antitumorale è prevalentemente basato sulla loro attività redox, che porta alla frammentazione del DNA, mentre alcuni hanno mostrato

complessazione con la flavina mononucleotide, inibizione della chinasi CK2, o la formazione di corpi apoptotici.^{35,36,37,38}

La veicolazione di RuPOM con attività di tipo CAT potrebbe espandere le potenzialità di questa classe di composti, che risulterebbero utili per la disattivazione di meccanismi ossidativi da parte di ROS, anche responsabili di malattie degenerative. Non sono ancora note, inoltre, le eventuali proprietà antitumorali o antivirali del RuPOM.

Gli ostacoli principali relativi all'utilizzo di POM in ambito farmacologico sono dovuti alle scarse solubilità (hanno masse elevate) e stabilità nelle normali condizioni fisiologiche, e alla loro potenziale tossicità. Lo studio dell'interazione fra POM e biomolecole, quindi, oltre ad essere utile per la comprensione dell'attività biologica dei POM, consente la progettazione di sistemi selettivi di veicolazione (*drug delivery*) dei polianioni, capaci di superare tali limitazioni.^{39,40}

1.4 Uso di macromolecole biogeniche come templanti

Date queste premesse, relative all'utilizzo di POM in nanodispositivi per la conversione dell'energia e come farmaci molecolari inorganici (*small inorganic drugs*), appare evidente come sia necessario individuare nuovi materiali ibridi che permettano il confinamento e/o l'assemblaggio ordinato, controllato, e riproducibile di complessi poliossometallati. Per soddisfare le esigenze di entrambi gli ambiti, materiali biogenici (di origine biologica) potrebbero costituire una interessante alternativa a CNT ed altre nanoparticelle.

Le biomolecole possiedono infatti numerosi siti funzionali ionizzabili o reattivi (prevalentemente ammine e gruppi carbossilici) che possono essere sfruttati per il disegno di sistemi bio-coniugati integranti complessi poliossometallati.

Nel corso del lavoro di tesi sono stati sperimentati due tipi di supporti a base di materiale biogenico: il virus del mosaico del tabacco e alcuni

polisaccaridi, che verranno presentati nei prossimi paragrafi. In entrambi i casi sono state studiate interazioni di tipo non covalente con poliossometallati

1.5 Interazione di POM con supporti di natura proteica: il virus del mosaico del tabacco (TMV)

L'interazione tra poliossometallati e sistemi proteici, può essere controllata variando in maniera opportuna la polarità, la distribuzione di carica, la forma e l'acidità del polianione. Uno studio, condotto sull'albumina da siero umano (HSA), ha dimostrato come l'interazione di tipo elettrostatico di due diversi POMs, quali $[H_2W_{12}O_{40}]^{6-}$ e $[NaP_5W_{30}O_{110}]^{14-}$, con l'HSA sia favorita dalla presenza di una tasca proteica contenente i residui di Arg257, Arg222, Lys199, His242, Arg218, e Lys 195.^{41,42,43}

Una pubblicazione più recente ha riportato uno studio relativo all'interazione di POM di diversa natura con proteine del tipo β -amiloidi, responsabili della formazione di placche coinvolte nella degenerazione cellulare che avviene con la Sindrome di Alzheimer. In tale ricerca, si è visto come POM diversi, grazie ad interazioni di tipo elettrostatico, possano legarsi a domini proteici contenenti una densità di carica positiva più elevata (dovuta a residui di lisina e istidina), prevenendo la aggregazione di tali residui e la formazione di fibre e delle placche stesse.⁴⁴

Una particolare classe di sistemi proteici, come già citato precedentemente, è costituita dai capsidi virali. In questo caso l'interesse è dato dalla possibilità di sfruttare la superficie proteica esterna sia come materiale templante (morfologia 1D), sia come supporto. I virus hanno diverse caratteristiche che sono adatte per la fabbricazione di nano materiali, tra le quali:

- Le dimensioni del virus sono nella gamma di poche decine a centinaia di nanometri, che è paragonabile alle dimensioni di nano particelle e nanotubi.⁴⁵
- I virus hanno precise dimensioni e struttura (monodispersione), in contrasto con i nanomateriali artificiali, soprattutto se preparati mediante approcci top-down.^{46,47}
- Auto-assemblaggio e funzionalità di superficie delle proteine del capsido possono essere controllati da mutagenesi specifiche.

Gli studi sul TMV come materiale templante si basano sulla sua capacità di formare fibre e fasci, sfruttando la sua forma tubolare (*rodlike*), mostrata in figura 1.8. Tale ordine a livello molecolare è stato già sfruttato nei campi di applicazione *shape-dependent*, cioè per i dispositivi elettronici, la sensoristica, l'*imaging* e la nano medicina.^{48,49,50}

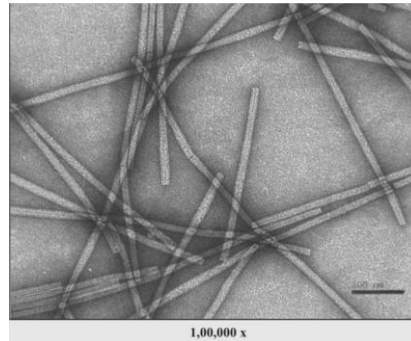


Figura 1.8-Microscopia elettronica (TEM) di TMV

Il TMV viene estratto dalla pianta infetta del tabacco (figura 1.9) tramite vari step:

1. Centrifugazione in presenza di K_3PO_4 ,
2. Aggiunta di $CHCl_3$:1-Butanolo 1:1
3. Precipitazione con PEG-6000 e NaCl
4. Risospensione e Centrifugazione
5. Risospensione

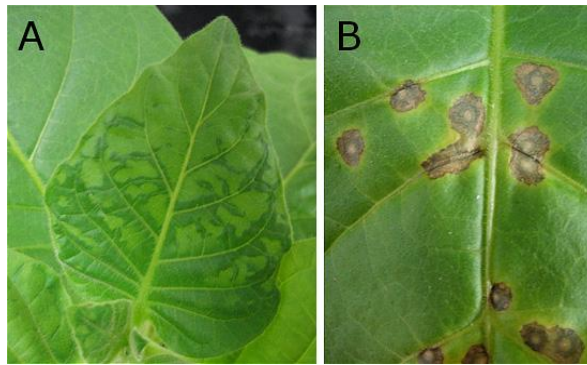


Figura 1.9-Infezione da Tobacco Mosaic Virus su una pianta di *Nicotiana tabacum*

La struttura tubolare del TMV è creata dal self-assembly di 2130 proteine identiche del capsid, che si impilano in una elica destrorsa e racchiudono il singolo filamento di RNA. Il TMV presenta una lunghezza di 300 nm, un diametro interno di 4 nm ed uno esterno di 18 nm; è biologicamente stabile a pH compresi tra 2.5 e 9 e fino ad una temperatura di 90°C.^{51,52,53}

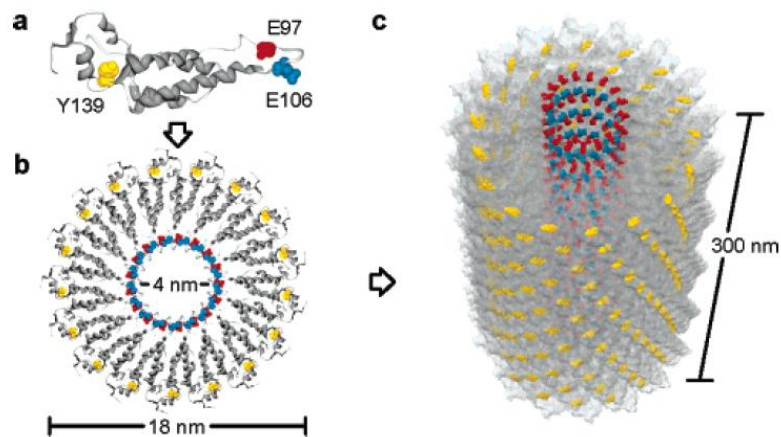


Figura 1.10-Rappresentazione schematica della struttura del TMV

Il punto isoelettrico del TMV è 3.4;⁷⁴ la superficie del TMV è infatti carica negativamente a pH neutro, a causa della presenza di gruppi carbossilici e tirosinici sulle superfici, rispettivamente, interne ed esterne. Sono noti diversi lavori riguardanti la modificazione covalente

di tali residui, come pure alcuni tentativi di modificare la distribuzione degli amminoacidi componenti mediante biotecnologie.^{54,55,56}

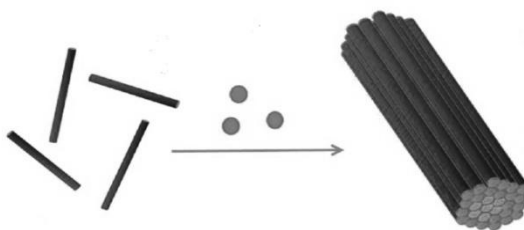
In soluzione acquosa, infatti, ed in determinate condizioni di pH e forza ionica, il TMV si associa sia tramite interazioni testa-coda che interazioni laterali, essendo identica la morfologia di ogni giro di elica del virus.^{57,58}

Il controllo delle proprietà della superficie può essere sfruttato per la fabbricazione di sistemi ibridi organici/inorganici, partendo proprio dalla deposizione di sostanze inorganiche sul virus. Tali nanomateriali ibridi hanno mostrato grandi potenzialità nei campi della catalisi, della nanoelettronica e delle energie rinnovabili.^{59,60,61,62,63}

Un esempio di tali potenzialità nel campo della nano elettronica è stato mostrato da Royston et al. nel lavoro di deposizione di ossidi metallici, su modelli di virus, per preparare semiconduttori uniformi o nanomateriali fotoelettronici.⁶⁴ Inoltre è stato fatto uno studio per vedere come varia la conducibilità elettrica al variare dello spessore di uno strato continuo di Pt depositato su TMV.⁶⁵ Sistemi ibridi metallo-TMV sono stati anche sfruttati per la produzione di batterie.⁶⁶ Le prestazioni dell'elettrodo batteria sono state aumentate mediante uno allineamento di compositi Ni / Si / TMV, preparati mediante *Physical Vapor Deposition* (PVD).⁶⁷ Allineando verticalmente il TMV, aumenta la superficie disponibile per la deposizione di cluster metallici, migliorando la capacità dell'elettrodo.⁶⁸

Nell'approccio più semplice, si possono sfruttare le cariche negative naturalmente presenti, per associare cationi e policationi. Ioni metallici bivalenti come Cd, Zn, Ba, sono stati usati per ottenere strutture aggregate, assemblaggi o la cui struttura e morfologia dipende dalla natura del catione.^{69,70} Ioni come lo Zn^{2+} o il Cd^{2+} , ad esempio, promuovono la precipitazione del TMV dalla soluzione di reazione una volta raggiunta una concentrazione critica, che è funzione del controcatone, del pH della soluzione e della forza ionica della stessa. In

presenza di tali ioni bivalenti, il TMV si associa in strutture ordinate monodimensionali dove i metalli fungono da ponte per il cross-linking di fasci di TMV.⁷¹ In presenza di Ba^{2+} invece, una volta raggiunto il rapporto molare critico tra ione bivalente e TMV, i residui virali si associano mostrando impaccamento a sezione esagonale (schema 1. 5). Il vantaggio di tale studio risiede nella possibilità di ottenere strutture ordinate di virus senza necessità di lavorare ad alte concentrazioni,⁷⁴ condizione necessaria per ottenere *nanorods* ordinati in presenza di altri ioni multivalenti che neutralizzano le cariche negative della superficie virale e ne permettono l'attrazione reciproca.^{72,73}



Schema 1. 5- Rappresentazione schematica dell'organizzazione reciproca dei residui di TMV in presenza di ioni Ba^{2+} .⁷⁴

In altri esempi, polimeri cationici come la polianilina o il polipirrolo protonati sono stati direttamente polimerizzati sulla superficie del TMV, che, agendo da template, ha permesso la formazione di fibre allungate grazie all'associazione testa-coda dei residui virali. La polianilina, infatti, permette la formazione di nano fibre monodimensionali allungate poiché favorisce l'allineamento testa-coda dei residui virali,, prevenendo contemporaneamente l'associazione laterale degli stessi a causa di un aumento delle repulsioni steriche tra le catene di polimero altamente cationico.^{75,76,77}

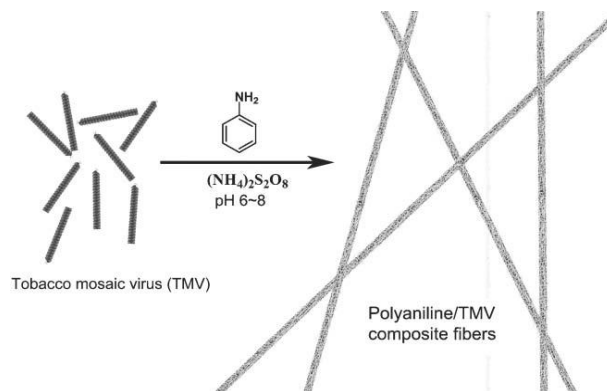
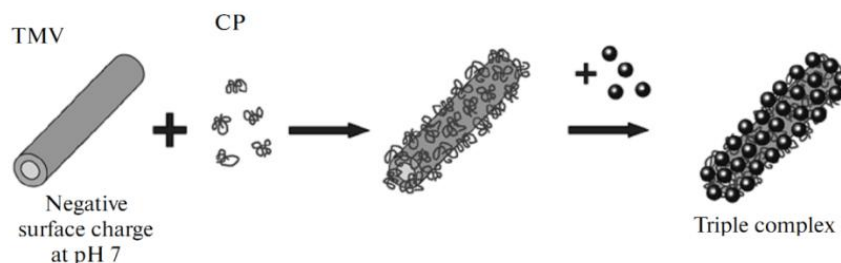


Figura 1.11- Formazione di fibre per polimerizzazione della anilina sulla superficie del TMV

Una volta rivestito il virus con tali polimeri policationici (CP) è stato inoltre possibile decorare la superficie virale depositando specie cariche negativamente, in modo da ottenere una disposizione di specie bioattive (BAC) sulla superficie virale, e quindi facilmente veicolabili all'interno della cellula.



Schema 1.6- Formazione del triplo complesso TMV-Polimero Policationico-Specie bioattiva

Un esempio di ciò è mostrato dal lavoro di Nikitin et al. che hanno utilizzato uno “spacer” policationico come l' N-etil poli 4-vinil piridina, mostrato in figura 1.12, per immobilizzare albumina, per via non covalente, sulla superficie virale termicamente modificata.⁷⁸ Tale approccio è stato utilizzato per formare nano particelle sferiche da sfruttare come carriers di BAC, quali: farmaci, enzimi, antigeni di varie patologie umane.

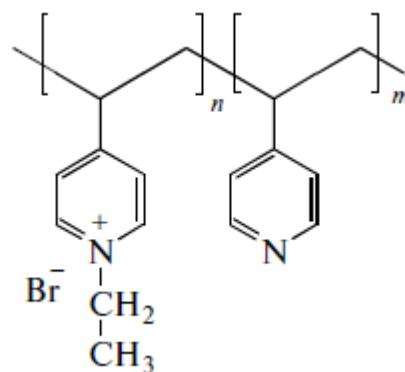
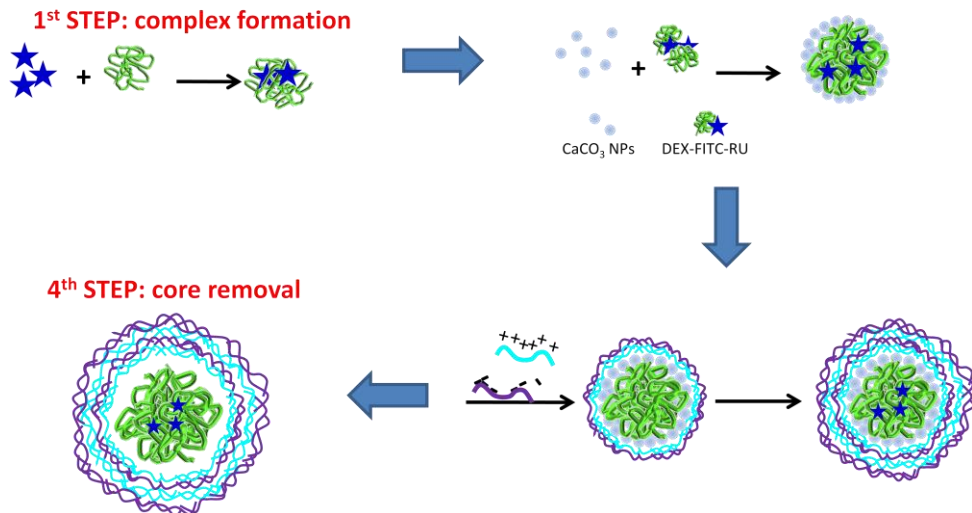


Figura 1.12- N-etil poli 4-vinil piridina

1.6 Interazione con supporti polisaccaridici: assembly layer by layer di microcapsule

I polisaccaridi sono difficili da utilizzare come materiali di supporto. Solitamente formano degli aggregati irregolari che richiedono agenti reticolanti per impartire stabilità al sistema assemblato (es: chitosano e tripoli fosfato, destrano e CaCO₃, carbossimetil chitosano e CaCl₂, chitosano e glutaraldeide).^{79,80,81,82} E' infatti comune l'impiego della procedura di gelificazione ionica nei casi in cui ioni o polianioni vengono utilizzati come reticolanti, grazie a interazioni elettrostatiche. In queste condizioni, è possibile utilizzarli come agenti templanti per la costruzione di capsule polimeriche multistrato (PMC). Le PMC sono particelle di dimensioni variabili, preparate mediante assemblaggio layer-by-layer (LbL)⁸³ di polimeri sopra un substrato sferico (sacrificale), seguito dalla decomposizione di tale substrato.^{84,85} Sistemi capsulari, quindi, consistono tipicamente in un struttura "core-shell" (Schema 1.7). Il core, ottenuto dopo rimozione del templatto sacrificale, costituisce il volume sostanziale della capsula, è il luogo in cui piccole molecole e macromolecole possono essere incapsulate, in modo tale da gestire la loro biodistribuzione, la solubilità e la reattività.

La “shell” è costruita tramite l’adsorbimento consecutivo di polimeri a carica opposta attorno al templatato sferico centrale.



Schema 1. 7- Schema generale di sintesi di micro-capsule

Nei sistemi più complessi, core e guscio possono essere caricati separatamente con diverse molecole funzionali, incluse molecole luminescenti, utili a seguire la localizzazione delle particelle stesse attraverso tecniche di fluorescenza.

Spesso gli strati sono permeabili alle piccole molecole, e disegnati in modo da permettere il rilascio controllato delle specie attive incapsulate o racchiuse tra gli strati stessi, in seguito a stimoli (pH, radiazioni) o bio-degradazione.⁸⁶ Macromolecole come i polisaccaridi possono essere inserite come templanti per impartire stabilità alla capsula, o per garantire l’ancoraggio di molecole da trasportare.^{87,88} Di seguito vengono descritti brevementi i polisaccaridi utilizzati.

a) Chitosano

Il chitosano è un polimero naturale ottenuto dalla deacetilazione della chitina. E’ composto da D-glucosamina e N-acetil-D-glucosamina,

legate tramite legami $\beta(1-4)$. Di notevole interesse nel campo delle nanotecnologie, la possibilità di utilizzare strutture costituite da chitosano come veicolo per farmaci.^{89,90} Esso, infatti, è un polisaccaride biocompatibile, non tossico e biodegradabile. A differenza della chitina, insolubile nella maggior parte dei solventi, il chitosano risulta solubile in molti solventi organici a pH inferiori al pKa dello stesso: 6.5 (Il punto isoelettrico del Chitosano è 6.4⁹¹).^{92,93} La biocompatibilità del chitosano è confermata, anche, dall'attuale utilizzo di tale composto come ingrediente di molte diete ipocaloriche. Infatti i gruppi amminici presenti nella sua struttura, a forte polarità positiva attirano i gruppi carbossilici a carica negativa degli acidi grassi (colesterolo, trigliceridi) e di quelli biliari. Questi legami di tipo elettrostatico, non possono essere scissi dagli enzimi del nostro apparato digerente e di conseguenza non possono essere assorbiti per via intestinale. Il polimero che si è formato viene escreto assieme a tutte le sostanze inglobate.^{94,95,96}

b) Destrano

E' un glucano: famiglia di polisaccaridi costituiti da molte molecole di glucosio. È composto da catene di varia lunghezza (da 3 a 2000 kDalton) ed è molto utilizzato nel campo medico come antitrombotico, dato che permette la riduzione della viscosità del sangue.

Dal punto di vista chimico le catene sono formate da legami $\alpha-1,6$ glicosidici tra le varie molecole di glucosio, mentre le ramificazioni avvengono tramite legami $\alpha-1,3$.

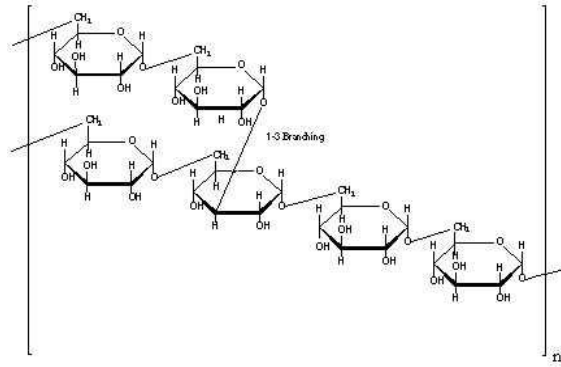
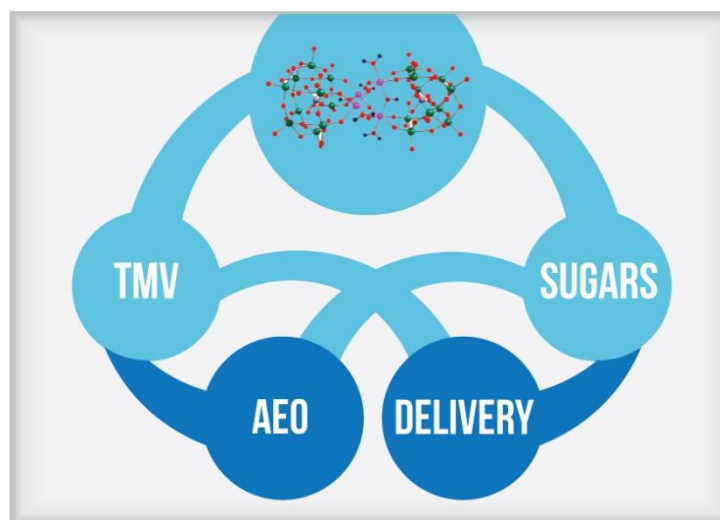


Figura 1.13. Destrano

Il destrano è ampiamente studiato per il suo efficace utilizzo come vettore polimerico nei nuovi sistemi di drug delivery. **Errore. Il segnalibro non è definito.**⁹⁷

1.7 Scopo della tesi

Il progetto di ricerca in cui si inserisce tale tesi, riguarda la realizzazione di dispositivi e intorni nanostrutturati contenenti il RuPOM, tali da consentirne l'utilizzo in diversi ambiti applicativi, sfruttando le proprietà biomimetiche del complesso in esame.



Schema 1.8

Il primo scopo dell'attività di ricerca in cui si inserisce tale lavoro riguarda l'ottenimento di nano materiali potenzialmente utilizzabili per la scissione della molecola di acqua, con l'obiettivo finale di ottimizzare sistemi foto sintetici, dove la luce solare viene convertita e immagazzinata (storage) in legami chimici ad alta energia, utilizzabili come "carburanti" solari, quali appunto l'idrogeno.

In tale ambito di ricerca rientra lo studio delle possibili interazioni tra catalizzatore e supporto virale (TMV), che prevede di sfruttare i virus come piattaforme nanostrutturate, grazie alla loro sequenza altamente ordinata di residui proteici, alla loro robustezza e rigidità, che può guidare l'organizzazione su scala nanometrica dell'unità catalitica mediante interazioni non covalenti.

Inoltre, una volta supportato su tale materiale biogenico, considerando che il TMV è un virus delle piante che non risulta infettivo nei confronti di altri organismi e di conseguenza non presenta un rischio biologico, esso potrebbe anche essere veicolabile in ambiente cellulare dove sono esplicabili le applicazioni farmacologiche del RuPOM, che presenta un'attività di tipo catalasi, per la decomposizione delle ROS.

Parallelamente all'utilizzo di tale supporto biogenico, sono stati studiati supporti di natura polisaccaridica, quali chitosano e destrano, che permettono di formare nanoparticelle stabili e veicolabili all'interno della cellula. In questo caso, per impartire maggior stabilità ai materiali compositi, sono state utilizzate capsule a base di polimeri polielettroliti per il loro confinamento. Il lavoro di tesi ha previsto anche la raccolta di dati preliminari sull'uso di polisaccaridi contenenti molecole fluorescenti, per seguire la localizzazione di tali particelle.

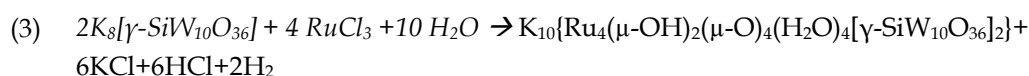
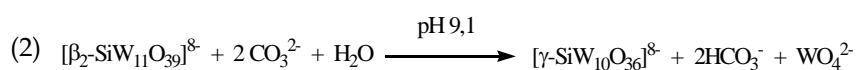
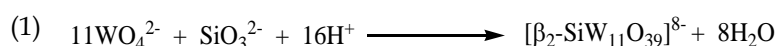
Anche per tali sistemi capsulari, sono stati esplorati diversi campi di applicazione. Per quanto riguarda l'attività di evoluzione di ossigeno, la

possibilità di inserire anche un foto sensibilizzatore tra gli strati polimerici potrebbe essere sfruttata quale modello di sistemi foto sintetici assemblati, controllando la geometria e la distanza dei componenti foto attivi e dei centri catalitici.

2. Risultati e Discussione

Il lavoro di tesi è stato prevalentemente dedicato allo studio delle interazioni del polioossometallato con supporti nano strutturati di natura biogenica.

Come anticipato nell'introduzione, il polioossometallato $\{\text{Ru}_4(\mu\text{-OH})_2(\mu\text{-O})_4(\text{H}_2\text{O})_4[\gamma\text{-SiW}_{10}\text{O}_{36}]\}^{10-}$, è stato scelto per le interessanti proprietà biomimetiche: l'attività ossidasi, per ossidazione dell'acqua in un processo simile a quello del Fotosistema II (PS-II) e l'attività come catalasi (CAT) per la decomposizione dell'acqua ossigenata a ossigeno. Il complesso è stato preparato a partire dai precursori Na_2WO_4 , Na_2SiO_3 , RuCl_3 , in tre passaggi: (i) sintesi del precursore bivacante $\beta\text{-SiW}_{11}\text{O}_{39}^{8-}$, (ii) conversione del POM monovacante a POM divacante $\gamma\text{-SiW}_{10}\text{O}_{36}^{8-}$, (iii) formazione del core tetra-rutenato, con struttura adamatanoide, stabilizzato grazie alla coordinazione di due unità $\gamma\text{-SiW}_{10}\text{O}_{36}$.



Schema 2.1- Schema di sintesi del $\{\text{Ru}_4(\mu\text{-OH})_2(\mu\text{-O})_4(\text{H}_2\text{O})_4[\gamma\text{-SiW}_{10}\text{O}_{36}]\}^{10-}$

Essendo complessi paramagnetici, la caratterizzazione è stata eseguita solo tramite spettroscopia FT-IR e UV-Vis, che permette un rapido confronto con i dati di letteratura.

