

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA**

**DIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIMICHE**

**CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN CHIMICA INDUSTRIALE**

**TESI DI LAUREA MAGISTRALE**

**Sviluppo di chemosensori basati su nanoparticelle d'oro  
per la profilazione di marker del neuroblastoma**

Relatore: Prof. Federico Rastrelli  
Dipartimento di Scienze Chimiche

Controrelatore: Prof. Marco Ruzzi  
Dipartimento di Scienze Chimiche

Laureando: Andrea Melotti

**ANNO ACCADEMICO 2023/2024**



<b>Indice</b>	
Glossario	1
<b>1. Introduzione</b>	3
1.1 Descrizione del Neuroblastoma	3
1.2 Metodologie di analisi per miscele complesse e NMR <i>chemosensing</i>	6
1.3 Applicazione di AuNPs nell'ambito del <i>chemosensing</i> e metodologie di sintesi	10
<b>2. Scopo della Tesi</b>	17
<b>3. Spettroscopia NMR</b>	19
3.1 <i>Steady-State</i> NOE	25
3.2 <i>Transient</i> NOE	26
<b>4. Esperimenti di NMR <i>chemosensing</i></b>	28
4.1 Esperimento <i>Saturation Transfer difference</i> (STD)	28
4.2 Esperimento <i>WaterLOGSY</i>	30
4.3 Esperimento <i>WaterSTD</i>	32
4.4 Esperimento <i>DOSY</i> ( <i>Diffusion ordered spectroscopy</i> )	37
<b>5. Caratterizzazione delle nanoparticelle d'oro</b>	44
<b>6. Nanoparticelle d'oro solfonate</b>	47
6.1 Spettri <sup>1</sup> H-NMR	47
6.2 Spettri <i>HP-wSTD</i>	49
6.3 Spettri <i>DOSY</i>	60
<b>7. Nanoparticelle d'oro tripeptidiche</b>	65
7.1 Spettri <sup>1</sup> H-NMR	65
7.2 Spettri <i>HP-wSTD</i>	67
7.3 Spettri <i>DOSY</i>	72
<b>8. Conclusioni</b>	77
<b>9. Materiali e metodi</b>	79
<b>10. Parte sperimentale</b>	80
<b>10.1 Sintesi tioli</b>	80
10.1.1 Sintesi tiolo solfonato T1	80
10.1.2 Sintesi tiolo solfonato T2	82

10.1.3 Sintesi tiolo solfonato T3	84
10.1.4 Sintesi tioli tripeptidici T4, T5 e T6	85
<b>10.2 Sintesi e caratterizzazione di nanoparticelle d'oro</b>	96
10.2.1 Sintesi delle nanoparticelle	96
10.2.2 Caratterizzazione di 1-AuNP	97
10.2.3 Caratterizzazione di 2-AuNP	99
10.2.4 Caratterizzazione di 3-AuNP	101
10.2.5 Caratterizzazione di 4-AuNP	103
10.2.6 Caratterizzazione di 5-AuNP	105
10.2.7 Caratterizzazione di 6-AuNP	107
<b>11. Appendice</b>	109
11.1 <i>Saturation transfer difference (STD)</i>	109
11.2 <i>WaterLOGSY</i>	110
11.3 <i>WaterSTD</i>	111
<b>12. Bibliografia</b>	112





## Glossario

NB	Neuroblastoma
<i>DOSY</i>	<i>Diffusion ordered spectroscopy</i>
<i>HPwSTD</i>	<i>High power water saturation transfer difference</i>
<i>LPwSTD</i>	<i>Low power water saturation transfer difference</i>
PFG	<i>Pulsed field gradient</i>
VMA	Acido vinilmandelico
HVA	Acido ovanillico
3-MT	3-metossitiramina
AuNPs	Nanoparticelle d'oro funzionalizzate
<i>WaterLOGSY</i>	<i>Water ligand observed with gradient spectroscopy</i>
TLC	Cromatografia su strato sottile
DMPA	2,2-dimetossi-2-fenilacetofenone
Fmoc	Fluorenilmetilossicarbonil
Tyr	Tirosina
Gln	Glutamina
Asp(OMe)	Acido aspartico beta-metil estere
Pro	Prolina
Trp	Triptofano
2-CTC	2-clorotritil cloruro
DIPEA	N,N diisopropilettilamina
HBTU	Esafuorofosfato benzotriazolo tetrametil uronio
HFIP	Alcol esafluoroisopropilico
TFA	Acido trifluoroacetico
TOABr	Tetraottillammonio bromuro





## 1. Introduzione

### 1.1 Descrizione del Neuroblastoma

Il neuroblastoma (NB) è un tumore che ha origine dai neuroblasti, cellule presenti nel sistema nervoso simpatico, una parte del sistema nervoso che controlla alcune funzioni involontarie del nostro organismo come la respirazione, la digestione e il battito cardiaco. Nella maggior parte dei casi ha origine nelle ghiandole surrenali, situate sopra i reni, o nei gangli nervosi, ovvero dei gruppi di cellule nervose presenti lungo la colonna vertebrale a livello di collo, torace, addome e pelvi <sup>[1]</sup>.

Secondo i dati dell'Associazione italiana registri tumori (AIRTUM), il neuroblastoma rappresenta circa il 10 per cento di tutti i tumori registrati dalla nascita ai 14 anni. In particolare, è il tumore più frequente in età neonatale. In Italia ogni anno vengono individuati 130-140 nuovi casi di neuroblastoma. L'età media alla diagnosi è di circa 18 mesi e l'incidenza è simile tra maschi e femmine. I segni e i sintomi del neuroblastoma possono essere molto diversi a seconda della parte del corpo interessata. Se la malattia si sviluppa nell'addome si potranno per esempio notare masse che, crescendo, possono portare a mancanza di appetito, sensazione di sazietà o dolore a livello addominale. Oltre ai disturbi dovuti alla pressione della massa tumorale sugli organi e le strutture con cui viene in contatto, spesso nel neuroblastoma sono presenti sintomi sistemici come tachicardia, ipertensione, febbre, manifestazioni emorragiche spontanee ed ecchimosi <sup>[1]</sup>.

Definire lo stadio di un tumore (stadiazione) significa stabilire quanto una malattia è diffusa. Sin dagli anni Novanta del secolo scorso, per stabilire lo stadio del neuroblastoma si usa un sistema noto come INSS (*International Neuroblastoma Staging System*) che suddivide la malattia in quattro stadi principali: da 1 per la malattia localizzata a 4 per quella che si è diffusa anche in altri organi. A questi stadi si aggiunge anche lo stadio 4S (neuroblastoma speciale), riservato ai casi in cui il paziente ha meno di un anno e la malattia si è diffusa a fegato, cute o midollo osseo <sup>[1]</sup>.

Generalmente la tipologia del trattamento dipende dalla stadiazione dello stesso, generalmente:

- Stadio 1: in assenza di particolari complicazioni, la strategia consiste nell'attendere una potenziale spontanea regressione del tumore;

- Stadio 2/3: numero variabile di cicli chemioterapici;
- Stadio 4/4S: cicli multipli di chemioterapia, accoppiati solitamente a trattamenti chirurgici e radioterapici [2].

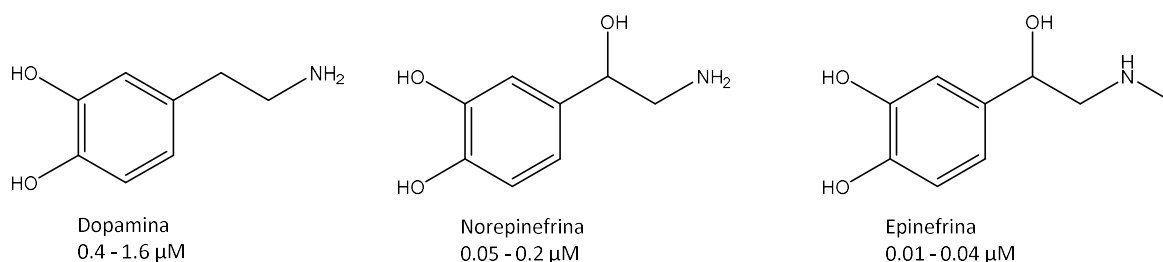
La prognosi attesa per i differenti stadi del tumore negli anni dal 1979 al 2004, espressa come OS (*Overall Survival*) a 5 anni, è riportata di seguito:

- Stadio 1-3:  $90 \pm 1 \%$  ;
- Stadio 4S:  $84 \pm 2 \%$  ;
- Stadio 4 con diagnosi dopo i 18 mesi di età:  $35 \pm 1 \%$  [2].

A causa della grande varietà del comportamento clinico, che va dalla regressione spontanea alla rapida progressione fatale, la prognosi è variabile e il trattamento del neuroblastoma è impegnativo [3]. La prognosi è attualmente basata su parametri quali l'età alla diagnosi, lo stadio della malattia e l'amplificazione del gene MYCN. Sulla base di questi fattori di rischio, stabiliti al momento della diagnosi, i pazienti vengono assegnati a gruppi di rischio differenti e trattati di conseguenza. Tuttavia, i pazienti che ricevono lo stesso trattamento possono comunque avere un decorso clinico marcatamente diverso, da cui la necessità di marcatori prognostici più accurati [3].

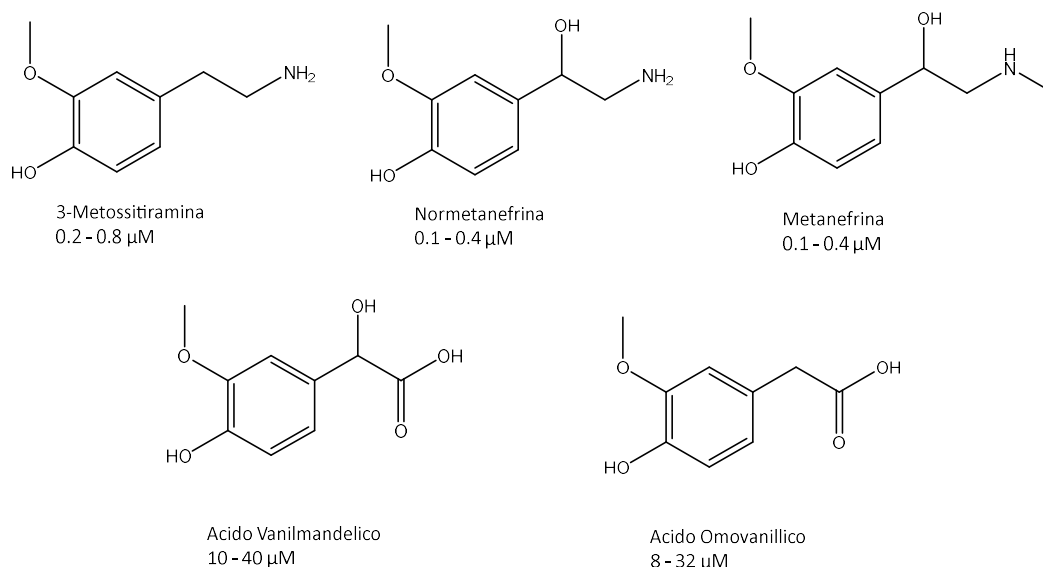
Allo stato attuale il NB è diagnosticato grazie a tecniche di imaging, istopatologiche e, solo recentemente, tramite l'analisi delle catecolamine urinarie e specialmente dei loro metaboliti [3]. Quest'ultima tecnica diagnostica sta attraendo sempre più interesse grazie alla possibilità di testare in modo non invasivo la presenza della malattia, cosa particolarmente utile specialmente per lo screening dei pazienti pediatrici [4].

Le catecolamine si ottengono a partire dall'amminoacido tirosina grazie all'azione di diversi enzimi [5]. Le catecolamine più importanti sono riportate in Fig. 1:



**Figura 1:** Struttura delle più importanti catecolamine urinarie e loro concentrazioni di riferimento nelle urine di pazienti sani [6].

Dopo il rilascio, la loro emivita nel plasma è di circa 1 minuto. Solo il 2-3% delle catecolamine vengono escrete immutate nelle urine, la maggior parte di esse viene metabolizzata attraverso varie vie enzimatiche in numerosi metaboliti [5]. I metaboliti delle catecolamine vengono escreti nelle urine in concentrazioni elevate nel 95% dei pazienti con neuroblastoma, e questo può essere usato per scopi diagnostici [3]. I più importanti metaboliti appartengono alle classi delle metanefrine (3-metossitiramina [3-MT], metanefrina [MN] e normetanefrina [NMN]) e acidi fenolici (l'acido omovanillico [HVA] e l'acido vanilmandelico [VMA]) [6], le loro strutture sono riportate in Fig. 2:



**Figura 2:** Struttura dei più importanti metaboliti delle catecolamine urinarie e loro concentrazioni di riferimento nelle urine di pazienti sani [6].

Di questi metaboliti VMA e HVA sono quelli più comunemente analizzati nell'urina dei pazienti per la diagnosi del NB. Tuttavia, la sensibilità diagnostica complessiva di VMA e HVA per NB è piuttosto bassa (massimo 81%), in particolare per i pazienti allo stadio 1, dove la sensibilità di VMA e HVA scende rispettivamente al 59% e 44%. La miglior sensibilità diagnostica che può essere ottenuta nei diversi stadi della malattia è pari al 95%, ma questo obiettivo può essere raggiunto solamente attraverso un'analisi combinata delle catecolamine e dei loro metaboliti [6].

Generalmente un rapporto VMA/HVA < 0,5 è correlato con la malattia in stadio avanzato e con una prognosi avversa, ma l'analisi di 3-MT ha ottenuto risultati superiori rispetto al rapporto VMA/HVA. In linea con i dati sperimentali si è scoperto che 3-MT è presente in

concentrazione elevata solamente nei pazienti in Stadio 4, si ha quindi la possibilità di discriminare in maniera non ambigua lo stadio più avanzato del tumore. Oltre a questo, un recente studio ha dimostrato anche la possibilità di sfruttare 3-MT per il monitoraggio della risposta alla terapia [7].

## **1.2 Metodologie di analisi per miscele complesse e NMR *chemosensing***

Come riportato nel Paragrafo 1.1 uno dei metodi utilizzabili per la diagnosi del NB consiste nell'analizzare specifici metaboliti all'interno dell'urina. L'analisi di quest'ultima, così come anche altri biofluidi, è ostacolata non tanto dai quantitativi a disposizione per l'analisi (generalmente presenti in grandi quantità), bensì, dalla complessità intrinseca delle stesse (presenza di un numero elevato di molecole e/o di possibili interferenti).

L'analisi di miscele complesse è stata affrontata negli anni attraverso differenti strategie: una possibilità consiste nel diminuire la complessità del sistema sfruttando metodi cromatografici (GC, HPLC), che è la prima opzione per la separazione degli analiti presenti. Tuttavia, la cromatografia preclude la possibilità di ottenere informazioni dettagliate sugli analiti (ad esempio la struttura), per questo motivo, detector non specifici (ad esempio quelli basati sulla fluorescenza), sono stati progressivamente abbandonati in favore di tecniche di spettrometria di massa. Lo sviluppo della tecnica *electrospray tandem mass spectrometry*, ha facilitato lo screening di miscele complesse senza un effettivo "pretrattamento" cromatografico. Questa tecnica non è però particolarmente adeguata per l'identificazione di composti incogniti (necessità di opportuni standard) [8].

Un'altra possibilità è data dalla spettroscopia NMR, questa tecnica garantisce: grande quantità di informazioni ottenibili (ad esempio strutturali), minima manipolazione del campione e analisi non distruttive. Comunque, sebbene l'NMR sia la tecnica preferita per l'identificazione di composti organici puri, il suo utilizzo diretto nell'analisi di miscele complesse è solitamente precluso. Ciò è legato all'eccesso di informazioni che compaiono nello spettro finale e che quindi, ad esempio, porta alla mancata identificazione dei segnali dell'analita target a causa della possibile sovrapposizione con segnali di altre specie presenti nella matrice. Oltre a questo, la più grande limitazione della tecnica NMR risiede nella scarsa sensibilità [8].

Per ovviare all'eccessiva complessità degli spettri NMR un approccio comune consiste nell'aumentare la dimensionalità dell'esperimento. Sebbene questa strategia risulti essere utile per spettri di composti puri, la sua applicazione a miscele complesse può essere infruttuosa. Lo spettro finale della miscela è dato dalla sovrapposizione dei singoli spettri delle diverse specie: aumentando quindi la dimensionalità, la sovrapposizione dei segnali permane, rendendo quindi questo approccio poco utile per ridurre la complessità [8].

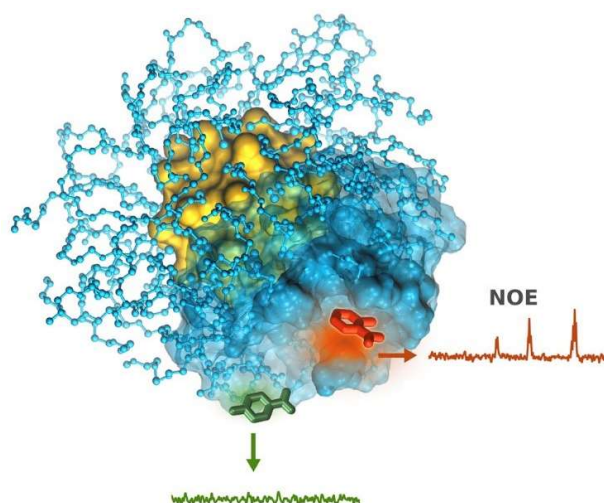
Un'altra possibilità consiste nell'accoppiare tecniche differenti, portando alle cosiddette tecniche combinate, come ad esempio LC-NMR. Sebbene questa strategia possa portare a degli ottimi risultati, l'effettiva implementazione risulta essere complessa: è necessario uno speciale "*flow cell probe*" attraverso il quale il campione fluisce continuamente. A causa dei ridotti tempi di residenza dell'analita, le osservazioni sono limitate a spettri al protone 1D, cosa che limita una più approfondita caratterizzazione strutturale. Per il complesso apparato strumentale e l'importante consumo di tempo richiesto per la separazione ed analisi, l'accoppiamento LC-NMR non ha mai preso piede in maniera importante per l'analisi effettiva di miscele complesse [8].

Al posto di una separazione fisica ottenuta attraverso cromatografia, un'alternativa può essere rappresentata da una separazione NMR "virtuale". Questa idea è alla base della tecnica *DOSY*, un approccio basato sulla differenziazione dei segnali di diverse molecole grazie al loro coefficiente di diffusione in soluzione. La combinazione di una sequenza di impulsi dedicata e un'elaborazione dati, permette di ottenere delle mappe 2D in cui nella dimensione diretta è riportato il *chemical shift*, mentre in quella indiretta il coefficiente di diffusione. La tecnica *DOSY* permette di assegnare in maniera non ambigua tutti i segnali NMR appartenenti alla stessa molecola, requisito fondamentale sia per l'identificazione di specie note, ma soprattutto, per specie incognite. Uno dei maggiori problemi legati però alla tecnica *DOSY* consiste nell'accidentale sovrapposizione dei segnali appartenenti a specie diverse nella dimensione diretta. Questa condizione causa spesso l'impossibilità di un'identificazione certa dei segnali dell'analita di interesse. Oltre a questo, un'altra problematica è legata alle specie con velocità di diffusione molto simili, come ad esempio gli isomeri [8].

Un approccio alternativo per ridurre la complessità nell'analisi di miscele consiste nello sfruttare dei sensori chimici per evidenziare in maniera chiara il segnale di un analita, o di una classe di analiti. Questa strategia si basa sul fatto che l'interazione tra il sensore e l'analita di

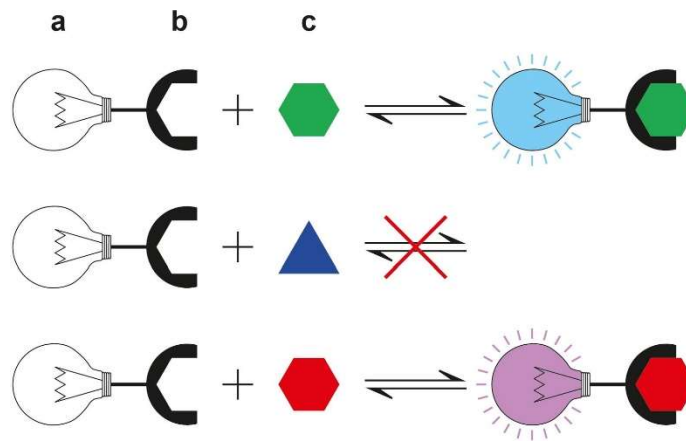
interesse può provocare una modifica misurabile nelle proprietà chimico/fisiche o del sensore, o dell'analita. Quando un sensore viene utilizzato per rivelare la presenza di uno specifico analita, l'informazione ottenuta (ad esempio variazione di corrente o di assorbanza) dipende unicamente dalla selettività del sensore, ed errori dovuti alla presenza di specie interferenti possono sempre avvenire. Per minimizzare questa problema, una possibilità è quella di combinare la selettività fornita da un opportuno sensore, con la specificità fornita dalla tecnica NMR [8].

Tra gli esperimenti NMR assistiti da molecole c'è il *chemosensing* NMR, una tecnica in cui le nanoparticelle d'oro agiscono come una fonte di magnetizzazione da trasferire selettivamente, attraverso il *Nuclear Overhauser effect* (NOE), solo a specifiche classi di molecole. Questo porta all'incremento selettivo dei segnali di alcuni analiti rispetto ad altri [9]. Il fenomeno è riportato graficamente in Fig. 3.



**Figura 3:** Rappresentazione grafica dell'esperimento NMR chemosensing assistito da nanoparticelle d'oro funzionalizzate. L'analita di color arancione interagisce con la macromolecola e riceve magnetizzazione da quest'ultima, cosa che non accade con l'analita verde non interagente [10].

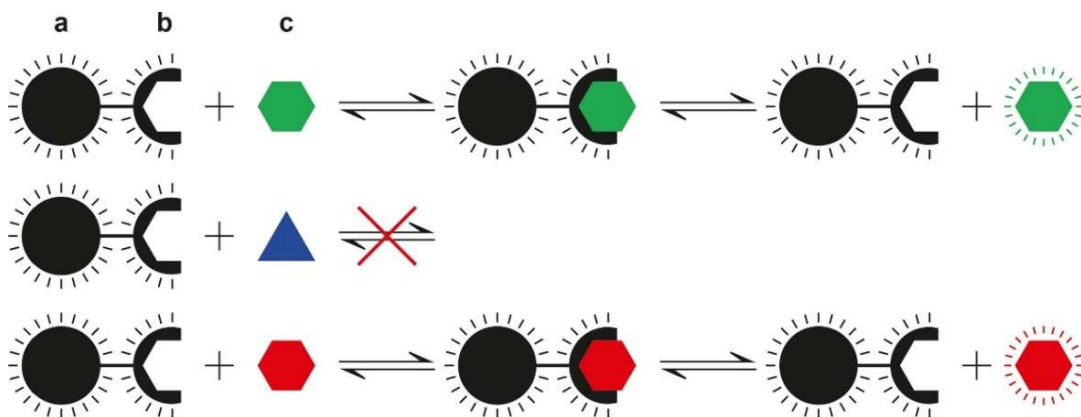
Vengono definiti due diversi approcci di *chemosensing*. Il primo, definito di *chemosensing* "indiretto", misura una variazione di qualche proprietà NMR del sensore che interagisce con l'analita target.



**Figura 4:** Approccio di *chemosensing* indiretto. Come risultato dell'evento di rivelazione, il segnale generato dal sensore (a) è differente quando analiti differenti (c) interagiscono con il recettore (b) del sensore chimico [8].

Questo approccio è limitato dal fatto che le informazioni sull'identità dell'analita possono essere ottenute solo per confronto con i relativi standard.

Il secondo approccio consiste nel *chemosensing* "diretto", nel quale si misura una variazione di qualche proprietà NMR dell'analita target. Un modo per raggiungere questo obiettivo è quello, come riportato poc'anzi, di sfruttare le nanoparticelle. La possibilità di funzionalizzare con *monolayer* organici la superficie di quest'ultime, specialmente quelle d'oro, garantisce un modo per incorporare degli opportuni recettori molecolari. Quando il diametro delle nanoparticelle risultanti è di pochi nanometri, la velocità di diffusione roto/traslazione permette di isolare e manipolare la magnetizzazione che deriva dagli spin nucleari del recettore [8] (Fig. 5).



**Figura 5:** Approccio di *chemosensing diretto*. Il sensore chimico consiste di due unità (a) supporto, (b) recettore. In questo caso il segnale rivelato è generato direttamente dall'analita interagente. Nel *chemosensing* assistito da nanoparticelle, l'evento di rivelazione è associato ad un trasferimento di magnetizzazione (nell'immagine espresso come raggi), che viene poi rivelato [8].

I vantaggi dell'approccio "diretto" sono molteplici: per prima cosa i segnali di possibili specie interferenti possono essere ridotti in intensità, o addirittura rimossi nello spettro NMR finale; oltre a questo, le informazioni ottenute anche solo da uno spettro  $^1\text{H}$  sono spesso sufficienti per l'identificazione dell'analita di interesse [8]. I vantaggi delle nanoparticelle d'oro in esperimenti di *chemosensing* "diretto" sono:

- Quando sono passivate con un opportuno *monolayer*, risultano essere stabili e formano soluzioni omogenee;
- Date le loro proprietà diamagnetiche, non perturbano l'omogeneità del campo magnetico, risultando compatibili con esperimenti NMR;
- La loro versatile chimica ne permette la funzionalizzazione della superficie con opportuni recettori molecolari. Variando questi ultimi, è possibile in linea teorica, sfruttare il sensore per rivelare qualsiasi classe di analiti [8].

### 1.3 Applicazione di AuNPs nell'ambito del *chemosensing* e metodologie di sintesi

La sintesi di nanoparticelle d'oro funzionalizzate con *monolayer* organici (leganti), consiste essenzialmente nella formazione spontanea di nuclei d'oro in soluzione a seguito della riduzione di sali d'oro con opportuni agenti riducenti. I leganti presenti nella miscela di reazione ricoprono la superficie della particella in crescita, prevenendo così l'aggregazione in un materiale *bulk*. Quando i leganti sono ammine o tioli, questi agiscono anche da agenti riducenti secondari, convertendo sali di oro (III) in polimeri di oro (I), che sono gli effettivi precursori delle nanoparticelle [8]. La forza delle interazioni tra legante e nanoparticella è generalmente inferiore rispetto a quella di un legame covalente e dipende in particolare dall'affinità del gruppo interagente del legante per l'oro. Generalmente le ammine sono dei leganti piuttosto deboli, che vengono facilmente rimossi dalla superficie della particella, i tioli invece interagiscono più fortemente, con una forza di legame tipica di 40-60 kcal mol<sup>-1</sup> [8]. Questo garantisce l'ottenimento di nanoparticelle con un'eccellente stabilità [11].

Durante gli anni sono state proposte diverse vie di sintesi per le nanoparticelle, che possono essere essenzialmente differenziate sulla base del numero di fasi presenti nella miscela di reazione (una o due) e sul numero di *step* necessari all'ottenimento del prodotto finale. Nel metodo "*one-phase*" il sale d'oro, il legante e l'agente riducente sono solubili nello stesso



solvente, mentre nel metodo “*two-phase*” è necessaria la presenza di un trasferitore di fase per garantire il passaggio delle specie tra fase organica (contenente solitamente il legante) e la fase acquosa (contenente l’agente riducente e il sale d’oro). Nel metodo “*one-step*” le nanoparticelle sono passivate dal legante finale durante la loro formazione. Viceversa, nel metodo “*two-step*”, i nuclei d’oro sono formati in presenza di un legante debole il quale successivamente viene scambiato con il legante più forte desiderato [8].

Una delle prime vie di sintesi è il cosiddetto metodo Turkevich, che può essere considerato come un metodo *one-phase, one-step*. In questo metodo un sale d’oro (solitamente tetracloroaurato) viene ridotto in ambiente acquoso dal citrato e si ottengono generalmente nanoparticelle con dimensioni nel range da 7 a 100 nm. Il citrato agisce anche da debole legante, garantendo una stabilizzazione elettrostatica della nanoparticella grazie alla sua carica negativa. Lo stesso approccio può essere anche esteso in un *two-step*, nel quale il legante citrato è sostituito da un legante più forte, come ad esempio un tiolo [8].

Un approccio molto utilizzato recentemente è rappresentato dal protocollo Brust-Schiffrin, che è generalmente un metodo *two-phase one-step*. Qui un sale d’oro (tetracloroaurato) e un agente riducente ( $\text{NaBH}_4$ ) sono solubili in acqua, mentre il legante (spesso alchiltioli) è solubile solamente in solventi organici di ridotta polarità. È necessario quindi un trasferitore di fase per portare il sale d’oro e l’agente riducente in fase organica, dove la reazione ha luogo.

Una variazione del metodo Brust-Schiffrin tradizionale riportato poc’anzi consiste nell’adottare un protocollo *two-step* anziché *one-step*. In questo caso le nanoparticelle sono preparate con un metodo *one* o *two-phase*, usando un’ammina (solitamente oleilammina) come legante. Dopo la sintesi, l’ammina viene scambiata con il tiolo desiderato in modo da ottenere un *coating* più stabile termodinamicamente. L’utilizzo di questa variante del protocollo Brust-Schiffrin permette di avere diversi vantaggi:

- La quantità di legante finale richiesta è minore rispetto al caso *one-step*, nel quale generalmente è richiesto un largo eccesso di legante al fine di passivare efficacemente la nanoparticella;
- Il rischio di degradazione del legante è minimizzato grazie al fatto che sia l’agente riducente, che il sale d’oro (carattere acido), sono rimossi dalla soluzione prima dell’aggiunta del legante;
- Miglior controllo delle dimensioni delle nanoparticelle nel caso in cui quest’ultime vengano preparate in presenza di un legante debole [8].

La scelta effettiva del metodo dipende da diversi fattori, come ad esempio le dimensioni desiderate della nanoparticella, la loro solubilità, dispersione delle dimensioni e reattività chimica dei leganti. In generale il metodo Turkevici è preferito quando sono richieste nanoparticelle di dimensioni maggiori di 7-8 nm. Con il metodo Brust-Schiffrin *one-phase* si ottengono nanoparticelle di dimensioni nel range 3-8 nm, con una ridotta dispersione delle dimensioni. La variante *two-phase* dello stesso protocollo, utilizzando ammine come agenti stabilizzanti, è preferita per l'ottenimento di particelle con dimensioni nel range 1-3 nm. È importante sottolineare che con questi metodi sintetici non si ottengono dei cluster con dimensioni e formula molecolare definite ("*atomically precise*"), ma piuttosto un insieme di nanoparticelle con una certa distribuzione delle dimensioni [8].

Nel contesto di questo lavoro di Tesi il metodo utilizzato per la sintesi di nanoparticelle d'oro funzionalizzate consiste in una variante del metodo Brust-Schiffrin modificata da Scrimin *et al* [12]. Il primo step consiste nella formazione di nuclei d'oro funzionalizzati con leganti amminici, il secondo step consiste nella passivazione finale della nanoparticella con il tiolo d'interesse. Lo schema sintetico del metodo Scrimin è riportato in Fig. 6.

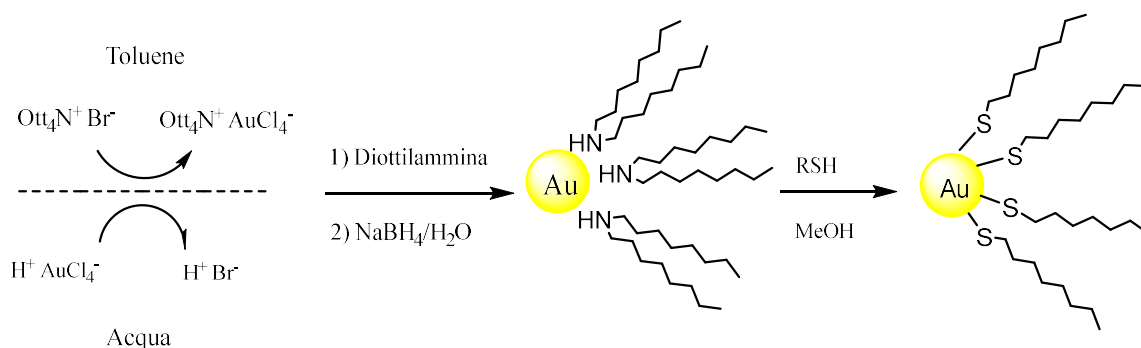
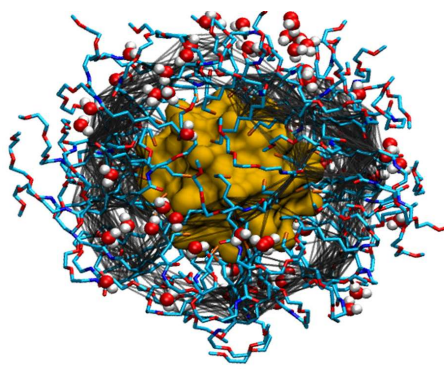


Figura 6: Schema sintetico del metodo Scrimin.

Nella pratica il primo passaggio consiste nel far passare il sale d'oro (acido cloroaurico) dalla fase acquosa, a quella organica. Questo è reso possibile grazie all'utilizzo di un opportuno trasferitore di fase, il tetraottilammonio bromuro. Successivamente si aggiunge una quantità opportuna di diottilammina (DOA) che ha il compito sia di passivare la superficie delle nanoparticelle agendo da controllo dimensionale, che di ridurre l'Au(III) ad un polimero di Au(I), l'effettivo precursore delle nanoparticelle. La riduzione effettiva ad Au(0) viene effettuata in seguito grazie all'aggiunta di sodio boroidruo. Infine si ha l'aggiunta del tiolo

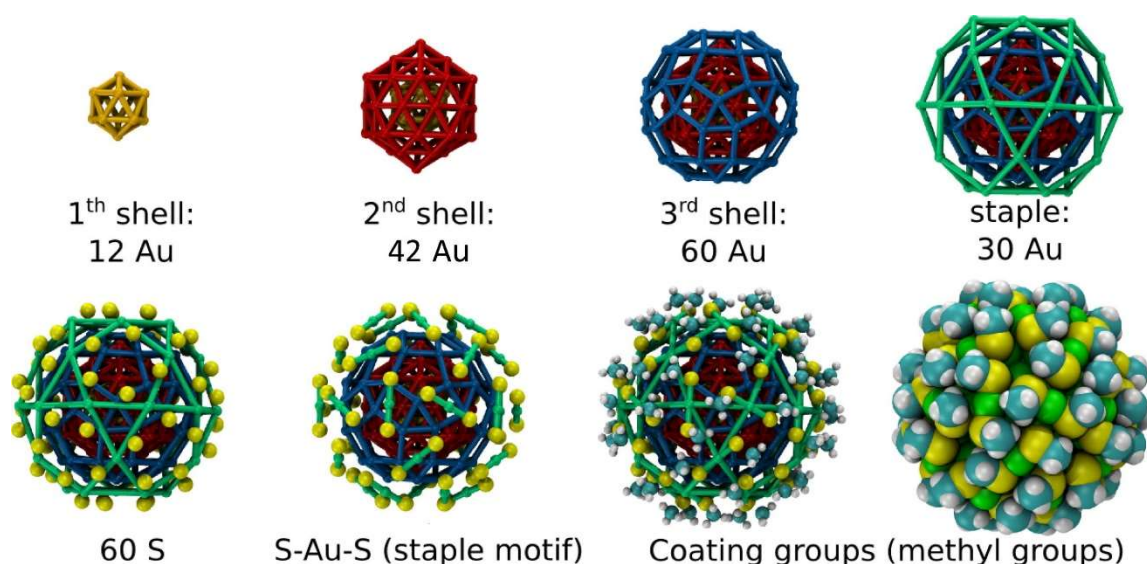
desiderato che andrà a rimpiazzare il legante amminico, formando quindi il *monolayer* finale. Le nanoparticelle così ottenute andranno purificate accoppiando cicli di lavaggi e centrifugazione con cromatografia ad esclusione dimensionale, in modo da eliminare la DOA e il tiolo in eccesso. In ogni caso il tipo di purificazione effettuato dipende fortemente dal tipo di nanoparticella sintetizzata, in particolar modo dalla sua solubilità.

In Fig. 7 è rappresentata la struttura di una nanoparticella d'oro funzionalizzata con un *monolayer* organico.



**Figura 7:** Rappresentazione grafica di una nanoparticella d'oro funzionalizzata con un monolayer organico [10].

Nel contesto dell'NMR *chemosensing* le performance ottimali sono ottenute generalmente con nanoparticelle di diametro attorno a 2 nm. In questi campioni il cluster più comune è considerato  $Au_{144}(SR)_{60}$ , la cui struttura è stata ampiamente studiata [13]. In questo caso il nucleo metallico è formato da tre strati: uno strato icosaedrico interno di 12 atomi di Au rivestito da uno strato icosaedrico intermedio di 42 atomi di Au e da uno strato strato romboicosadodecaedrico di 60 atomi di Au. Questo nucleo di  $Au_{144}$  è ulteriormente stabilizzato da 30 Au-S-Au distribuiti sulla sua superficie in maniera ordinata [8].



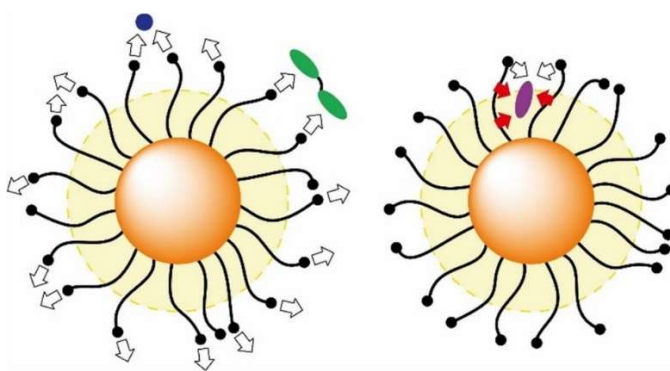
**Figura 8:** Strutture di Lopez-Acevedo per il modello  $Au_{144}(SR)_{60}$ , in questo caso il *monolayer* è rappresentato da gruppi metili [8].

Ogni legante presente sulla superficie della nanoparticella può esibire uno o più gruppi funzionali, oltre a quello responsabile dell'interazione con il nucleo d'oro. Questo rende la nanoparticella un oggetto multivalente, in cui le proprietà chimico-fisiche di ogni legante sono replicate centinaia di volte. Grazie quindi alla somma dei singoli contributi, si ottiene un complesso macromolecolare con una maggiore affinità nei confronti dell'analita di interesse [8].