I segnali FT-IR più rilevanti sono situati nella zona compresa tra 1000 e 600 cm^{-1} , dove sono focalizzati gli stretching dei legami caratteristici della struttura inorganica di POMs:

- 1000 cm^{-1} (m): stretching dei legami Si-O
- 960 cm^{-1} (s): stretching dei legami W-O
- 784-875 cm^{-1} (s): stretching dei legami W-O-W
- 544 cm^{-1} (m): bending dei legami Si-O-Si e W-O-W

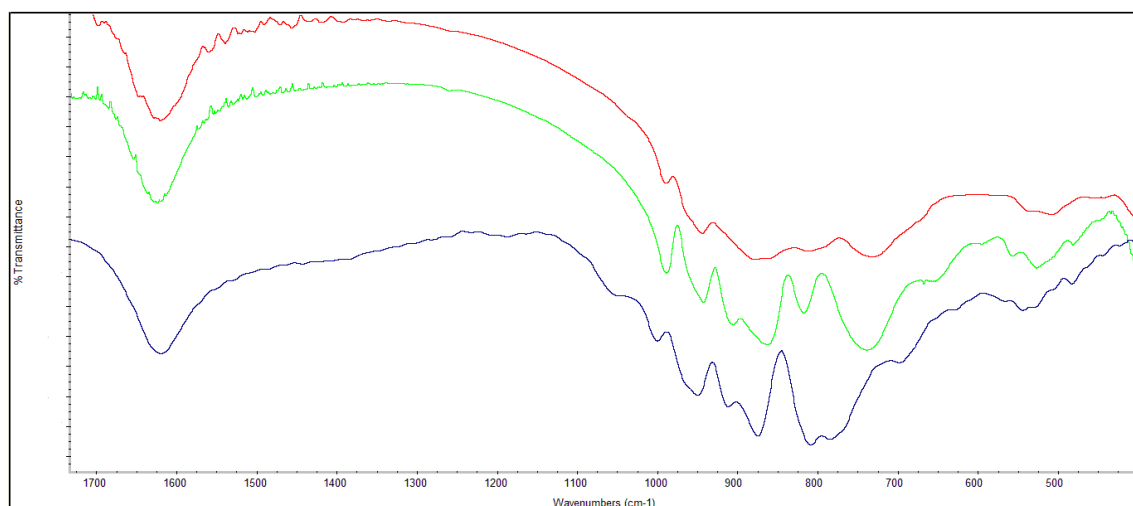


Figura 2.1- Spettri IR dei POM sintetizzati: $\beta\text{-SiW}_{11}\text{O}_{39}$ (rosso), $\beta\text{-SiW}_{10}\text{O}_{36}$ (verde), $\gamma\text{-Ru}_4(\text{SiW}_{10}\text{O}_{36})_2$ (blu).

L'introduzione del core tetrarutenato è dimostrata dallo spostamento di tutti i segnali, rispetto al precursore, verso maggiori numeri d'onda. Questo comportamento è atteso, sulla base di una maggior rigidità e stabilità del complesso dimerico.

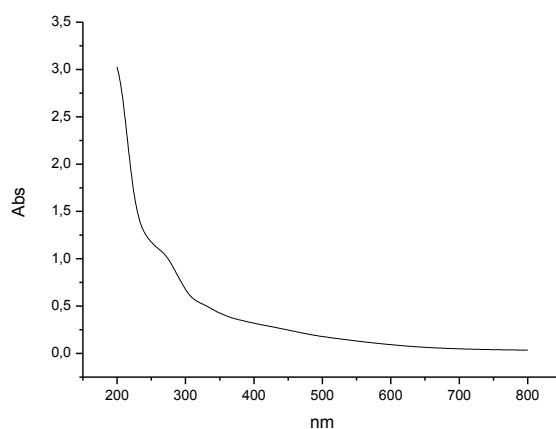


Figura 2.2- Spettro di assorbimento UV-VIS del RuPOM sintetizzato

Lo spettro UV del RuPOM mostra un assorbimento caratteristico a 280 nm dovuto al contributo di bande di transizione di carica O→W ed alle transizioni d→d del Ru(IV).

I supporti di tipo biogenico sono sostanzialmente di natura proteica (virus del mosaico del tabacco) e polisaccaridi (chitosano, destrani). La possibilità di sfruttare ben 10 cariche anioniche sulla superficie del POM ha permesso di studiare la coniugazione con tali supporti mediante interazioni di tipo elettrostatico,. L'associazione tra i due domini è stata monitorata mediante diverse tecniche: spettroscopia di fluorescenza e di assorbimento, analisi DLS (Dynamic light scattering) e Z-Potential, SEM e TEM.

L'analisi DLS permette di valutare la variazione delle dimensioni delle particelle in soluzione, in presenza del POM. L'analisi Z-Potential, molto utile nel caso in cui le particelle siano troppo grandi o non sferiche, permette di monitorare la variazione della carica superficiale delle particelle presenti in soluzione. Infine le microscopie elettroniche permettono di confermare l'integrità e la morfologia a diversi livelli dei materiali compositi.

2.1 Interazione tra Complessi Poliossometallati (POM) e Virus del Mosaico del Tabacco (TMV)

L'agente patogeno TMV ha una struttura ottimale per la preparazione di sistemi 1D nanostrutturati. Ha infatti una forte tendenza ad aggregare (testa-coda) per dare nano-fibrille allungate. La formazione di tali fibre sembra essere facilitata dalla presenza di ioni bivalenti e rivestimenti polimerici policationici, che interagiscono con la struttura originaria del TMV neutralizzando parzialmente la carica negativa superficiale, dovuta ai numerosi residui tirosinici. Tale strategia risulta quindi anche conveniente per una successiva interazione con il

polianione inorganico. Per la preparazione di ibridi POM-TMV sono stati quindi utilizzati, capsidi virali come tali, protonate, trattate con ioni Zn^{2+} o con complessi di coordinazione carichi (quali il $Ru(bpy)_3^{2+}$), e con policationi organici.

2.1.1 Interazione tra TMV e RuPOM a pH neutro.

La prima prova effettuata ha riguardato lo studio spettroscopico della interazione tra il TMV e il RuPOM a pH 7, stabilendo un primo controllo delle condizioni sperimentali da ottimizzare per i passaggi successivi. Tale interazione è stata monitorata, seguendo il quenching di fluorescenza dei residui triptofanici della proteina indotto da aggiunte successive di RuPOM.

E' stata quindi utilizzata una λ_{exc} pari a 270 nm, per eccitare i residui triptofanici presenti sul TMV, mentre la fluorescenza è stata monitorata ad una $\lambda_{max}=310$ nm. In queste condizioni, si è osservato quenching totale della fluorescenza dopo l'aggiunta di $2,67 \times 10^{-6}$ moli di RuPOM (15 mg RuPOM/ 1 mg TMV).

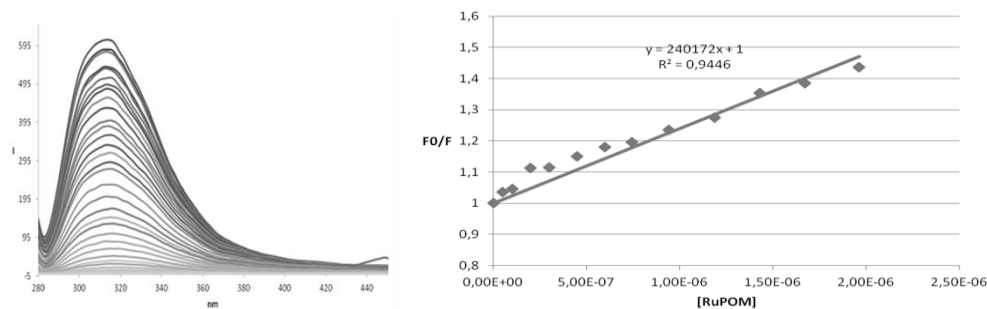


Figura 2.3- Quenching di fluorescenza sui residui triptofanici ad opera del RuPOM a pH neutro e relativo grafico di Stern-Volmer.

Dal quenching di fluorescenza è possibile risalire alla costante di binding dell'interazione tra TMV e RuPOM: il grafico di Stern-Volmer mostra che la costante di binding tra TMV e RuPOM a pH neutro è $2,4 \times 10^5$ M^{-1} (Vedi appendice sull'utilizzo della correlazione di Stern-

Volmer). La curvatura verso l'alto del grafico, per concentrazioni maggiori, suggerisce che si tratta di un quenching di tipo statico, che implica la formazione di una associazione tra il RuPOM e la superficie del virus.⁹⁸ Questo comportamento e il valore della costante di binding sono in accordo con dati di letteratura relativi all'interazione tra analoghi complessi poliossometallati e albumina del siero umano (HSA).⁹⁹

L'associazione tra il TMV e il RuPOM è stata anche confermata tramite studi di DLS, che rivelano la evoluzione di strutture aggregate in soluzione (Fig. 2.4). Infatti rispetto all'esperimento di controllo sul TMV isolato registrato in analoghe condizioni (Fig.2.4 in alto), si nota una crescita di aggregati a raggio idrodinamico maggiore (da 300 nm a 800-1000 nm) e con minore polidispersione, (Fig. 2.4 sotto)

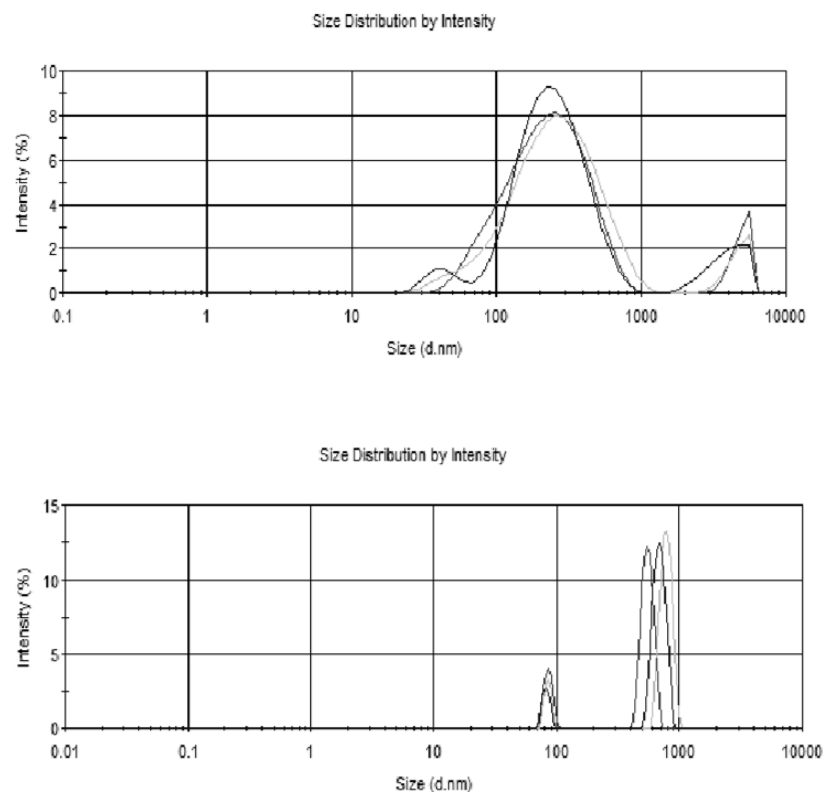


Figura 2.4 - Grafico rappresentante le tre analisi DLS effettuate in sequenza su campioni di TMV isolato a pH neutro (sopra) e di TMV+RuPOM (sotto).

In queste condizioni, i valori di Z-Potential sono negativi e distribuiti in un range relativamente ampio, prevalentemente tra 0 e -50 mV. Dalla media delle tre misure si riscontra comunque uno spostamento a valori più negativi, pari a circa 10 mV (da -16 mV a -25 mV) in seguito all'associazione con il RuPOM.

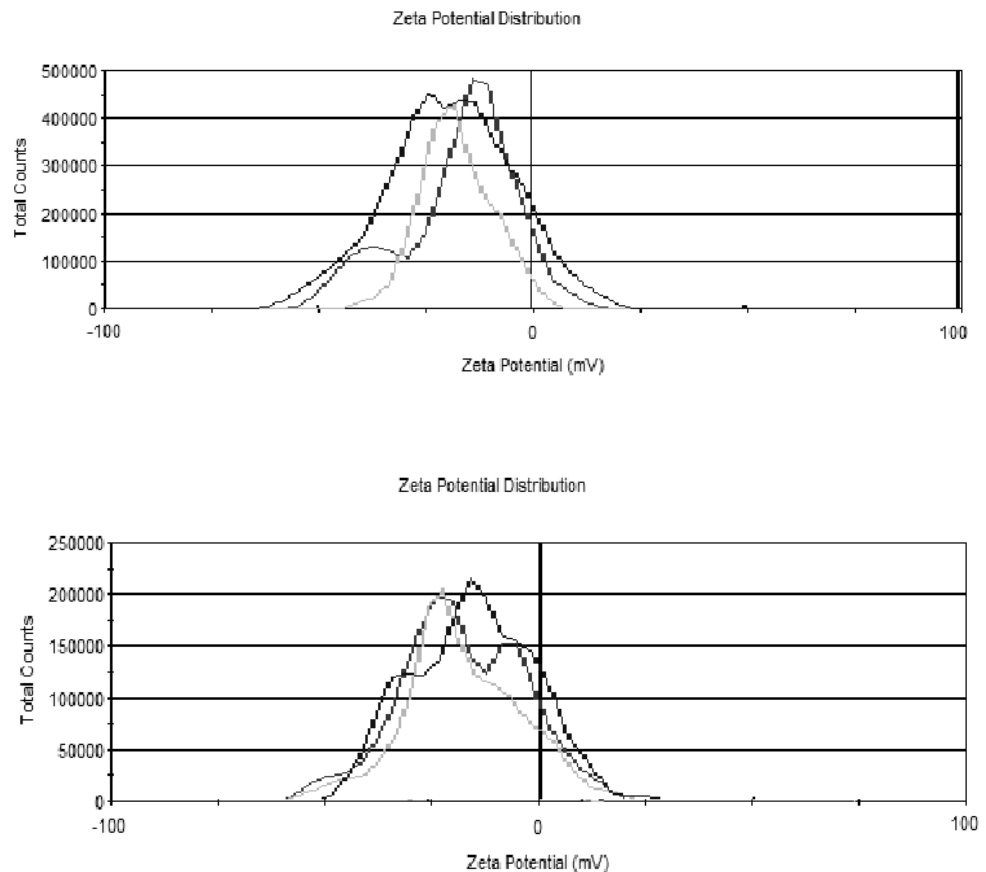


Figura 2.5 - Grafici delle tre Misurazioni del Potenziale Z effettuate in sequenza di TMV isolato (sopra) e TMV+RuPOM a pH neutro (sotto)

2.1.2 Interazione tra TMV e RuPOM a pH 3.5

Analogamente a quanto riportato nel precedente paragrafo, è stato monitorato lo spegnimento della fluorescenza dei residui triptofanici ad opera del RuPOM, anche in tampone acetato a pH 3.5.

Per evitare la denaturazione del TMV, il pH della soluzione deve comunque essere mantenuto in prossimità del punto isoelettrico del sistema proteico (pH=3.4).⁷⁴ A questo pH potrebbero rimanere delle cariche negative nella superficie interna, ricca di acido glutammico.¹⁰⁰ Lo spegnimento della fluorescenza (λ_{ex} pari a 270 nm) conferma l'associazione tra la superficie proteica e il RuPOM, con una stechiometria di interazione simile a quella rilevata a pH neutro e pari a $2,36 \times 10^{-6}$ moli di POM (13 mg RuPOM/ 1 mg TMV).

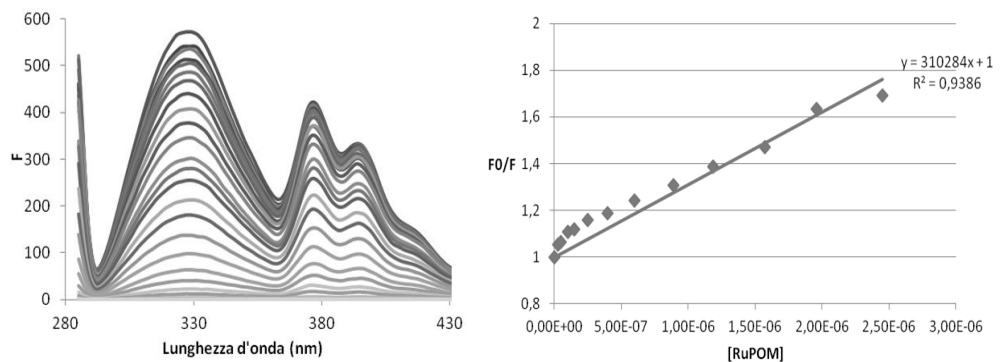


Figura 2.6 - Quenching di fluorescenza dei residui troptofanici con RuPOM a pH 3.5 e annesso grafico di Stern-Volmer.

Tuttavia il grafico di Stern-Volmer mostra una costante di associazione tra il TMV e RuPOM a pH 3.5 pari a $3.1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, di poco superiore al valore trovato a pH neutro. Confrontando i grafici di Stern-Volmer è visibile la diversa pendenza delle curve.

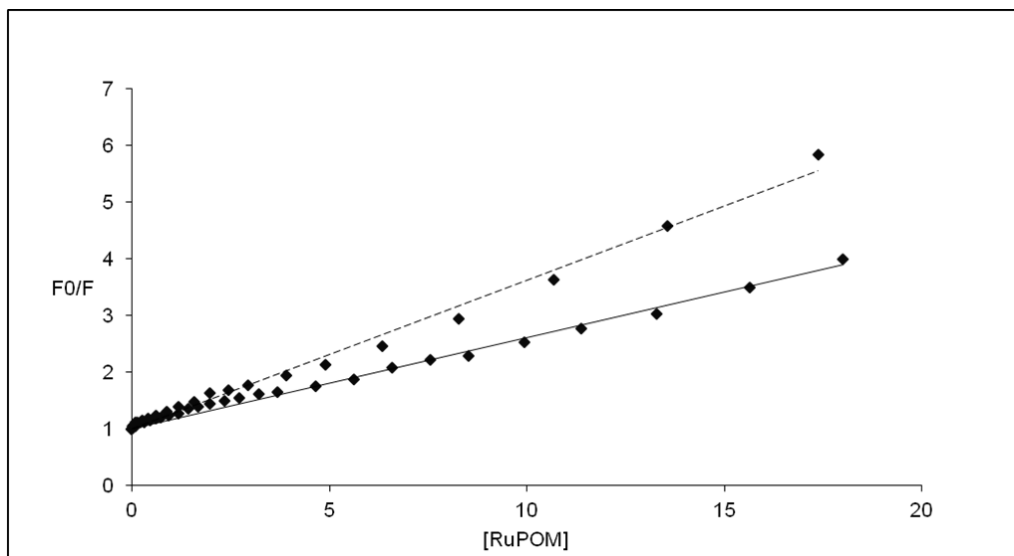


Figura 2.7 - Confronto rette di Stern-Volmer per quenching dei residui triptofanici del TMV ad opera del RuPOM a pH neutro (retta continua) e pH 3.5 (retta tratteggiata)

La modesta differenza tra le costanti di associazione suggerisce comunque che la formazione di complessi ibridi POM-TMV, risulta debolmente favorita in ambiente acido: il TMV fu il primo virus ad aver una sequenza amminoacidica totalmente esplicita da cui si evince una prevalenza di residui con catena laterale alifatica sulla superficie esterna rispetto ad una distribuzione più scarsa di gruppi basici (tirosine).

Tuttavia l'analisi Z-Potential indica una variazione verso valori più positivi della carica superficiale del TMV a pH 3.5, che arriva a 1.87 mV, così da favorire la complessazione del polianione inorganico. Infatti, la stessa determinazione a pH 3.5, in presenza di RuPOM, rivela una carica globale del sistema aggregato pari a -36.8 mV, come risulta dalla media di tre misure (Fig. 2.8)

L'analisi DLS mostra in queste condizioni, anche la presenza di particelle di dimensioni fino a 700 nm, ma con scarsa riproducibilità di distribuzione.

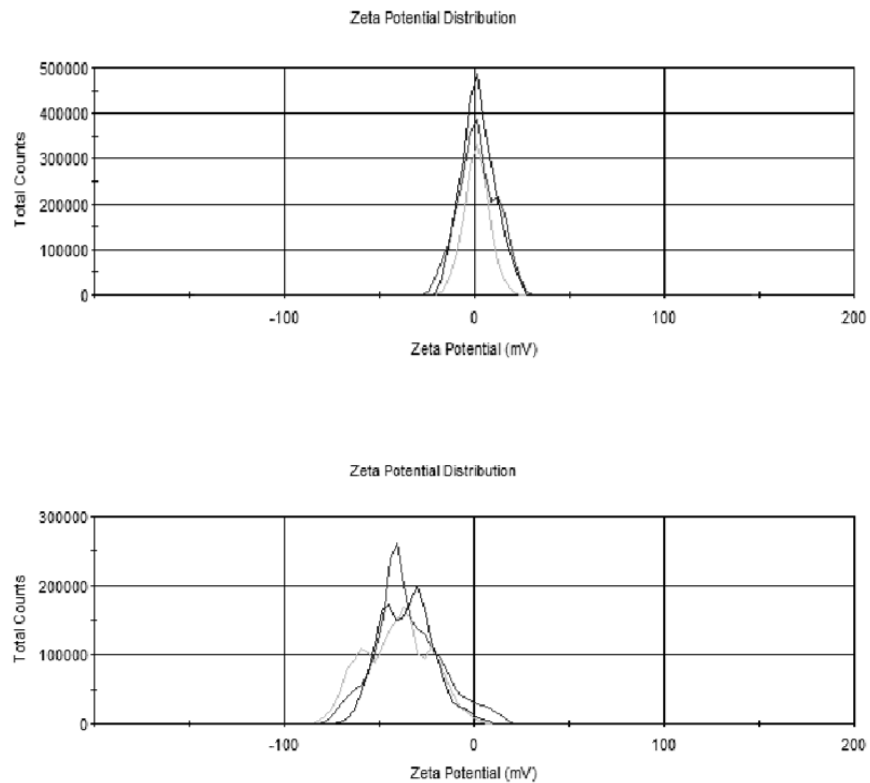


Figura 2.8- Grafici delle tre misure di Z-Potential effettuate in sequenza del campione di TMV a pH 3.5 (sopra) e del complesso TMV+RuPOM a pH 3.5 (sotto)

L'analisi microscopica TEM, effettuata dopo aggiunta di 1,36 mg POM / 1.5 mg TMV, come previsto per un quenching parziale della fluorescenza dei triptofani presenti sul TMV, mostra la presenza di unità virali macro-aggregate di dimensioni fino ad oltre 1 μm in lunghezza (Fig. 2.9 alto). All'analisi SEM è possibile riconoscere grossi fasci, di lunghezza anche fino a 20 μm , e di diametro pari a 200 nm. La distribuzione di POMs sulla superficie delle fibre proteiche, è responsabile della formazione di aggregati sferici (macro vescicole), che decorano i fasci in evidenza nella immagine SEM di Fig. 2.9.

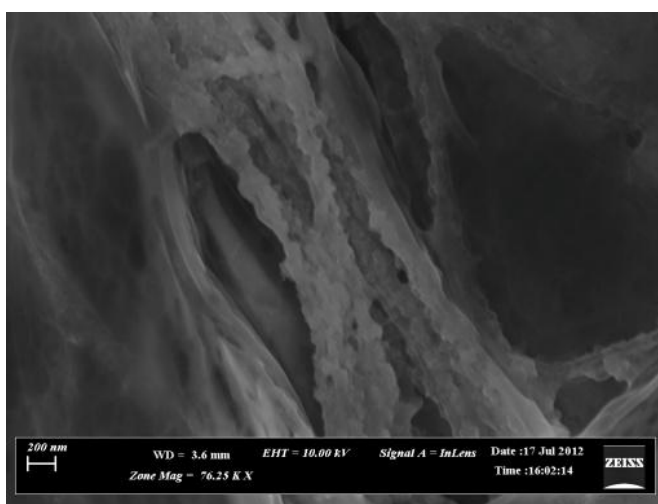
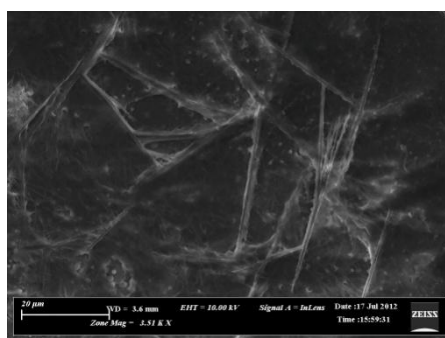
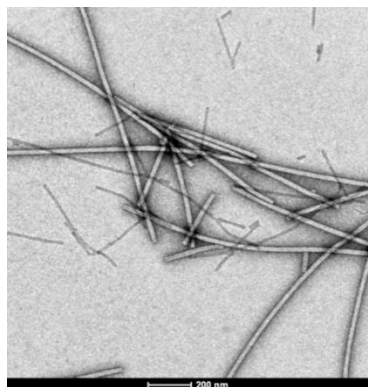


Figura 2.9- Analisi TEM e SEM di TMV+RuPOM a pH 3.5

Tale risultato è promettente per la preparazione di materiali ibridi nanostrutturati. Il campione ottenuto, sarà sottoposto a misure TEM ad alta risoluzione, associata ad analisi EDX, per verificare la presenza di Ru, W, imputabili alla struttura del poliossometallato. Il materiale ibrido, verrà esaminato all'interfaccia di elettrodi, per valutare l'attività elettrocatalitica del catalizzatore molecolare, nell'ossidazione

dell'acqua. A questo scopo dovrà essere valutata e la stabilità del materiale in dipendenza del pH della soluzione, e la resistenza dell'intorno organico relativamente a condizioni di potenziale di ossidazione elevato. Per tale motivo, si stanno studiando tecniche di preparazione di elettrodi che prevengono l'uso di matrici stabili, quali membrane polimeriche, in cui intrappolare l'addotto POM-TMV.¹⁰¹ Per lo stesso motivo, sono state esplorate ulteriori possibilità per promuovere l'associazione tra il RuPOM e il TMV, descritte nei prossimi paragrafi.

2.1.3 Interazione tra RuPOM e TMV ricoperto da metalli

Mediazione dello Zn^{2+} nel processo di aggregazione e decorazione di TMV

Oltre all'effetto della protonazione, è stata presa in esame l'interazione della superficie di TMV con ioni di metalli bivalenti, per valutarne un possibile effetto sulla strutturazione degli aggregati di TMV e sulla decorazione con POM.

A questo scopo, in letteratura sono noti casi di interazione di TMV con Zn^{2+} , Cd^{2+} , Ba^{2+} .^{70,71} Vista la convenienza dal punto di vista della minore tossicità, la prima prova effettuata ha riguardato l'utilizzo dello Zn^{2+} . L'interazione tra il residuo virale e il metallo è stata effettuata seguendo le condizioni riportate in letteratura, ovvero facendo interagire il TMV con una concentrazione di Zn^{2+} pari a 23 mM (per TMV= 0.05 mg/ml).⁷¹ Lo Zn^{2+} interagisce con i virus promuovendone l'aggregazione longitudinale in fibre. Infatti l'analisi TEM mostra la presenza di unità virali aggregate e allungate, fino a circa 900 nm in lunghezza.

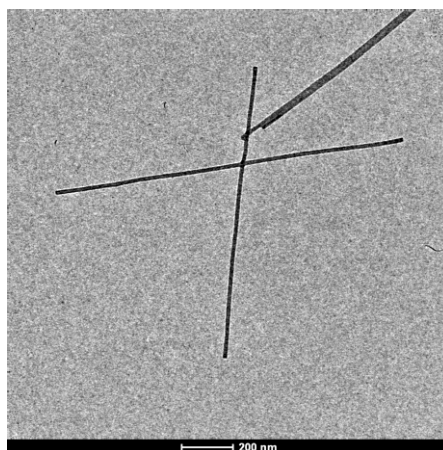


Figura 2.10 - Analisi TEM di TMV+Zn²⁺

Le caratterizzazioni tramite DLS e Z-Potential non hanno dato risultati apprezzabili, data l'alta polidispersione delle dimensioni delle particelle nella soluzione analizzata, comunque indicativa dell'assembly tra le unità virali.

La soluzione di TMV associato a Zn²⁺ è stata successivamente titolata con RuPOM, monitorando anche in questo caso, tramite fluorimetria, il quenching di fluorescenza ad opera di RuPOM sui residui triptofanici del TMV ($\lambda_{ex}=270$ nm, $\lambda_{max}=310$ nm). Il quenching totale della fluorescenza è stato ottenuto dopo l'aggiunta di $1,1 \cdot 10^{-6}$ moli di RuPOM (6 mg RuPOM/1 mg di TMV). Anche in questo caso il quenching ci dimostra che l'assembly è possibile, e la costante di binding calcolata tramite il grafico di Stern-Volmer è pari a $4.1 \cdot 10^5 M^{-1}$, poco superiore alla costante di binding osservata nei precedenti casi, ma comunque piuttosto vicina come valore.

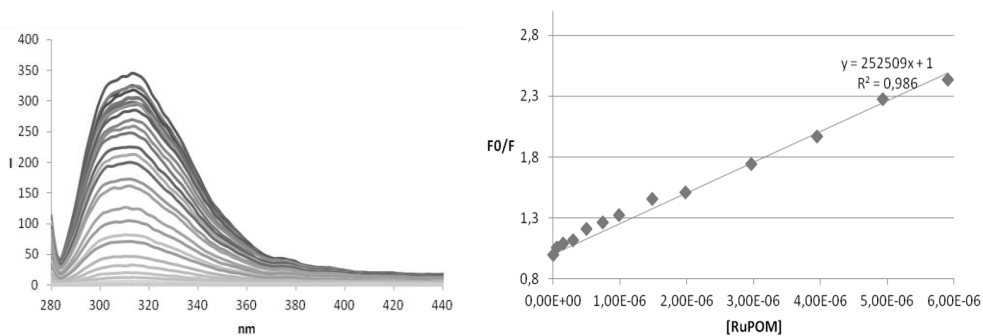


Figura 2.11 -Quenching di fluorescenza ad opera del RuPOM sui residui triptofanici del TMV associato allo Zn^{2+} e relativo grafico di Stern-Volmer

L'analisi TEM del complesso così ottenuto, mostra la presenza di fasci di lunghezza pari a $1 \mu m$, e spessore fino 100 nm . Si osservano anche aggregati globulari ($>100 \text{ nm}$ di diametro), probabilmente dovuti all'aggregazione del solo POM.

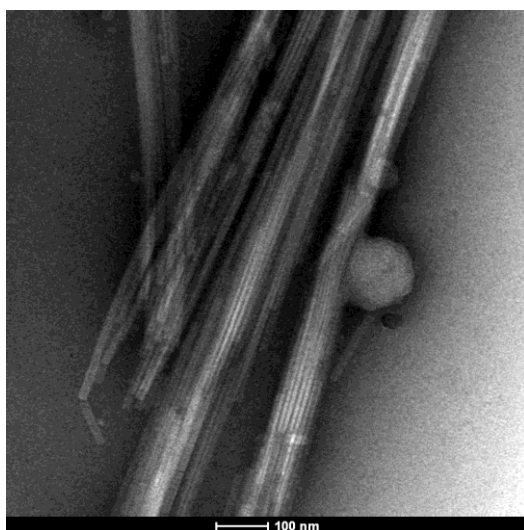


Figura 2.12- Analisi TEM di TMV+ Zn^{2+} +RuPOM

Anche in questo caso le analisi DLS e Z-Potential non hanno riportato valori utili, data l'eccessiva polidispersione della misura.

Anche tale campione, in sospensione acquosa, verrà sottoposto ad analisi TEM ad alta risoluzione. La liofilizzazione è invece piuttosto difficile: il campione risulta essere molto idratato e di difficile

isolamento per poter essere trattato in fase solida e depositato sulla superficie di elettrodi.

Mediazione del $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ nel processo di aggregazione e decorazione di TMV

Con lo stesso ruolo esibito dal catione bivalente Zn^{2+} , è stato utilizzato anche il complesso di tris(bipiridina)-Ru(II)-dicloruro, come precursore del sensibilizzatore cationico abbreviato come $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$. Il complesso è carico positivamente, presenta un sistema di leganti organici modificabili per l'ancoraggio a supporti eterogenei, ed è un efficiente fotosensibilizzatore, utilizzato in cicli fotosintetici per l'ossidazione catalitica dell'acqua.^{102,114} Il ruolo di ione a ponte per l'ancoraggio del RuPOM su superfici eterogenee di elettrodi e di materiali nanostrutturati ha una valenza importante, in termini di costruire una giusta geometria di contatto di una triade surf- $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ -POM. Tale geometria potrebbe veicolare un flusso di elettroni fotoindotto dal sensibilizzatore, dal catalizzatore all'elettrodo, a bassa energia, ispirandosi al sistema modulare della membrana foto sintetica. A tale scopo, in prima istanza l'interazione tra il TMV e $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ è stata valutata tramite titolazione spettrofotometrica UV-Vis.

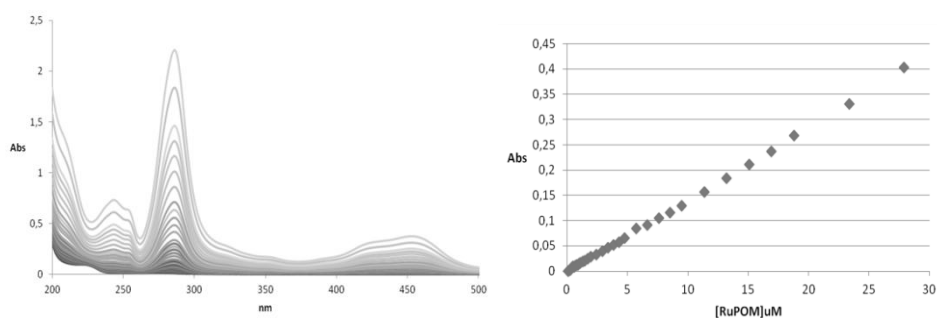


Figura 2.13 - Spettro di Assorbimento del TMV all'aggiunta graduale di Rubipy e annesso grafico di Lambert-Beer per $\lambda=453$ nm.

Tale analisi non ha, però, presentato un'andamento a saturazione, come sarebbe previsto sulla base di una saturazione di siti di legame, e quindi non risulta essere utile per confermare l'associazione.

Anche l'analisi Z-Potential mostra che l'assembly non è efficace: come dimostrato dal modesto abbassamento della carica negativa (-14.0 mV), rispetto al TMV isolato (-16 mV).

Inoltre l'analisi di microscopia TEM ci mostra la presenza di fibre, risultanti dall'impilamento di poche unità di TMV (<3), in presenza, però, di numerosi frammenti.

La successiva interazione con RuPOM non risulta pertanto utile per la formazione di un materiale strutturato.

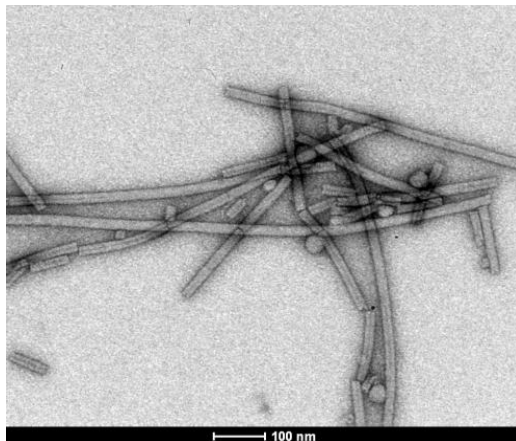


Figura 2.14 - Analisi TEM di TMV+Rubipy

E' possibile quindi che il sistema di leganti del complesso impedisca una associazione efficace del sensibilizzatore per via elettrostatica.

Una via alternativa consiste nell'ancoraggio covalente del sensibilizzatore a residui tirosinici sulla superficie del TMV. Per questo scopo, il TMV estratto dalla fonte vegetale e isolato in matrice di polietilenglicole (PEG), dovrà essere purificato e funzionalizzato in modo opportuno.

2.1.4 Prove di purificazione di nano-strutture ibride TMV-POM

La purificazione di TMV decorati con POM è stata affrontata tramite tecniche di centrifugazione ed ultracentrifugazione.

In particolare, il sistema composito TMV+ Zn²⁺ +RuPOM è stato inizialmente centrifugato a 4000 rpm per 20 minuti, su concentratori a membrana con cut-off di 50kDa. Al termine della centrifugazione, il volume della soluzione è ridotto di una decina di volte. Sono stati quindi effettuati anche due lavaggi con acqua deionizzata della frazione trattenuta dalla membrana. Effettuata l'analisi UV del permeato si è notata la presenza nella prima soluzione raccolta della quasi totalità del RuPOM iniziale e probabilmente anche del TMV, essendo la banda del virus coperta da quella del RuPOM più intensa (vedi spettri allegati in appendice), e la totale assenza di RuPOM in soluzione nelle acque di lavaggio. Questo lo si deduce anche effettuando un'analisi UV-VIS della soluzione concentrata che, dopo diluizione 1:10 con acqua deionizzata, non mostra le caratteristiche spettrali attese.

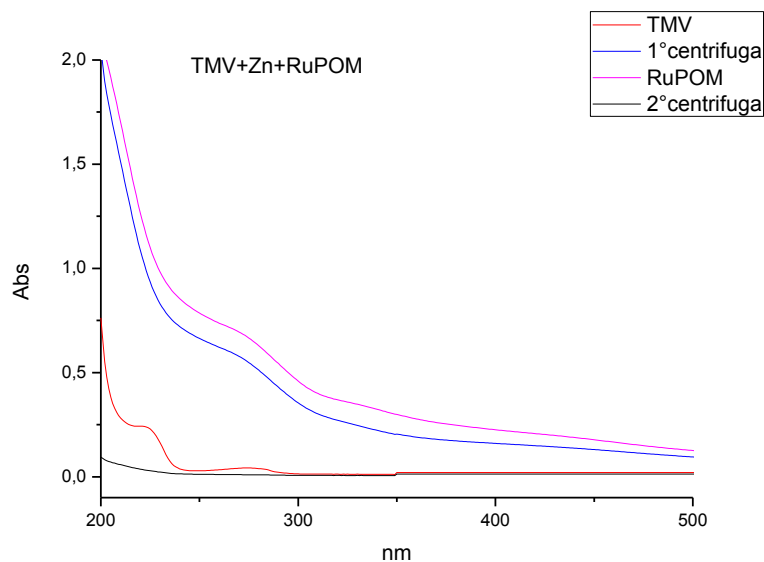


Figura 2.15 -Confronto Spettri UV della soluzione di TMV+Zn²⁺+RuPOM ottenuta dalla 1° centrifugazione (linea blu), dal 1° lavaggio (linea nera), del RuPOM iniziale in soluzione (linea rosa), e del TMV in soluzione (linea rossa)

L'ipotesi è che l'addotto riesca ad attraversare la membrana, infilandosi perpendicolarmente ai pori o, più probabilmente, spezzettandosi in residui di minori dimensioni, a causa della scarsa resistenza meccanica in condizioni di elevata pressione contro la membrana.

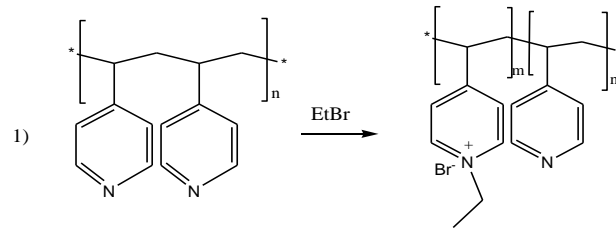
Alla luce di ciò sono state effettuate delle prove di ultracentrifugazione, tecnica utilizzata per la purificazione del virus una volta estratto dalla pianta.^{103,104,105}

La soluzione contenente l'addotto TMV+Zn²⁺+RuPOM è stata quindi ultracentrifugata a 12000 rpm per 1 h. La soluzione surnatante, diluita ed analizzata mediante fluorimetria, mostra un'elevata quantità di TMV in soluzione. Sembra pertanto che l'interazione tra i due domini sia troppo debole e che l'addotto non resista alle condizioni di centrifugazione.

2.1.5 Interazione del RuPOM con TMV in presenza di additivi polimerici

Oltre all'utilizzo di mediatori cationici per l'interazione tra la superficie del Virus e il POM, sono state effettuate delle prove di rivestimento superficiale del materiale bio-genico con polimeri poliarichi. Lo scopo è di fornire un rivestimento artificiale alle nanostrutture virali per permettere una associazione elettrostatica più efficiente del polianione inorganico. Alcuni esperimenti esplorativi sono stati condotti utilizzando un protocollo riportato in letteratura per la sintesi di polianilina in fibre in presenza di due diversi iniziatori: il potassio persolfato e l'ammonio persolfato.¹⁰⁶ Sebbene l'ottenimento della polianilina, in entrambi i casi, è stato confermato dall'analisi IR dei prodotti ottenuti, l'analisi TEM non mostra la morfologia attesa in nessuno dei due casi e l'analisi SEM del prodotto presenta solo polianilina amorfa.

Successivamente si è provato a sintetizzare l'N-etil poli 4-vinil piridinio come polimero di rivestimento del TMV, sul quale poi fare aderire il POM. La sintesi di tale polimero prevede la quaternizzazione della poli 4-vinil piridina, in presenza di bromo etano.



Schema 2.2- Schema di sintesi dell' N-etil poli 4-vinil piridina partendo dalla poli 4-vinil piridina

Utilizzando un precursore polimerico di 600 KDa, il prodotto finale, identificato via spettroscopia FTIR, non risulta solubile in acqua ⁷⁸

Infine è stato provato il rivestimento del TMV con il poli diallil dimetil ammonio (PDADMA), un polimero commerciale già presente in soluzione acquosa. L'analisi TEM di tale prodotto evidenzia l'allineamento dei residui virali sottoforma di fasci di diverse dimensioni, con spessore di circa 100 nm, e lunghezza di circa 900 nm,.

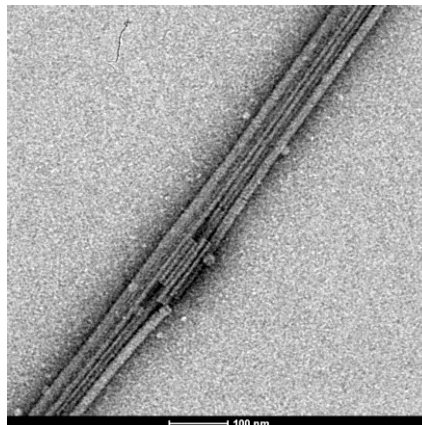


Figura 2.16 - Analisi TEM di TMV rivestito da poli diallil dimetil ammonio

L'associazione del RuPOM, tuttavia, non ha permesso di ottenere risultati riproducibili e le condizioni di complessazione dovranno essere ottimizzate.

2.1.6 Prospettive sull'uso di TMV come scaffold

I risultati ottenuti per i vari sistemi assemblati descritti nei precedenti paragrafi sono riassunti nella tabella sottostante. Possiamo concludere che la presenza di ioni positivi è utile a garantire una maggiore efficienza di interazione, come dimostrato dalla diminuzione dei valori di Z-potential e dall'aumento delle costanti di associazione.

Tabella 2.1- Tabella di raccolta dei dati sperimentali ottenuti per i vari assembly di TMV e RuPOM trattati.

	TMV pH 7	TMV +RuPOM pH 7	TMV pH 3.5	TMV+ RuPOM pH 3.5	Zn ²⁺	Zn ²⁺ + RuPOM	Ru(bpy) ₃ ²⁺
K _a (M ⁻¹)		2.4x10 ⁵		3.1x10 ⁵		4.1x10 ⁵	
DLS (d, nm)	272,3	667	n.d. ^a	<700	900	n.d. ^b	n.d. ^b
Z-Pot. (mV)	-16	-25	1.87	-36.8	n.d. ^b	n.d. ^b	-14

a) non misurato; b) non attendibile a causa dell'elevata dispersione.

Anche l'utilizzo di polimeri amorfi policationici sembra confermare l'utilità di questa strategia per promuovere interazioni tra lo scaffold virale e il polianione.

Ulteriori prospettive in tale ambito di ricerca riguardano la modificazione covalente della superficie virale. Questo potrebbe essere realizzato con derivati epossidici di alchil ammonio (figura 2.17),

sfruttando la nucleofilicità degli atomi di ossigeno delle tirosine accessibili sulla superficie virale.

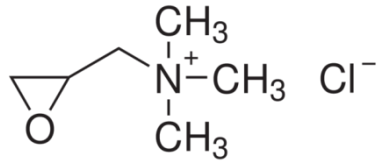


Figura 2.17-Glicidil-trimetil ammonio cloruro

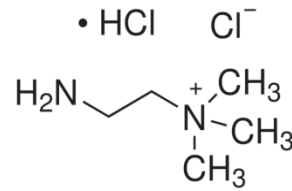


Figura 2.18-Ammino-etil-trimetil ammonio cloruro

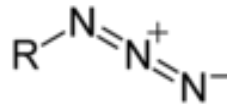


Figura 2.19- Gruppo azide

Ammino etil ammonio potrebbe essere utilizzato per la derivatizzazione di gruppi carbossilici, ma questi, come già introdotto, sono presenti soprattutto nella parente interna del virus. Una strategia frequentemente riportata in letteratura prevede la funzionalizzazione mediante introduzione di gruppi azido, da far reagire poi mediante cicloadizione 1,3 dipolare (click chemistry) con gruppi amminosi diversamente funzionalizzati, ottenendo facilmente ossime.

2. 2 Confinamento di POM in particelle core-shell

I polisaccaridi sono stati utilizzati con successo per la veicolazione di farmaci. Anche i poliossometallati sono stati introdotti nelle cellule grazie all'interazione con amido, chitosano e carbossimetilchitosano. Nel caso del chitosano, i gruppi amminici possono essere protonati a pH acido ($pK_a=6.28$)¹⁰⁷ ed agire come controione per i POM, che fungono quindi da reticolanti nel processo di gelificazione ionica.^{108,107}

Il carbossimetilchitosano presenta gruppi carbossilici che possono interagire in modo analogo con ioni Ca^{2+} . In questo caso il POM interagisce anch'esso con il calcio bivalente, rimanendo intrappolato durante la gelificazione. Se si opera in soluzioni diluite, gli addotti che si ottengono sono globulari e nanodimensionali.¹⁰⁹

In alcuni casi i polissaccaridi come i destrani sono stati impiegati come agenti strutturanti per la preparazione di microcapsule. In questo caso, microparticelle di $CaCO_3$ vengono formate in situ in presenza di destrano (*core*), e rivestite di polimeri carichi (*shell*), mediante tecnica LbL (*layer by layer*). Dopo rimozione del $CaCO_3$ con EDTA, il destrano rimane ad impartire stabilità alla capsula.¹¹⁰

Il vantaggio di tali sistemi risiede nella possibilità di confinare molecole funzionali distribuite nel core o nella shell: molecole con attività biologica (farmaci, geni) associati ad agenti che ne stimolino il rilascio controllato (nanoparticelle inorganiche) o a specie luminescenti/radioattive che permettono di monitorare la localizzazione della capsula tramite diverse tecniche di *imaging*.

In questa parte del lavoro di tesi saranno descritti i diversi approcci impiegati per il confinamento di RuPOM all'interno di microcapsule: il materiale costituente del *core* (POM, POM+Polisaccaridi) è stato racchiuso con Polistirene solfonato e poli diallil dimetil ammonio, utilizzando il metodo di ricoprimento *layer-by-layer*, sfruttando le

interazioni elettrostatiche tra gli strati da assemblare. Una volta rivestita la capsula con 4 strati di polimero è stato rimosso il materiale templante, CaCO_3 , tramite incubazione con EDTA.

2.2.1 Utilizzo di CaCO_3

La prima prova effettuata è stata quella di verificare l'interazione tra RuPOM e CaCO_3 anche in assenza di polisaccaridi. Il processo di sintesi prevede l'aggiunta di una soluzione di CaCl_2 (0.33M) e successivamente di NaHCO_3 (0.33M) ad una soluzione di RuPOM (5mg/ml), per formare in situ microparticelle di CaCO_3 , che precipitano inglobando il polianione. L'uso di NaHCO_3 piuttosto che di Na_2CO_3 consente di evitare un ambiente troppo alcalino, che sarebbe dannoso per la stabilità del RuPOM. L'efficienza del metodo di incapsulamento è confermata dall'analisi UV delle acque surnatanti e di lavaggio (figura 2.20), che mostra l'assenza di RuPOM nelle acque.

Mentre lo spettro IR (Figura 2.21) è totalmente dominato dalle bande del CaCO_3 :

- 1400 - 1500 cm^{-1} (s, b) stretching asimmetrico del legame C-O,
- 875 cm^{-1} (s) bending CO_3 fuori dal piano,
- 744 cm^{-1} (w, b) bending O-C-O nel piano,
- 1083 cm^{-1} (w) stretching simmetrico C-O

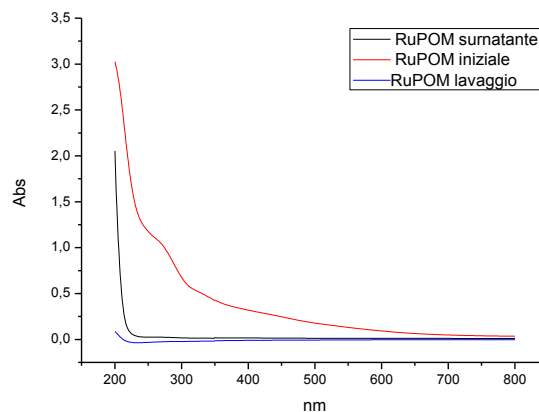


Figura 2.20- Analisi UV del RuPOM nel surnatante e nelle acque di lavaggio

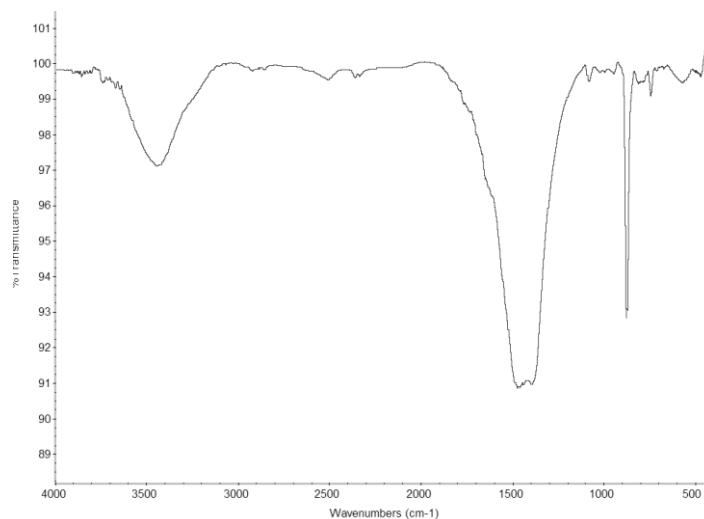


Figura 2.21- Spettro IR capsula CaCO_3 con RuPOM nel core.

e quindi non è diagnostico per controllare la presenza di RuPOM all'interno della capsula. L'analisi SEM mostra la presenza di particelle con morfologia abbastanza regolare e sferica, di dimensioni di circa $5 \mu\text{m}$; mentre l'analisi EDX conferma la presenza di RuPOM nelle particelle.

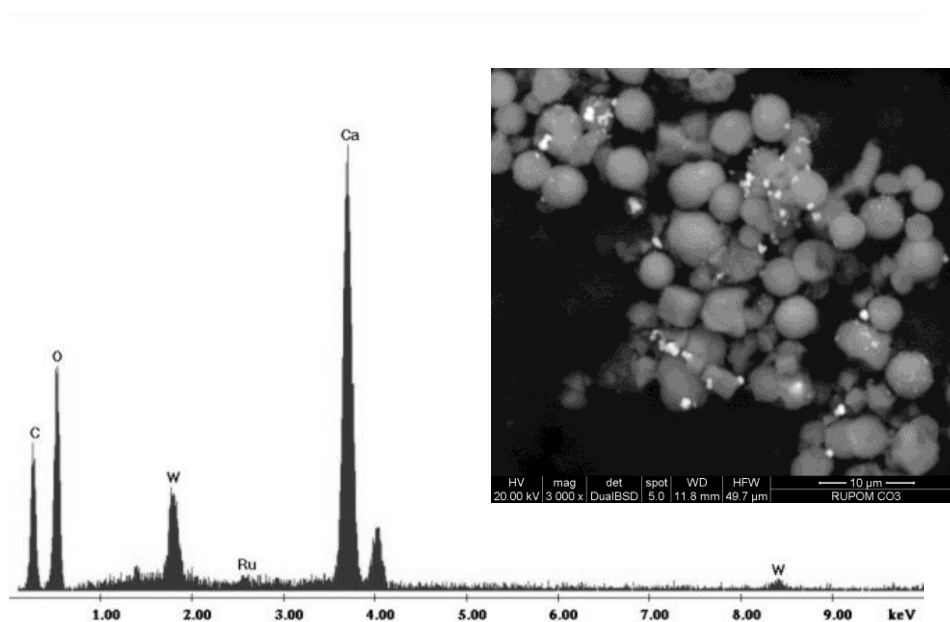


Figura 2.22- Analisi SEM ed EDX delle particelle di CaCO_3 contenenti RuPOM

Tali aggregati sono stati quindi ricoperti con 4 strati di polimero utilizzando in alternanza, Polistirene solfonato di sodio (PSS) e Poli diallil dimetil ammonio cloruro (PDADMA), monitorando ogni step tramite spettroscopia IR, che conferma il coating. Infatti vediamo la progressiva crescita di:

- bande (s) tra 2800 e 3000 cm^{-1} dovute allo stretching asimmetrico e simmetrico dei CH_2 alchilici;
- picchi (m) a 1480 e 1165 cm^{-1} dovuti rispettivamente allo scissoring e al wagging dei CH_2 alchilici;
- bande (s) tra 1600 e 1500 cm^{-1} dovute allo stretching asimmetrico dei doppi legami $\text{C}=\text{C}$ nell'anello arilico del PSS e dei picchi (s) tra 690 e 900 cm^{-1} dovuti al bending dei legami $\text{C}-\text{H}$ aromatici del PSS;
- picchi (s) a circa 1325 cm^{-1} e 1140 cm^{-1} dovuti agli stretching dei gruppi sulfonici del PSS;
- picchi (m) tra 1000 e 1250 cm^{-1} dovuti agli stretching dei legami $\text{C}-\text{N}$ del PDADMA.

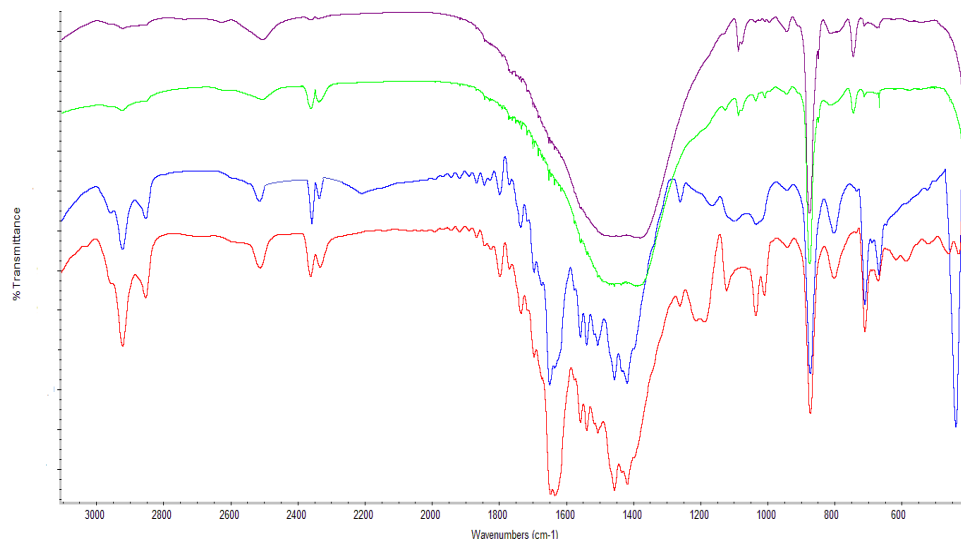


Figura 2.23-Confronto spettri IR dopo ogni step di rivestimento con polimeri della capsula di CaCO_3 : RuPOM+ CaCO_3 +PSS(viola), RuPOM+ CaCO_3 +PSS+PDADMA (verde), RuPOM+ CaCO_3 +PSS+PDADMA+PSS (blu), RuPOM+ CaCO_3 +PSS+PDADMA+PSS+PDADMA (rosso).