È importante specificare che l'interazione tra analita e nanoparticella è basata su interazioni non covalenti, in particolar modo elettrostatiche o idrofobiche. Queste possono originare da un'interazione diretta tra l'analita e i gruppi funzionali esterni del monostato, oppure attraverso la formazione di tasche transienti all'interno di quest'ultimo (Fig. 9). Queste due diverse tipologie di interazioni non si escludono a vicenda ma, anzi, possono essere presenti entrambe con il vantaggio di impartire una maggiore selettività nei confronti della molecola d'interesse. Le tasche transienti hanno una struttura a "ciotola" in cui le pareti interne sono rappresentate dalle catene alchiliche del legante, mentre il bordo è rappresentato dai gruppi funzionali terminali del legante. La forma di queste tasche transienti suggerisce quindi che le nanoparticelle funzionalizzate prediligono analiti anfifilici, che possano quindi beneficiare sia delle interazioni con la parte interna, che del bordo della cavità. Questa struttura generale spiega in maniera efficace l'abilità di questi complessi macromolecolari di legare in maniera selettiva alcuni analiti rispetto ad altri [8].

Nel caso specifico delle nanoparticelle solfonate preparate in questo lavoro di Tesi la tasca transiente presenta il bordo carico negativamente, mentre la parte sottostante non carica. Pensando quindi alla struttura della 3-MT, si può affermare che esiste un'interazione elettrostatica tra il gruppo carico positivamente dell'analita ( $-NH_2$ ) e quello carico negativamente del legante, ma anche un'interazione idrofobica tra la parte aromatica dell'analita e la catena di atomi di carbonio del legante.

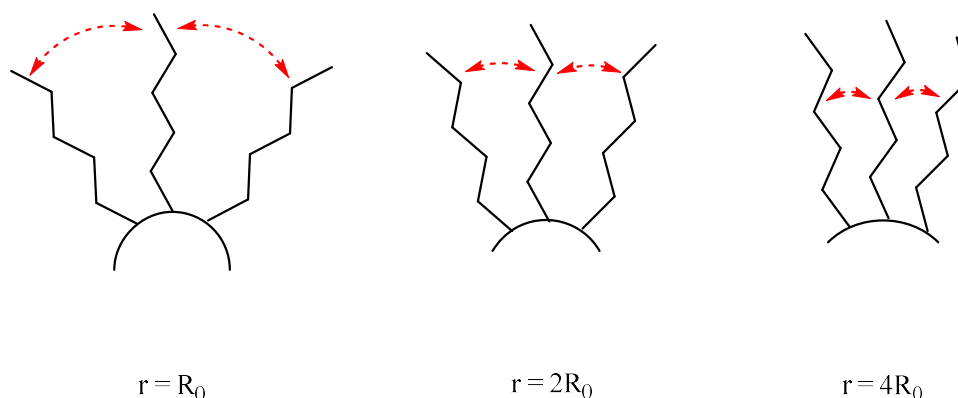
Una delle maggiori difficoltà nello sviluppare questi complessi macromolecolari risiede proprio nella flessibilità del *monolayer*, in modo da permettere la formazione delle fondamentali tasche transienti. L'inserimento di un opportuno componente inerte (spesso alchilico come nel caso di questo lavoro di Tesi), che agisca da *spacer*, si è dimostrata una condizione che favorisce la formazione di cavità nel monostrato.



**Figura 9:** Diversa tipologia di interazione analita/nanoparticella d'oro funzionalizzata. La parte colorata di giallo rappresenta la parte idrofobica del monolayer. Le frecce colorate rappresentano le diverse interazioni con gli analiti, quelle bianche con il gruppo terminale, quelle rosse con la catena [8].

Come riportato precedentemente, nanoparticelle d'oro funzionalizzate per esperimenti di NMR *chemosensing* richiedono un diametro medio di 1.6-1.8 nm. Questi oggetti garantiscono di avere un'efficiente condizione nota come "*spin diffusion*", una caratteristica fondamentale in esperimenti di trasferimento di saturazione (come verrà poi specificato nel capitolo 3). La curvatura superficiale di tali aggregati garantisce una sufficiente mobilità dei leganti, condizione favorevole per la formazione di tasche transienti. Nanoparticelle più piccole permettono la formazione di cavità nel monostrato, ma compromettono la possibilità di avere una *spin diffusion* efficiente. Al contrario, nanoparticelle con dimensioni maggiori garantiscono un'ottima *spin diffusion*, ma a causa della diminuzione della curvatura superficiale si ha un *monolayer* più "affollato", con conseguente maggior difficoltà nella

formazione di tasche transienti [8]. L'influenza delle dimensioni delle nanoparticelle sulla mobilità del *monolayer* è riportata graficamente in Fig. 10.



**Figura 10:** Rappresentazione grafica di come al diminuire del raggio della nanoparticella si abbia una diminuzione di mobilità dei leganti e, conseguentemente, un'aumentata difficoltà nel formare tasche transienti.

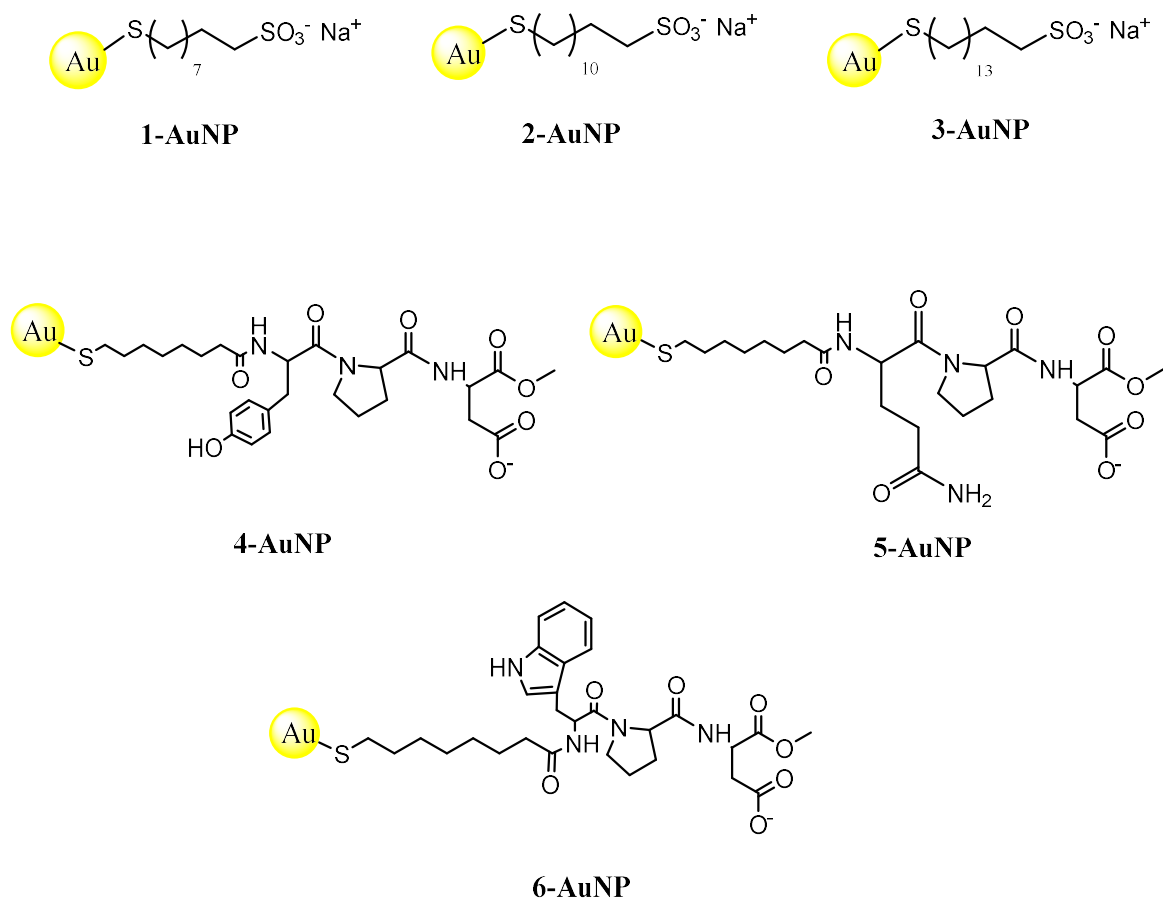
Come riportato precedentemente, la sintesi di nanoparticelle d'oro funzionalizzate con il metodo Brust-Schiffrin modificato garantisce l'ottenimento di particelle con un diametro medio di 1.8 nm. Grazie all'elevata simmetria di questi sistemi, il loro spettro NMR al  $^1\text{H}$  si presenta con dei segnali abbastanza risolti, questo almeno quando lo *spacer* alchilico è una catena corta di atomi di carbonio ( $R$ ). Quando la lunghezza della catena aumenta invece, la rotazione attorno al primo legame S-C in  $\text{Au}_{144}(\text{SR})_{60}$  è essenzialmente bloccata. Questa rigidità si traduce in un significativo allargamento delle linee spettrali: all'aumentare delle dimensioni della catena, aumenta anche il raggio idrodinamico del nucleo metallico, questo provoca un aumento del tempo di correlazione rotazionale, che a sua volta influenza il tempo di rilassamento trasversale ( $T_2$ ). Per questo motivo gli spettri NMR al  $^1\text{H}$  esibiscono generalmente gli stessi segnali del legante, ma con un notevole allargamento delle righe spettrali (spesso anche al di sotto del limite di rivelazione). Questo allargamento è tanto più importante, quanto maggiori sono le dimensioni della nanoparticella, motivo per il quale utilizzare AuNPs con un diametro superiore a 3 nm per esperimenti NMR diventa problematico [8].

## 2. Scopo della Tesi

Lo scopo di questo lavoro di Tesi consiste nel validare l'utilizzo della tecnica NMR assistita da nanoparticelle d'oro opportunamente funzionalizzate per la diagnosi del neuroblastoma. Come evidenziato nell'introduzione, un metabolita delle catecolamine urinarie molto promettente non solo per la diagnosi della malattia con prognosi avversa, ma anche per il monitoraggio della risposta alla terapia è rappresentato da 3-MT. Per tali motivazioni quest'ultimo è stato scelto come metabolita target nelle analisi di questo lavoro di Tesi. Trattandosi ancora di studi preliminari, le analisi sono effettuate su campioni costruiti ad hoc, in attesa di un'effettiva applicazione futura su campioni reali di urina di pazienti affetti da neuroblastoma.

Il lavoro di Tesi può essere suddiviso essenzialmente in due parti:

1. Sintesi e caratterizzazione di sei nanoparticelle d'oro funzionalizzate con tioli, le prime tre che differiscono per lunghezza di catena (9, 12 e 15 atomi di carbonio) e con un gruppo solfonato carico negativamente alle loro estremità (Fig. 11). Le altre tre presentano invece tre differenti tripeptidi legati al nucleo d'oro mediante uno *spacer* alchilico di otto atomi di carbonio. I differenti tripeptidi sono costituiti da due amminoacidi esterni fissi, partendo dall'esterno Acido Aspartico (OMe) e Pro (Prolina), mentre gli amminoacidi più interni sono rappresentati da Tyr (Tirosina), Gln (Glutamina) e Trp (Tryptofano) (Fig. 11). La scelta dei leganti specifici è stata effettuata sulla base di simulazioni MD "short steered" condotte su una libreria di 100 AuNP passivate con tripeptidi, al fine di valutarne l'affinità prevista con la 3-metossitiramina (3-MT). Questa molecola presenta una porzione aromatica idrofobica e un gruppo carico positivamente a pH neutro (ammina protonata), caratteristica che fornisce indicazioni importanti nella scelta di AuNP *host* appropriato. Dato che la 3-MT è un metabolita naturale della dopamina, si sono inoltre esplorati i suoi recettori nativi (ovvero le proteine), per ottenere informazioni su potenziali gruppi funzionali complementari e sulle loro caratteristiche strutturali.



**Figura 11:** Nanoparticelle d'oro funzionalizzate oggetto di studio per questo lavoro di Tesi con relativi codici identificativi.

2. Test di *chemosensing* aventi come metabolita target la 3-MT. L'esperimento che viene utilizzato a tal fine è l'*HPwSTD*: come verrà approfondito più nel dettaglio durante la descrizione del lavoro di Tesi, la scelta di questa tipologia di esperimento è dovuta sia a motivi di sensibilità, che alla possibilità di ridurre (o al limite eliminare) i segnali di specie differenti dall'analita target nello spettro finale. Un punto favorevole di questa scelta, come detto poc'anzi, è rappresentato dall'elevata sensibilità che permette di ottenere ottimi risultati anche con concentrazioni  $\mu\text{M}$  (ovvero lo stesso ordine di grandezza della concentrazione di 3-MT nelle urine).

L'altra tipologia di esperimento che verrà utilizzato è il *DOSY*: sebbene questa tecnica soffra di per sé di limitazioni, come descritto nel paragrafo 1.2, in presenza di nanoparticelle d'oro funzionalizzate la situazione può essere migliorata. In particolare, l'interazione tra l'analita e la nanoparticella induce una variazione del coefficiente di diffusione dell'analita rispetto alle condizioni in cui esso è isolato. Ciò potrebbe quindi permettere l'identificazione univoca del metabolita target presente in soluzione, cosa che verrà verificata sperimentalmente durante questo lavoro di Tesi.



### 3. Spettroscopia NMR

Il *Nuclear Overhauser Effect* (NOE) può essere definito come una variazione in intensità di una risonanza, quando la transizione di spin di un'altra risonanza viene in qualche modo perturbata rispetto alla condizione di equilibrio. La perturbazione che porta alla variazione della popolazione di equilibrio consiste o nel saturare una certa risonanza (*steady-state* NOE), che porta ad eguagliare la differenza di popolazione di spin tra gli stati, oppure ad invertire la popolazione tra gli stati di spin coinvolti (*transient* NOE). L'entità (o *enhancement*) del NOE viene espressa come rapporto tra la variazione di intensità di una risonanza rispetto alla condizione di equilibrio (a seguito della perturbazione) e l'intensità di equilibrio stessa:

$$\eta_I \{S\} = \frac{I - I_0}{I_0} \times 100 (\%) \quad (1)$$

Dove  $\eta_I \{S\}$  rappresenta il NOE osservato per lo spin I quando lo spin S viene perturbato. La variazione di intensità dovuta al NOE può essere positiva (un aumento) o negativa (una diminuzione), a seconda sia delle dimensioni molecolari, che del segno del rapporto giromagnetico  $\gamma$  degli spin coinvolti <sup>[14]</sup>.

Il NOE deriva, in ultima analisi, da una redistribuzione di popolazione tra gli stati di spin. Tale redistribuzione avviene grazie a fenomeni di rilassamento, i quali a loro volta richiedono un campo magnetico oscillante alla frequenza della corrispondente transizione. Questa condizione è analoga all'eccitazione di un sistema di spin all'equilibrio dovuta ad un impulso di radiofrequenza: solo se l'impulso di radiofrequenza presenta la componente magnetica oscillante alla frequenza di Larmor dello spin, l'eccitazione può avvenire.

Il campo magnetico rilevante per il NOE è quello locale che uno spin risente a causa dell'interazione dipolare con i nuclei magnetici vicini nello spazio. A causa del fatto che le molecole ruotano in soluzione (*tumbling*), il campo locale risentito da uno spin cambia sia in orientazione che in intensità. Tali fluttuazioni fanno sì che il campo locale effettivamente risentito sia una grandezza casuale. In sintesi, i campi locali risentiti dagli spin agiscono come degli impulsi casuali di radiofrequenze, ed è proprio questo che sta alla base del rilassamento dipolare. I moti casuali delle molecole avvengono in un ampio intervallo di frequenze. Per descrivere la scala temporale di tali moti, viene introdotta una grandezza che prende il nome

di tempo di correlazione  $\tau_c$ , che rappresenta il tempo medio richiesto da una molecola per muoversi di un radiante. L'espressione analitica, ipotizzando il caso di una molecola sferica, è riportata nell'equazione (2):

$$\tau_c = \frac{4\pi\eta r^3}{3k_B T} \quad (2)$$

dove  $k_B$  è la costante di Boltzmann,  $\eta$  è la viscosità del mezzo,  $T$  la temperatura assoluta e  $r$  il raggio idrodinamico. Tempi di correlazione brevi corrispondono ad un *tumbling* rapido e viceversa. La distribuzione di frequenze dei campi magnetici fluttuanti associati a tali moti casuali è denominata densità spettrale  $J(\omega)$ ; questa funzione può essere rappresentata come la probabilità di trovare una componente del moto ad una data frequenza  $\omega$  (in rad/s). Il rilassamento longitudinale può avvenire solo quando questa componente si avvicina alla frequenza di Larmor degli spin. Per un tumbling isotropico, la densità spettrale ha la seguente espressione:

$$J(\omega) = \frac{2\tau_c}{1 + \omega^2\tau_c^2} \quad (3)$$

Quando  $J(\omega_0)$  viene diagrammato contro  $\tau_c$ , si osserva un andamento a massimo per  $\tau_c = 1/\omega_0$ : ne consegue che l'interazione dipolare (e quindi i fenomeni di rilassamento) sono massimi quando il tempo di correlazione è il reciproco della frequenza di Larmor.

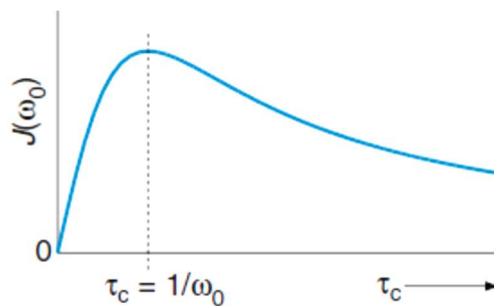


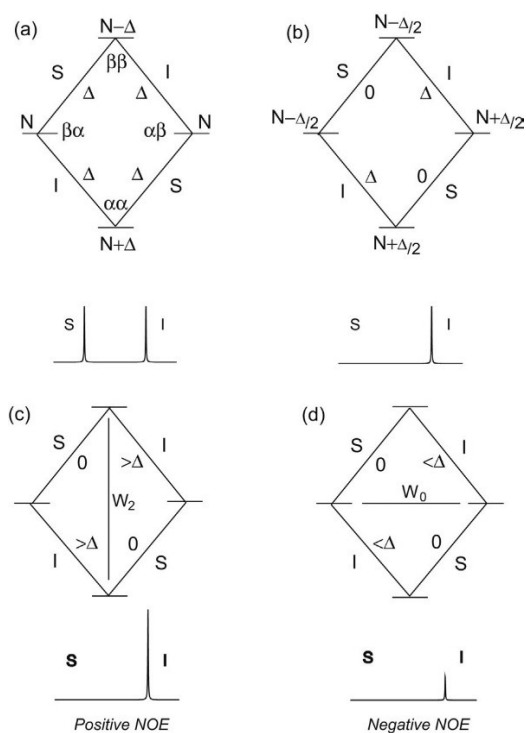
Figura 12: Andamento di  $J(\omega_0)$  contro  $\tau_c$ .

Normalmente si introduce la densità spettrale ridotta  $j(\omega)$ , anziché  $J(\omega)$ . La relazione che le collega è riportata nell'equazione (4).

$$J(\omega) = \overline{B_{loc}^2} j(\omega) \quad (4)$$

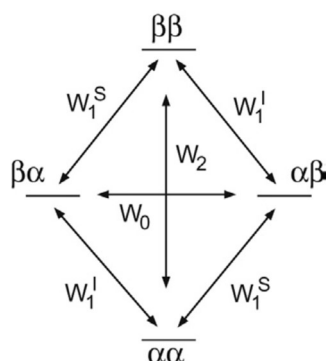
Dove  $\overline{B_{loc}^2}$  rappresenta la media del campo magnetico locale al quadrato. All'interno di  $\overline{B_{loc}^2}$  è racchiusa la dipendenza spaziale del NOE, che nel caso rilassamento dipolare è proporzionale a  $1/r^6$ . Vista tale dipendenza, nella pratica un NOE significativo tra protoni si ha quando essi distano al massimo 0.5 nm circa l'uno dall'altro [14].