Dopo il secondo ricoprimento è stata effettuata un'analisi al SEM che mostra la presenza di aggregati di maggiori dimensioni, rispetto a quelle delle particelle non ricoperte, di diametro fino a 8 μm , e con morfologia più irregolare.

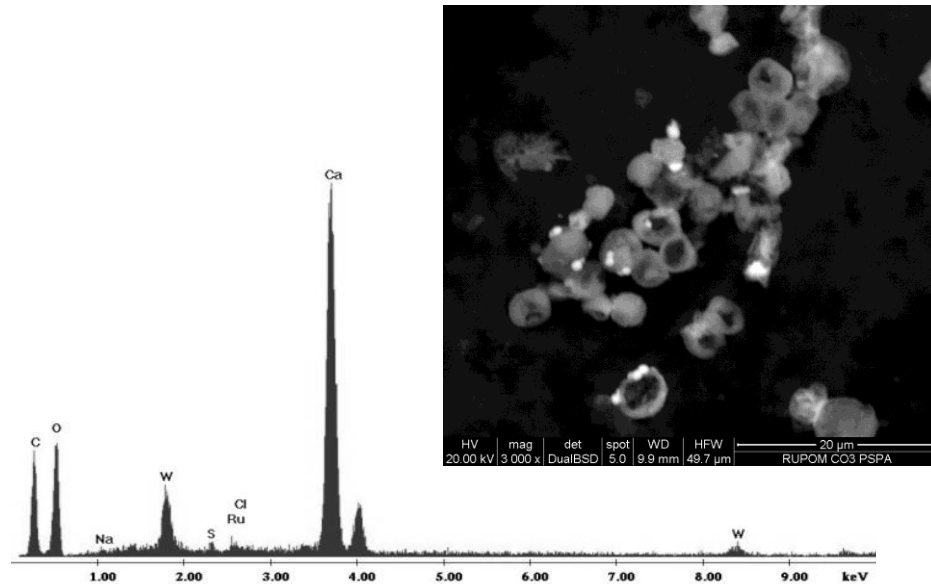


Figura 2.24 - Analisi SEM di particelle di CaCO_3 contenenti RuPOM rivestite con 2 strati di polimero (PSS+PDADMA) e analisi EDX di RuPOM in CaCO_3 ricoperto da PSS e PADMA

L'analisi EDX di tali capsule conferma la presenza di zolfo, oltre che degli altri elementi già presenti, in accordo con il ricoprimento da parte dei polimeri.

Da tale particella è stato quindi rimosso il materiale templante, CaCO_3 . Lo spettro IR, tuttavia, non presentava segnali attribuibili al RuPOM. È stata quindi effettuata l'analisi UV della soluzione di EDTA surnatante e di lavaggio, ma non è stata riscontrata sufficiente assorbanza del RuPOM nemmeno in tali soluzioni. È possibile che il POM venga gradualmente rilasciato durante gli stadi di ricoprimento con i polimeri, durante i lavaggi e soprattutto dopo rimozione del CaCO_3 . Sembra quindi effettivamente necessario un materiale di supporto permanente che permetta di trattenere il POM all'interno della capsula.

2.2.2 Uso di CaCO_3 e polisaccaridi come templanti

Per quanto riguarda l'uso di polisaccaridi (destrani e chitosano), la prima prova è stata effettuata con Destrano solfato di sodio.

La presenza di cariche negative sul polisaccaride migliora l'interazione con CaCO_3 , ma non è prevista l'associazione con il polianione inorganico, quindi permette di esaminare il ruolo del destrano come solo agente templante. Il primo step di sintesi delle capsule ha previsto la formazione di CaCO_3 in situ, in una soluzione contenente RuPOM e Destrano solfato. L'avvenuto incapsulamento è dimostrato dall'analisi UV del surnatante e delle acque di lavaggio della soluzione di reazione che non presentano RuPOM in soluzione.

L'analisi SEM delle capsule così formate mostra una morfologia irregolare e la presenza di poche sfere e altri aggregati, amorfi e cristallini. L'analisi EDX conferma la presenza del RuPOM.

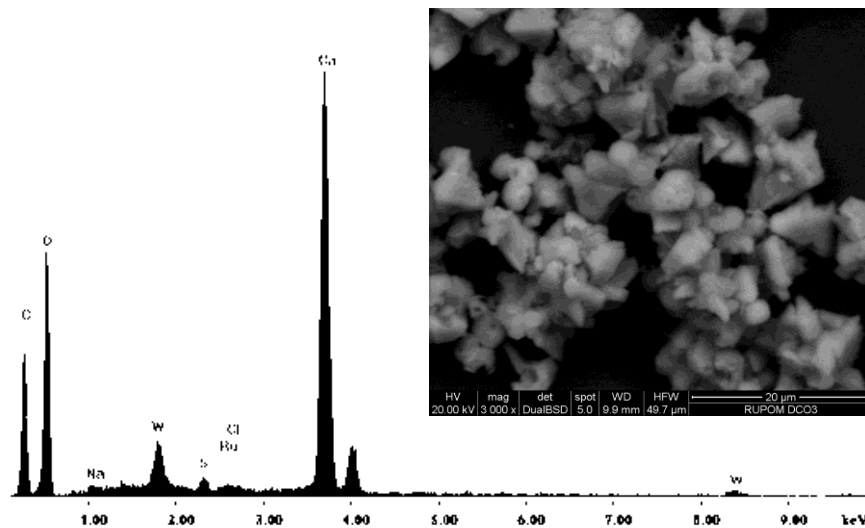


Figura 2.25- Analisi SEM ed EDX delle capsule di CaCO_3 contenenti RuPOM+Dex

Una volta rivestita con 2 strati di polimero, è stata effettuata nuovamente una analisi SEM, che conferma la presenza di aggregati irregolari, di dimensioni comprese tra 5 e 8 μm e avvolte da una matrice polimerica. L'analisi EDX ci conferma la presenza del rivestimento

polimerico. Dopo rivestimento con ulteriori due strati di polimero, è stato rimosso il CaCO_3 con EDTA. A questo punto le capsule sono risultate instabili, e non si è riusciti a recuperare il solido rimanente. In questo caso è possibile che, dopo la rimozione per complessamento del Ca^{2+} , il destrano solfato e il RuPOM, entrambi carichi negativamente, si respingano portando anche al collasso delle capsule.

2.2.3 Uso di CaCO_3 , destrano negativo e chitosano come templanti

Considerati gli scarsi risultati nell'utilizzo del Destrano solfato come templante per il RuPOM, è stata effettuata una prova suddividendo la quantità di templante tra destrano solfato e chitosano, in modo da sfruttare anche l'interazione con i gruppi amminici presenti sul chitosano per migliorare l'associazione con il RuPOM e con il destrano polianionico. Una volta sintetizzata la capsula in situ, e dimostrata tramite spettroscopia l'assenza di RuPOM nelle acque surnatanti e di lavaggio, si è proceduto al rivestimento con due doppi strati polimerici e alla rimozione del CaCO_3 , tramite incubazione con EDTA. L'analisi UV delle acque surnatanti e di lavaggio non ha mostrato la presenza di RuPOM nella soluzione di EDTA.

Ogni passaggio è stato confermato mediante microscopia a scansione elettronica ed EDX. Le capsule risultanti, in particolare, sono state caratterizzate tramite SEM (con strumento Zeiss Z-Supra a maggiore risoluzione) TEM e spettroscopia IR. Il SEM (figura 2.27) mostra la presenza di numerose capsule di dimensioni che vanno da 1 a 3 μm in diametro, con morfologia regolare, in presenza di altre particelle di dimensioni minori.

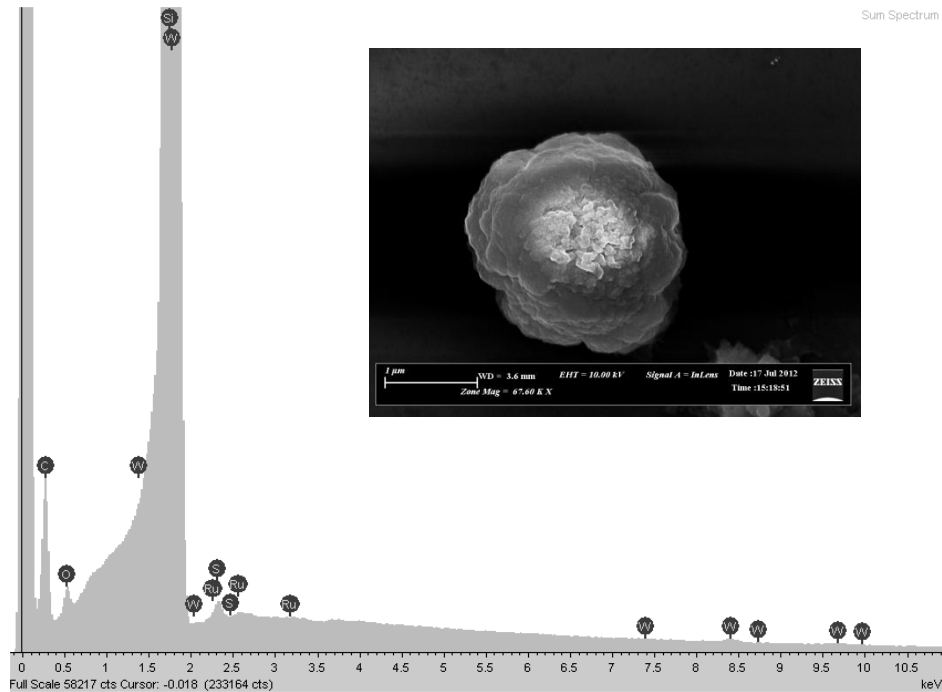


Figura 2.26- Analisi microscopica SEM delle capsule contenenti nel core DEX+CS+RuPOM una volta rimosso il template CaCO_3 e analisi EDX.

l'analisi EDX conferma la presenza di RuPOM all'interno di tali capsule e l'assenza di ioni calcio. Anche il TEM conferma la presenza di capsule ben definite (diametro anche inferiore ad $1 \mu\text{m}$) assieme ad altri aggregati più piccoli ed amorfi.

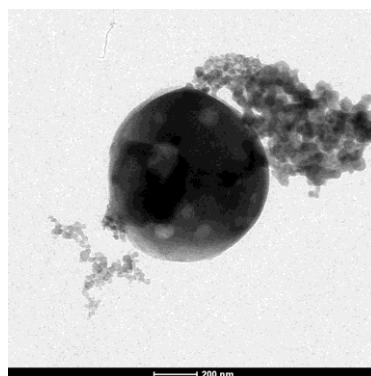


Figura 2.27- Analisi TEM della capsula contenente Dex+CS+RuPOM dopo la rimozione del CaCO_3

Lo spettro IR, per quanto presenti alcuni deboli picchi caratteristici del RuPOM, non risulta particolarmente diagnostico. Questi dati mostrano

che l'uso di una piattaforma cationica può migliorare morfologia e stabilità delle capsule, ma la presenza di materiale amorfo indica che la procedura non è ancora ottimale.

2.2.4 Uso di Chitosano da solo e come templante con CaCO₃

Alla luce di tali risultati, si è quindi provato a sintetizzare microcapsule contenenti come materiale templante il solo Chitosano oltre al CaCO₃. Per prima cosa è stata provata la sintesi di nano particelle di Chitosano e RuPOM considerando diversi rapporti in volume dei reagenti e diverse condizioni di pH, per trovare le condizioni migliori per l'associazione dei due reagenti. Le soluzioni sono state analizzate mediante analisi DLS e Z-potential.

Tabella 2.2- Tabella dei risultati ottenuti al DLS (in volume, nm) e Z-Potential (mV) dopo la sintesi di diverse nanoparticelle di CS+RuPOM, riportando anche la polidispersione (Pdl) delle misure di DLS, e la deviazione standard (Z-deviation) dal valore di Z-Potential.

Condizioni	pH= 4.14	pH= 5.97	pH= 6.07
	RuPOM : CS 1:10	RuPOM : CS 1:20	RuPOM : CS 1:10
Volume(d,nm)	~450	~160	~290
Pdl	0.368	0.461	0.425
Z-Potential (mV) (Z-deviation)	57.2(5.87)	23.9 (6.81)	23.9 (5.15)

Dai risultati ottenuti si è visto che a pH 4.14, le particelle presentano maggiori dimensioni. La presenza di una elevata densità di gruppi protonati è confermata dalla maggior carica positiva, misurata

mediante Z-potential, che suggerisce anche una ridotta concentrazione del POM sulla superficie.

Sono state quindi sintetizzate capsule contenenti nano particelle di Chitosano e RuPOM nel core. L'analisi UV del surnatante e delle acque di lavaggio mostra un uptake completo anche utilizzando il solo chitosano. Una volta rivestite tale capsule con quattro strati polimerici, e dissolto il CaCO_3 , si è visto che l'analisi UV del surnatante di EDTA e delle acque di lavaggio non mostrava la presenza di RuPOM, segno che è rimasto all'interno della capsula polimerica. Il SEM (Figura 2.28), però, conferma la presenza di particelle sferiche su una matrice amorfa e anche di numerosi altri aggregati; le dimensioni delle poche particelle sferiche sono superiori a quelle con il destrano: circa 4-6 μm in diametro. Sembra quindi che il chitosano da solo non sia molto efficace per il controllo della morfologia. E' possibile che il polimero anionico (PPS, primo strato) tenda ad associarsi al chitosano, portando al parziale collasso delle capsule.

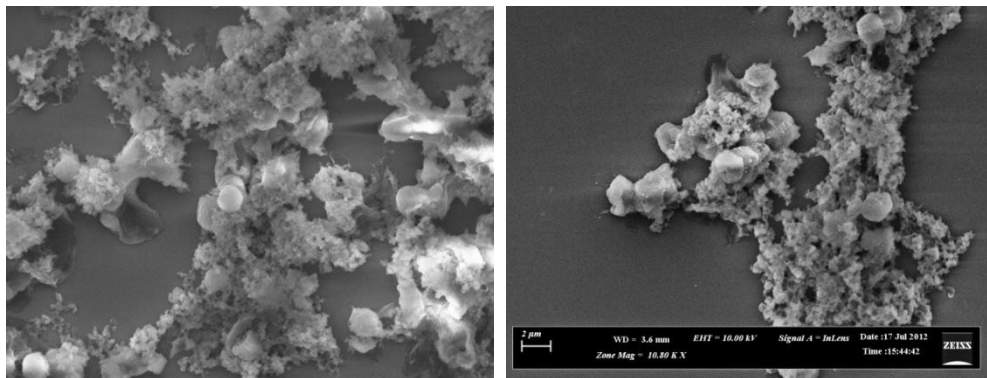


Figura 2.28-Analisi SEM di capsule contenenti CS+RuPOM nel core, dopo la rimozione del CaCO_3

2.2.5 Uso di destrano positivo

Una prova ulteriore è stata condotta utilizzando destrano funzionalizzato con gruppi ammonio quaternari: Dietil ammino etil destrano cloridrato (DEAE-Dextran). A differenza del Chitosano, quindi, si sfrutta un polisaccaride contenente cariche positive residenti. L'analisi UV del surnatante e delle acque di lavaggio del primo step di sintesi delle capsule di CaCO_3 , ci mostra, anche in questo caso, un uptake completo del RuPOM nella capsula. Lo spettro IR, totalmente dominato dalle bande del CaCO_3 , non permette di confermare la presenza del POM nella particella, ma continuando il rivestimento layer-by-layer con i polimeri di tale capsula, e poi dissolto il CaCO_3 con EDTA, vediamo all'UV che nel surnatante contenente EDTA non è presente RuPOM in soluzione, che è quindi rimasto totalmente inglobato dentro la capsula insieme al destrano cationico. Ciò è visibile anche ad occhio nudo o al microscopio ottico, data la marcata colorazione bruna del solido ottenuto. L'analisi microscopica SEM mostra (Figura 2.29) la presenza di numerosi aggregati coesi, di diametro anche inferiore ad 1 μm .

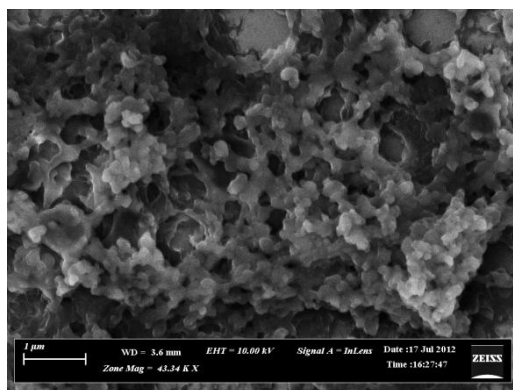


Figura 2.29- Analisi SEM delle capsule contenenti Dex⁺+RuPOM nel core una volta rimosso il CaCO_3

In questo caso il materiale ottenuto sembra quindi più omogeneo. Dall'analisi di questa serie di dati, è evidente come il polisaccaride

influenzi notevolmente la morfologia del materiale e costituisca un importante agente templante assieme al CaCO_3 .

2.2.6 POM nella shell

Come anticipato nell'introduzione, le capsule oltre a presentare la specie attiva nel core insieme ad un templante, possono contenere molecole funzionali tra gli strati della shell, sfruttando anche in questo caso l'assembly layer-by-layer.

Nel caso dei POM, esiste un unico esempio di preparazione di microcapsule basate sull'uso di MnCO_3 come templante, e con POM inserito nella shell.¹¹¹

A tale scopo è stata sintetizzata una capsula contenente il polioossometallato nella shell e destrano (neutro) nel core. Vista l'assenza del RuPOM nel core, la formazione del CaCO_3 è stata condotta aggiungendo una soluzione di Na_2CO_3 (0.33M) alla soluzione contenente destrano e CaCl_2 (0.33M), anziché NaHCO_3 . Ciò perché la formazione del CaCO_3 in presenza di CaCl_2 è più veloce ed efficace. Il confinamento del RuPOM nella shell è stato dimostrato tramite analisi UV delle acque surnatanti e di lavaggio, dato che lo spettro IR non risulta diagnostico nemmeno in questo caso. La presenza di RuPOM nelle acque surnatanti indica che stavolta è presente in eccesso. Il POM associato allo strato polimerico, invece, non viene rimosso in seguito ai lavaggi e nemmeno dopo rimozione del CaCO_3 con EDTA.

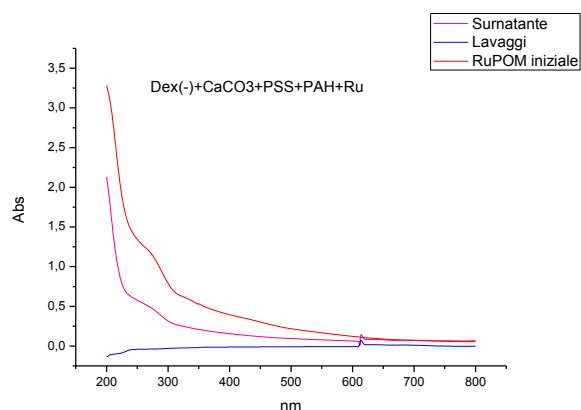


Figura 2.30 - Spettro UV del surnatante e delle acque di lavaggio dello step di associazione del RuPOM nella shell della capsula contenente Dex nel core.

Il prodotto è stato caratterizzato tramite TEM, che conferma la presenza di capsule sia aggregate che isolate (Figura 2.31), di dimensioni di circa 1 μm in diametro, con maggiore contrasto nella shell, come atteso in seguito alla presenza di atomi pesanti del RuPOM.

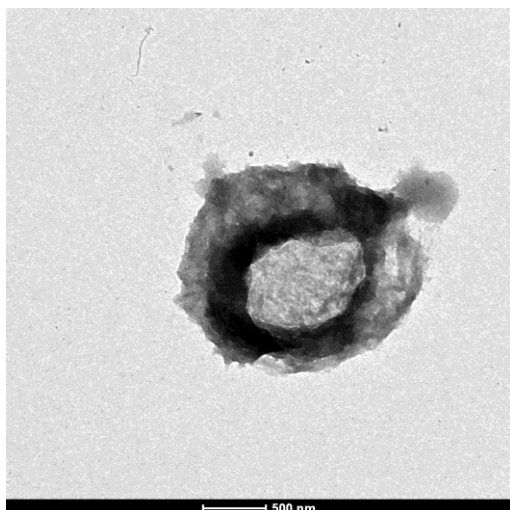


Figura 2.31 - Analisi TEM della capsula contenente il RuPOM nella shell e il Dex nel core, dopo la rimozione del CaCO_3 .

Tale risultato risulta in linea con quello ottenuto da collaboratori dell'NNL di Lecce (Dott.ssa L.L. del Mercato) per una sintesi analoga. Infatti, caratterizzando nel nostro dipartimento il campione da loro sintetizzato, abbiamo ottenuto dall'analisi SEM, la presenza di particelle

di dimensioni comprese tra 2,5 e 3 μm in diametro, con una maggiore densità di Ru, W e Si, nella shell piuttosto che nel core, come confermato dall'analisi EDX sulla parte più esterna della capsula (stavolta visibile come zone chiare, a causa della maggior riflessione di elettroni nelle zone ricche di POM).

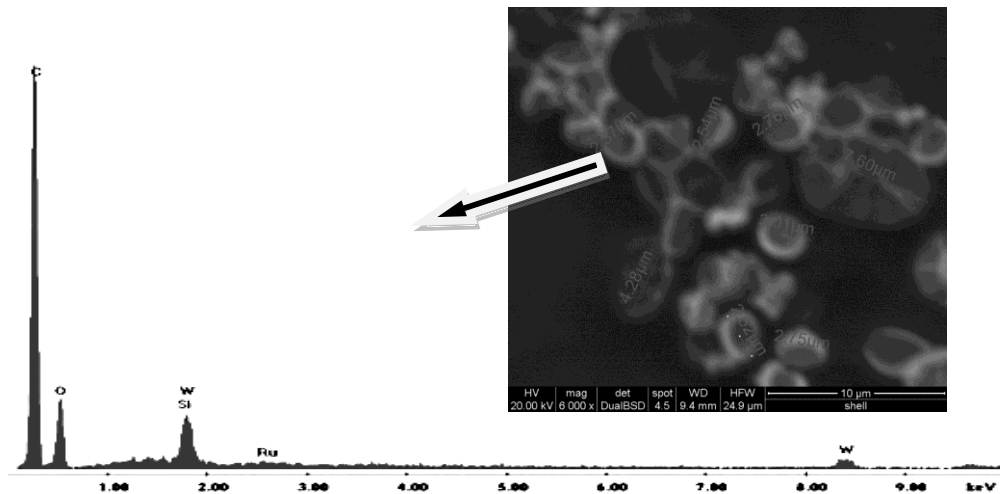


Figura 2.32- Analisi SEM ed EDX della capsula contenente RuPOM nella shell e DEX nel core ottenute presso NNL.

Questi risultati dimostrano come le interazioni elettrostatiche siano molto efficienti per il ricoprimento di polimeri cationici con il POM. Ulteriori prove hanno permesso di preparare capsule contenenti, oltre al RuPOM, ulteriori molecole funzionali nel core o nella shell. Avendo visto l'efficienza nel ricoprimento polimerico per tali capsule contenenti il POM nella shell, le sintesi fatte successivamente non sono state caratterizzate step-by-step, ma si è mirato ad ottenere il prodotto da caratterizzare direttamente al microscopio fluorescente, come mostrato di seguito.

2.2.7 POM nella shell associato ad un tag fluorescente

Per valutare possibili applicazioni per il drug delivery delle capsule in ambiente fisiologico, in cui si possa sfruttare il RuPOM per la sua attività come catalasi, è stata sintetizzata una capsula contenente Destrano Fluorescente nel core (FITC-Destrano) e RuPOM nella shell. Una volta creato il core di Destrano fluorescente e materiale templante CaCO_3 , questo è stato ricoperto con quattro strati polimerici (PSS-PAH)₂, e successivamente con il RuPOM, anch'esso rivestito ulteriormente con quattro strati polimerici prima di rimuovere il CaCO_3 . Le capsule così ottenute sono state caratterizzate tramite microscopia a fluorescenza, utilizzando un filtro a 488 nm, grazie alla collaborazione con la Dott.ssa Elsa Fabbretti (Università di Nova Gorica, Slovenia).

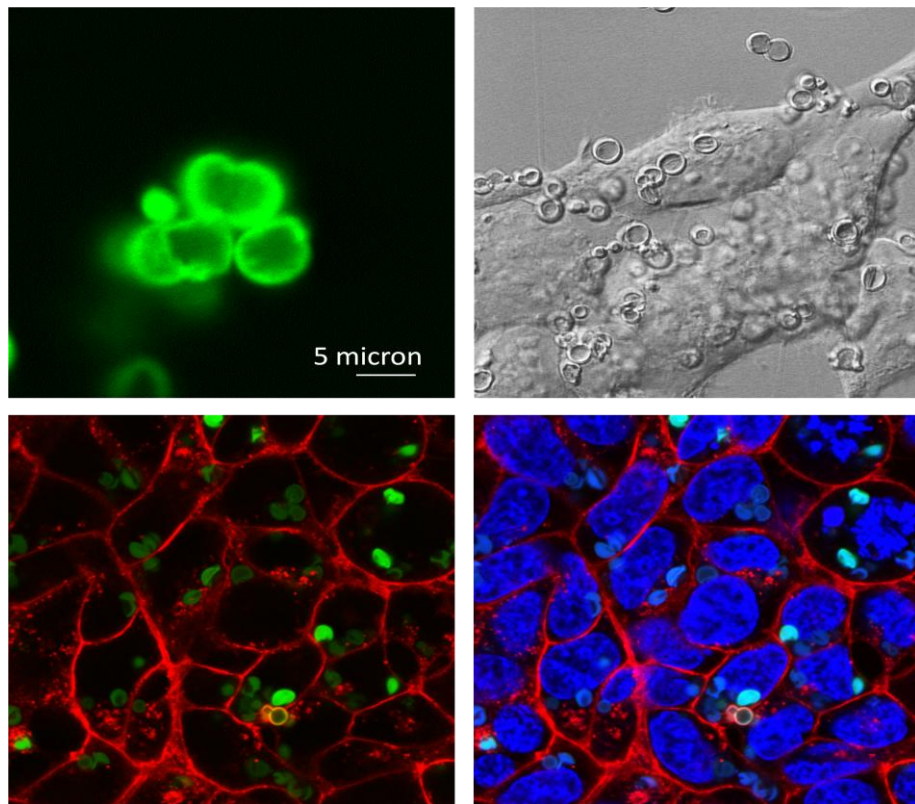


Figura 2.33- Immagini al microscopio di Capsule di FTIC-DEX(core) RuPOM (shell).
Sopra (sinistra): immagine ottenuta con microscopio a fluorescenza (filtro 488

nm): (destra) immagine ottenuta al microscopio ottico per capsule poste a contatto con cellule HEK. Sotto: immagini al microscopio confocale ottenute dopo 24 h di incubazione delle capsule, che mostrano l'internalizzazione delle capsule (verdi o azzurre) grazie ad agenti di imaging WGA (Wheat Germ Agglutinin Conjugate), per la visualizzazione delle pareti cellulari (rosse, a sinistra) o con Hoechst 33342 (blue, Invitrogen H1399), per identificare i nuclei delle cellule (blu, a destra).

La fluorescenza caratteristica della FITC ($\lambda_{ex}= 490 \text{ nm}$; $\lambda_{em}= 520 \text{ nm}$) permette di osservare la regolare morfologia delle capsule, che presentano un diametro di 3-4 μm e maggior concentrazione di molecole fluorescenti verso la shell. Le capsule sono state anche poste in contatto con cellule modello HEK (incubazione per 16 h a 37°C). Si può osservare che molte capsule attraversano la parete cellulare e mantengono la fluorescenza anche in condizioni fisiologiche. L'integrità delle cellule dopo il trattamento suggerisce una ridotta tossicità, che dovrà essere comunque verificata mediante specifiche prove di proliferazione e vitalità cellulare.

Test ulteriori, eseguiti mediante microscopia confocale, hanno permesso di visualizzare la localizzazione delle capsule. Agenti di imaging quali Wheat Germ Agglutinin Conjugate o Hoechst 33342 consentono di evidenziare, rispettivamente, la parete cellulare ed il nucleo, mostrando come le capsule siano localizzate a livello del citoplasma (Figura 2.33).

Contemporaneamente a ciò, è stata effettuata una prova di decomposizione dell'acqua ossigenata, in modo da verificare il mantenimento dell'attività di catalasi e l'accessibilità del RuPOM confinato nella shell. L'esperimento è stato condotto disperdendo in tampone fosfato, a pH 7, circa 80 mg di capsule ed aggiungendo H₂O₂.

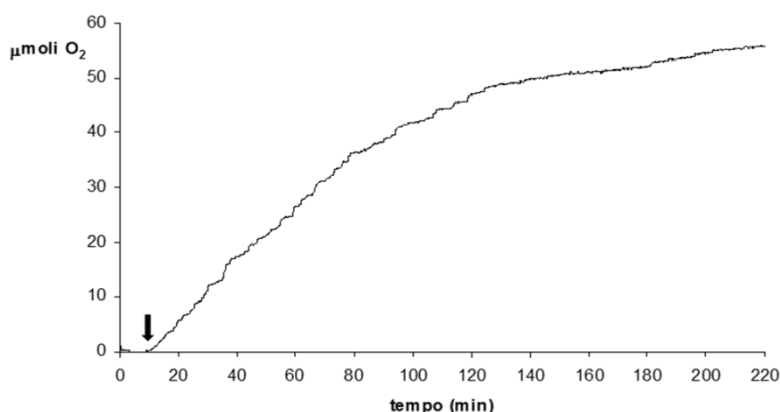
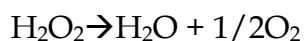


Figura 2.34-.Sviluppo di O₂ registrato in soluzione contenente H₂O₂ e capsule FTIC-DEX(core) RuPOM (shell), monitorato mediante sensore di pressione collegato ad un reattore chiuso.

Lo sviluppo di ossigeno è stato rivelato dal crescente sviluppo di pressione nel reattore. La quantità di ossigeno sviluppata è compatibile con una decomposizione quantitativa dell'acqua ossigenata, secondo la stechiometria di reazione.



L'attività inizia dopo un tempo di induzione di 10 min., probabilmente necessari per consentire la diffusione di H₂O₂ verso gli strati interni della particella. E' possibile misurare una Velocità massima si produzione di O₂ pari a $9.63 \cdot 10^{-3}$ μmoli O₂/s. Conoscendo la costante di velocità della reazione in condizioni omogenee ($k = 36.8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), e nell'ipotesi che altri fattori non comportino un rallentamento di attività, è possibile risalire alla quantità di RuPOM accessibile, pari a $1.58 \cdot 10^{-8}$ moli = 0.09 mg.

Questi risultati sono molto promettenti: il RuPOM potrebbe effettivamente essere introdotto nelle cellule per effettuare lo smaltimento di ROS in eccesso, in un sistema confinato che potrebbe limitarne l'eventuale tossicità o la disattivazione da parte di macromolecole biologiche. Ulteriori studi saranno condotti utilizzando

anche polimeri biodegradabili, per valutare l'effetto di un rilascio graduale nella cellula.

2.2.8 POM nella shell associato a sensibilizzatori

Per applicazioni nel campo della conversione di energia solare, sono state sintetizzate delle capsule contenenti nella shell anche un foto sensibilizzatore, quale la porfirina tetra cationica (Figura 2.38) e il Rubipy (figura 2.35). Come accennato nel precedente capitolo, questo particolare sistema permette di ottenere modelli di superfici su cui assemblare i *building block* necessari ad effettuare l'ossidazione foto catalitica dell'acqua.

- **Ru(bpy)₃²⁺ come foto sensibilizzatore**

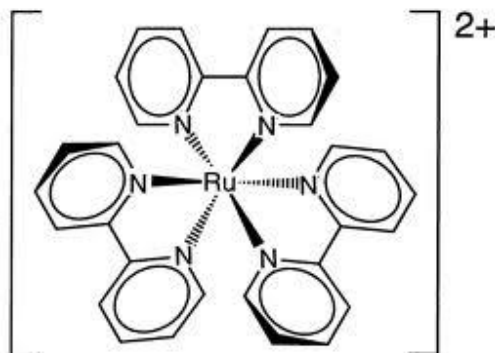


Figura 2.35-Ru(bpy)₃²⁺

In collaborazione con la Dott.ssa L.L. del Mercato si è provato ad inserire Rubipy negli strati più esterni rispetto al POM, in modo da agire da efficace sistema antenna e raccogliere le radiazioni visibili. La scarsa densità di carica del complesso non ne permette un'interazione stabile. Si è provato quindi a preparare una capsula contenente il foto sensibilizzatore nel core utilizzando CaCO₃ e polistirene solfonato come

templanti, e il catalizzatore RuPOM nella shell. L'analisi IR, una volta rimosso il CaCO_3 , ci mostra la presenza nella capsula sia del $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ che quella del RuPOM, essendo presenti anche le bande caratteristiche del POM nella zona compresa tra $600\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$.

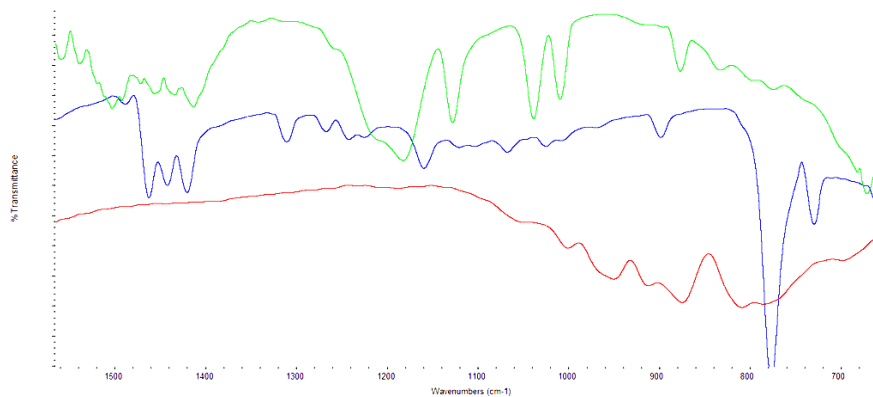


Figura 2.36- Confronto tra gli spettri IR del campione contenente $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ nel core e RuPOM nella shell (campione proveniente da NNL) (verde), $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ (blu), RuPOM (rosso)

La microscopia di fluorescenza mostra la presenza di capsule aventi diametro di $5\ \mu\text{m}$. L'emissione è visibile su tutta la sezione delle particelle grazie alla luminescenza del Rubipy a 610 nm ($\lambda_{\text{ex}}=453\text{ nm}$). Da notare che questa tecnica è interessante perché non richiede l'applicazione di vuoto, che spesso porta al collasso/ripiegamento delle capsule.

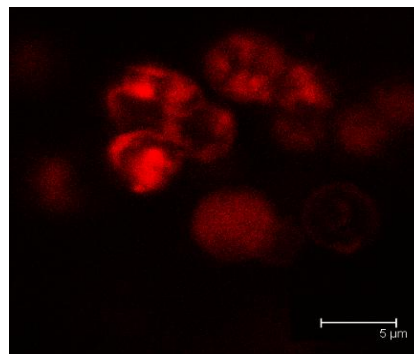
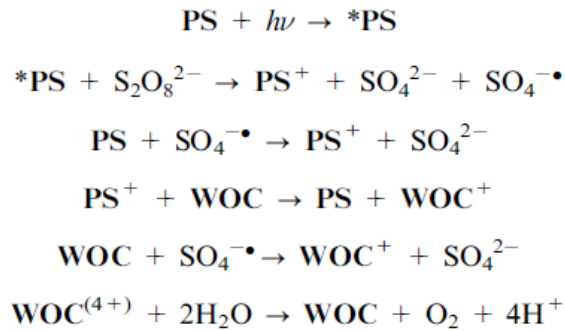


Figura 2.37- Capsule di Rubipy (core) RuPOM (shell). Visualizzate mediante microscopia di fluorescenza con filtro a 450 nm .

L'ossidazione fotocatalitica dell'acqua da parte del RuPOM in presenza di un fotosensibilizzatore e di un accettore di elettroni sacrificale quale lo ione persolfato avviene mediante una serie di processi riportati nello schema sottostante.



Schema 2.3- Step di fotocatalisi per lo splitting dell'acqua

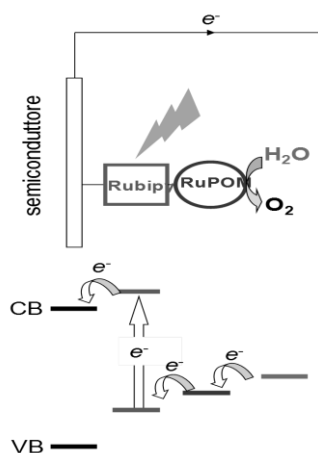
Inizialmente l'assorbimento della luce promuove il fotosensibilizzatore (PS) al suo stato eccitato (PS*), che può reagire con una molecola di persolfato per generare la sua forma ossidata (PS+) e un radicale solfato; quest'ultimo reagisce con una seconda molecola di fotosensibilizzatore formando la specie ossidata e uno ione solfato. Il fotosensibilizzatore nella forma ossidata reagisce infine con il catalizzatore (WOC) portandolo alla forma ossidata. Dopo successivi step di ossidazione si arriva a WOC⁴⁺, che è in grado di ossidare l'acqua, in un passaggio che sviluppa ossigeno molecolare e riporta la specie allo stato iniziale. Nel caso particolare del persolfato come accettore sacrificale, può avvenire anche la reazione diretta del radicale solfato con il WOC.¹¹²

In fase omogenea, questo tipo di sistema è molto efficiente e consente di ottenere un alto numero di cicli catalitici per il RuPOM, con alte velocità di produzione di ossigeno.¹¹³

L'esperimento con le capsule è stato condotto in condizioni di reazioni simili a quelle riportate per il sistema omogeneo. Circa 10 mg di capsule

sono state sospese in soluzione acquosa (tampone $\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{SiF}_6$, $\text{pH} = 5.2$) in presenza di ioni persolfato e il sistema è stato sottoposto ad irraggiamento con luce monocromatica a 450 nm.

In queste condizioni, tuttavia, non si è osservata produzione di ossigeno. Le principali ragioni possono essere: (i) lo scarso contenuto di Rubipy nelle capsule e la competizione da parte del RuPOM nell'assorbimento della luce, che precludono un'efficace promozione del fotosensibilizzatore allo stato eccitato; infatti negli esperimenti condotti in fase omogenea il Rubipy viene solitamente utilizzato in concentrazioni abbastanza elevate (1 mM), in largo eccesso rispetto al RuPOM (1-5 μM); (ii) la possibilità che il fotosensibilizzatore, pur assorbendo la luce, non risulti accessibile allo ione persolfato, in quanto è presente all'interno del core; (iii) il possibile spegnimento dello stato eccitato del Rubipy da parte del RuPOM, come recentemente riportato dal nostro gruppo.¹¹⁴ Quest'ultima limitazione potrebbe essere comunque superata passando ad un sistema in fase eterogenea basato sull'uso di un semiconduttore, come quello riportato nello schema 2.4 in alto, che impedirebbe lo spegnimento da parte del RuPOM. In questo caso, infatti, si realizza il veloce trasferimento di elettroni dal fotosensibilizzatore, nello stato eccitato, al semiconduttore.



Schema 2.4- schema che illustra la sequenza dei componenti su di un fotoanodo e i relativi trasferimenti elettronici.

- **Meso-Tetra(N-metil-4-piridil)porfirina tetratosilata (TMPyP) come fotosensibilizzatore**

In alternativa al Rubipy, sono state preparate capsule contenenti anche altri fotosensibilizzatori. La porfirina tetra cationica è stata scelta perché dispone di cariche multiple, capaci di promuovere un'interazione più efficace con i polimeri superficiali.

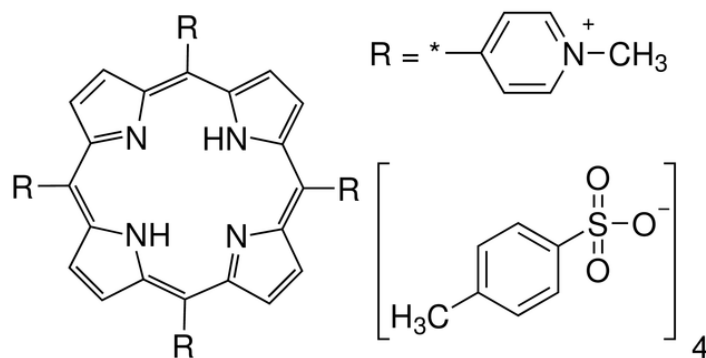


Figura 2.38 -Porfirina tetracationica utilizzata: meso-Tetra(N-metil-4-piridil)porfirina tetratosilata (TMPyP)

L'uptake della porfirina nella shell è confermato dall'analisi UV del surnatante e delle acque di lavaggio di tale step di reazione. Anche in questo caso la quantità di porfirina utilizzata per il rivestimento dello strato carico negativamente, precedentemente depositato sulla capsula, risulta in eccesso. L'UV delle acque surnatanti infatti ci conferma l'ancoraggio di parte della porfirina sulla superficie della capsula.

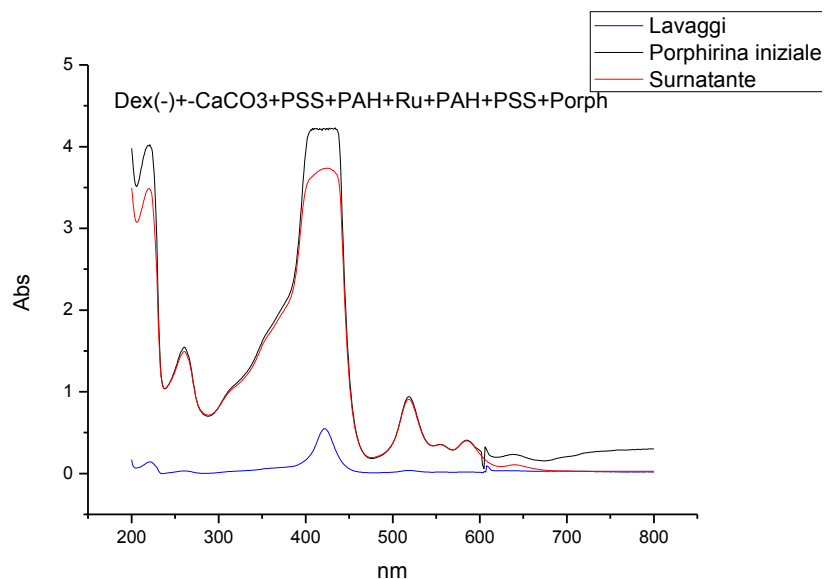


Figura 2.39- Spettro UV del surnatante e delle acque di lavaggio dello step di associazione della porfirina nella shell della capsula contenente Dex nel core e RuPOM nella shell.

Una volta rivestito tale strato con un doppio strato polimerico, è stato rimosso il CaCO_3 , e dall'analisi UV di tali acque surnatanti e di lavaggio, notiamo l'assenza di RuPOM o porfirina in soluzione. Durante i vari step di rivestimento si è proceduto a prelevare aliquote di particelle per misurare l'alternanza della carica, mediante misure di Z-potential, in modo da capire se dopo ogni rivestimento la carica sulle particelle fosse sufficiente da garantire il legame del successivo layer: i risultati ottenuti sono mostrati in tabella 2.3.

Tabella 2.3- Valori di Z-Potential ottenuti dall'analisi di una sospensione delle capsule dopo ogni step di rivestimento, in acqua milli-Q.

	STEP SINTETICI	Z-Potential (mV)	Z-Deviation (mV)
1°step	[Dex+CaCO ₃]	-8,21	4,89
2°step	[Dex+CaCO ₃] PSS	-11,67	5,35
3°step	[Dex+CaCO ₃] PSS/PAH	+0.686	3,74
4°step	[Dex+CaCO ₃] PSS/PAH/PSS	-6,24	7,05
5°step	[Dex+CaCO ₃] (PSS/PAH) ₂	+1,54	5,42
6°step	[Dex+CaCO ₃] (PSS/PAH) ₂ RuPOM	-13,23	5,8
7°step	[Dex+CaCO ₃] (PSS/PAH) ₂ RuPOM+PAH	-1,29	4,57
8°step	[Dex+CaCO ₃] (PSS/PAH) ₂ RuPOM(PAH/PSS)	-18,8	9,73
9°step	[Dex+CaCO ₃] (PSS/PAH) ₂ RuPOM(PAH/PSS)H ₂ TMPyP	-4,81	9,15
10°step	[Dex+CaCO ₃](PSS/PAH) ₂ RuPOM(PSS/PAH)H ₂ TMPyP+PSS	-17,2	9,78
11°step	[Dex+CaCO ₃](PSS/PAH) ₂ RuPOM(PSS/PAH)H ₂ TMPyP+PSS+PAH	-0.673	5,14
12°step	[Dex+CaCO ₃](PSS/PAH) ₂ RuPOM(PSS/PAH)H ₂ TMPyP(PSS/PAH/PSS)	-25,33	7,5
13°step	[Dex+CaCO ₃](PSS/PAH) ₂ RuPOM(PSS/PAH)H ₂ TMPyP(PSS/PAH) ₂	+6,89	7,54

Dall'analisi allo Z-Potential si osserva che in alcuni casi, dopo il ricoprimento con il Poli allil ammonio cloruro (PAH) dello strato di RuPOM o dopo ricoprimento con la porfirina tetra cationica, il

polielettrolita aggiunto non è in grado di neutralizzare totalmente la carica presente sulla capsula. Nonostante ciò, la saturazione dei siti carichi, e soprattutto l'attesa alternanza del potenziale, continuano efficacemente nello strato successivo.

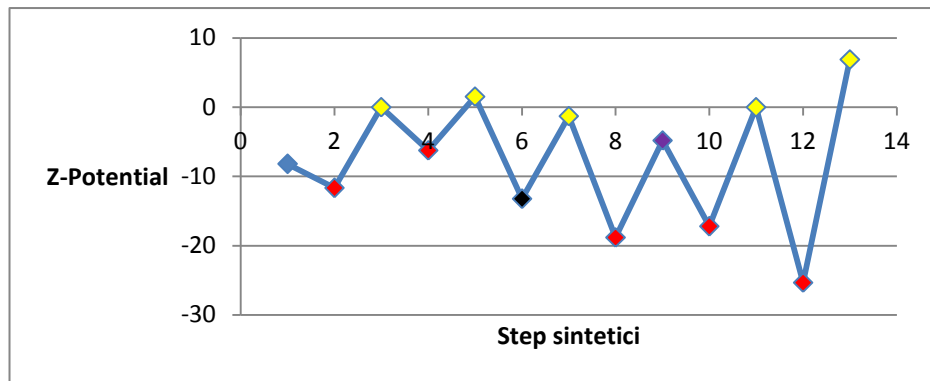


Figura 2.40-Grafico esplicitante l'alternarsi del valore di Z-Potential dopo vari step di ricoprimento:solo CaCO₃(blu), PSS(rosso),PAH(giallo), RuPOM (nero), TMPyP(viola).

Il prodotto, ottenuto dopo la rimozione del CaCO₃, è stato quindi caratterizzato tramite TEM, da cui notiamo, oltre a materiale estesamente aggregato, la presenza di capsule isolate aventi diametro > 1 µm. Le sfere hanno superficie rugosa, e sono caratterizzate da un forte contrasto, dovuto a elevata concentrazione di atomi pesanti nella shell. Grazie alla luminescenza della porfirina a 662 e 721 nm ($\lambda_{ex}=418$), è stato possibile ottenere immagini al microscopio a fluorescenza, che mostrano capsule di 4 µm di diametro che emettono prevalentemente nella zona della shell.

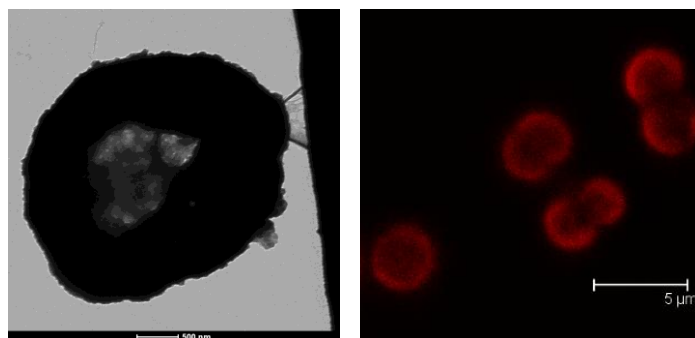


Figura 2.41-Analisi TEM della capsula contenente RuPOM e TMPyP nella shell e Dex nel core, dopo la rimozione del CaCO₃ e immagine ottenuta al microscopio a fluorescenza con filtro 450.

Anche le capsule contenenti porfirine e POM possono essere applicate in fotocatalisi per l'ossidazione dell'acqua; si è deciso, innanzitutto, di studiare il sistema in fase omogenea, in modo da trovare le condizioni di reazione adatte, in quanto tale sistema non è ancora stato riportato in letteratura.

Prendendo spunto dalle condizioni di letteratura utilizzate per il Rubipy, la prima prova catalitica è stata effettuata su un campione omogeneo contenente Porfirina e RuPOM, utilizzando le stesse concentrazioni utilizzate per il Rubipy. Dopo aver degasato con azoto la soluzione, essa è stata mantenuta al buio per 20 minuti e successivamente illuminata con una lampada al tungsteno, utilizzando un filtro cut-off a 375 nm, per eliminare la radiazione UV. Il profilo cinetico di produzione di Ossigeno è riportato in Figura 2.42.

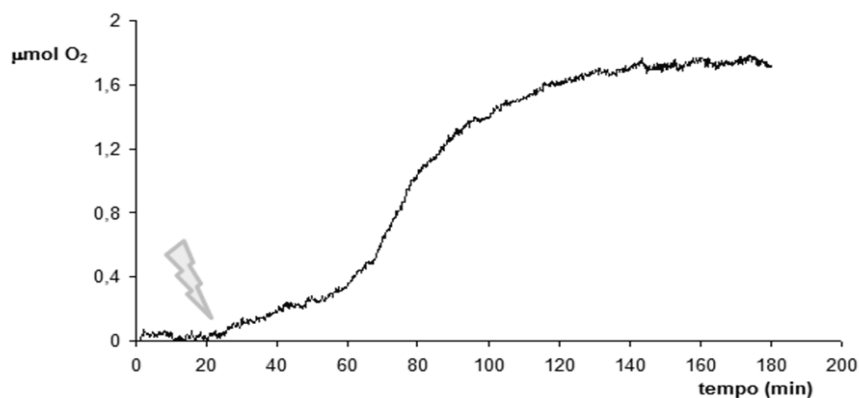
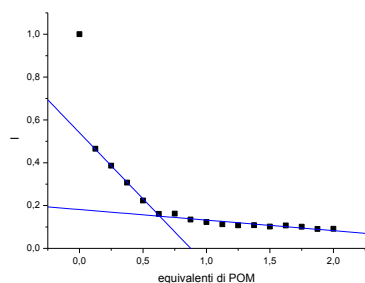


Figura 2.42-Profilo cinetico di produzione di Ossigeno da una campione contenente Porfirina e RuPOM in soluzione

Come si nota, in concomitanza con l'irraggiamento della soluzione, si osserva l'istantanea produzione di ossigeno. La cinetica di produzione è, tuttavia, complessa visto che si osserva un aumento di velocità solo dopo circa 70 minuti di reazione. E' possibile che una delle cause per tale comportamento della cinetica sia dovuto alla non completa omogeneità del sistema. La produzione di ossigeno termina dopo circa 150 minuti, raggiungendo un valore di 1,78 micromoli di O₂, corrispondenti a 23 cicli catalitici (TON). È interessante valutare anche la produzione di ossigeno massimo (calcolata nel punto di massima pendenza della curva), che risulta essere pari a $6,94 \cdot 10^{-10}$ moli O₂/s, corrispondenti ad una frequenza di cicli catalitici (TOF) di $9,13 \cdot 10^{-3}$ s⁻¹. Pur essendo i valori di TON e TOF inferiori rispetto all'analogo sistema con il Rubipy (TON=350, TOF= $8 \cdot 10^{-2}$ s⁻¹)¹¹³ il sistema risulta interessante perché la porfirina è un sensibilizzatore *metal free*, ed apre la possibilità ad una ottimizzazione del sistema.

A questo punto è stata testata l'attività catalitica delle capsule, che tuttavia nelle stesse condizioni, non hanno portato a produzione di ossigeno. E' da considerare che mantenendo le stesse quantità di reagenti (0.15mM in Porfirina; 0.08mM in RuPOM; 10mM in Na₂S₂O₈), anche il sistema in fase omogenea risulta inattivo. Anche in questo caso i motivi possono essere molteplici, e ricalcano quelli già elencati precedentemente per il Rubipy. In particolare è stata verificato, mediante titolazione di fluorescenza, che il catalizzatore spegne lo stato eccitato della porfirina (Figura 2.43).



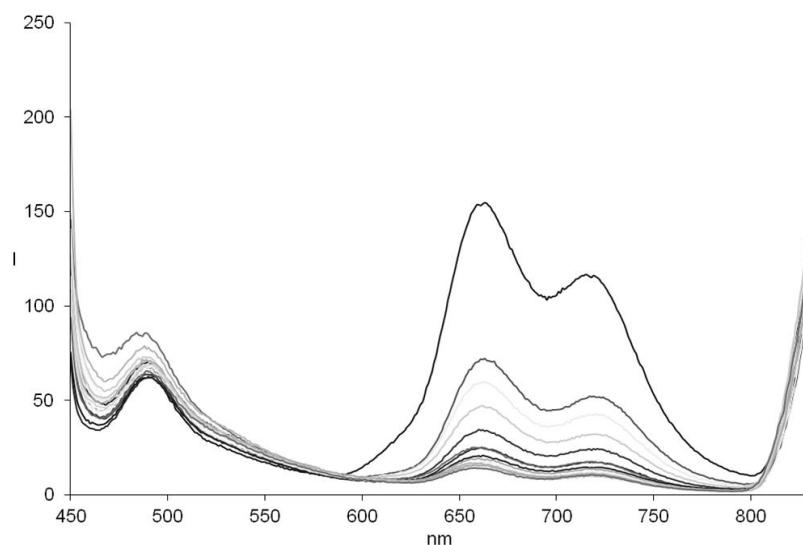


Figura 2.43-Quenching di fluorescenza della TMPyP in presenza di RuPOM.
 $\lambda_{ex}=421\text{nm}$

È possibile che il meccanismo di quenching sia simile a quello osservato con il Rubipy, dovuto a trasferimento elettronico dal sensibilizzatore al RuPOM, seguito da trasferimento elettronico inverso.¹¹⁴ Seguendo l'intensità della fluorescenza a 662 nm in funzione degli equivalenti di RuPOM aggiunti, si nota un cambiamento di pendenza dopo l'aggiunta di 0.5 equivalenti di catalizzatore; questo comportamento è ancora analogo a quello osservato con il Rubipy ed è indicativo della formazione di coppie ioniche in soluzione con un rapporto medio di porfirina: RuPOM, 2:1. Questo rapporto è atteso sulla base delle cariche accessibili dei due componenti: 4+ per la porfirina, 8- per il RuPOM (pur essendo 10- la carica totale del catalizzatore, è stato osservato che due cationi Na^+ , non vengono rimossi dalla struttura). Il fenomeno di spegnimento pur essendo un problema in sistemi in fase omogenea, non pregiudica la possibilità di utilizzare le due componenti in un elettrodo (fotoanodo), in cui il trasferimento elettronico dal fotosensibilizzatore all'elettrodo stesso è molto veloce.