Si consideri ora un sistema di due nuclei I ed S che si trovano in una molecola che si muove in soluzione (*tumbling* isotropo). I due nuclei non sono accoppiati scalarmente, ma sono sufficientemente vicini da presentare un accoppiamento dipolare. Considerando un sistema omonucleare, le energie di transizione per I ed S sono essenzialmente identiche (piccole differenze di *chemical shift* sono trascurabili rispetto alla frequenza di Larmor); questo permette quindi di assumere che le popolazioni dei due stati  $\alpha\beta$  e  $\beta\alpha$ , siano eguali all'equilibrio. In accordo con la distribuzione di Boltzmann, esiste un eccesso di nuclei nello stato  $\alpha\alpha$  a minor energia e un difetto nello stato  $\beta\beta$  ad alta energia. Il diagramma dei livelli energetici e di differenza di popolazione per i due spin S ed I, che condividono un accoppiamento dipolare, è riportato in Fig. 13. Supponendo di saturare istantaneamente la risonanza di S (forzare la differenza di popolazione della transizione di S a zero), la nuova popolazione di spin è riportata in Fig. 13b.



**Figura 13:** Rappresentazione schematica dei diagrammi di energia e di differenza di popolazione per due spin S ed I, che presentano accoppiamento dipolare (a) all'equilibrio, (b) dopo saturazione di S, (c) dopo rilassamento via  $W_2$ , (d) dopo rilassamento via  $W_0$ . I simboli  $+\Delta$  e  $-\Delta$  rappresentano rispettivamente un eccesso e un difetto di popolazione relativi agli stati  $\alpha\beta$  e  $\beta\alpha$  [14].

A questo punto il sistema che si trova fuori equilibrio tende a riequilibrare la condizione iniziale e questo può avvenire grazie a diversi processi di rilassamento (Fig. 14). Quattro di questi processi corrispondono a transizioni a singolo quanto ( $W_1$ ), mentre gli altri due processi ( $W_0$  e  $W_2$ ) non possono essere osservati direttamente in un esperimento NMR a causa del fatto che sono processi proibiti dalle regole di selezione ( $\Delta M = \pm 1$ ). Il processo  $W_0$  è denominato transizione a quanto zero ( $\Delta M = 0$ ), mentre il processo  $W_2$  è denominato transizione a doppio quanto ( $\Delta M = 2$ ). Questi ultimi due processi sono entrambi in grado di generare rilassamento e, in particolare, sono solo questi due processi responsabili del NOE <sup>[14]</sup>.



**Figura 14:** Possibili transizioni responsabili del rilassamento per un sistema a due spin. La lettera W fa riferimento alla probabilità di transizione. Il numero al pedice invece rappresenta il numero quantico magnetico della transizione <sup>[14]</sup>.

Ritornando alla Fig. 13, quando si satura la transizione  $W_1^S$ , la differenza di popolazione attraverso la transizione dello spin I rimane comunque  $\Delta$  dato che si trova in condizioni di equilibrio. Per questo motivo il processo  $W_1^I$  non risulta efficace nel ristabilire la condizione di equilibrio e non presenta alcun ruolo nella produzione del NOE. Il processo  $W_2$  agisce rimuovendo popolazione dallo stato  $\beta\beta$  e trasferendola nello stato  $\alpha\alpha$ , questo per cercare di contrastare la differenza di popolazione della transizione di S. Nel fare questo, vi è un aumento della differenza di popolazione attraverso le due transizioni di I (Fig. 13c.). Quindi il rilassamento attraverso il processo  $W_2$  risulta in un incremento dell'intensità dei segnali di I nello spettro, fenomeno che prende il nome di *positive* NOE. Allo stesso modo, il processo  $W_0$  agisce trasferendo spin dallo stato  $\beta\alpha$  a quello  $\alpha\beta$ , in questo caso il risultato è una diminuzione dell'intensità dei segnali di I nello spettro, fenomeno che prende il nome di *negative* NOE (13d). I due processi  $W_2$  e  $W_0$  competono uno con l'altro e sarà quello più favorito che determinerà il segno del NOE osservato. Poiché il processo  $W_1^I$  agisce cercando di riequilibrare la differenza di popolazione prima che il NOE inizi a svilupparsi, questo provoca un

impedimento allo sviluppo dello stesso. Quindi, se il processo di rilassamento  $W_1^I$  è favorito rispetto agli altri due, non sarà possibile avere NOE <sup>[14]</sup>.

La cinetica con cui il NOE si sviluppa nel tempo viene descritta dalle equazioni di Solomon, che nel caso del *steady-state* NOE risulta essere:

$$\eta_I \{S\} = \frac{\gamma_S}{\gamma_I} \left[ \frac{W_2 - W_0}{W_0 + 2W_1^I + W_2} \right] = \frac{\gamma_S}{\gamma_I} \left[ \frac{\sigma_{IS}}{\rho_{IS}} \right] \quad (5)$$

Dove  $\sigma_{IS}$  rappresenta la costante di velocità del *cross-relaxation* per i due spin,  $\rho_{IS}$  rappresenta la costante di velocità del rilassamento longitudinale dipolare per lo spin I. Nel caso in esame di due spin omonucleari il rapporto  $\frac{\gamma_S}{\gamma_I}$  vale 1. Come si nota quantitativamente dall'equazione (5), i processi  $W_2$  e  $W_0$  stabiliscono il segno del NOE, mentre il processo  $W_1^I$  non solo non contribuisce, ma riduce l'intensità del NOE. Le espressioni quantitative per la velocità di rilassamento in un sistema a due spin accoppiato dipolarmente sono riportate nelle equazioni (6), (7) e (8) <sup>[14]</sup>:

$$W_{1I} \propto \gamma_I^2 \gamma_S^2 \left[ \frac{3\tau_c}{r^6(1 + \omega_I^2 \tau_c^2)} \right] \quad (6)$$

$$W_0 \propto \gamma_I^2 \gamma_S^2 \left[ \frac{2\tau_c}{r^6(1 + (\omega_I - \omega_S)^2 \tau_c^2)} \right] \quad (7)$$

$$W_2 \propto \gamma_I^2 \gamma_S^2 \left[ \frac{12\tau_c}{r^6(1 + (\omega_I + \omega_S)^2 \tau_c^2)} \right] \quad (8)$$

Si fa notare che oltre alla dipendenza del NOE da  $\tau_c$ , vi è anche una dipendenza dalla distanza internucleare tra S ed I come riportato precedentemente. Quando una molecola presenta un moto di *tumbling* rapido in soluzione  $\omega \tau_c \ll 1$ , le espressioni riportate poc'anzi si semplificano:

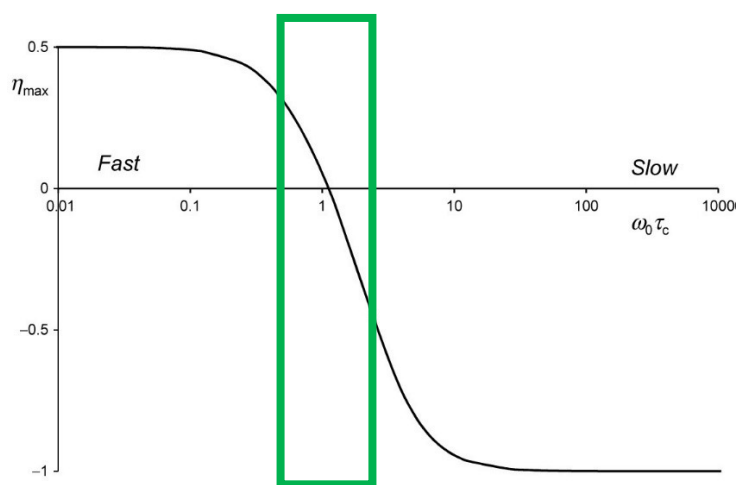
$$W_{1I} \propto \gamma_I^2 \gamma_S^2 \frac{3\tau_c}{r^6} \quad (9)$$

$$W_0 \propto \gamma_I^2 \gamma_S^2 \frac{2\tau_c}{r^6} \quad (10)$$

$$W_2 \propto \gamma_I^2 \gamma_S^2 \frac{12\tau_c}{r^6} \quad (11)$$

Questa condizione prende il nome di *extreme narrowing limit* poiché tutti gli effetti di allargamento attribuibili all'interazione dipolare vengono mediati a zero. Questo regime si riscontra solitamente con molecole di piccole dimensioni (ridotto  $\tau_c$ ) e in solventi a bassa viscosità. La condizione all'estremo opposto è rappresentata dalla condizione di *spin diffusion* (elevato  $\tau_c$ ), che si riscontra per molecole di dimensioni elevate e/o in solventi viscosi [14].

Inserendo le equazioni (9-11) all'interno dell'equazione 5, è possibile ottenere il seguente andamento grafico:



**Figura 15:** Variazione teorica del massimo NOE steady-state in un sistema a due spin in funzione della velocità di *tumbling* molecolare (definita dal prodotto  $\omega_0\tau_c$  dove  $\omega_0$  rappresenta la frequenza di Larmor ) [14].

La curva presenta tre regioni distinte, partendo da sinistra: *fast (extreme narrowing limit)*, *intermediate (zero crossing regime)* e *slow motion (spin diffusion)*. Per molecole che si muovono velocemente in soluzione, come riportato poc'anzi, ci si trova in condizione di *extreme narrowing limit*, ed il massimo valore del NOE può spaziare da +0.5 a 50%. È importante specificare che molecole di dimensioni ridotte (ridotto  $\tau_c$ ) risentono di un NOE positivo, questo può essere ben apprezzato dall'andamento riportato in Fig. 15. Al contrario, molecole di grandi dimensioni (elevato  $\tau_c$ ) risentono di un NOE negativo; il massimo NOE che può essere ottenuto è pari a -100 %. Tra i due estremi esiste una regione intermedia (evidenziata in Fig.15 dal riquadro verde) in cui il NOE cambia segno e può anche diventare zero se  $W_2 = W_0$ . Generalmente molecole con masse di 1000-2000 Da in spettrometri a medio campo cadono in questo regime. Il punto di "zero-crossing" si ha quando [14]:

$$\omega\tau_c = \sqrt{\frac{5}{4}} \quad (12)$$

ovvero quando la *molecular tumbling rate* ( $1/\tau_c$ ) eguaglia approssimativamente la frequenza dello spettrometro.

In conclusione, l'efficienza del NOE dipende da: distanza spaziale tra gli spin ( $1/r^6$ ), frequenza di risonanza  $\omega_0$  e dinamiche molecolari (tempo di correlazione  $\tau_c$ ).

Ritornando ai due modi possibili per perturbare una determinata risonanza, saturando, oppure invertendo, è importante differenziare questi due diversi casi: *Steady State* NOE e *Transient* NOE. Per gli esperimenti di NMR *chemosensing*, entrambi i fenomeni risultano essere coinvolti.

### 3.1 *Steady-State* NOE

In questo tipo di esperimento lo spin S viene perturbato per un determinato tempo grazie all'applicazione di una radiofrequenza selettiva, trascorso tale tempo (necessario per il raggiungimento dello *steady-state*), la magnetizzazione di entrambi gli spin viene rivelata grazie ad un impulso di  $90^\circ$ . Poiché evidenziare l'aumento di un segnale all'equilibrio risulta poco pratico, per rivelare la presenza di NOE *enhancement* quello che si fa è acquisire un ulteriore spettro in condizione di equilibrio, che andrà poi sottratto dallo spettro ottenuto saturando.

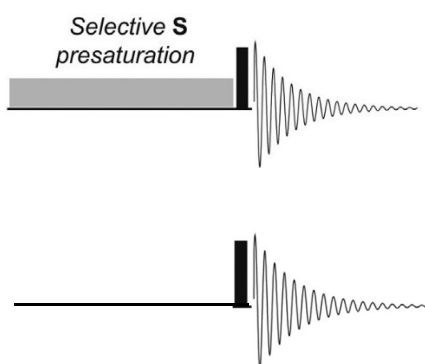
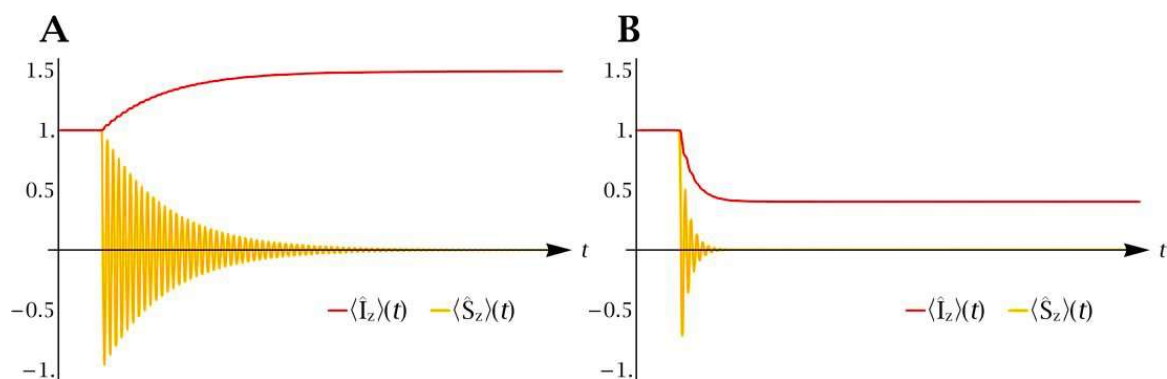


Figura 16: Schema dell'esperimento *Steady-State* NOE <sup>[14]</sup>.

La traiettoria della magnetizzazione longitudinale durante un esperimento *steady-state* NOE è rappresentata in Fig. 17 per i casi di due spin in regime di *fast* (A) e *slow* (B) motion.

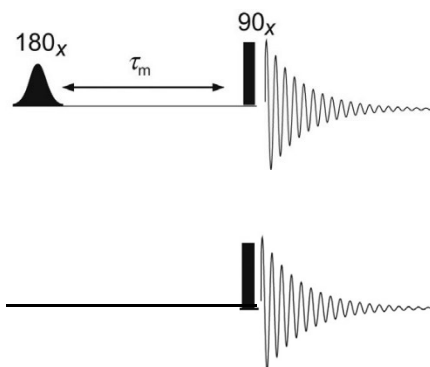


**Figura 17:** Traiettoria della magnetizzazione per un esperimento *steady-state* NOE osservato in un sistema omonucleare AX in seguito a saturazione selettiva dello spin S. Le curve sono state ottenute con simulazioni in SpinDynamica per due protoni in un campo magnetico di 11.74 T ( $\omega_0 = -2\pi \cdot 500 \times 10^6 \text{ rad s}^{-1}$ ) separati da una distanza di 3Å. (A)  $\tau_c = 30 \text{ ps}$  ( $\omega_0\tau_c < 1$ ) extreme narrowing limit, (B)  $\tau_c = 1 \text{ ns}$  ( $\omega_0\tau_c > 1$ ) spin diffusion limit [15].

L'esperimento *wSTD* utilizzato in questo lavoro di Tesi si basa proprio sullo *steady-state* NOE.

### 3.2 Transient NOE

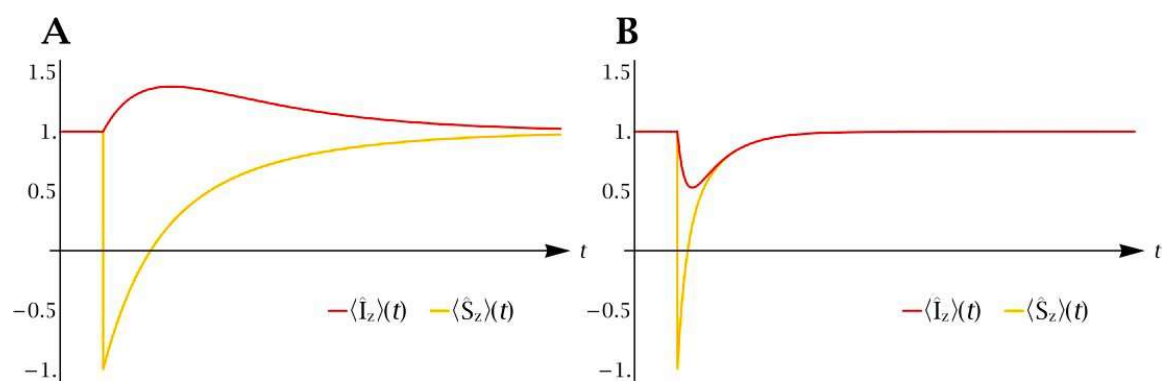
In questo tipo di esperimento la magnetizzazione dello spin S viene selettivamente invertita e, dopo un certo tempo che permette al NOE di svilupparsi, si rivela la magnetizzazione di entrambi gli spin tramite un impulso di  $90^\circ$ . Anche in questo caso, per rivelare la presenza di segnali NOE quello che si fa è acquisire un ulteriore spettro all'equilibrio, che andrà poi sottratto dallo spettro ottenuto saturando.



**Figura 18:** Schema dell'esperimento *transient* NOE [14].



La traiettoria della magnetizzazione longitudinale durante un esperimento *transient* NOE è rappresentata in Fig. 19 per i casi *fast* (A) e *slow* (B) *motion*.



**Figura 19:** Traiettoria della magnetizzazione per un esperimento *transient* NOE in un sistema di spin omonucleare AX dopo l'inversione selettiva dello spin S. Le curve sono ottenute con simulazione in SpinDynamica per due protoni a un campo magnetico di 11.74 T ( $\omega_0 = -2\pi 500 \times 10^6 \text{ rad s}^{-1}$ ) separati da 3 Å. (A)  $\tau_c = 30 \text{ ps}$  ( $\omega_0\tau_c < 1$ ). (B)  $\tau_c = 1 \text{ ns}$  ( $\omega_0\tau_c > 1$ ) [15].

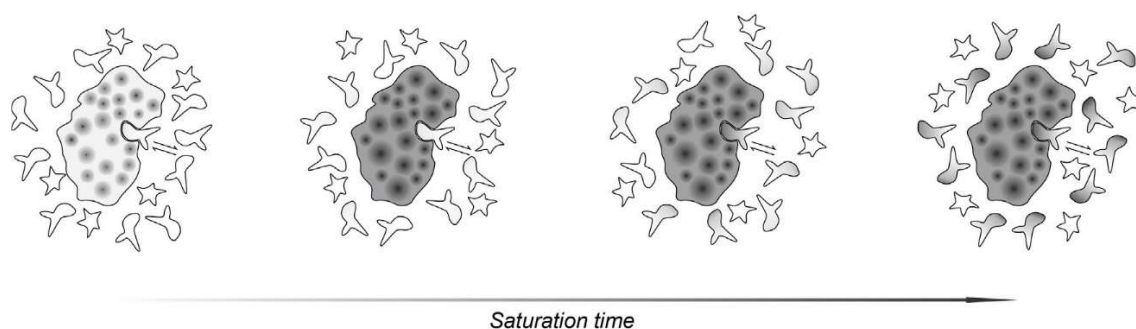
## 4. Esperimenti di NMR *chemosensing*

### 4.1 Esperimento *Saturation Transfer difference (STD)*

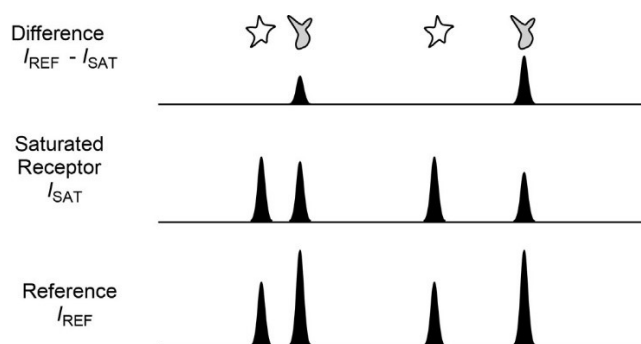
Il metodo STD è stato originariamente utilizzato per rivelare l'interazione legante/recettore in sistemi biologici. L'idea di base consiste nell'osservazione diretta del legante in soluzione e richiede che quest'ultimo sia in regime di scambio veloce con il recettore molecolare <sup>[14]</sup>.