2.8 Sommario dei risultati riguardanti la preparazione di capsule

Le prove eseguite hanno permesso di ottenere informazioni sul metodo di incapsulamento di POM in capsule a multistrato polimerico. I risultati sono riassunti in Tabella 2.4.

In generale, l'inserimento del RuPOM nel core appare più problematico per la presenza di materiale amorfo o per la ridotta stabilità del core stesso. Questo è probabilmente dovuto all'influenza del POM nel processo di formazione delle microparticelle di CaCO₃. Si può ipotizzare che un'ulteriore ottimizzazione della composizione del core, che preveda comunque l'uso di templanti cationici, possa garantire omogenea morfologia e buona capacità di trattenere il POM.

L'inserimento di RuPOM nella shell, cioè quando le microparticelle sono già preformate e parzialmente rivestite, sembra essere il metodo migliore per la preparazione di materiale regolare e di dimensioni minori. In questo caso si è potuta anche sperimentare l'associazione a molecole funzionali diverse, mostrando come queste non influiscano sulla stabilità e morfologia del prodotto finale.

Tabella 2.4-Tabella riassuntiva dei dati sperimentali ottenuti dalla sintesi delle varie capsule

		Stabilità del core	Morfologia	Diametro (µm)
Capsule con RuPOM nel core	RuPOM	X	Sferica, regolare	5 ^a
	RuPOM+ Dex ⁻	X	Cristallina, irregolare	6-8 ^a
	RuPOM+ Dex ⁺ +CS	√	Sferica, regolare ^d	< 1-3 ^a
	RuPOM+CS	√	Irregolari, sferiche ^d	4-6 ^a
	RuPOM+ Dex ⁺	√	Sferiche, irregolari ^d	1 ^a

Capsule con RuPOM nella shell	Dex core RuPOM shell	√	Sferiche irregolari	1 ^b
	Rubpy ₃ ²⁺ + PSS core RuPOM shell	√	Sferiche, regolari	3-4 ^c
	Dex core RuPOM e TMPyP shell	√	Sferiche, regolari	2-3 ^c
	FITC-Dex core RuPOM shell	√	Sferiche, regolari	5 ^c

Dettagli ottenuti da: a) immagini SEM; b) immagini TEM; c) immagini al microscopio a fluorescenza. d) presenza di materiale amorfo.

2.9 Conclusioni generali

In conclusione, è stato condotto uno studio preliminare sulla interazione di complessi poliossometallati con materiali nano strutturati di tipo biogenico e con derivati polimerici. In particolare, la ricerca è stata diretta all'osservazione del virus mosaico del tabacco, e a polimeri organici o polisaccaridi, e ad una combinazione di questi organizzati in microcapsule di struttura core/shell:

Il supporto di POM su TMV è possibile a pH acido, in presenza di cationi metallici o di polimeri policationici. In alcuni casi sono stati osservati aggregati anche molto lunghi (diversi μm). Studi ulteriori dovranno comunque essere realizzati per ottenere un protocollo di sintesi del materiale, riproducibile e che permetta il controllo della morfologia risultante. Tale strategia che sfrutta interazioni di tipo supramolecolare fra i componenti del sistema, è particolarmente interessante, perché si presta ad una ottimizzazione rapida, e ad eventuali interventi di auto-riparazione (self-healing) tipici di sistemi

naturali. Inoltre, sono stati sperimentati protocolli per la purificazione del TMV da sottoporre a modificazione covalente della superficie

Per quanto riguarda le capsule core/shell, l'uso di macromolecole cationiche è indispensabile per la preparazione di capsule in grado di confinare il complesso POM nel "core" interno. Sono state anche messe a punto tecniche per isolare il POM nello strato esterno della "shell", in questo modo potendo controllare la compartimentalizzazione delle molecole funzionali necessarie al sistema foto sintetico (catalizzatore e sensibilizzatore), o a molecole "probe" per l'imaging della capsula (fluorofori).

Le capsule prodotte sono permeabili alle piccole molecole, come visto da test di sviluppo di O₂ in seguito alla decomposizione di H₂O₂. I sistemi assemblati sono quindi promettenti per la preparazione di micro reattori in cui il POM risulta protetto e facilmente rimuovibile dall'ambiente di reazione.

I sistemi ibridi sono anche promettenti per il delivery di RuPOM nelle cellule. Sistemi contenenti residui fluorescenti nel core possono essere introdotti nelle cellule e monitorati mediante microscopia di fluorescenza. Questo studio iniziale verrà sviluppato per determinare effetti tossicologici del polianione e l'efficacia nella decomposizione di specie ossigenate reattive, ROS nei sistemi biologici.

Sono stati inoltre ottenuti dati importanti riguardanti l'utilizzo di meso-Tetra(N-metil-4-piridil)porfirina come sensibilizzatore per RuPOM per la costruzione di un sistema foto sintetico artificiale.

3. PARTE SPERIMENTALE

3.1 Strumentazione

Gli spettri infrarossi sono stati raccolti utilizzando uno strumento Nicolet 5700 della Thermo Quest interfacciato con il programma Omnic versione 7.1. La terminologia usata è la seguente:

w: "weak" ;

m: "medium";

s: "strong";

sh: "shoulder";

b: "broad"

Il *pH* dei tamponi e di altre soluzioni sono stati misurati con pHmetro Metrohm munito di elettrodo a vetro tarato quotidianamente con soluzioni tampone standard a pH 4, 7 e 10.

Gli *spettri di Fluorescenza* sono stati registrati tramite spettrofluorimetro Perkin-Elmer LS55, interfacciato da software LB_Winlab.

Gli *spettri UV-Vis* sono stati registrati utilizzando spettrofotometri Perkin-Elmer (Lambda 45) e Varian (Cary 5000) dotati di portacelle termostate a circolazione d'aria. Gli spettri sono stati raccolti nell'intervallo 200-800 nm usando cuvette di quarzo con cammino ottico di 1 cm.

Le *analisi DLS e Z-Potential* sono state effettuate con uno strumento Z-Sizer Malvern.

Le *analisi TEM* sono state registrate presso il Dipartimento di Biologia con uno strumento FEI Tecnai G2.

Le *analisi SEM* sono state fatte con uno strumento Zeiss SUPRA 40VP, usando un voltaggio di accelerazione di 1-5kV.

La *cromatografia a scambio ionico* è stata realizzata con una colonna preparata con resina Amberlite IR-120 (Sigma-Aldrich) nella sua forma acida.

Le immagini al *microscopio confocale* sono state realizzate con uno strumento Leica TCS SP5 X.

3.2 Solventi, reagenti e loro purificazione

Acqua milli-Q: l'acqua deionizzata è stata purificata con sistema Millipore, costituito da una resina a scambio ionico e resine a carbone attivo.

I seguenti reagenti sono stati utilizzati senza ulteriori purificazioni:

- **(Sigma Aldrich)**: tris-(2,2'-bipiridil)dicloro-rutenio(II) esaidrato, Polistirene sulfonato di sodio, Poli diallil dimetil ammonio cloruro, Poli allil ammonio cloruro, Polipiridina, 5,10,15,20-Tetrakis(1-metil-4-piridina)porfirina tetra(p-toluenesulfonata), Poli-D-Glucosammina, Destrano solfato di sodio, Destrano, Dietil ammino etil destrano idroclorurato, Bromo etano.
- **(Carlo Erba)**: acido cloridrico 37%, potassio persolfato.
- **(Normapur)**: sodio idrogeno carbonato, Sodio idrossido.

3.3 Metodologie

Preparazione della soluzione tampone: Tampone acetato pH 3.5, 50mM

In una beuta da 250 mL vengono posti 94.9 mg (0.70 mmoli) di CH_3COONa e 687 μl (12 mmoli) di CH_3COOH al 100% (d=1.049 gr/ml),

e circa 250 mL di H₂O deionizzata. Dopo una vigorosa agitazione il valore di pH misurato è 3.42.

Preparazione della soluzione tampone: Tampone Na₂SiF₆/NaHCO₃, 50 mM

In una beuta da 50 ml vengono sciolti, con qualche ml di acqua milli-Q, 204 mg di Na₂SiF₆ (1.08 mmoli) e 119 mg di NaHCO₃ (1.41 mmoli), e portati a volume con acqua milli-Q. Il pH della soluzione così preparata è 5,22.

Preparazione della soluzione di PSS da 2mg/ml, in NaCl a pH 6.50

In un becker da 500 ml sono stati dissolti 14,6 g di NaCl (250 mmoli) in 500 ml di acqua deionizzata, in modo da ottenere una soluzione 0.5M di NaCl. Successivamente in una beuta da 250 ml sono stati posti 500 mg di PSS, i quali sono stati solubilizzati in 250 ml della soluzione di NaCl 0.5 M precedentemente preparata, ottenendo una soluzione di PSS da 2 mg/ml in NaCl 0.5M.

Tale soluzione è stata portata a pH 6,46 aggiungendo qualche microlitro di una soluzione di HCl 1N.

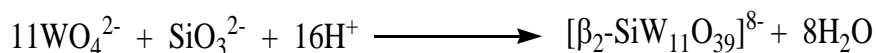
Preparazione della soluzione di PDADMA da 2mg/ml, in NaCl a pH 6.50

In una beuta da 250 ml sono stati posti 2,24 ml di PDADMA ai quali sono stati aggiunti circa 250 ml della soluzione di NaCl 0.5M precedentemente preparata, in modo da ottenere una soluzione di PDADMA da 2 mg/ml in NaCl 0.5 M.

Tale soluzione è stata portata a pH 6.57 mediante l'aggiunta di qualche microlitro di una soluzione di NaOH 1N.

3.4 Sintesi del RuPOM.

Sintesi di $K_8[\beta_2\text{-SiW}_{11}\text{O}_{39}]$.



In una beuta da 50 ml si sciolgono 0.5 g (4.1 mmol) di Na_2SiO_3 in 25 ml di acqua, a temperatura ambiente. A parte, in una beuta da 250 ml si sciolgono 15,1 g (45,9 mmol) di $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ in 75 ml di H_2O , quindi si immerge la beuta in un bagno di acqua e ghiaccio alla temperatura di 5° C. Alla soluzione così preparata vengono aggiunti, tramite imbuto gocciolatore, 13,3 ml di HCl 4.1 M (54,3 mmol) in 30 min agitando vigorosamente per sciogliere l'acido tungstico che si forma in seguito all'aggiunta di acido. A fine reazione si estrae la beuta dal bagno e vi si aggiunge la soluzione di metasilicato precedentemente preparata. Si aggiusta il pH della soluzione a 5.5 tramite l'ausilio di un pH-metro, addizionando piccole aliquote di HCl 4.1 M e si mantiene costante il valore di pH a 5.5 per 100 min sempre aggiungendo piccoli quantitativi di HCl (circa 2 ml).

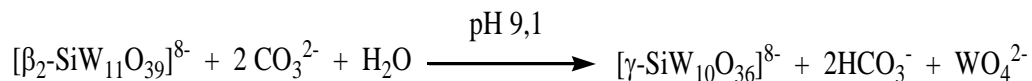
Il precipitato si ottiene addizionando 7,4 g (98,9 mmol) di KCl alla soluzione, mantenuta sotto agitazione per 15 min, e filtrazione su gootch.

Il materiale grezzo di reazione viene purificato ridisciogliendolo in 70 ml di acqua a 25 °C e filtrandolo per eliminare residui insolubili. Si filtra il materiale su gootch e il prodotto viene riprecipitato addizionando 6,6 g (88,1 mmol) di KCl alla soluzione, mantenendola sotto agitazione per 10 min. A questo punto il prodotto precipitato viene filtrato su gootch, e lavato con KCl 2 M (2 × 4 ml).

Si ottengono 5,7 g di $K_8[\beta_2\text{-SiW}_{11}\text{O}_{39}] \cdot 14 \text{H}_2\text{O}$, come solido bianco (resa 45 %).

FT-IR (KBr, cm^{-1}): 1623 (m), 990 (m), 945 (s), 878 (s), 860 (s), 813 (s), 733 (s), 507 (m).

Sintesi di $\text{K}_8[\gamma\text{-SiW}_{10}\text{O}_{36}]$.

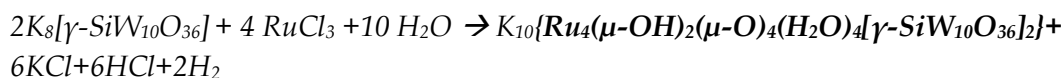


Questa sintesi richiede un accurato controllo mediante pHmetro.

5.00 g (1,64 mmoli) di $\text{K}_8[\beta_2\text{-SiW}_{11}\text{O}_{39}]$ preparato di recente vengono disciolti in 50 ml d'acqua all'interno di un becker, quindi si filtrano velocemente su gootch le impurezze indissolte, generalmente dovute a paratungstati. La soluzione viene basificata aggiungendo piccole aliquote di una soluzione 2M di K_2CO_3 , fino a pH 9.1. Il pH viene mantenuto costante a 9.1 per 16 min, aggiungendo poca soluzione di K_2CO_3 (5,7 ml in tutto). Il sale di potassio del γ -decatungstosilicato viene precipitato versando nel becker 13,6 g (182 mmol) di KCl, e si mantiene il pH costante a 9.1 per altri 10 min. Il precipitato bianco formatosi viene filtrato su gootch e lavato con una soluzione 1M di KCl (1×9 ml). Si ottengono, dopo essiccamento sotto vuoto 3.3 g (1.1 mmoli) di prodotto (resa = 70%).

FT-IR (KBr, cm^{-1}): 1626 (m), 988 (m), 943 (m), 906 (s), 864 (s,b), 818 (m), 743 (s,b), 557 (m), 526 (m).

Sintesi di $\{\text{Ru}_4(\mu\text{-OH})_2(\mu\text{-O})_4(\text{H}_2\text{O})_4[\gamma\text{-SiW}_{10}\text{O}_{36}]\}^{10-}$



In un pallone da 100 ml, si pongono 1.00 g di $\text{K}_8[\gamma\text{-SiW}_{10}\text{O}_{36}]$ (0.33 mmoli), precedentemente preparato, 165 mg di RuCl_3 (0.734 mmoli) e

30 ml di H₂O deionizzata. La soluzione ottenuta viene sottoposta ad agitazione per 1h a 70°C, in un bagno ad olio. Il pH della soluzione passa da 7.5, in presenza del solo K₈[γ-SiW₁₀O₃₆], a 2.8 in presenza di RuCl₃. Dopo 1h di agitazione il prodotto viene precipitato dalla soluzione come sale di Cs, aggiungendo 4.4 gr di CsCl e centrifugando la soluzione per 20 minuti a 3000 rpm. Dopo aver effettuato due lavaggi con qualche mL d'acqua deionizzata, il prodotto viene ridisciolti in 4 ml H₂O deionizzata e caricato su una colonna a scambio cationico, precedentemente caricata con NaCl, in modo da scambiare Cs⁺ con Na⁺, utilizzando H₂O come eluente.

Si rimuove quindi il solvente e si ridiscioglie il campione in 3 ml di H₂O deionizzata, per purificarlo su una colonna ad esclusione dimensionale Sephadex, precedentemente condizionata. Raccolta la soluzione e rotoevaporato il solvente, sono stati ottenuti 610 mg (0.107 mmoli) di prodotto solido nero (resa=33%), caratterizzato tramite spettroscopia IR (figura 2.1) e UV-Vis (figura 2.2).

FT-IR (KBr, cm⁻¹): 1620 (m), 1000 (m), 950 (m-s), 912 (s), 875 (s), 809 (s), 784 (s), 698 (sh), 630 (sh), 568 (sh), 544 (ms), 482 (s).

UV: λ, nm (logε): = 280 (4,54), 450 (3,74).

3.5 Sintesi e caratterizzazione dei composti non commerciali utilizzati

3.5.1 Sintesi degli addotti complessi di TMV con RuPOM

Complesso di TMV e RuPOM a pH 7

Ad 1.5 ml di TMV 0.05mg/ml (1.8*10⁻¹²moli) vengono aggiunti gradualmente 2.5*10⁻⁷ moli di RuPOM, monitorando il cambiamento della fluorescenza dei residui triptofanici del TMV dopo ogni aggiunta tramite spettro fluorimetria: λ_{ex}=270 nm, λ_{max}= 310 nm (Figura 2.3). Il

prodotto ottenuto al termine della titolazione è stato caratterizzato tramite DLS (Figura 2.4) e Z-Potential (Figura 2.5).

ζ potential= -25 mV;

Analisi al DLS= 687,9 nm (88,5%); 82,07 nm (11,5%) di diametro.

Addotto tra TMV e RuPOM in tampone acetato a pH 3.5

Ad 1.5 ml di TMV 0.05mg/ml ($1.8 \cdot 10^{-12}$ moli) in tampone acetato 50mM a pH 3.42, vengono aggiunti gradualmente $1.66 \cdot 10^{-7}$ moli di RuPOM, monitorando il cambiamento della fluorescenza dei residui triptofanici del TMV, dopo ogni aggiunta, tramite spettro fluorimetria: $\lambda_{ex}=270$ nm, $\lambda_{max}= 310$ nm (Figura 2.6). Il prodotto così ottenuto al termine della titolazione è stato caratterizzato tramite DLS, Z-Potential (Figura 2.8), TEM e SEM (Figura 2.9).

ζ potential= -35,5 mV

Analisi al DLS= 688,6 nm (27,2%); 123,6 nm (66,8%); 30,99 nm (6,0%) di diametro.

Addotto tra TMV e RuPOM a pH neutro, mediato da Zn^{2+}

A 1,5 ml di TMV 0.05 mg/ml ($1,8 \cdot 10^{-12}$ moli) sono stati aggiunti 23 μ L di $ZnCl_2$ 1M (0.023 mmoli), pari alla quantità riportata in letteratura,⁷¹ e il prodotto così ottenuto è stato caratterizzato tramite TEM (Figura 2.10).

A tale soluzione sono stati aggiunti gradualmente $8,2 \cdot 10^{-8}$ moli di RuPOM, monitorando, ad ogni aggiunta, la variazione della fluorescenza dei triptofani presenti nel residuo virale, con una $\lambda_{ex}=270$ nm e $\lambda_{max}=310$ nm (Figura 2.11). Il prodotto ottenuto al termine della titolazione è stato caratterizzato tramite TEM (Figura 2.12).

Complesso di TMV e RuPOM mediato da Ru(bpy)₃²⁺

Ad 1 ml di TMV 0,05 mg/ml ($1,25 \cdot 10^{-12}$ moli) sono stati aggiunti gradualmente $4,15 \cdot 10^{-9}$ moli di Ru(bpy)₃²⁺, monitorando tramite spettrofotometro UV-Vis, dopo ogni aggiunta, l'andamento dell'assorbanza a $\lambda = 453$ nm, relativa all'assorbimento del Ru(bpy)₃²⁺ (Figura 2.13). Il prodotto così ottenuto è stato caratterizzato tramite Z-Potential, e TEM (Figura 2.14).

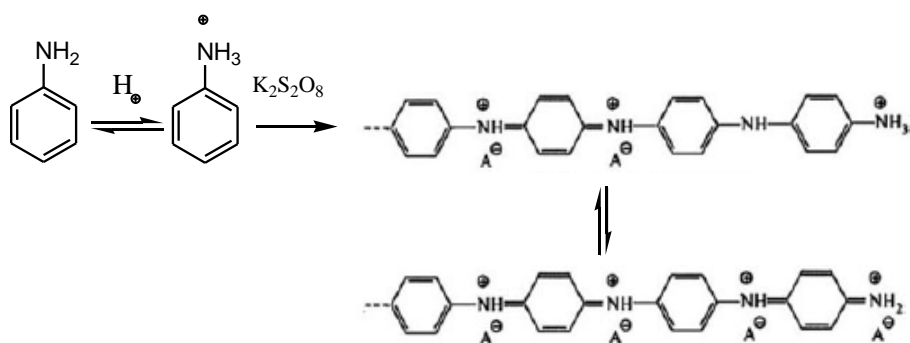
ζ potential = -14,0 mV

Tale soluzione, è stata successivamente titolata con $3,83 \cdot 10^{-7}$ moli di RuPOM, monitorando dopo ogni aggiunta il cambiamento della fluorescenza sia dei residui triptofanici del TMV ($\lambda_{ex} = 270$ nm, $\lambda_{max} = 310$ nm), che sul Ru(bpy)₃²⁺ ($\lambda_{ex} = 453$ nm, $\lambda_{max} = 610$ nm), ad opera del RuPOM. Il complesso così ottenuto è stato caratterizzato tramite Z-Potential e TEM.

ζ potential = -30,0 mV

3.5.2 Sintesi dei polimeri non commerciali utilizzati.

Sintesi Polianilina¹⁰⁶



Dopo aver distillato 10 ml di Anilina al 99% ($d=1,022$ gr/ml), ne sono stati posti $451\mu\text{L}$ in circa 95 ml di H_2O deionizzata (4,9 mmoli), in modo da ottenere una concentrazione finale di Anilina in acqua pari a $4,9 \cdot 10^{-2}\text{M}$. A tale soluzione sono stati aggiunti 1,38 g di Persolfato di Potassio (5,1 mmoli) e 4,9 ml di HCl 1M (4,3 mmoli) e la soluzione così ottenuta è stata lasciata sotto vigorosa agitazione per 10 minuti in un bagno d'acqua a 80°C . Trascorsi 10 minuti la soluzione è stata velocemente raffreddata in un bagno di ghiaccio ($0^\circ \pm 3^\circ \text{C}$) e mantenuta a tale temperatura per 10 ore. Il prodotto precipitato, verde scuro, è stato quindi filtrato su gootch, lavato con acqua deionizzata fredda e tenuto sotto vuoto per 24h. Il prodotto ottenuto pesa 470 mg ed è stato caratterizzato tramite FT-IR e SEM.

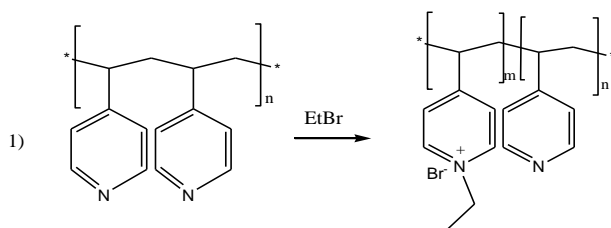
FT-IR (KBr, cm^{-1}): 3258 (sh), 2960 (w), 2921(w), 2851 (w), 1772 (b, m), 1576 (m), 1491 (m-s), 1384 (s), 1299 (m), 1244 (sh), 1143 (s), 881 (w), 814 (m), 754 (w), 692 (s), 668 (s), 600 (w), 505 (m).

La stessa reazione è stata eseguita utilizzando come iniziatore l'ammonio persolfato, sintetizzato di fresco. Il prodotto ottenuto è stato anch'esso caratterizzato tramite FT-IR e SEM.

FT-IR (KBr, cm^{-1}): 3252 (sh), 3042 (w), 2960 (w), 2918 (w), 2851 (w)1771 (b, m), 1575 (m), 1494 (m-s), 1371 (w), 1297 (m), 1238 (sh), 1144 (s), 881 (w), 813 (m), 750 (w), 691 (s), 668 (sh), 600 (w), 500 (m).

Nonostante l'ottenimento del prodotto desiderato, questo non presenta la forma in fibre che ci aspettavamo e per tale motivo non è stato utilizzato per lo scopo progettato.

Sintesi N-etil poli 4-vinil piridina⁷⁸



1,99 g di poli 4-vinil piridina ($3.33 \cdot 10^{-5}$ moli) sono stati disciolti in 100 ml di una soluzione di etanolo al 30%. Una volta solubilizzato il polimero, sono stati aggiunti 8,63 ml di etil bromuro al 98% ($d=1,46$ gr/ml), (113 mmoli) e la soluzione è stata posta in vigorosa agitazione per 72h a 45°C . Il prodotto è stato precipitato dalla soluzione di reazione con acetone, centrifugato a 3000 rpm per 20 minuti. Sono stati effettuati due lavaggi con acetone ed il prodotto giallino ottenuto è stato asciugato (peso 650 mg). Il solido è stato quindi caratterizzato tramite spettroscopia FT-IR.

FT-IR (KBr, cm^{-1}): 2962 (w), 2919 (w), 2851 (w), 1647 (m), 1457 (w), 1386 (sh), 1261 (s), 1167 (w), 1098 (m-s), 1019 (m), 928 (w), 878 (m), 801 (s), 667 (s), 526 (w), 467 (w).

3.5.3 Sintesi di nanoparticelle di chitosano e RuPOM

Preparazione della soluzione di chitosano

100 mg di chitosano vengono posti in 100 ml di una soluzione di acido acetico glaciale allo 0.05% e agitati vigorosamente per 2h. Una volta sciolto tutto il chitosano, la soluzione viene filtrata su millipore da $0.45\mu\text{m}$, in modo da ottenere una soluzione limpida di chitosano da circa 1 mg/ml.

Sintesi delle nanoparticelle di chitosano e RuPOM

10 ml della soluzione di chitosano da 1 mg/ml vengono sonicati per 30 minuti, parallelamente ad una soluzione di RuPOM da 1 mg/ml. La soluzione di chitosano è stata quindi portata a pH 6.07 aggiungendo lentamente qualche μL di NaOH 0.1N. A questo punto, alla soluzione di chitosano così ottenuta, è stato aggiunto, lentamente e durante agitazione, 1 ml della soluzione di RuPOM. Il prodotto così ottenuto è stato caratterizzato tramite DLS e Z-potential.

ζ potential= 23,9 mV

Analisi al DLS= 290 nm di diametro.

La sintesi è stata ripetuta, sia variando il rapporto in volume tra la soluzione di chitosano e quella di RuPOM a 20:1 (pH portato a 5.97), sia lasciando invariato il rapporto in volume a 10:1, mantenendo il pH naturale della soluzione di Chitosano a 4.14. Entrambi i prodotti sono stati caratterizzati in soluzione tramite DLS e Z-potential.

- ✓ CS : RuPOM \rightarrow 20:1, pH 5.97 : ζ potential= 23,9 mV; Analisi al DLS= 160 nm di diametro.
- ✓ CS:RuPOM \rightarrow 10:1, pH 4.14 : ζ potential= 57.2 mV; Analisi al DLS= 450 nm di diametro.

3.5.4 Sintesi di microparticelle contenenti RuPOM nel core

2.30 ml di una soluzione da 5 mg/ml del materiale da incapsulare (riportati in tabella 3.1) vengono posti ad agitare, in una vial da 20 ml. A tale soluzione sono stati aggiunti 1.84 ml di una soluzione di CaCl_2 0.33M (0.6 mmoli), e subito dopo, goccia a goccia, 1,84 ml di una soluzione di $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ 0.33M (0.6 mmoli).

Tabella 3.1-Composizione del core delle capsule sintetizzate

	Dextran hydrochloric solution	Dextran sulfate sodium	Chitosan	RuPOM	CaCO ₃
1°serie		✓			✓
2°serie				✓	✓
3°serie		✓		✓	✓
4°serie		✓	✓	✓	✓
5°serie			✓	✓	✓
6°serie	✓			✓	✓

All'aggiunta di NaHCO₃, la soluzione, inizialmente limpida, mostra istantaneamente la formazione di precipitato bruno (in presenza di RuPOM), che rimane in sospensione grazie all'agitazione. Trascorsi 30 secondi dall'aggiunta del bicarbonato, la soluzione viene posta in fiale Eppendorf per centrifuga e centrifugata per 15 secondi a 4000 rpm. Una volta rimossa la soluzione surnatante, sono stati effettuati 3 cicli di lavaggio con circa 3 ml di H₂O milli-Q. Le soluzioni surnatanti e di lavaggio sono state caratterizzate tramite analisi spettroscopica UV-Vis, mentre il solido ottenuto tramite IR, e in alcuni casi anche tramite SEM (vedi capitolo 2.2). Gli spettri IR delle microcapsule così ottenute, in tutti i casi, mostrano la predominanza delle bande del CaCO₃.

FT-IR (KBr, cm⁻¹): 1400 - 1500 (b, s), 875 (s), 744 (w, b), 1083 (w).