Il metodo (sequenza di impulsi riportata in Appendice 11.1) prevede la saturazione di una porzione dello spettro NMR del *monolayer* (nel caso specifico di questo lavoro di Tesi composto da tioli). La saturazione a questo punto diffonde rapidamente attraverso il network di protoni della macromolecola, grazie al fenomeno di *spin diffusion* (Paragrafo 3) guidato da una forte *dipolar cross-relaxation*. In queste condizioni ogni legante che interagisca per un tempo sufficientemente lungo con la nanoparticella (il tempo di residenza dell'analita deve essere maggiore o uguale del tempo di correlazione rotazionale della nanoparticella  $\tau_c$ ) riceve una saturazione dei suoi protoni. Tale saturazione viene mantenuta e trasportata dall'analita in soluzione e può quindi essere rivelata. Viceversa, analiti che non interagiscono con la macromolecola non presentano un trasferimento di saturazione (Fig. 20) e solamente le risonanze degli analiti interagenti mostrano un'attenuazione nello spettro <sup>1</sup>H finale.

Un secondo spettro viene acquisito saturando lontano dalla regione spettrale di interesse (solitamente -40 ppm), in modo da produrre gli stessi effetti termici sul campione, ma senza perturbare le popolazioni di spin di equilibrio. I due spettri *on-resonance* e *off-resonance* vengono sottratti, in modo da mostrare nello spettro differenza solo i segnali degli analiti che hanno risentito di una variazione in intensità, ovvero quelli interagenti (Fig. 21).



**Figura 20:** Rappresentazione grafica del processo di trasferimento di saturazione tra macromolecola (nel caso in esame una proteina) e legante. I cerchi grigi rappresentano i protoni irradiati della macromolecola. L'equilibrio di associazione e dissociazione dei leganti durante il periodo di saturazione provoca una progressiva saturazione dei protoni del legante, con effetto di diminuzione di intensità dei picchi nello spettro finale. Analiti non interagenti (stelle) non ricevono saturazione [14].



**Figura 21:** Rappresentazione schematica degli spettri che si ottengono dall'esperimento STD [14].

La possibilità di evidenziare dei segnali in un esperimento STD è fortemente dipendente dal tempo di interazione tra analita e nanoparticella: questo deve essere sufficientemente veloce per garantire la conservazione della magnetizzazione acquisita (che rilassa con velocità  $1/T_1$ ), ma non troppo corto da non lasciare un tempo sufficiente per il trasferimento di saturazione. Quindi, analiti che interagiscono troppo o troppo poco danno luogo a segnali non interpretabili in esperimenti STD. Per questi motivi, l'assenza di un segnale in spettri STD non sempre fornisce una garanzia del fatto che un analita non stia legando effettivamente la macromolecola, ma dipende appunto dalla costante cinetica di associazione e dissociazione [14].

Una limitazione generale dell'STD è che, per evitare falsi positivi, non ci deve essere sovrapposizione tra i segnali dell'analita e quelli della macromolecola che vengono saturati. Nel caso delle nanoparticelle d'oro funzionalizzate è sempre presente uno *spacer* alchilico tra il nucleo d'oro e il gruppo funzionale finale. Tale configurazione consente di avere un punto di partenza a bassi ppm per la propagazione della saturazione [8]. A tale proposito, un problema

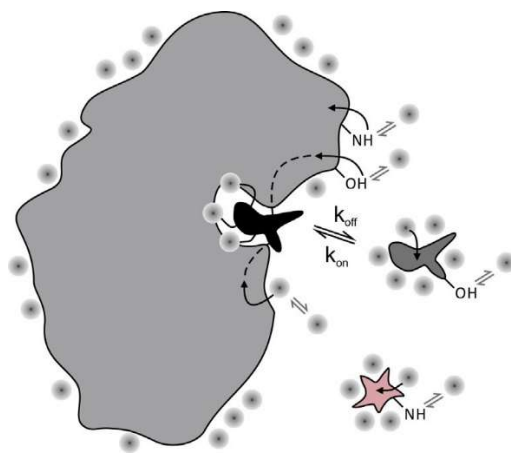
connesso sta nella possibile presenza di discontinuità negli accoppiamenti dipolari  $^1\text{H}$  del *monolayer*, condizione che può portare ad avere una minor efficienza di *spin diffusion*. Di conseguenza, certe parti del *monolayer* possono non essere saturate completamente, portando alla presenza di falsi negativi dovuti al fatto che la porzione “attiva” per il legame con l’analita è di fatto esclusa dalla saturazione.

## 4.2 Esperimento *WaterLOGSY*

Con l'obiettivo di incrementare la sensibilità dell’NMR chemosensing, è possibile utilizzare come fonte di magnetizzazione le molecole d’acqua che si trovano in *long-lived association* con il monostrato della nanoparticella [9]. Un esperimento che utilizza questa idea, e che nasce nel contesto del bio-NMR, è il *WaterLOGSY* (*water-ligand observed with gradient spectroscopy*). In questo caso le molecole d’acqua si trovano nei siti attivi delle proteine, permettendo quindi il trasferimento di magnetizzazione agli analiti interagenti. Allo stesso modo è possibile applicare tale esperimento a nanoparticelle d’oro funzionalizzate solubili in ambienti acquosi [8].

L’esperimento *WaterLOGSY* è complementare a quello STD e si basa sul trasferimento di magnetizzazione dalla macromolecola all’analita in equilibrio di associazione - dissociazione con il recettore. In questo caso però, contrariamente all’esperimento STD, non si satura direttamente la macromolecola, bensì si inverte la popolazione di spin delle molecole d’acqua (la sequenza di impulsi è riportata in Appendice 11.2). Le varie implementazioni dell’esperimento *WaterLOGSY* prevedono di perturbare la risonanza dell’acqua tramite un’inversione selettiva della magnetizzazione, che provoca l’instaurarsi di un NOE transiente. La magnetizzazione può quindi essere trasferita dall’acqua ai leganti attraverso numerosi processi (Fig. 22). Questi possono includere il trasferimento dalle molecole d’acqua che si trovano sulla superficie del recettore della macromolecola e poi via *spin diffusion* ad un analita; oppure il trasferimento diretto ad analiti che si trovano nelle vicinanze delle molecole d’acqua presenti nel recettore della macromolecola. Un altro possibile meccanismo coinvolge lo scambio chimico di protoni saturati dell’acqua con protoni scambiabili della macromolecola (ad es. gruppi OH e NH), tale saturazione può poi arrivare via *spin-diffusion*, o in maniera diretta, all’analita. Il trasferimento di magnetizzazione ai leganti avviene in regime di *slow*

*tumbling* della macromolecola, generando quindi un NOE negativo per l'analita interagente. Quando lo stesso torna in soluzione trasporta la magnetizzazione trasferita, portando ad una riduzione dell'intensità del suo segnale <sup>[14]</sup>.



**Figura 22:** Processi di trasferimento di magnetizzazione in un esperimento *WaterLOGSY*. Le molecole di acqua invertite (sfere grigie) possono trasferire magnetizzazione secondo diversi meccanismi: NOE diretto (freccie nere) alle specie legate (molecola nera) e alle specie libere (molecola rosa); *spin diffusion* attraverso il recettore (linee tratteggiate); scambio chimico diretto con i protoni labili (doppie frecce) <sup>[14]</sup>.

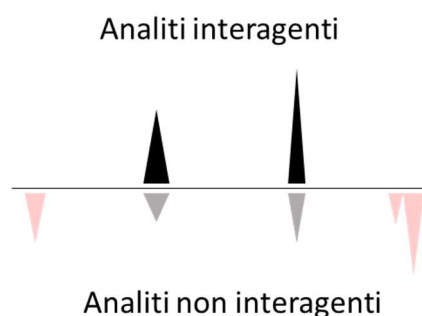
L'analita libero in soluzione risente comunque di un trasferimento di magnetizzazione intermolecolare dalle molecole d'acqua (NOE diretto, frecce nere e scambio chimico con protoni saturati, doppie frecce, Fig. 22), ma questa volta il risultato è un incremento dell'intensità del segnale, poiché il NOE intermolecolare cade in un regime positivo<sup>1</sup>. Si noti che il trasferimento di magnetizzazione diretto dalle molecole d'acqua può avvenire anche verso analiti che non interagiscono direttamente con la macromolecola (che risentiranno quindi solo di un NOE positivo). In un esperimento *WaterLOGSY* esisterà sempre quindi una competizione tra un aumento dell'intensità del segnale che deriva dall'interazione diretta acqua/analita (nel *bulk* della soluzione) e la diminuzione dell'intensità del segnale che si origina dall'interazione analita/macromolecola <sup>[14]</sup>.

Nel contesto dell'*NMR chemosensing* assistito da nanoparticelle d'oro, l'utilizzo del metodo *WaterLOGSY* pone delle problematiche: nello spettro risultante appaiono tutte le risonanze

---

<sup>1</sup> Il NOE intermolecolare è più debole di quello intramolecolare e dipende dal numero spin sorgente per unità di volume, dalla distanza di massimo avvicinamento tra spin sorgente e spin target, dal loro coefficiente di diffusione relativo e da una densità spettrale diversa rispetto al caso intramolecolare.

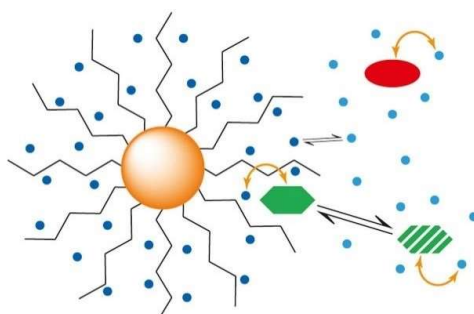
delle specie interagenti e non interagenti, ma con segno opposto che dipende, come riportato poc'anzi, dal tipo di interazione (Fig.23). Quando i segnali dell'analita (d'interesse) interagente e non interagente accidentalmente si sovrappongono tendono a cancellarsi a vicenda, generando quindi un falso negativo <sup>[8]</sup>. Questa è una limitazione importante in esperimenti per l'analisi di miscele di diversi analiti incogniti, motivo per il quale non è stato ritenuto opportuno l'applicazione di tale metodologia per questo lavoro di Tesi.



**Figura 23:** Rappresentazione schematica dello spettro *Water-LOGSY*. I segnali della specie interagente (nero) sono una media tra il NOE negativo della frazione legata e il NOE positivo della frazione libera (segnali grigi); le specie non interagenti presentano segnali con fase opposta (rosa).

### 4.3 Esperimento *WaterSTD*

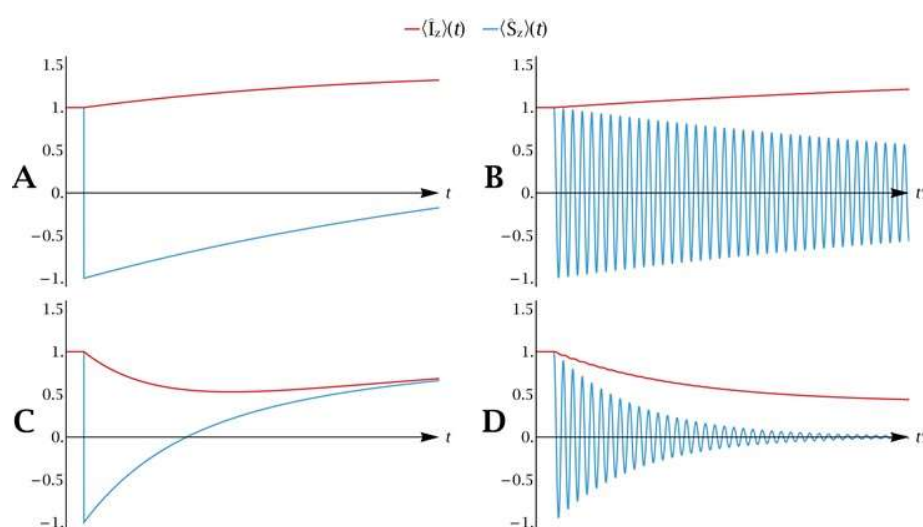
Invece di invertire le popolazioni di spin dell'acqua, un'alternativa consiste nel saturarle; in pratica si esegue un esperimento STD in cui la sorgente di saturazione non sono gli spin della macromolecola, bensì quelli dell'acqua. Questa strategia viene denominata *WaterSTD* <sup>[16]</sup> e la sequenza di impulsi è riportata in Appendice 11.3.



**Figura 24:** Rappresentazione grafica di un esperimento *WaterSTD*, i cerchi blu rappresentano molecole d'acqua, il cerchio rosso un analita non interagente con la macromolecola, gli esagono verde rappresentano l'analita in equilibrio tra la forma libera e legata. Le frecce gialle rappresentano il trasferimento di saturazione a seguito degli impulsi <sup>[8]</sup>.

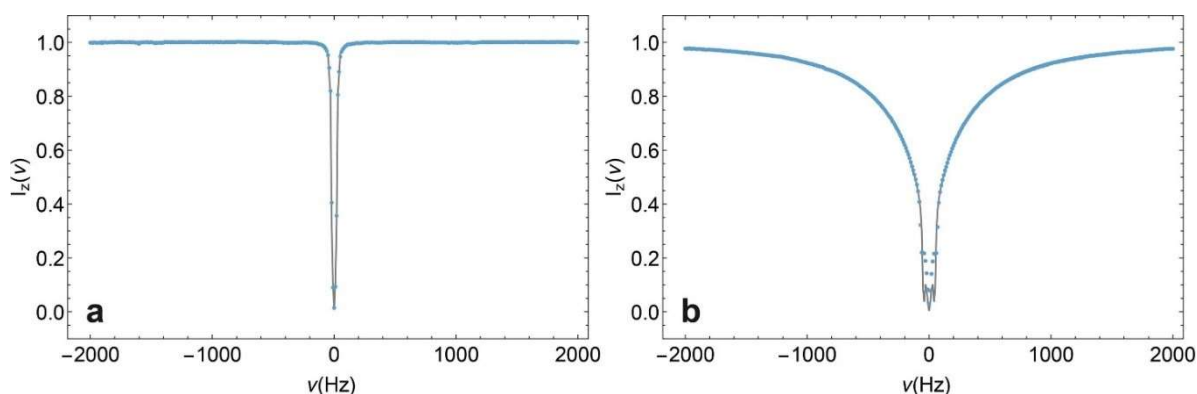
Anche in questo caso, come nell'esperimento classico STD, si registrano due spettri alternativamente, uno *on-resonance* (saturazione dell'acqua) e uno *off-resonance* (saturazione di una regione spettrale lontana dai segnali interessati). Durante l'acquisizione dello spettro *on-resonance* si ha la generazione di uno *steady-state* NOE con segno positivo per le molecole che si trovano in regime di *fast-tumbling* (in soluzione), mentre di segno negativo per le molecole che si trovano in regime di *slow-tumbling* (che interagiscono con la macromolecola).

Lo spettro *WaterSTD* non differisce in maniera significativa da quello ottenuto da un esperimento *WaterLOGSY*: sono presenti i segnali dei diversi analiti, interagenti e non, con fase positiva per quelli non interagenti e viceversa. Anche in questo caso permane la problematica di accidentale sovrapposizione delle risonanze che portavano alla cancellazione dei segnali degli analiti. Una simulazione su un sistema modello conferma come l'incremento di NOE prodotto, differisce di poco tra gli esperimenti eseguiti per saturazione o per inversione (Figura 25).



**Figura 25:** Simulazione in SpinDynamica che illustra l'evoluzione della componente z della magnetizzazione in un sistema di due spin I e S accoppiati da interazione dipolare a seguito dell'inversione (A e C) e della saturazione (B e D) dello spin S. Il campo magnetico esterno è settato a 11.74 T (corrispondente a 500 MHz). Il  $\tau_c$  è 30 ps per (A) e (B) e 1 ns per (C) e (D) [15].

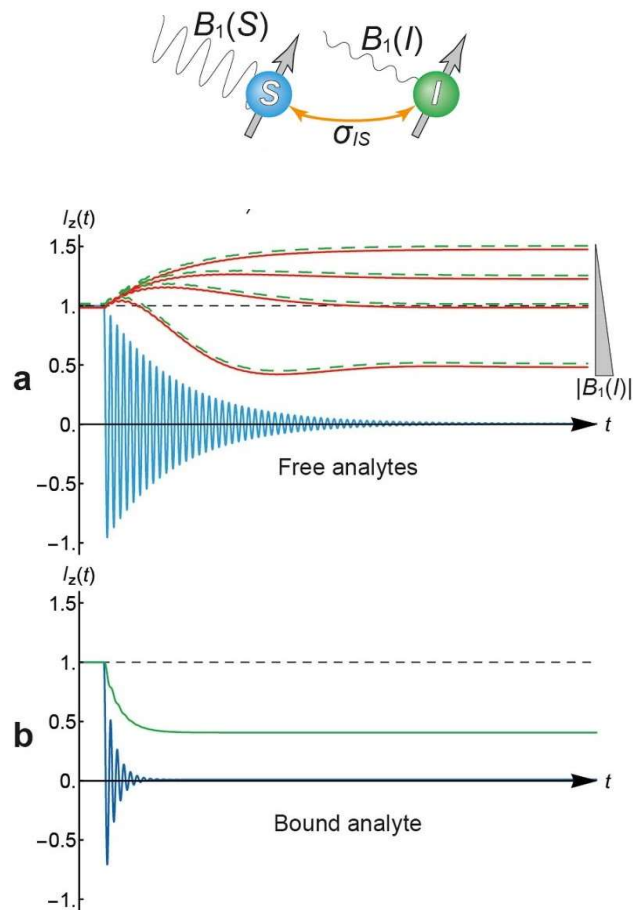
La situazione cambia notevolmente incrementando la potenza degli impulsi di saturazione. Ad alte potenze si ottiene un allargamento della banda di saturazione (Fig. 26) che favorisce il ritorno della magnetizzazione longitudinale di analiti non legati all'equilibrio, facendoli scomparire dallo spettro differenza finale [8].



**Figura 26:** Profilo di saturazione sperimentale (cerchi blu) che emerge da un treno di 40 impulsi Gaussiani, ciascuno della durata di 50 ms e con troncamento dell'1%, a bassa potenza *LP-WaterSTD* ( $\gamma B_1 = 24.3$  Hz, a sinistra) e ad alta potenza *HP-WaterSTD* ( $\gamma B_1 = 750$  Hz, a destra). I profili sono stati misurati alla frequenza  $^1\text{H}$  di Larmor a 500 MHz su un campione contenente una soluzione di  $\text{GdCl}_3$  0.3 mM in  $\text{H}_2\text{O}:\text{D}_2\text{O} = 1:9$  ( $T_{1,\text{water}} = 0.210$  s,  $T_{2,\text{water}} = 0.194$  s). La traccia grigia rappresenta l'andamento ottenuto con una simulazione SpinDynamica [8].

Sebbene l'esperimento in generale prenda il nome di *WaterSTD*, è pratica comune differenziare le due varianti dell'esperimento che utilizzano diverse potenze degli impulsi di saturazione. Nel caso in cui la potenza sia ridotta si parla di *low power WaterSTD (LP-WaterSTD)*, viceversa il caso in cui si aumenta opportunamente la potenza degli impulsi si parla di *high power WaterSTD (HP-WaterSTD)*. Utilizzando l'esperimento *high power* si possono ottenere due importanti effetti: primo, il segnale delle specie non interagenti viene fortemente ridotto nello spettro differenza finale e secondo, il segnale delle specie interagenti diventa più intenso, guadagnando quindi in termini di sensibilità. Entrambi gli effetti sono legati alla cancellazione del NOE positivo risentito da tutti le specie in soluzione "bulk". Nel caso degli analiti interagenti, le frazioni libere e legate contribuiscono allo stesso segnale, ma con segno opposto perché risentono del NOE in due regimi dinamici differenti. L'esperimento *HP-WaterSTD* rimuove solamente il contributo che deriva dalla frazione di analita libero in soluzione, permettendo di risolvere quindi l'accidentale sovrapposizione delle risonanze di analiti appartenenti a regimi dinamici differenti [8]. L'effetto di differenti livelli di potenza degli impulsi di saturazione in un esperimento *WaterSTD* è riportato in Fig. 27:





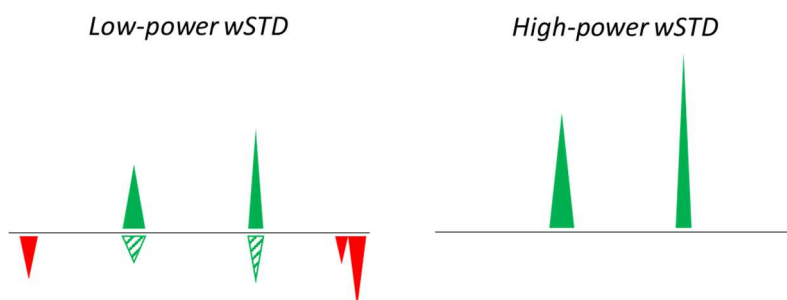
**Figura 27:** Rappresentazione schematica, ottenuta con simulazione SpinDynamica, dell'effetto di diversi livelli di potenza degli impulsi di saturazione in un esperimento *WaterSTD*. (a) Evoluzione della magnetizzazione longitudinale dello spin S (acqua, blu) e dello spin I (analiti, rosso e verde Fig.24) calcolati per diverse potenze di  $B_1(I)$  in un regime di *fast tumbling* ( $\tau_c$  30 ps), tipico di analiti non legati. (b) stessa traiettoria per lo spin S (acqua, blu) e lo spin I (analita, verde) calcolati con lo stesso valore di  $B_1(S)$  e  $B_1(I)$  in un regime di *slow tumbling* ( $\tau_c$  1 ns) tipico di analiti legati. In questo caso le curve calcolate per i diversi valori di  $B_1(I)$  sono sovrapposte [8].

La Fig. 27 mostra la traiettoria della magnetizzazione longitudinale per un sistema di due spin in diverse condizioni di saturazione, in due diversi regimi dinamici (in alto *extreme narrowing*, in basso *spin diffusion*). Per analiti che si trovano in regime di fast-tumbling esiste un valore di  $B_1(I)$  che permette di guidare la magnetizzazione dello spin I vicino al valore di equilibrio, portando quindi alla scomparsa del suo segnale dallo spettro finale differenza. In parallelo, lo stesso  $B_1(I)$  non ha alcuna influenza sugli analiti che si trovano in regime di *spin-diffusion* (quindi legati). Il valore di  $B_1(I)$  corretto da utilizzare, è quindi quello che permette di riportare la magnetizzazione longitudinale degli analiti in *fast-tumbling* in condizione vicine a quella di equilibrio ( $I_z(t) = 1$ ).

È importante far notare che l'allargamento della banda di saturazione (Fig.26) può arrivare a saturare anche gli spin del *monolayer* della nanoparticella, in maniera del tutto simile a quello che accade in un esperimento classico STD. Questo permette di ottenere una ulteriore fonte

di saturazione aggiuntiva che può essere trasferita agli analiti interagenti, garantendo un ulteriore guadagno in sensibilità [8].

In sintesi, la rappresentazione grafica di un esperimento *LP-WaterSTD* e *HP-WaterSTD* è riportata in Fig. 28:



**Figura 28:** Rappresentazione schematica dei contributi NOE negli spettri *WaterSTD*, *low-power* (a sinistra) e *high-power* (a destra). Nello spettro LP sono presenti i segnali delle specie interagenti (verdi pieno) e non interagenti (rosso e verde tratteggiato), mentre nello spettro HP, dove vengono cancellati i contributi del NOE positivo, si notano solamente quelli delle specie interagenti e con intensità aumentata.

Sebbene l'utilizzo di impulsi a potenza sempre maggiore possa sembrare una soluzione efficace per aumentare il più possibile la sensibilità, questo ha come effetto collaterale un aumento eccessivo (Fig. 27 (a)) della banda di saturazione, che porta a sua volta ad una perdita di selettività e causa l'insorgenza di falsi positivi. Ciò avviene perché la radiazione di saturazione colpisce diverse regioni dello spettro con intensità differente; in particolare essa è più intensa nelle regioni adiacenti al segnale saturato (quello dell'acqua,  $\approx 4.7$  ppm), rispetto alle regioni estreme dello spettro [17]. In linea di principio è possibile aggirare questa problematica registrando uno spettro nelle stesse condizioni sperimentali ma, come per il *WaterLOGSY*, in assenza del recettore. In questo modo, dalla differenza con lo spettro contenente il recettore, è possibile stabilire se i segnali presenti sono indice dell'avvenuta interazione o se sono falsi positivi dovuti al profilo di saturazione.

#### 4.4 Esperimento *DOSY* (*Diffusion ordered spectroscopy*)

Come riportato nella sezione “scopo della Tesi”, esperimenti di diffusometria *DOSY* possono essere utilizzati nell’ambito dell’NMR *chemosensing* al fine di identificare in maniera univoca un analita target all’interno di una miscela complessa. In particolare, nei casi in cui l’interazione tra analita e nanoparticella sia sufficientemente forte da sbilanciare la popolazione dello stesso verso lo stato legato, è possibile osservare una variazione del coefficiente di diffusione nello spettro *DOSY* risultante (effetto “pseudo-cromatografico”). Quindi è possibile, sfruttando l’interazione analita-nanoparticella, identificare le diverse specie presenti in soluzione grazie alla variazione del coefficiente di diffusione della molecola in assenza e in presenza del recettore macromolecolare. Tale variazione è direttamente proporzionale all’affinità dell’analita per il *monolayer* della nanoparticella [8].

Il coefficiente di diffusione  $D$  viene espresso normalmente attraverso la seguente relazione:

$$D = \frac{k_B T}{f} \quad (13)$$

dove  $k_B$  è la costante di Boltzmann,  $T$  la temperatura assoluta ed  $f$  è il cosiddetto *frictional factor*, un termine che riflette la dimensione e la forma della molecola. Nel caso ideale di una forma sferica,  $f$  può essere relazionato al raggio idrodinamico della sfera  $r_s$  e alla viscosità della soluzione  $\eta$  attraverso l’equazione di Stokes:

$$f = 6\pi\eta r_s \quad (14)$$

Combinando le due equazioni, si ottiene l’espressione del coefficiente di diffusione secondo l’equazione di Stokes-Einstein, che nel caso di una sfera risulta:

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta r_s} \quad (15)$$

Nei casi più complessi dove la forma delle molecole non può più essere approssimata a quella di una sfera il coefficiente di diffusione è un tensore i cui assi principali seguono quelli di inerzia [14].

Lo studio della diffusione molecolare in esperimenti NMR sfrutta impulsi di campo a gradiente, ovvero brevi periodi di tempo in cui il campo magnetico  $B_0$  applicato viene reso intenzionalmente disomogeneo, ad esempio utilizzando una bobina aggiuntiva che produce un campo che varia linearmente lungo l’asse  $z$ . Quando il campo magnetico non è omogeneo

gli spin che si trovano in punti diversi del campione risentono di campi magnetici diversi, mostrando quindi diverse frequenze di risonanza:

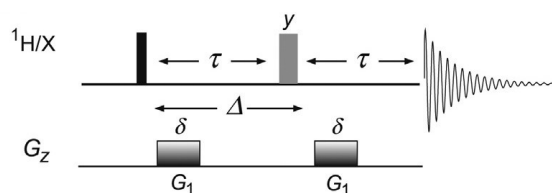
$$\omega_L = \gamma(B_0 + B_g) = \gamma(B_0 + Gz) \quad (16)$$

Dove  $\gamma$  è il rapporto giromagnetico,  $B_0$  è il campo statico e  $B_g$  è il campo a gradiente.  $B_g$  può essere espresso a sua volta come il prodotto tra l'intensità del gradiente  $G$ , per la posizione lungo l'asse  $z$ . A seguito dell'applicazione del gradiente per un tempo  $t$ , la fase  $\phi(z)$  in ogni posizione del campione è pari a:

$$\phi(z) = \gamma(B_0 + Gz)t \quad (17)$$

Il termine  $\gamma Gzt$  rappresenta la dipendenza spaziale di fase indotta dall'impulso a gradiente.

Lo schema di base (Fig. 29) che permette lo studio della diffusione in esperimenti NMR è il cosiddetto PFG (*pulsed field gradient*) *spin-echo*.



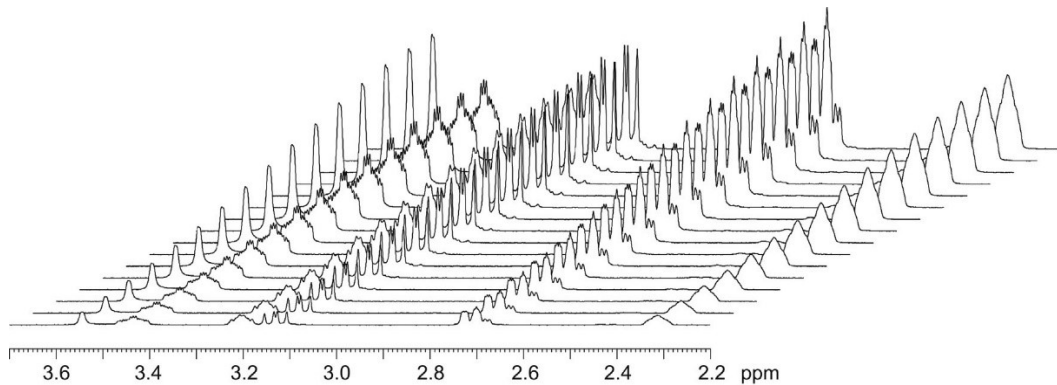
**Figura 29:** Schema di impulsi di base PFG *spin-echo* per la misura della diffusione molecolare.  $\Delta$  rappresenta il *diffusione delay*,  $\delta$  la durata dei gradienti e  $G$  la loro intensità [14].

In questa sequenza il primo gradiente impone una dipendenza spaziale di fase. Questo provoca la “distruzione” del segnale NMR e tanto più forte è il gradiente di campo, tanto più la distruzione del segnale risulta essere veloce. La “distruzione” della magnetizzazione è tuttavia reversibile grazie all'applicazione un secondo gradiente che ha lo scopo di rifocalizzare la magnetizzazione defasata dal primo gradiente.

Una completa rifocalizzazione del segnale avviene solo se il campo locale risentito dagli spin rimane identico durante i due impulsi a gradiente. Tale condizione si verifica solo se gli spin rimangono nella stessa posizione fisica quando i due PFG sono applicati. Se le molecole diffondono lontano dalla posizione iniziale durante il *diffusion delay*  $\Delta$  (Fig.29), il campo locale risentito durante il secondo impulso a gradiente non eguaglierà perfettamente quello iniziale, causando solo una parziale rifocalizzazione del segnale. Il segnale rivelato sarà quindi

attenuato di una quantità che dipende da quanto le molecole si sono allontanate durante il periodo  $\Delta$  e quindi, dal loro coefficiente di diffusione <sup>[14]</sup>.

Per studiare la diffusione è possibile agire su diversi parametri: aumentare progressivamente il periodo di diffusione  $\Delta$ , agire sulla lunghezza degli impulsi a gradiente, oppure sulla loro intensità  $G$  monitorando al contempo le variazioni che si ottengono nello spettro NMR risultante. In ogni caso, in presenza di fenomeni diffusivi, l'intensità del segnale diminuisce. Generalmente, incrementi importanti di  $\Delta$  introducono un'ulteriore fonte di attenuazione del segnale derivante dal rilassamento, motivo per il quale il parametro su cui si preferisce agire è l'intensità del gradiente  $G$  (lasciando invariato il tempo di diffusione).



**Figura 30:** Tracce di spettri 1D  $^1\text{H}$  di diffusione, ottenuti aumentando progressivamente l'intensità del gradiente (dal fondo a davanti) <sup>[14]</sup>.

L'intensità del segnale osservata alla fine dello *spin-echo*  $I_G$  per la sequenza base riportata in Fig. 29, è data dall'espressione di Stejskal-Tanner:

$$I_G = I_0 \exp\left(-\frac{2\tau}{T_2}\right) \exp\left[-(\gamma\delta G)^2 D \left(\Delta - \frac{\delta}{3}\right)\right] \quad (18)$$

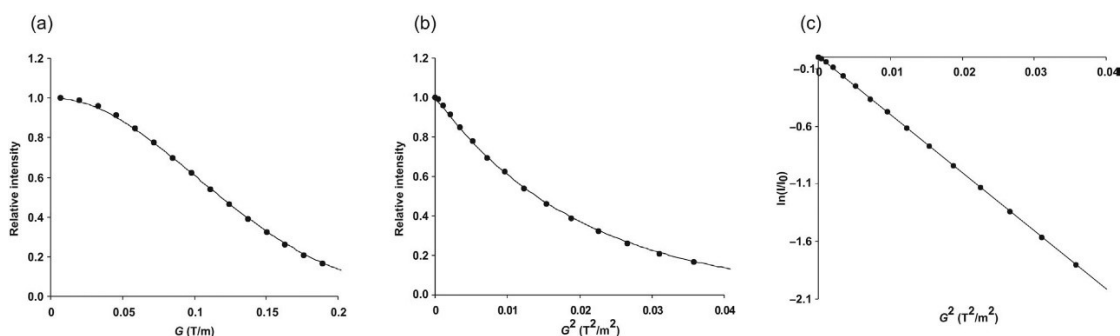
Dove  $I_0$  rappresenta l'intensità del segnale in assenza di *gradient spin-echo* (quindi solo dopo un semplice impulso di  $90^\circ$ ),  $D$  il coefficiente di diffusione,  $T_2$  è il tempo di rilassamento trasversale, le altre grandezze presenti sono state definite precedentemente. Per il caso tipico in cui il tempo totale di *echo*  $2\tau$  sia mantenuto costante e venga fatta variare l'intensità del gradiente  $G$  si ottiene:

$$I_G = I_{G=0} \exp\left[-(\gamma\delta G)^2 D \left(\Delta - \frac{\delta}{3}\right)\right] \quad (19)$$

Dove  $I_{G=0}$  rappresenta l'intensità del segnale di *spin-echo* in condizione di gradiente pari a zero. Note quindi  $\gamma$ ,  $\delta$  e  $\Delta$ , il coefficiente di diffusione può essere calcolato direttamente attraverso un'opportuna regressione lineare o non lineare dei dati sperimentali [14].

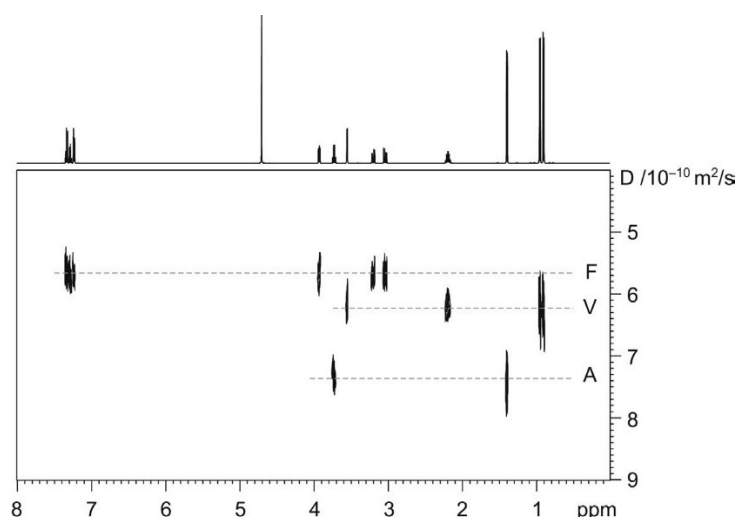
Avendo raccolto i dati sperimentali di diffusione come una serie di tracce 1D registrate aumentando progressivamente l'intensità del gradiente, rimane solo da estrarre il valore dei coefficienti di diffusione. Avendo a disposizione solitamente 8-32 spettri 1D, la procedura prevede di misurare il decadimento dell'intensità del segnale (attraverso l'area o attraverso l'altezza) in funzione del gradiente applicato. È quindi fondamentale avere un'assenza di sovrapposizione di risonanze, perché in tal caso, si otterrebbe un coefficiente di diffusione "mediato" tra quello dell'analita di interesse e quello della specie interferente. In casi quindi di sovrapposizione di risonanze, l'utilizzo della tecnica *DOSY* risulta difficile.

Diagrammando  $I_G$  contro  $G$  il profilo che si ottiene è un decadimento Gaussiano (Fig. 31 (a)), se invece si riporta  $I_G$  contro  $G^2$  si ottiene un andamento di decadimento esponenziale (Fig. 31 (b)), e  $D$  può essere quindi ricavato, noti gli altri parametri, grazie ad un'appropriata regressione non lineare. Un approccio alternativo consiste nel diagrammare  $\ln\left(\frac{I_G}{I_{G=0}}\right)$  contro  $G^2$  ottenendo  $D$  dalla pendenza (Fig. 31 (c)) [14].



**Figura 31:** Regressioni più comuni per l'ottenimento del coefficiente di diffusione. L'unità di misura di  $G$  è pari a T/m [14].

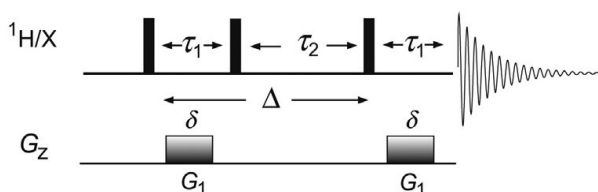
Un modo comune di riportare i risultati di esperimenti di diffusione consiste nel costruire delle mappe *DOSY* (Fig. 32). In queste mappe una dimensione (quella diretta) riporta il *chemical shift*, mentre l'altra (quella indiretta) riporta il coefficiente di diffusione apparente delle molecole. Il centro dei picchi nella dimensione di diffusione rappresenta il valore stesso del coefficiente di diffusione, mentre la larghezza dei picchi, nella stessa dimensione, riflette l'errore ottenuto a seguito dell'interpolazione dei dati sperimentali.