Alle sospensioni di microparticelle così ottenute, sono stati aggiunti 3 ml di una soluzione di PSS da 2 mg/ml in NaCl 0.5M a pH 6.46. La miscela è stata mantenuta in agitazione per 15 minuti a temperatura ambiente. Successivamente, la dispersione è stata nuovamente posta in

fialette Eppendorf da centrifuga e centrifugata per 30 secondi a 4000 rpm. Una volta rimossa la soluzione surnatante, il solido ottenuto è stato lavato effettuando 3 cicli di centrifugazione con qualche millilitro di acqua milli-Q.

Alle sospensioni di microparticelle ricoperte di PSS, poste in una vial da 10 ml, sono stati aggiunti 3 ml di una soluzione di PDADMA da 2 mg/ml in NaCl 0.5 M a pH 6.57. La soluzione è stata posta in agitazione per 15 minuti, e successivamente disposta in Eppendorf da centrifuga e centrifugata a 4000 rpm per 30 secondi, per facilitare la deposizione del solido sospeso. Rimosso il liquido surnatante, sono stati effettuati 3 cicli di centrifugazione, dopo l'aggiunta di qualche millilitro di acqua milli-Q, in modo da purificare il solido ottenuto da eventuali reagenti in eccesso.

Tali due step di ricoprimento sono stati ulteriormente ripetuti sulle particelle così ottenute, in modo da avere, al termine della procedura di ricoprimento, micro particelle rivestite da quattro strati polimerici.

Il solido ottenuto dopo ogni step di rivestimento è stato caratterizzato, in tutti i casi, tramite spettroscopia FT-IR, monitorando la crescita delle bande tra 2800-3000 cm^{-1} , 1480-1165 cm^{-1} ; 1600-1500 cm^{-1} ; 690-900 cm^{-1} ; e in particolare dei picchi a circa 1325 cm^{-1} , 1140 cm^{-1} e tra 1000-1250 cm^{-1} , caratteristici degli stretching e dei bending dei legami presenti nei polimeri. Per tutte le microcapsule sintetizzate, gli spettri IR confermano la crescita degli strati polimerici sul core centrale, come mostrato in figura sottostante, che mostra la crescita degli strati polimerici sulla micro particella contenente Destrano cationico e RuPOM nel core.

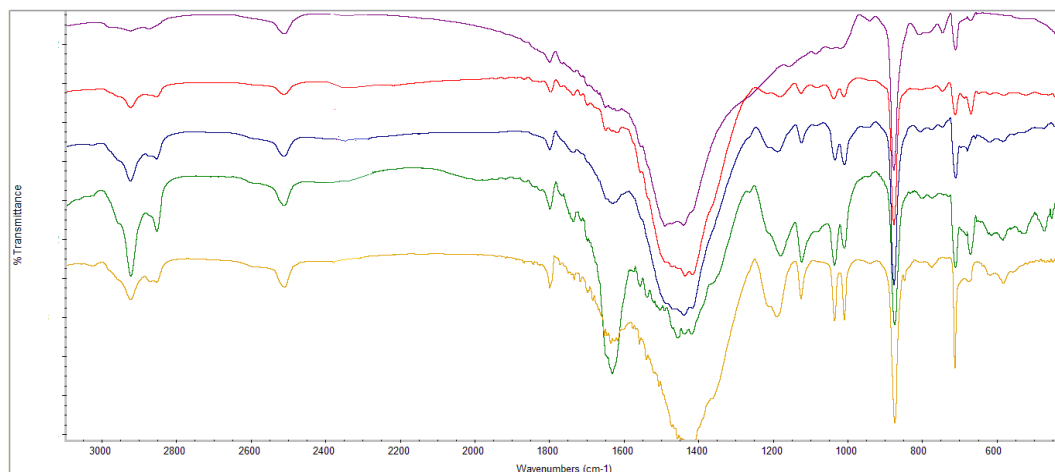


Figura 3.1- Confronto spettri IR delle particelle ottenute dopo ogni step di rivestimento polimerico contenenti Dex+ e RuPOM nel core: CaCO₃ (viola), CaCO₃+PSS (rosso), CaCO₃+PSS+PDADMA (blu), CaCO₃+PSS+PDADMA+PSS (verde), CaCO₃+PSS+PDADMA+PSS+PDADMA (giallo).

Le micro particelle solide sono state poste in una vial da 10 ml, e sottoposte ad agitazione, per qualche minuto, dopo l'aggiunta graduale di 3 ml di una soluzione di EDTA 0.2 M (0.6 mmoli) a pH 7.01. A questo punto la miscela è stata distribuita in fiale Eppendorf da centrifuga e centrifugata per 15 secondi a 4000 rpm. Successivamente una volta rimosso il surnatante sono stati effettuati 3 cicli di centrifugazione, aggiungendo acqua milli-Q per rimuovere l'EDTA in eccesso. Le acque surnatanti e di lavaggio sono state caratterizzate tramite spettroscopia UV-Vis, confermando l'assenza di RuPOM in soluzione. Il solido, in tutti i casi, è stato caratterizzato tramite spettroscopia FT-IR per confermare la mantenuta integrità della capsula, monitorando sia la scomparsa dei picchi caratteristici del CaCO₃ a 1400 - 1500 cm⁻¹ (s, b) ; 875 cm⁻¹ (s); 744 cm⁻¹ (w, b); 1083 cm⁻¹ (w), che la mantenuta presenza di quelli dei polimeri, precedentemente elencati. Inoltre ogni micro particella è stata caratterizzata tramite microscopia elettronica SEM, e in alcuni casi anche TEM, che conferma in tutti i casi l'integrità della micro particella una volta rimosso il CaCO₃, ad eccezione delle micro

particelle contenenti solo RuPOM e RuPOM con destrano solfato nel core, dove l'assenza del materiale templante nel primo caso e la presenza delle cariche negative nel secondo caso, destabilizzano la particella una volta rimosso il templante CaCO_3 .

3.5.4 Sintesi di microparticelle contenenti il RuPOM nella shell

La stessa procedura precedentemente descritta, è stata eseguita anche per la sintesi di particelle contenenti il catalizzatore RuPOM nella shell, ed un foto sensibilizzatore (Rubipy + PSS) nel core o (porfirina tetracationica) anch'esso nella shell. In questo caso il binding di ogni strato di ricoprimento (con polimeri e non) attorno al core centrale, è stato monitorato tramite analisi Z-Potential di una miscela contenente le particelle in sospensione. Il prodotto ottenuto è stato caratterizzato tramite microscopia di fluorescenza in entrambi i casi (Figura 2,37- Figura 2,41) ed anche TEM nel secondo (Figura 2,41).

Infine un'ultima prova è stata effettuata inserendo nel core un tag fluorescente quale il destrano funzionalizzato con fluoreiscaina isotiocianato. Mantenendo le stesse quantità di reagenti riportate nel paragrafo precedente, il prodotto finale è stato caratterizzato al microscopio fluorescente (figura 2.33), in modo da indagare la possibilità di utilizzarlo per monitorare il delivery cellulare della capsula. Su tali capsule è stata anche effettuata una prova di decomposizione dell'acqua ossigenata, in modo da indagare l'accessibilità del RuPOM confinato nella shell, e l'efficienza della sua attività di catalasi.

3.5.5 Ossidazione dell'acqua catalizzata dalle microcapsule contenenti il RuPOM nella shell ed un foto attivatore.

Nelle prove di ossidazione dell'acqua indotta dalla luce, si utilizza uno schlenk in vetro munito di due rubinetti laterali. La preparazione della miscela di reazione viene effettuata coprendo le pareti esterne dello schlenk con fogli di alluminio, in modo che la soluzione rimanga al buio. Nel reattore vengono quindi introdotti circa 50 mg di microcapsule contenenti il foto sensibilizzatore (nel core o nella shell) e il RuPOM (nella shell), 9 mg dell'ossidante $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$ e 3,5 ml di tampone $\text{Na}_2\text{SiF}_6/\text{HCO}_3^-$ 50 mM a pH 5.22.

Si chiude, quindi, il reattore con il tappo metallico in cui è inserita la sonda e si fa fluire azoto fino a raggiungere livelli minimi e noti di ossigeno all'interno. A questo punto si chiudono i rubinetti del reattore e si aspetta che il sistema si stabilizzi per circa 20 minuti, al termine dei quali si accende la lampada UV nel caso della particella contenente RuPOM nella shell e $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ nel core; mentre si accende la lampada al tungsteno, munita di filtro centrato a 475 nm, per le particelle contenenti nella shell sia il RuPOM che la porfirina tetra cationica. L'attività del catalizzatore viene valutata registrando le μmoli di O_2 prodotte nel tempo e, successivamente, elaborando i dati per ottenere i valori di TON e TOF.

3.5.6 Decomposizione dell'acqua ossigenata ad opera delle microcapsule contenenti RuPOM nella shell e FITC-Destrano nel core

Nell'analogo reattore utilizzato per la prova di fotossidazione, descritto nel paragrafo precedente, vengono posti circa 80 mg di microcapsule, disperse in 3,5 ml di tampone fosfato 0.2M a pH 7. A tale soluzione eterogenea vengono aggiunti 100 μl di una soluzione di H_2O_2 3,3 mM (115,5 μmoli) e registrata la produzione di O_2 come μmoli di O_2 prodotte nel tempo.

4.BIBLIOGRAFIA

-
- ¹ A. Muller, M.T. Pope in *Heteropoly and Oxometalates*; Springer Verlag: New York, **1983**.
- ² Muller, M.T. Pope, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1991**, 30, 34-48.
- ³ L. Hill in *Polyoxometalate*; Chem. Rev. (Special Issue) **1998**, 98, 1.
- ⁴ D.L. Kepert in *The Early Transition Metals*; Academic Press Inc.: London **1972**.
- ⁵ Lipscomb W.N., *Inorg. Chem.*, **1965**, 4, 132.
- ⁶ Illingworth J.W., Keggin J.F., *J. Chem. Soc.*, **1935**, 575.
- ⁷ Tezé A., Hervé G., Finke R.G., Lyon D.K., *Inorg. Synth.*, **1990**, 27, 71-96.
- ⁸ Hill, C. L.; McCharta, C. M. *Coord. Chem. Rev.* **1995**, 143, 407.
- ⁹ S. Berardi, M. Bonchio, M. Carraro, V. Conte, A. Sartorel, G. Scorrano *J. Org. Chem.* **2007**, 72, 8954-8957.
- ¹⁰ Acerete R., Hammer C. F., Baker L.C.W., *J. Am. Chem. Soc.*, **1982**, 104, 5384.
- ¹¹ Massart R., Contant R., Fruchart J., Ciabrini J.P., Fournier M., *Inorg. Chem.*, **1977**, 16, 2916.
- ¹² Judeinstein P., Deprun C., Nadjo L., *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, **1991**.
- ¹³ Filowitz M., Ho R.K.C., Klemperer W.G., Shum W., *Inorg. Chem.*, **1979**, 18, 93.
- ¹⁴ P. Goumert, A. Proust, *Chem. Rev.* **1998**, 98, 77-111.
- ¹⁵ Bagno, M. Bonchio, M. Carraro, G. Scorrano, *Adv. Synth. Catal.* **2004**, 346, 648-654.
- ¹⁶ P. Kögerler, A. Müller, *Coord. Chem. Rev.* **1999**, 182, 3-17.
- ¹⁷ a) Zhao J.W., Zheng S.T., Yang G.Y., *J. Sol. St. Chem.*, 180, **2007**, 3317. Li B., Yan. b) Y., Li F., Bi L., Wu L., *Inorg. Chim. Acta*, 362, **2009**, 2796.
- ¹⁸ M. Bonchio, M. Carraro, A. Sartorel, G. Scorrano *U. Kortz J. Mol. Catal.: A. Chem.*, **2006**, 251, 93-99
- ¹⁹ Sartorel A, Carraro M, Scorrano G, De Zorzi R, Geremia S, McDaniel ND, Bernhard S, Bonchio M (**2008**) Polyoxometalate embedding of a tetraruthenium(IV)-oxo-core by template-directed metalation of [g-SiW10O36] 8-: a totally inorganic oxygen-evolving catalyst. *J Am Chem Soc* 130:5006–5007
- ²⁰ Geletii YV, Botar B, Kögerler P, Hillesheim DA, Musaev DG, Hill CL (**2008**) An all-inorganic, stable, and highly active tetraruthenium homogeneous catalyst for water oxidation. *Angew Chem Int Ed* 47:3896–3899
- ²¹ Geletii YV, Botar B, Kögerler P, Hillesheim DA, Musaev DG, Hill CL (**2008**) An all-inorganic, stable, and highly active tetraruthenium homogeneous catalyst for water oxidation. *Angew Chem Int Ed* 47:3896–3899
- ²² Carraro, M., et al; *Top Curr Chem* (**2011**) 303: 121–150.
- ²³ A. Sartorel, P. Miro´, E. Salvadori, S. Romain, M. Carraro, G. Scorrano, M. Di Valentin, A. Llobet, C. Bo and M. Bonchio, *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, 131, 16051–16053.
- ²⁴ Y. V. Geletii, Z. Huang, Y. Hou, D. G. Musaev, T. Lian and C. L. Hill, *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, 131, 7522–7523.
- ²⁵ F. M. Toma, A. Sartorel, M. Iurlo, M. Carraro, S. Rapino, L. Hooper-Burkhardt, T. Da Ros, M. Marcaccio, G. Scorrano, F. Paolucci, M. Bonchio and M. Prato, *Chem Sus Chem*, **2011**, 4, 1447–1451.
- ²⁶ Kongkanand, A., Martı´nez Domı´nguez, R. & Kamat, P. V. Single wall carbon nanotube scaffolds for photoelectrochemical solar cells. capture and transport of photogenerated electrons. *Nano Lett.* 7, 676–680 (**2007**).
- ²⁷ Brown, P., Takechi, K. & Kamat, P. V. Single-walled carbon nanotube scaffolds for dye-sensitized solar cells. *J. Phys. Chem. C* 112, 4776–4782 (**2008**).
- ²⁸ Saito, R., Dresselhaus, G. & Dresselhaus, M. S. *Physical Properties of Carbon Nanotubes* (Imperial College Press, **1998**).

-
- ²⁹ Cracknell, J. A., Vincent, K. A. & Armstrong, F. A. Enzymes as working or inspirational electrocatalysts for fuel cells and electrolysis. *Chem. Rev.* 108, 2439–2461 (2008).
- ³⁰ Andrea Sartorel, Melissa Truccolo, Serena Berardi, Martino Gardan, Mauro Carraro, Francesca Maria Toma, Gianfranco Scorrano, Maurizio Prato and Marcella Bonchio, *Chem. Commun.*, **2011**, 47, 1716–1718
- ³¹ K. Yagi et al; **1992**, *Excerpta Medica*
- ³² (a) D. A. Judd, J. H. Nettles, N. Nevins, J. P. Snyder, D. C. Liotta, J. Tang, J. Ermolieff, R. F. Schinazi, C. L. Hill, *J. Am. Chem. Soc.* 2001, 123, 886-897. (b) S. Shigeta, S. Mori, E. Kodama, J. Kodama, K. Takahashi, T. Yamase, *AntiViral Res.* 2003, 58, 265-271. (c) X. Wang, J. Liu, M. T. Pope, *Dalton Trans.* 2003, 957-960. (d) Y. Tajima, *Microbiol. Immunol.* **2003**, 47, 207-12.
- ³³ (a). Yamase, *Mol. Eng.* 1993, 3, 241-262; (b) T. Yamase, H. Fujita, K. Fukushima, Y. Seto, *Front. Biosci.* **2005**, 10, 275-287; (c) H. Yanagie, A. Ogata, S. Mitsui, T. Hisa, T. Yamase, M. Eriguchi, *Biomed. Pharmacoter.* 2006, 60, 349–352.
- ³⁴ (a) J.-F. Liu, Y.-G. Chen, L. Meng, J. Guo, Y. Liu, M. T. Pope, *Polyhedron* 1998, 17, 1541-1546, (b) X.-H. Wang, J.-F. Liu, Y.-G. Chen, Q. Liu, J.-T. Liu, M. T. Pope, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **2000**, 7, 1139-1142.
- ³⁵ Tomita, K., T. Yamase and K. Shishido: Medical chemistry of polyoxometalates. Part 2. Enzymatic study on binding of heptamolybdate to DNA. *Inorganica Chimica Acta* 157, 167-169 (1989)
- ³⁶ Yamase, T: Anticancer agents containing heteropolytungstate ethers. *Jpn. Kokai Tokkyo Koho, Terumo Corp.*, Japan, Jp 02204416, (1990)
- ³⁷ Yamase, T., H. Fujita, K. Fukushima and T. Sakurai: Anticancer agents containing heteropolytungstates. *Jpn. Kokai Tokkyo Koho, Terumo Corp.*, Japan, Jp 02204415, (1990)
- ³⁸ Wang, X., J. Liu, J. Li, Y. Yang, J. Liu, B. Li and M. T. Pope:). *Journal of Inorganic Biochemistry* 94, 279-284 (2003)
- ³⁹ Illum, L. *Pharm. Res* **1998**;15:1326-1331.
- ⁴⁰ Wang, X., J. Liu and J. Li.: *Inorganic Chemistry Communications* 4, 372-374 (2001)
- ⁴¹ He, X. M.; Carter, D. C. *Nature* **1992**, 358, 209.
- ⁴² Sugio, S.; Kashima, A.; Mochizuki, S.; Noda, M.; Kobayashi, K. *Protein Eng.* **1999**, 12, 439.
- ⁴³ Stryer, L. *Annu. Rev. Biochem.* 1978, 47, 819.
- ⁴⁴ J. Geng, M. Li, J. Ren, E. Wang, X. Qu *Angew. Chem. Int. E.* 2011, 50, 1-6.
- ⁴⁵ Douglas T, Young M. 2006. Viruses: Making friends with old foes. *Science* 312(5775):873–875.
- ⁴⁶ Liu WL, Alim K, Balandin AA, Mathews DM, Dodds JA. 2005. Assembly and characterization of hybrid virus-inorganic nanotubes. *Appl Phys Lett* 86(25):253108.
- ⁴⁷ Singh P, Gonzalez MJ, Manchester M. 2006. Viruses and their uses in nanotechnology. *Drug Dev Res* 67(1):23–41
- ⁴⁸ Rueckes, T.; Kim, K.; Joselevich, E.; Tseng, G. Y.; Cheung, C. L.; Lieber, C. M. *Science* 2000, 289, 94–97.
- ⁴⁹ Zhong, Z. H.; Wang, D. L.; Cui, Y.; Bockrath, M. W.; Lieber, C. M. *Science* 2003, 302, 1377–1379.
- ⁵⁰ Murphy, C. J.; Sau, T. K.; Gole, A. M.; Orendorff, C. J.; Gao, J.; Gou, L.; Hunyadi, S. E.; Li, T. J. *Phys. Chem. B* 2005, 109, 13857–13870.
- ⁵¹ Knez, M., et al. 522, 2002, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, pp. 70-74.
- ⁵² Zaitlin, M. **2000**, *AAB Descriptions of Plant Viruses*, p. 370.
- ⁵³ Stubbs, G. **1990**, *Semin. Virol.*, Vol. I, pp. 405-412.

- ⁵⁴ Bruckman, M. A.; Kaur, G.; Lee, L. A.; Xie, F.; Sepulveda, J.; Breitenkamp, R.; Zhang, X.; Joralemon, M.; Russell, T. P.; Emrick, T.; Wang, Q. *ChemBioChem* **2008**, *9*, 519–523.
- ⁵⁵ Schlick, T. L.; Ding, Z.; Kovacs, E. W.; Francis, M. B. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 3718–3723.
- ⁵⁶ H.; Rubloff, G. W.; Culver, J. N. *Langmuir* **2007**, *23*, 2663–2667.
- ⁵⁷ Butler, P. J. G. *Philos. Trans. R. Soc. London, Ser. B: Biol. Sci.* **1999**, *354*, 537.
- ⁵⁸ Klug, A. *Philos. Trans. R. Soc. London, Ser. B: Biol. Sci.* **1999**, *354*, 531.
- ⁵⁹ Yi, H. M.; Yang, C. X.; Manocchi, A. K.; Lee, B. J. *Mater. Chem.* **2011**, *21*, 187–194.
- ⁶⁰ Li, T.; Niu, Z. W.; Suthiwangcharoen, N.; Li, R.; Prevelige, P. E.; Wang, Q. *Sci.*
- ⁶¹ Lee, B.; Manocchi, A. K.; Seifert, S.; Yi, H. M. *Langmuir* **2010**, *26*, 7516–7522.
- ⁶² Miller, R. A.; Presley, A. D.; Francis, M. B. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 3104–3109.
- ⁶³ Lee SY, Choi J, Royston E, Janes DB, Culver JN, Harris MT. **2006a**. Deposition of platinum clusters on surface-modified tobacco mosaic virus. *J Nanosci Nanotechnol* *6*(4):974–981.
- ⁶⁴ Royston E, Lee SY, Culver JN, Harris MT. **2006**. Characterization of silicacoated tobacco mosaic virus. *J Colloid Interface Sci* *298*(2):706–712.
- ⁶⁵ Gorzny ML, Walton AS, Wnek M, Stockley PG, Evans SD. **2008**. Four-probe electrical characterization of Pt-coated TMV-based nanostructures. *Nanotechnology* *19*(16):165704
- ⁶⁶ Royston E, Ghosh A, Kofinas P, Harris MT, Culver JN. **2008**. Self-assembly of virus-structured high surface area nanomaterials and their application as battery electrodes. *Langmuir* *24*(3):906–912.
- ⁶⁷ Chen X, Gerasopoulos K, Guo J, Brown A, Wang C, Ghodssi R, Culver JN. **2010**. Virus-enabled silicon anode for lithium-ion batteries. *ACS Nano* *4*(9):5366–5372.
- ⁶⁸ Gorzny ML, Walton AS, Evans SD. **2010**. Synthesis of high-surface-area platinum nanotubes using a viral template. *Adv Funct Mater* *20*(8): 1295–1300.
- ⁶⁹ Baranov, D.; Fiore, A.; van Huis, M.; Giannini, C.; Falqui, A.; Lafont, U.; Zandbergen, H.; Zanella, M.; Cingolani,; Manna, L. *Nano Lett.* **2010**, *10*, 743–749.
- ⁷⁰ Zanella, M.; Bertoni, G.; Franchini, I. R.; Brescia, R.; Baranov, D.; Manna, L. *Chem. Commun.* **2010**, 203_205.
- ⁷¹ Nedoluzhko A., Douglas T., *Journal of Inorganic Biochemistry*, **84** (**2001**), 233-240.
- ⁷² GronbechJensen, N.; Mashl, R. J.; Bruinsma, R. F.; Gelbart, W. M. *Phys. Rev. Lett.* **1997**, *78*, 2477–2480.
- ⁷³ Netz, R. R. *Eur. Phys. J. E* **2001**, *5*, 557–574.
- ⁷⁴ Tao Li; Randall E. Winans; Byeongdu Lee; *Langmuir* **2011**, *27*, 10929–10937.
- ⁷⁵ Samuelson, L. A.; Anagnostopoulos, A.; Alva, K. S.; Kumar, J.; Tripathy, S. K. *Macromolecules* **1998**, *31*, 4376.
- ⁷⁶ Bloor, D.; Monkman, A. *Synth. Met.* **1987**, *21*, 175.
- ⁷⁷ Huang, J.; Kaner, R. B. *Chem. Commun.* **2006**, 367.
- ⁷⁸ N.A. Nikitin, A.S. Malinin, A.A. Rakhnyanskaya, E.A. Trifonova, O.V. Karpova, A.A. Yaroslavov, J.G. Atabekov, **2011**, published in *Vysokomolekulyarnye Soedineniya, Ser. A*, **2011**, Vol. 53, No. 11, pp. 1885–1891.
- ⁷⁹ A. Bernkop-Schnurch, D. Guggi, Y. Pinter, *J. Control Release* **94** (2004) 177–186.
- ⁸⁰ Y. Wang, Q. Jiang, R. Li, L. Liu, Q. Zhang, Y. Wang, J. Zhao., *Nanotechnology* **19**, (2008) 145101.
- ⁸¹ J.H. Park, Y.W. Cho, H. Chung, I.C. Kwon, S.Y. Jeong, *Biomacromolecules* **4** (2003) 1087–1091..
- ⁸² A Trapani, M.G. Fuentes, M.J. Alonso, *Nanotechnology* **19** (2008) 185101.
- ⁸³ Decher, *Science*, **1997**, *277*, 1232–1237.
- ⁸⁴ F. Caruso, R. A. Caruso and H. Mohwald, *Science*, **1998**, *282*,1111–1114.

-
- ⁸⁵ E. Donath, G. B. Sukhorukov, F. Caruso, S. A. Davis and H. Mohwald, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **1998**, 37, 2202–2205.
- ⁸⁶ L. L. del Mercato and W. J. Parak, *Nanomedicine*, **2009**, 4, 967–979.
- ⁸⁷ Y. E. Lee, R. Kopelman, R. Smith, *Annu Rev Anal Chem* **2009**, 2, 57.
- ⁸⁸ M. Brasuel, R. Kopelman, J. W. Aylott, H. Clark, H. Xu, M. Hoyer, T. J. Miller, R. Tjalkens, M. A. Philbert, *Sensors And Materials* **2002**, 14, 309.
- ⁸⁹ Kreuter J.; Marcel Dekker; **1994**; 261-276.
- ⁹⁰ Mueller R. H.; CRC Press, **1991**,379.
- ⁹¹ Xiao Fang Li, Xiao Qiang Feng, Sheng Yang, Ting-Pu Wang, Zhong-Xiung Su; *Iranian Polymer Journal*, 17(11), **2008**, 843-852.
- ⁹² Hoppe-Seiler F. *Ber Dtsch Chem Ges.* **1994**, 3329-3331.
- ⁹³ Roberts GAF; MacMillan; Houndmills; **1992**, 274-329.
- ⁹⁴ Razdan A., Pettersson D. (**1994**). *British Journal of Nutrition* 74 (2): 277–288.
- ⁹⁵ I. Furda (**1990**). *Advances in Experimental Medicine and Biology* (Plenum Press) 270: 67–82.
- ⁹⁶ Ikeda, I.; Sugano, M.; Yoshida, K.; Sasaki, E.; Iwamoto, Y.; Hatano, K. (March **1993**). *Agriculture and Food Chemistry* 41 (3): 431–435.
- ⁹⁷ W. Tiyaboonchai, N. Limpeanchob, *International Journal of Pharmaceutics* 329 (1–2) (**2007**) 142–149.
- ⁹⁸ Valeur, B. *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*; Wiley-VCH: Weinheim, Germany, **2002**.
- ⁹⁹ G. Zhang, B. Keita, J.-C. Brochon, P. de Oliveira, L. Nadjo, C. T. Craescu, S. Miron *J. Phys. Chem. B* **2007**, 111, 1809–1814
- ¹⁰⁰ Dujardin, E., Peet, C., Stubbs, G., Culver, J., and Mann, S. Organization of metallic nanoparticles using tobacco mosaic virus templates. *Nano Letters*, 3, 413–417 (**2003**).
- ¹⁰¹ X. Dang, H. Yi, M. Ham, J. Qi, D. S. Yun, R. Ladewski, M. S. Strano, P. T. Hammond, and A. M. Belcher, *Nature Nanotechnology* | Vol 6 | June **2011**
- ¹⁰² M. Carraro, A. Sartorel, F. M. Toma, F. Puntoriero, F. Scandola, S. Campagna, M. Prato, and M. Bonchio; *Top Curr Chem* (**2011**) 303: 121–150.
- ¹⁰³ W. M. Stanley, *Science* 81, 644 (**1935**).
- ¹⁰⁴ S. Sasaki and O. Taniguchi, *J. Japan Soc. Mech. Eng.*, 54, 255 (**1951**).
- ¹⁰⁵ I. Watanabe and Y. Hawade, *Chemistry and Chem. Industry.* 5, 585 (**1952**).
- ¹⁰⁶ Tang, Q., Wu, J., Sun, X., Li, Q., Lin, J. and Huang, M., *Chem. Commun*, **2009**, 2166–2167.
- ¹⁰⁷ Inés Paños, Niuris Acosta and Angeles Heras; *Current Drug Discovery Technologies*, **2008**, 5, 333–341
- ¹⁰⁸ S. A. Agnihotri, N. N. Mallikarjuna, T. M. Aminabhavi, *J. Control. Release* **2004**, 100, 5.
- ¹⁰⁹ Georg Geisberger, Susann Paulus, Mauro Carraro, Marcella Bonchio, and Greta R. Patzke; *Chem. Eur. J.* **2011**, 17, 4619 – 4625
- ¹¹⁰ Viviana Vergarola, Francesca Baldassarre, Flavia De Santisa, Giuseppe Ciccarella, Gianluigi Giannelli and Stefano Leporatti; *Current Pharmaceutical Design*, **2012**, 18
- ¹¹¹ Lei Gao, Enbo Wang,* Zhenhui Kang, Yanli Song, Baodong Mao, and Lin Xu, *J. Phys. Chem. B* **2005**, 109, 16587–16592
- ¹¹² Andrea Sartorel, Marcella Bonchio, Sebastiano Campagna and Franco Scandola; *Chem Soc Rev*, **2013**, DOI: 10.1039/c2cs35287g
- ¹¹³ Y. V. Geletii, Z. Huang, Y. Hou, D. G. Musaev, T. Lan and C. L. Hill, *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, 131, 7522.
- ¹¹⁴ M. Natali, M. Orlandi, S. Berardi, S. Campagna, M. Bonchio, A. Sartorel and F. Scandola, *Inorg. Chem.*, 2012, 51, 7324.