**Figura 32:** Rappresentazione di una mappa *DOSY*. Lo spettro evidenzia la presenza di tre specie in soluzione, in accordo con la presenza di tre valori di coefficienti di diffusione [14].

La sequenza PFG *spin-echo* illustrata in Fig. 29 è poco utilizzata sperimentalmente a causa dell'eccessiva attenuazione introdotta dal rilassamento trasversale e attribuibile al fatto che la magnetizzazione si trova nel piano *xy* durante il periodo di diffusione. Dato che molecole di grandi dimensioni richiedono tempi di diffusione via via sempre maggiori per muoversi di una certa distanza, l'utilizzo di lunghi *diffusion delay*  $\Delta$  può portare ad un'eccessiva attenuazione del segnale a causa del rilassamento. Oltre a ciò, la sequenza *spin-echo* può generare anche un'evoluzione indotta dalle costanti *J* (*coupling evolution*) che porta a distorsioni del segnale [8].

Un'alternativa è data dalla sequenza *stimulated-echo* (STE) (Fig. 33). In questa sequenza la magnetizzazione si trova nel piano trasversale solo durante il breve periodo di tempo  $\tau_1$  (1-10 ms), mentre rimane longitudinale durante il restante periodo  $\tau_2$  (grazie al secondo impulso di 90°). Questo fa sì che il rilassamento, e quindi l'attenuazione del segnale, sia dettata dal tempo di rilassamento longitudinale  $T_1$ .



**Figura 33:** Sequenza di impulsi PFG *stimulated-echo* [14].

L'andamento di  $T_1$  e  $T_2$  in funzione di  $\tau_c$ , e quindi delle dimensioni molecolari, è riportato in Fig. 34. Come si vede dall'andamento, molecole di grandi dimensioni hanno  $T_1 > T_2$  e questo si traduce in una minore attenuazione del segnale quando la magnetizzazione si trova lungo l'asse longitudinale anziché nel piano  $xy$ .

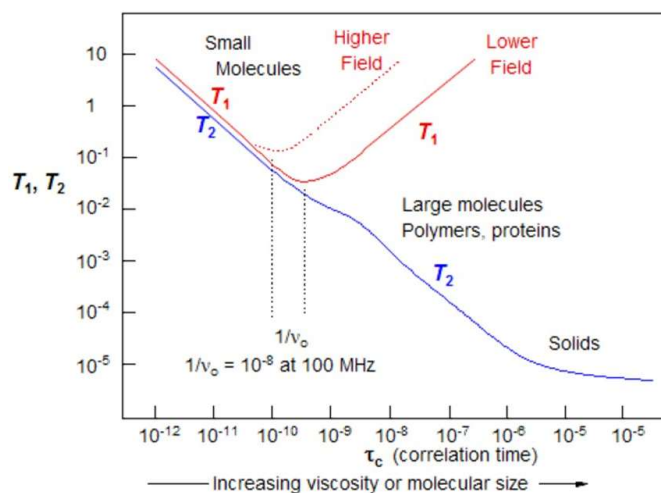
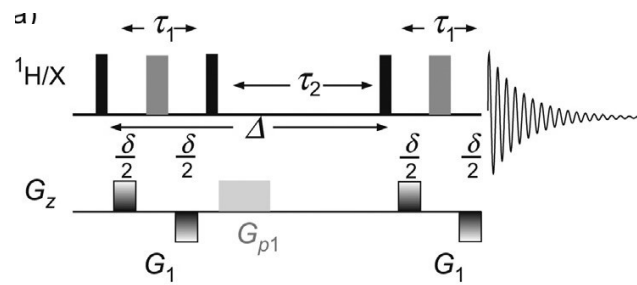


Figura 34: Andamento di  $T_1$  e  $T_2$  in funzione delle dimensioni molecolari.

Infine la magnetizzazione viene riportata nel piano per la misura grazie al terzo impulso di  $90^\circ$  (Fig. 33).

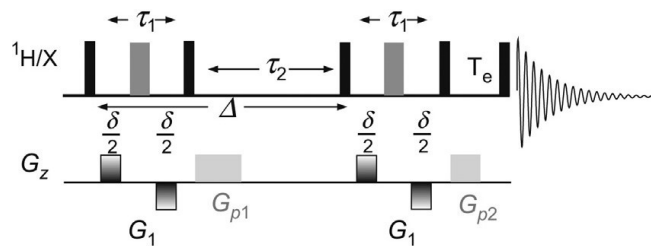
L'utilizzo di impulsi a gradienti di campo intensi, come accade per le sequenze *spin-echo* e *stimulated-echo*, provoca la generazione di correnti parassite (*eddy current*) che disturbano il segnale. Oltre a questo, durante l'applicazione di tali gradienti il segnale del lock viene distrutto, con conseguenti problematiche legate alla forma dei picchi nello spettro. Notevoli benefici si possono ottenere quando un singolo impulso a gradiente viene sostituito da due impulsi di segno opposto e con durata pari a metà di quello iniziale, separati da un impulso non selettivo di  $180^\circ$  (Fig. 35). I due gradienti uguali, ma di segno opposto, defasano solamente gli spin che risentono dell'impulso centrale di  $180^\circ$ . Per tale motivo, dato che i nuclei di deuterio non risentono di tale impulso, i gradienti non hanno alcun effetto complessivo sul sistema del lock. Oltre a questo, poiché i due impulsi di campo a gradiente sono applicati in direzione opposta, generano meno *eddy current*, diminuendo anche in questo caso difetti nello spettro finale. Tali impulsi prendono il nome *bipolar pulse pairs* (BPPs) e la sequenza che ne deriva viene denominata BPP-STE (Fig. 35) [14].





**Figura 35:** Sequenza di impulsi BPP-STE, L'impulso di *purge*  $G_{p1}$  è necessario per distruggere ogni possibile residuo di magnetizzazione trasversa durante il periodo di diffusione <sup>[14]</sup>.

Per fare in modo di minimizzare ulteriormente le correnti parassite, una strategia è quella di modificare la sequenza BPP-STE inserendo un tempo denominato *eddy current delay period*  $T_e$  durante il quale la magnetizzazione viene mantenuta lungo l'asse longitudinale. Dopo tale periodo (che può variare da qualche millisecondo a decine di millisecondi) le *eddy current* si sono dissipate e la magnetizzazione viene riportata nel piano trasversale dall'ultimo impulso di  $90^\circ$ . La sequenza risultante prende il nome di BPP-LED ed è riportata in Fig. 36.



**Figura 36:** Sequenza BPP-LED.  $G_{p2}$  è necessario per distruggere ogni possibile residuo di magnetizzazione trasversa durante  $T_e$ , dove la magnetizzazione desiderata si trova lungo l'asse longitudinale <sup>[14]</sup>.

## 5. Caratterizzazione delle nanoparticelle d'oro

Le nanoparticelle d'oro ottenute vengono caratterizzate sfruttando le seguenti tecniche:

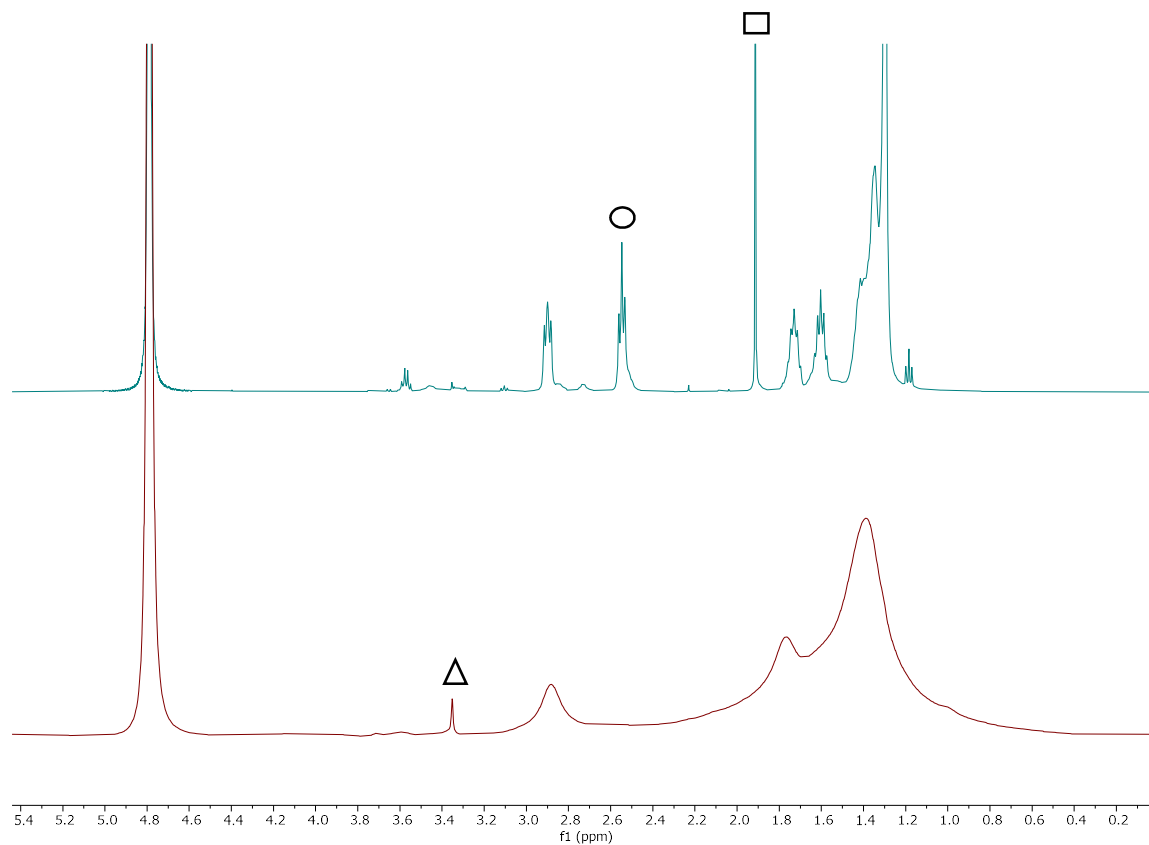
- **Microscopia elettronica a trasmissione (TEM):** Questa tecnica si avvale degli elettroni emessi da un apposito emettitore, i quali vengono successivamente accelerati mediante l'applicazione di tensioni fino a 1000 keV. Gli elettroni generati raggiungono il campione, che deve essere sufficientemente sottile da permettere il passaggio del fascio. Gli elettroni trasmessi vengono inizialmente raccolti dalla lente obiettivo, che consente la formazione dell'immagine; successivamente, l'ingrandimento viene ottenuto grazie alla lente proiettore. Nel nostro caso siamo interessati ad ottenere un'immagine bidimensionale a diversi ingrandimenti delle nanoparticelle ottenute. Tramite questa analisi è stato possibile quindi misurare le dimensioni delle nanoparticelle ottenute, ricavando successivamente il diametro medio attraverso il fitting con una funzione gaussiana.
- **Analisi termogravimetrica (TGA):** questa tecnica permette di misura la perdita di massa del campione all'aumentare della temperatura. Depositando il campione in un contenitore di platino e riscaldando con un gradiente di temperatura fino a 1000°C sotto flusso d'aria, è possibile ricavare la percentuale di massa organica rispetto a quella inorganica delle nanoparticelle. Dall'analisi effettuata, è possibile determinare la perdita di massa percentuale, che, combinata con la distribuzione dimensionale ottenuta tramite TEM, ha consentito di calcolare il rapporto oro/tiolo.
- **Spettroscopia UV-Vis:** questa tecnica permette di verificare ulteriormente le dimensioni delle nanoparticelle ottenute grazie alla presenza o all'assenza della banda di risonanza plasmonica, che generalmente per nanoparticelle di dimensioni superiori a 2 nm è situata a 520 nm. La dimensione effettiva per il quale inizia a comparire la banda di risonanza plasmonica dipende da molti fattori, tra cui ad esempio la forma delle nanoparticelle e anche dalla diversa tipologia dei leganti con cui vengono funzionalizzate <sup>[18]</sup>. Per questo motivo i risultati ottenuti devono essere tenuti in considerazione assieme a quelli del TEM.

- **Spettroscopia NMR:** acquisendo lo spettro NMR delle nanoparticelle d'oro ottenute in  $D_2O$  si può confermare l'avvenuta formazione del monostrato sulla superficie di quest'ultima. Questo si può ben verificare notando l'allargamento del segnale dei tioli e la perdita della struttura iperfine nello spettro della nanoparticella ottenuta, rispetto al tiolo libero. Bisogna considerare che catene di dimensioni maggiori provocano un aumento del raggio idrodinamico della nanoparticella, portando a sua volta ad un aumento del tempo di correlazione rotazionale. Come riportato in Fig. 34 un aumento del tempo di correlazione è legato ad una diminuzione del tempo di rilassamento trasversale  $T_2$ , parametro legato all'ampiezza del picco a metà altezza. Protoni quindi che rilassano più velocemente, sono caratterizzati da segnali via via sempre più allargati al diminuire di  $T_2$  (e quindi all'aumentare delle dimensioni del tiolo).

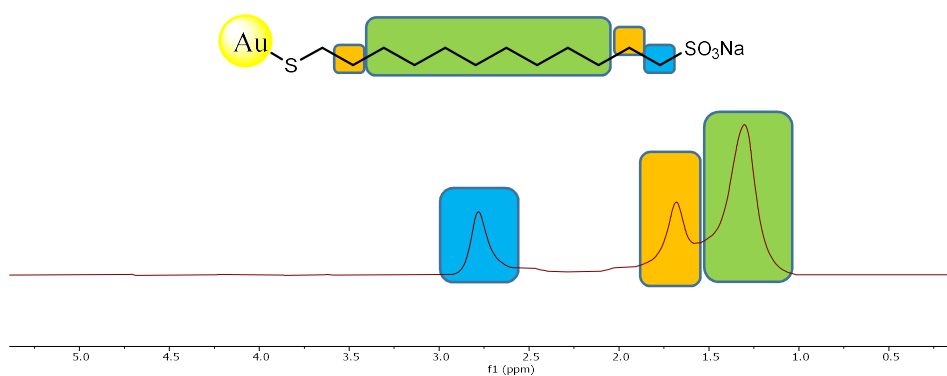
Viene inoltre acquisito uno spettro con filtro di diffusione: tale sequenza ha lo scopo di eliminare dallo spettro i segnali delle specie che diffondono velocemente (non legate alla superficie della nanoparticella), permettendo quindi di verificare che i segnali del tiolo siano ancora presenti, informazione che permette di confermare ulteriormente l'avvenuta formazione del monostrato.

In Fig. 37 viene riportato il confronto tra lo spettro NMR del tiolo libero **T2** e della **2-AuNP**. Come si può notare dal confronto il tripletto relativo a  $RCH_2CH_2SH$  del tiolo libero (cerchio trasparente nello spettro) non è più presente nello spettro di **2-AuNP**, questo a causa dell'importante allargamento del segnale dovuto alla rotazione impedita attorno al legame S-C.

In Fig. 38 viene riportato lo spettro ottenuto con filtro di diffusione e le rispettive assegnazioni per **2-AuNP**.



**Figura 37:** Confronto tra lo spettro  $^1\text{H-NMR}$  in  $\text{D}_2\text{O}$  del tiolo libero **T2** (azzurro) e quello della nanoparticella **2-AuNP** (rosso). Il singoletto indicato col quadrato trasparente è relativo al metile del gruppo acetato, che conferma peraltro la rimozione del gruppo protettore (sezione 10.1.2). Il singoletto indicato col triangolo trasparente è relativo a metanolo residuo.



**Figura 38:** Spettro  $^1\text{H-NMR}$  con filtro di diffusione di **2-AuNP** in  $\text{D}_2\text{O}$  con assegnazione dei segnali alle rispettive porzioni del tiolo del monostrato.

## 6. Nanoparticelle d'oro solfonate

### 6.1 Spettri $^1\text{H-NMR}$

I dettagli della sintesi dei tioli e delle successive nanoparticelle sono riportati nelle sezioni 10.1.1, 10.1.2, 10.1.3 e 10.2.1.

Di seguito vengono riportati gli spettri  $^1\text{H-NMR}$ , con le relative assegnazioni, delle nanoparticelle ottenute.

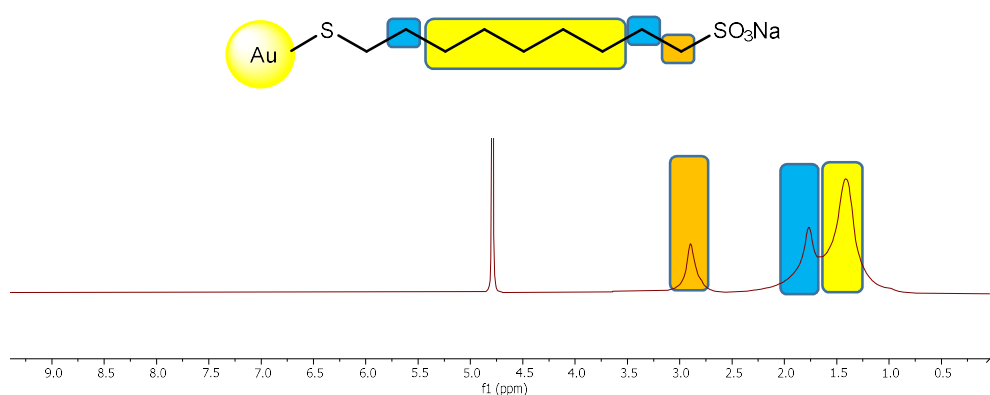


Figura 39: Spettro  $^1\text{H}$  di 1-AuNP in  $\text{D}_2\text{O}$ .

Come ribadito nella Sezione 5 l'assenza del segnale relativo al  $\text{CH}_2$  direttamente legato allo zolfo è dovuta alla rigidità del legame S-C, condizione che provoca un allargamento e quindi una scomparsa, del relativo segnale.

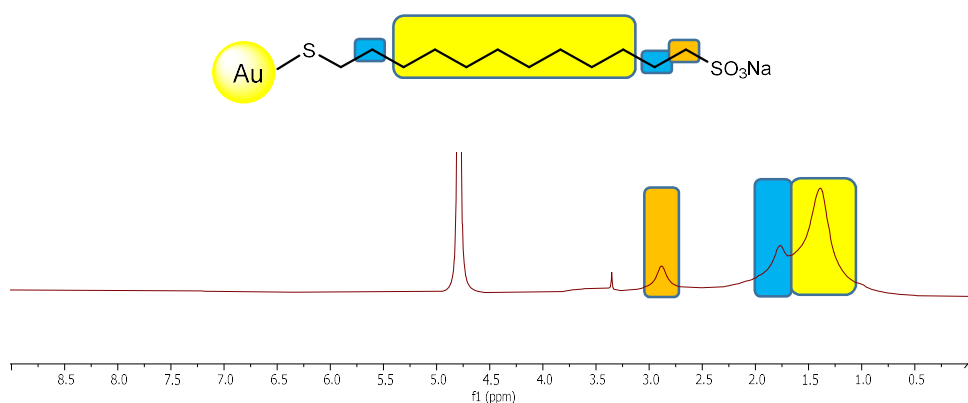
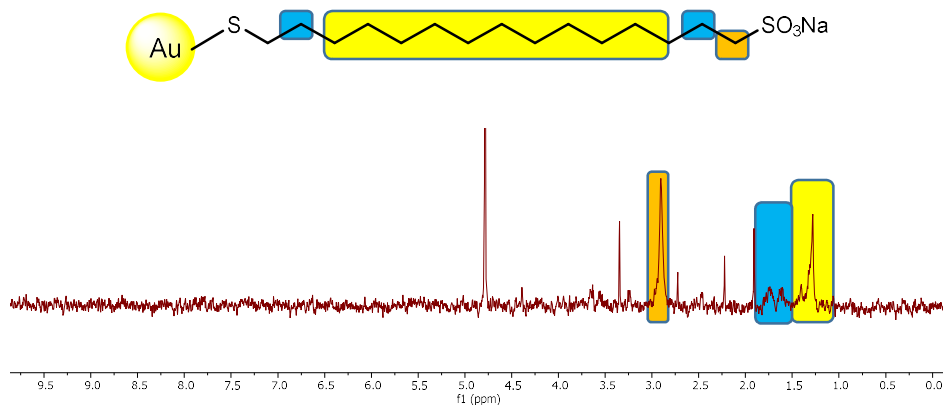


Figura 40: Spettro  $^1\text{H}$  di 2-AuNP in  $\text{D}_2\text{O}$ . Il segnale a 3.34 ppm è relativo a metanolo residuo.