5. Appendice

5.1 ABBREVIAZIONI

AEO: Anodic Electrode Oxidation

BAC: Bioactive Compound

CS: Chitosano

Dex: Destrano

DLS: Dynamic Light Scattering

ϵ : Coefficiente di estinzione molare

FT: Trasformata di Fourier

FTIC: Fluoresceina isotiocianato

IR: infrarosso

λ : lunghezza d'onda

PDADMA: Poli diallil dimetil ammonio cloruro

POM: Poliossometallato

PS: Fotosensibilizzatore

PSS: Polistirene sulfonato di sodio

ROS: Reactive oxygenated species

Rubipy: $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$

RuPOM: $\{\text{Ru}_4(\mu\text{-OH})_2(\mu\text{-O})_4(\text{H}_2\text{O})_4[\gamma\text{-SiW}_{10}\text{O}_{36}]\}^{10-}$

TMPyP: Meso-Tetra(N-metil-4-piridil)porfirina tetratosilata

TMV: Tobacco Mosaic Virus

TOF: Turn Over Frequency

TON: Turn Over Number

UV: Ultravioletto

Vis: Visibile

WOC: Water oxidation catalyst

5.2 Quenching della fluorescenza: correlazione di Stern-Volmer

L'intensità di fluorescenza può diminuire per effetto di molti fattori. Tale fenomeno è noto come quenching (spegnimento). In generale, la diminuzione dell'emissione di fluorescenza avviene per effetto di una seconda sostanza, che si chiama *quencher*.

Ci sono vari processi che possono provocare quenching della fluorescenza: reazioni chimiche che avvengono quando il fluoroforo è nello stato eccitato, formazione di complessi tra il fluoroforo ed una seconda specie presente in soluzione, trasferimento di energia e collisioni. I meccanismi di quenching più frequenti sono il trasferimento di energia e il quenching collisionale. Nel trasferimento di energia, i fotoni sono emessi dal fluoroforo, ma vengono in parte riassorbiti da una seconda specie. Questo fenomeno è molto comune perchè avviene ogni volta che si ha una soluzione molto concentrata di fluorofori, in cui è la stessa specie a svolgere il ruolo di emettitore e di riassorbitore.

Il *quenching collisionale* avviene quando il fluoroforo passa dallo stato eccitato a quello fondamentale in seguito ad un contatto o un urto con il quencher, senza che l'energia in eccesso venga poi emessa sotto forma di un fotone.

I meccanismi di quenching si dicono **dinamici** se dipendono dalla velocità di diffusione del quencher verso il fluoroforo, mentre si dicono **statici** se sono indipendenti dai processi diffusivi. Il quenching collisionale è un tipico processo dinamico, in quanto il quencher deve diffondere verso il fluoroforo perchè avvenga l'urto, mentre il trasferimento di energia o di carica dovuto alla formazione di complessi è un tipico processo statico. Il quenching collisionale è descritto dall'**equazione di Stern-Volmer**:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + k_q \tau_0 [C_q] = 1 + K_D [C_q]$$

dove F_0 ed F sono l'intensità di fluorescenza in assenza ed in presenza del quencher, k_q è la costante di quenching bimolecolare, t_0 è il tempo di vita del fluoroforo in assenza del quencher, $[C_q]$ è la concentrazione del quencher e $K_D = k_q t_0$ è la *costante di quenching di Stern-Volmer*. Secondo l'equazione di Stern - Volmer, il rapporto F_0/F dipende linearmente dalla concentrazione di quencher $[C_q]$ con pendenza pari alla costante di quenching K_D . Per il quenching collisionale, la diminuzione dell'intensità di fluorescenza è equivalente alla diminuzione del tempo di vita di fluorescenza.

Il *quenching statico* ricorre quando il fluoroforo forma dei complessi o degli addotti con una seconda specie che agisce da quencher, con l'effetto di avere una intensità di fluorescenza inferiore rispetto al fluoroforo isolato. In questo caso il grafico di Stern-Volmer presenta una deviazione dalla linearità, ad alte concentrazioni di quencher, indice della formazione di complessi, tra il fluoroforo e il quencher, con interazioni multiple.

La formazione del complesso è regolata da una **costante di associazione** K_s :

$$K_s = \frac{[C_{Fq}]}{[C_F][C_q]}$$

dove $[C_{Fq}]$ è la concentrazione del complesso, mentre $[C_F]$ e $[C_q]$ sono le concentrazioni del fluoroforo e del quencher non complessati. Se il complesso è non fluorescente, allora l'intensità di fluorescenza F dipende dalla concentrazione di fluoroforo libero $[C_F]$, così come l'intensità di fluorescenza in assenza di quencher F_0 dipende dalla concentrazione totale di fluoroforo $[C_F] + [C_{Fq}]$:

$$F = k_{ost} \cdot [C_F]$$

$$F_0 = k_{ost} \cdot ([C_F] + [C_{Fq}])$$

Pertanto si può scrivere che:

$$K_s = \frac{[C_F] + [C_{Fq}] - [C_F]}{[C_F][C_q]} = \frac{F_0 - F}{F[C_q]} = \frac{F_0}{F[C_q]} - \frac{1}{[C_q]}$$

Da cui deriva:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_s [C_q].$$

Tale relazione ha la stessa forma della Stern - Volmer, ma in questo caso la costante di proporzionalità tra F_0/F e la concentrazione C_q è la costante di associazione K_s . Nel quenching statico, il tempo di vita di fluorescenza non è alterato dal quencher, in quanto è la frazione di fluoroforo i cui fotoni possono raggiungere il rivelatore ad essere diminuita dall'azione complessante del quencher

5.3 Raccolta spettri non riportati nel capitolo "Risultati e discussioni"

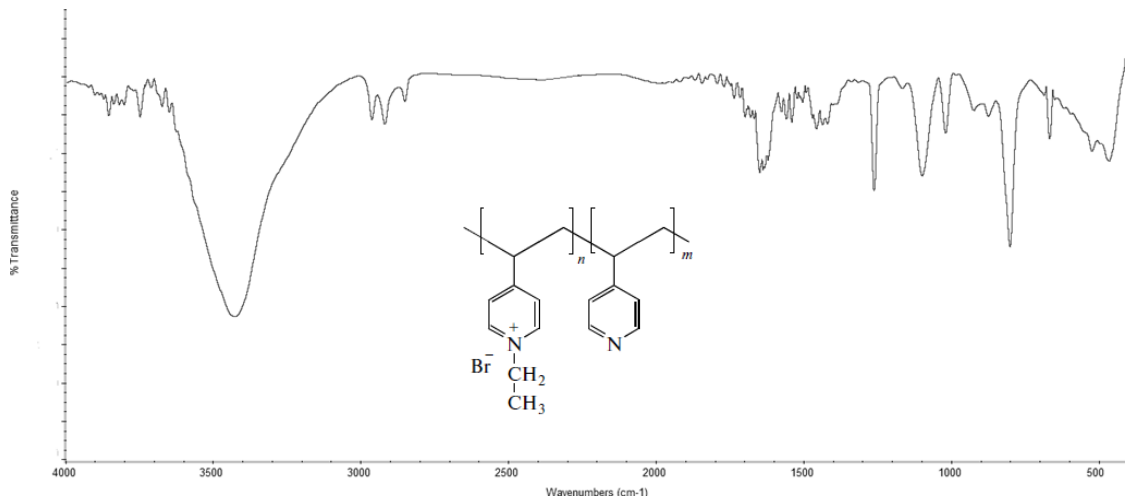


Figura 5.2-Spettro IR N-etil poli 4-vinil piridina

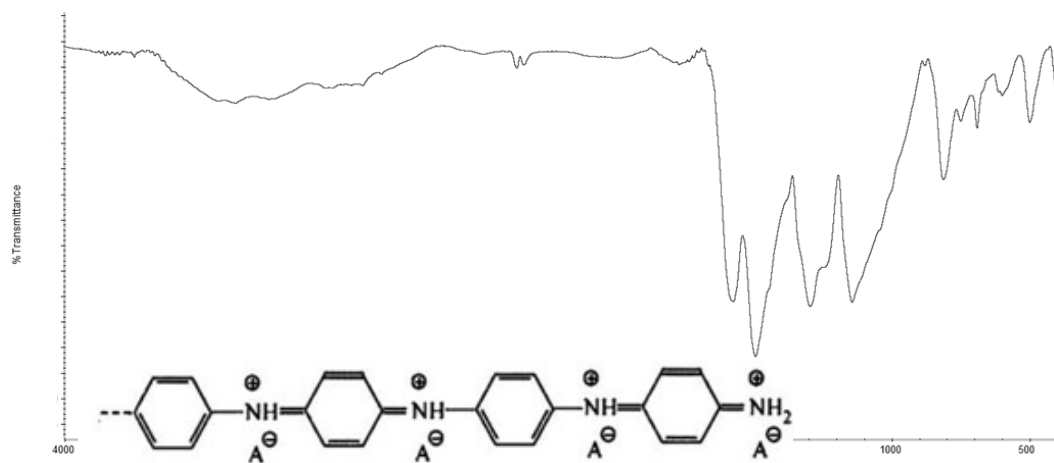


Figura 3-Spettro IR Polianilina da APS

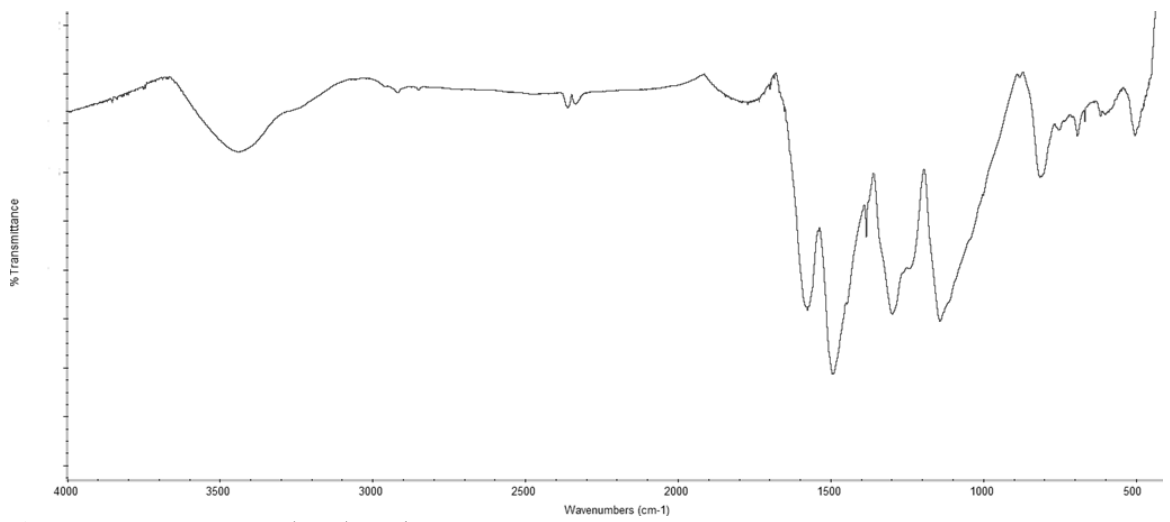


Figura 5.4-Spettro IR Polianilina da KPS

TMV

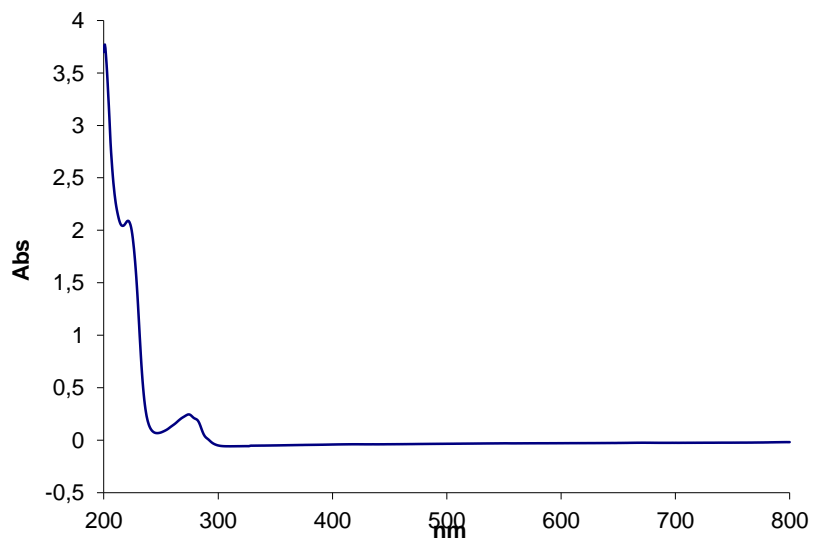


Figura 5.4-Spettro di assorbimento UV-Vis di una soluzione di TMV 0.05mg/ml

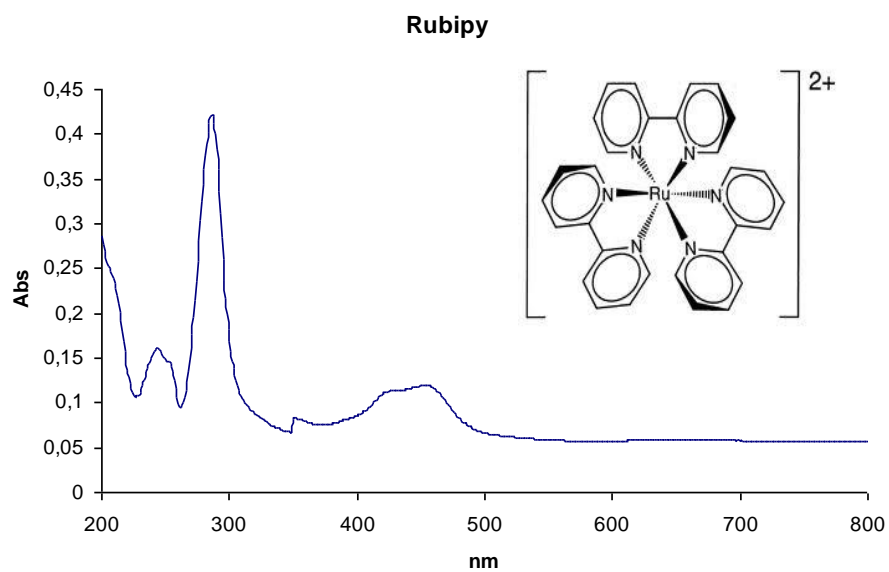


Figura 5.5-Spettro di assorbimento UV-Vis di Rubipy $5 \cdot 10^{-6}$ M

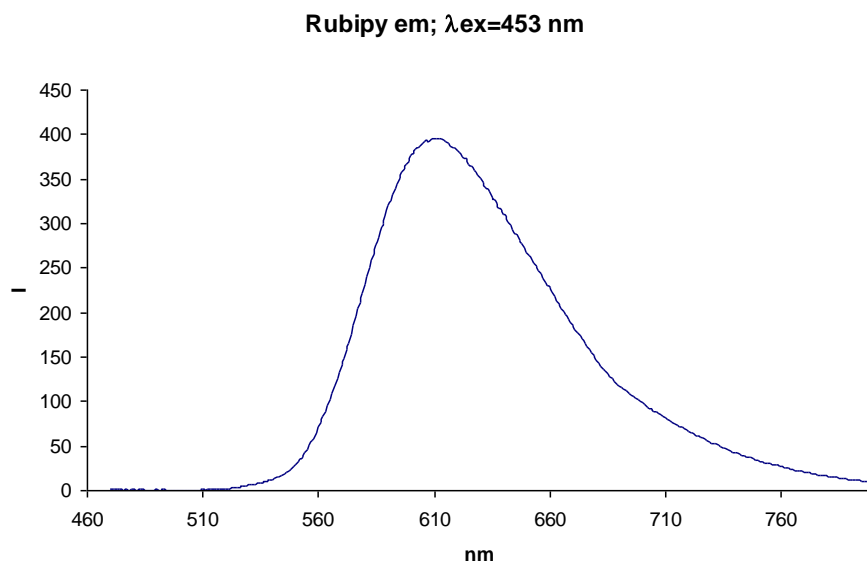


Figura 5.6-Spettro di fluorescenza in emissione di Rubipy $5 \cdot 10^{-6}$ M, $\lambda_{ex}=453$ nm.

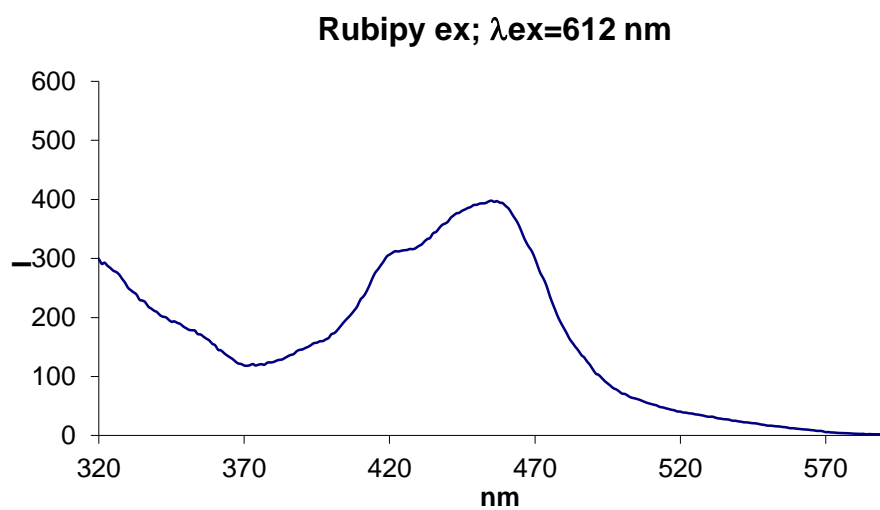


Figura 5.7-Spettro di fluorescenza in eccitazione di Rubipy $5 \cdot 10^{-6}M$, $\lambda_{ex}=612$ nm.

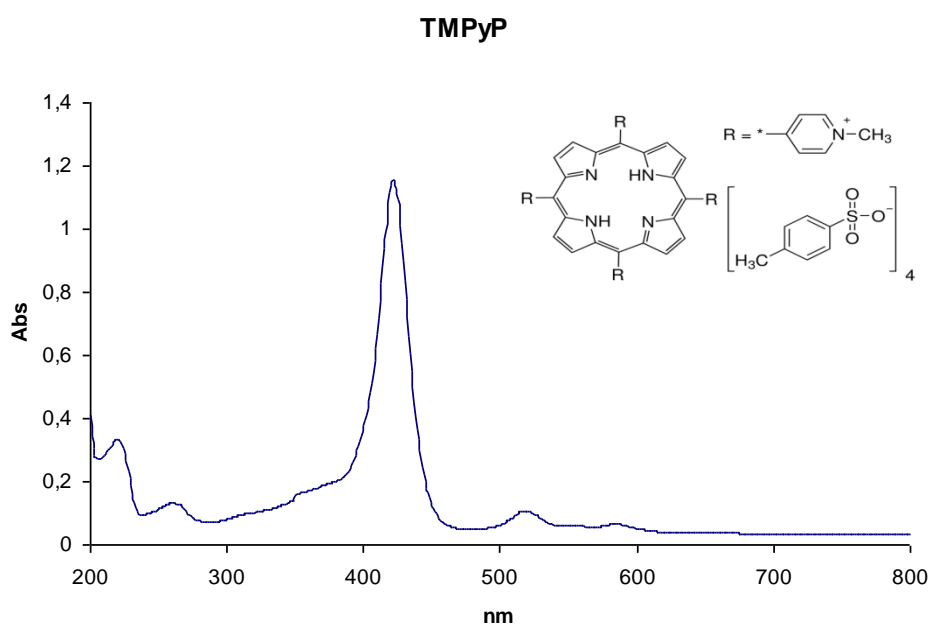


Figura 5.8-Spettro di assorbimento UV-Vis di TMPyP $5 \cdot 10^{-6}M$

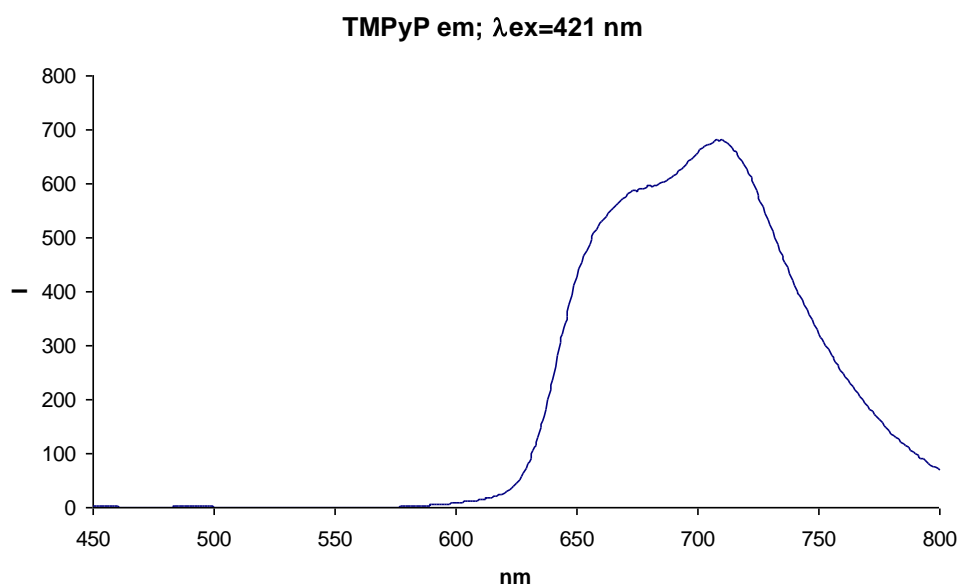


Figura 5.9-Spettro di fluorescenza di TMPyP $5 \cdot 10^{-6}M$, $\lambda_{ex}=421$ nm.

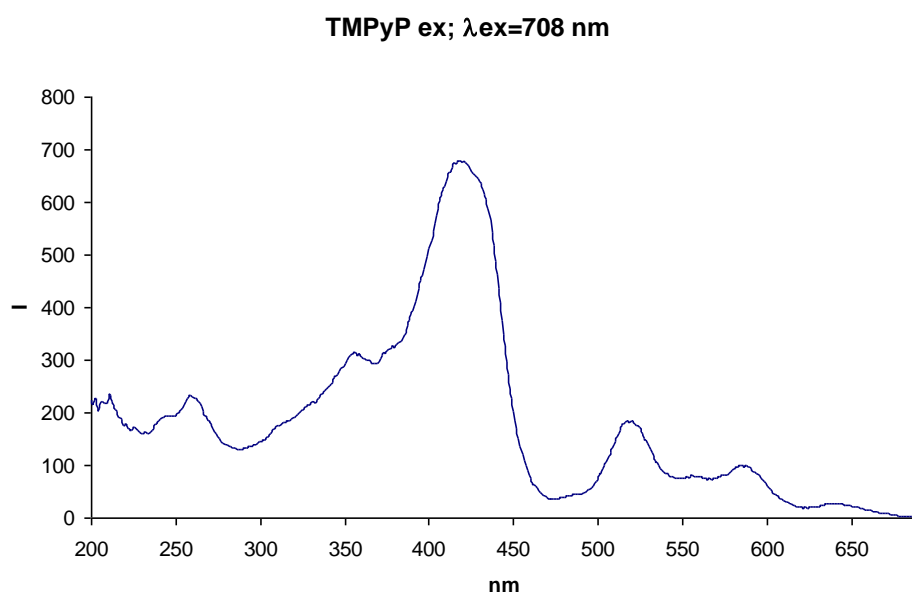


Figura 5.10-Spettro di fluorescenza in eccitazione di TMPyP $5 \cdot 10^{-6}M$, $\lambda_{ex}=708$ nm.

E adesso siamo giunti al momento di ringraziare ...

Ringrazio, innanzitutto, la dott.ssa Marcella Bonchio per avermi permesso di svolgere l'attività di ricerca presso i suoi laboratori, per la disponibilità mostratami, per i consigli e le idee sempre nuove che stimolano la curiosità scientifica.

Ringrazio il Prof. Marco Zecca per la sua gentilezza, disponibilità, e i consigli utili datemi in questi mesi.

Ringrazio infinitamente, il Dott. Mauro Carraro per non avermi lasciata mai sola durante lo svolgimento del lavoro di ricerca, per i consigli, per gli insegnamenti, per l'enorme pazienza e per la sua simpatia che ha reso tutto più semplice.

Desidero ringraziare sentitamente anche il Dott. Andrea Sartorel per l'infinita gentilezza, disponibilità, pazienza e per tutti i consigli datemi in questi mesi.

Ringraziamenti particolari vanno ai ragazzi del laboratorio che hanno allietato la mia permanenza tra scherzi, playlist, infinite chiacchierate, consigli utili per lo svolgimento del lavoro, e soprattutto per avermi sopportato nei momenti più ricchi di tensione. Gloria, Irene, Antonio, Omar, e anche se arrivata da poco Valeria; come non ringraziare i "compagni di sorte" con i quali ho condiviso le tensioni del periodo e i successi di questo lavoro, per aver reso divertentissime le giornate in laboratorio. Andrea, Angela, Erica, Matteo. Grazie mille a tutti voi: non ho trovato dei compagni di laboratorio ma degli amici.

Volevo ringraziare anche la mia coinquilina Lucia per avermi sempre supportata e aiutata nei momenti di sconforto, per avermi ascoltata e sostenuto; la mia collega-amica Marta per le infinite chiacchierate e il sostegno emotivo che non mi è mai mancato. Grazie ragazze per quanto credete in me.

Anche se lontani, non posso non ringraziare i miei amici di sempre, semplicemente perché sempre presenti nella mia vita anche se a chilometri di distanza.

E' doveroso ringraziare Alessandro perché lui conosce veramente il significato della parola "Pazienza" nei miei confronti, per il supporto che mi da ogni giorno, perché sa farmi sorridere anche nei momenti più "delicati" e per quanto crede in me. grazie di cuore.

Infine, ma non in ordine di importanza, voglio ringraziare la mia famiglia che mi ha permesso di seguire questa scelta di studiare lontano da casa, che mi sostiene, mi consiglia nei momenti di incertezza e non mi fa mai sentire "sola". Ed anche se non possono ancora capirlo, devo ringraziare i miei due splendidi nipotini, perché nei momenti più tristi o duri, se trascorsi insieme a loro mi sento in pace con il mondo.

Grazie, inoltre, a tutte le persone, non citate, che hanno arricchito nel bene e nel male questa fase della mia vita.