**Figura 41:** Spettro <sup>1</sup>H di **3-AuNP** in D<sub>2</sub>O. Il segnale a 3.34 ppm è relativo a metanolo residuo, quello a 2.22 ppm è relativo ad acetone residuo e quello a 1.91 ppm è relativo al singoletto del metile dell'acetato (vedere sezione "sintesi tioli).

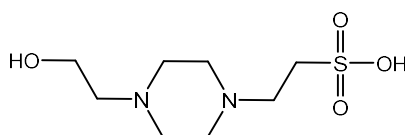
Dal confronto degli spettri ottenuti per le nanoparticelle solfonate si può ben apprezzare quanto affermato nella sezione "caratterizzazione delle nanoparticelle d'oro": all'aumentare delle dimensioni del tiolo legato alla particella si ha sia un aumento del raggio idrodinamico del centro metallico, che crea una maggior rigidità del legame S-C. Queste condizioni spiegano il progressivo allargamento dei segnali nel passare dallo spettro della nanoparticella C-9 a quella C-12. Questo allargamento diventa veramente importante quando si ha a che fare con la nanoparticella C-15, nel quale i segnali della catena sono così allargati da "emergere" nello spettro solo con un'intensità molto modesta rispetto alle altre due nanoparticelle. Un dettaglio interessante da fare notare nello spettro della nanoparticella C-15 è rappresentato dal fatto che il segnale relativo al gruppo CH<sub>2</sub> direttamente legato al solfonato (riquadro arancione in Fig. 41), presenta un'intensità maggiore rispetto ai segnali della catena alchilica (riquadri gialli e azzurri in Fig. 41). Questo è legato al fatto che il CH<sub>2</sub> direttamente legato al solfonato, essendo il gruppo più lontano dal centro metallico, gode di una maggior mobilità rispetto agli altri metileni in catena. Per questo motivo quindi si ha un allargamento maggiore e quindi una minor intensità dei segnali relativi alla catena; cosa che invece viene mitigata per il CH<sub>2</sub> terminale grazie alla sua maggior mobilità.

## 6.2 Spettri *HP-wSTD*

In questa sezione vengono riportati i risultati ottenuti da esperimenti *HP-wSTD* per le nanoparticelle solfonate. Sono state testate sia diverse concentrazioni in tiolo, che diverse concentrazioni di analita. I campioni erano così costituiti:

- AuNPs solfonate, concentrazioni in tiolo 0.5 Mm e 0.05 mM;
- 3-MT, concentrazioni 100, 50 e 25  $\mu$ M;
- HEPES, concentrazione 1 mM;
- H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O 9:1.

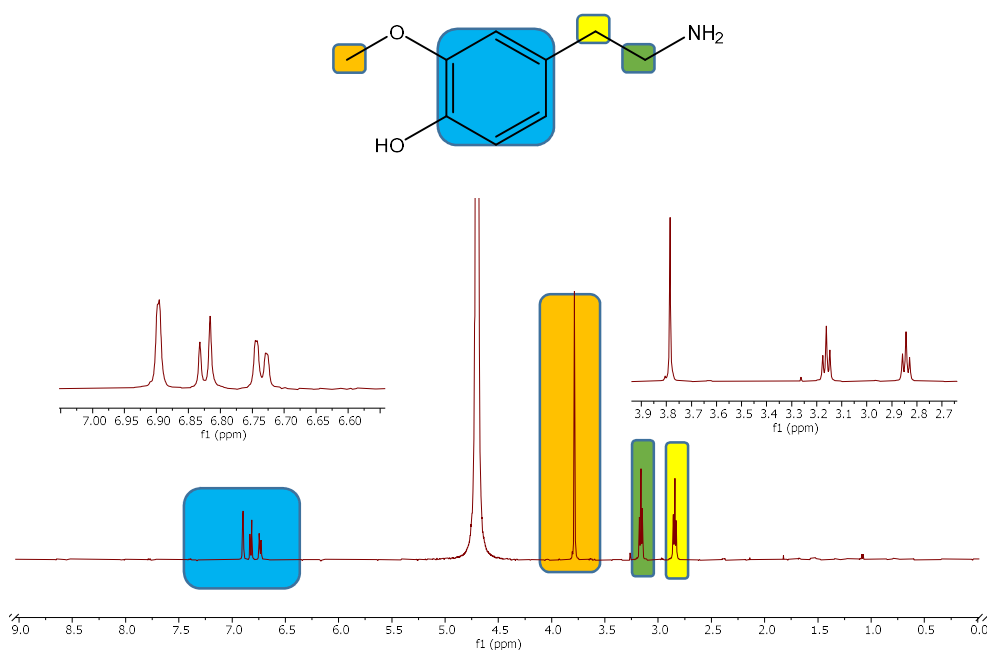
HEPES è una sostanza organica utilizzata per preparare soluzioni tampone, per le misure il pH è stato fissato ad un valore di 7.



**Figura 42:** Formula di struttura di HEPES.

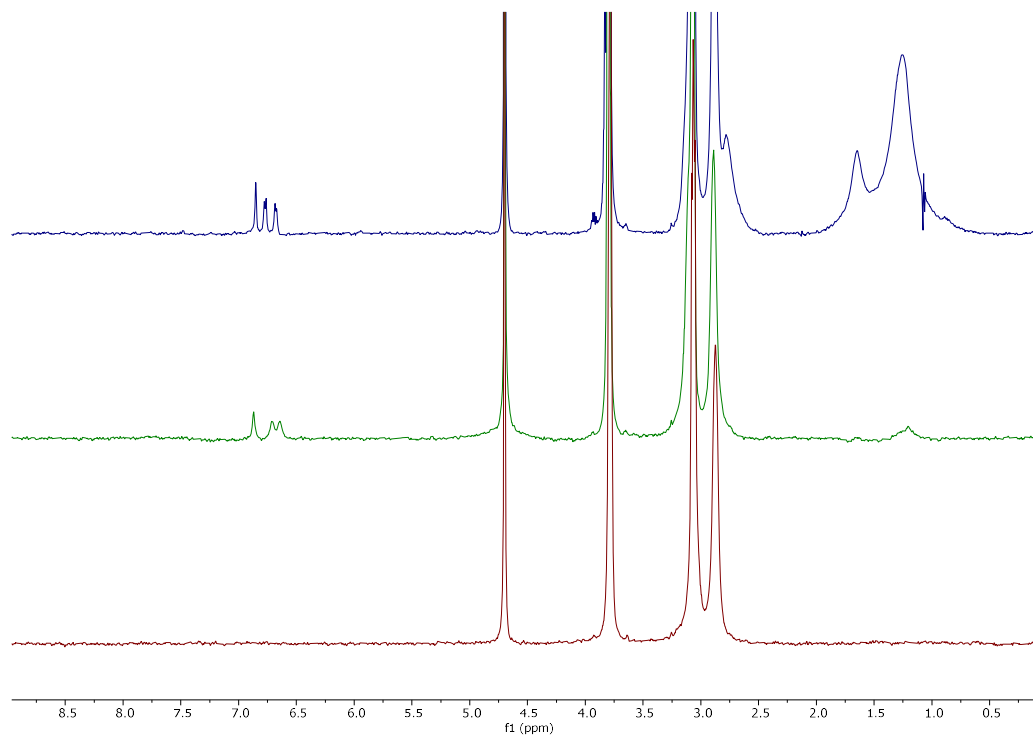
La presenza abbondante di acqua in esperimenti *HP-wSTD* è fondamentale in quanto l'acqua viene utilizzata proprio come fonte per il trasferimento di magnetizzazione. La presenza invece di D<sub>2</sub>O è resa necessaria al fine di permettere l'operazione di *lock* dello strumento.

Inizialmente viene riportato per chiarezza di comprensione lo spettro <sup>1</sup>H della 3-MT.



**Figura 43:** Spettro <sup>1</sup>H in D<sub>2</sub>O di 3-MT 0.25 mM.

Vengono prima riportati gli spettri relativi alla concentrazione in tiolo pari a 0.5 mM e successivamente verranno riportati quelli relativi alla concentrazione 0.05 mM. Per poter confrontare le prestazioni come sensori chimici delle nanoparticelle, verranno confrontati i rapporti segnale/rumore relativi al singoletto a 6.85 ppm della 3-MT. È stato scelto 3 come valore limite del rapporto segnale/rumore al di sotto del quale i segnali non si considerano più significativi.

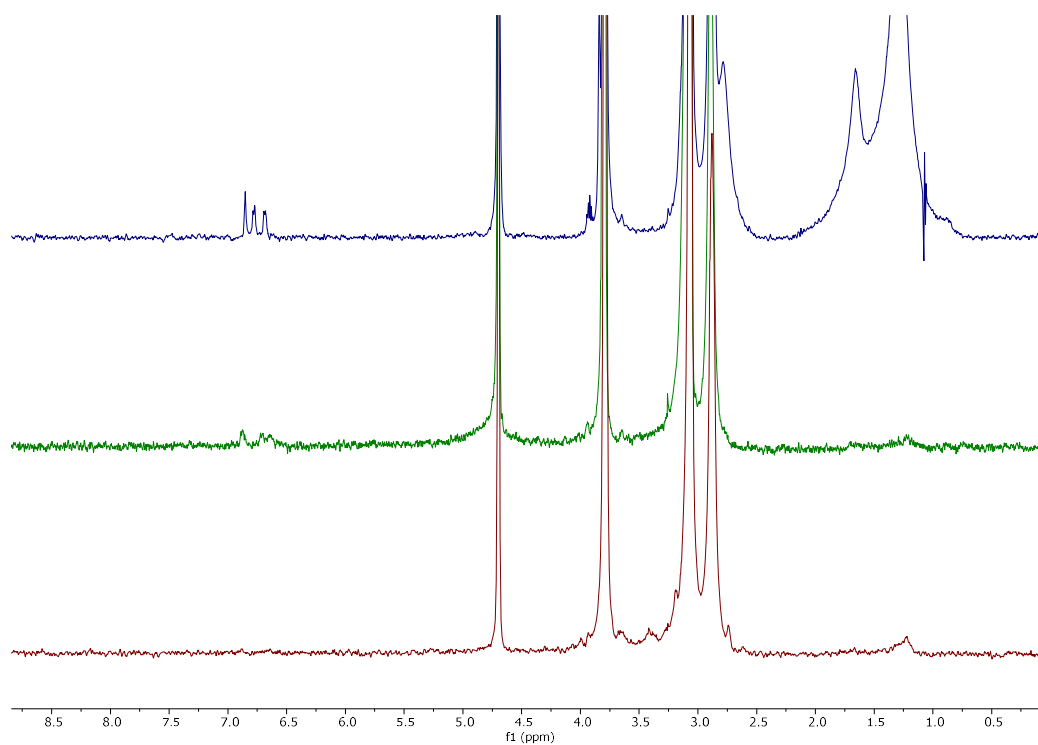


**Figura 44:** Spettri *HP-wSTD* in presenza di HEPES 1 mM, 3-MT 100  $\mu$ M e 0.5 mM in tiolo di **1-AuNP** (blu), **2-AuNP** (verde), **3-AuNP** (rosso).

Tabella 1: Rapporti segnale rumore relativi al segnale a 6.85 ppm della 3-MT 100  $\mu$ M in presenza di **1-AuNP**, **2-AuNP** e **3-AuNP**.

S/N
36.00
16.63
N.D.

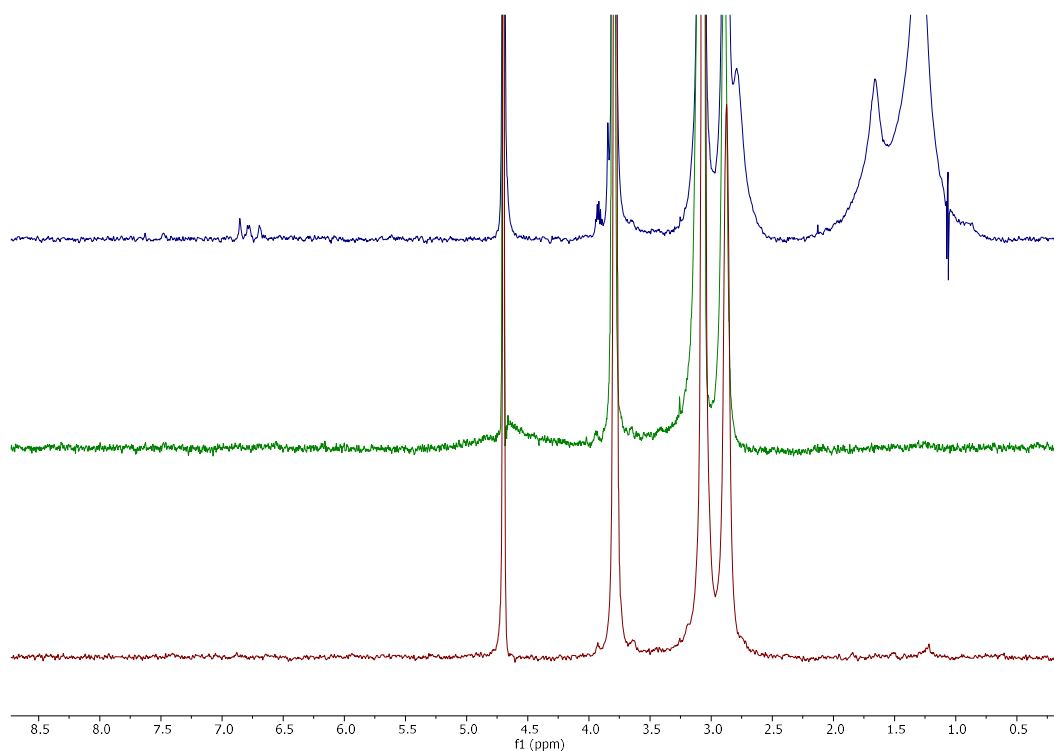




**Figura 45:** Spettri *HP-wSTD* in presenza di HEPES 1 mM, 3-MT 50  $\mu$ M e 0.5 mM in tiolo di **1-AuNP** (blu), **2-AuNP** (verde), **3-AuNP** (rosso).

Tabella 2: Rapporti segnale rumore relativi al segnale a 6.85 ppm della 3-MT 50  $\mu$ M in presenza di **1-AuNP**, **2-AuNP** e **3-AuNP**.

S/N
18.06
4.04
N.D.



**Figura 46:** Spettri *HP-wSTD* in presenza di HEPES 1 mM, 3-MT 25  $\mu$ M e 0.5 mM in tiolo di **1-AuNP** (blu), **2-AuNP** (verde), **3-AuNP** (rosso).

Tabella 3: Rapporti segnale rumore relativi al segnale a 6.85 ppm della 3-MT 25  $\mu$ M in presenza di **1-AuNP**, **2-AuNP** e **3-AuNP**.

S/N
7.01
N.D.
N.D.

Dal confronto tra gli spettri *HP-wSTD* a diverse concentrazioni di 3-MT e con le tre nanoparticelle solfonate presenti con concentrazioni in tiolo pari a 0.5 mM, si possono apprezzare prestazioni di *chemosensing* molto differenti. La nanoparticella che permette di ottenere il maggior rapporto S/N a tutte e tre le concentrazioni di 3-MT è quella con la catena costituita da nove atomi di carbonio. Quest'ultima fornisce non solo ottime prestazioni di *chemosensing* a concentrazioni di 3-MT 100  $\mu$ M, ma anche nel caso di 3-MT 25  $\mu$ M. **2-AuNP** invece fornisce dei risultati buoni solo a concentrazioni di 3-MT pari a 100  $\mu$ M e arriva al limite del rapporto S/N a 50  $\mu$ M; a 25  $\mu$ M non c'è presenza di alcun tipo di segnale dell'analita. **3-AuNP** non esibisce alcun segnale dell'analita a tutte e tre le concentrazioni di 3-MT, ciò è probabilmente dovuto al fatto che **3-AuNP** interagisce troppo fortemente con l'analita, portando ad un allargamento completo del suo segnale. Per ottenere risultati ottimali

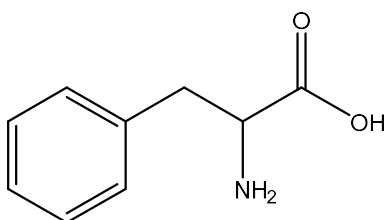
nell'esperimento HP-wSTD, è infatti fondamentale avere una frazione di analita libera in soluzione. In caso contrario (binding forte) l'analita assume la stessa dinamica della nanoparticella e, conseguentemente, l'allargamento del segnale è tale da farlo scomparire dallo spettro (come accaduto nel caso di **3-AuNP**). Nel caso di un'elevata affinità analita/nanoparticella, è possibile ottenere una significativa frazione di analita libero solo in due condizioni. La prima è la presenza di un eccesso di analita, in modo da poter contare sulla frazione di analita che non può accomodarsi nei siti di legame della particella. In tale condizione però non vi sarà nessuna corrispondenza proporzionale tra la concentrazione di analita e l'intensità del segnale prodotto. La seconda condizione prevede invece di spostare l'equilibrio associazione/dissociazione verso lo stato non legato diminuendo la quantità di nanoparticella. Così facendo si aumenta la frazione di analita in soluzione e quindi si possono ottenere dei migliori risultati in termini di rapporto S/N in esperimenti HP-wSTD. Anche questa soluzione porta ad uno svantaggio: se vi è una minor presenza di sensore in soluzione saranno anche presenti un minor numero di siti di legame per l'analita; questo si traduce nel fatto che, aumentando la concentrazione dell'analita, si assiste ad una rapida saturazione della nanoparticella. Diminuire quindi la concentrazione di sensore in soluzione può portare un beneficio in termini di valori del rapporto S/N, ma dall'altro canto limita molto il range di concentrazione di 3-MT rivelabili.

Riassumendo, si può affermare che la nanoparticella più promettente dal punto di vista del *chemosensing* è **1-AuNP**, **2-AuNP** fornisce risultati solo a concentrazioni di 3-MT pari a 100  $\mu\text{M}$ , ma i segnali osservati subiscono già un rilevante allargamento, mentre **3-AuNP** risulta non adeguata per test di questo tipo.

Si fa notare inoltre la presenza negli spettri HP-wSTD dei segnali di HEPES situati a 3.78, 3.06 e 2.87 ppm, ed anche quelli della nanoparticella (specialmente nel caso di **1-AuNP**). Questo è dovuto principalmente all'allargamento del profilo di saturazione tipico dell'esperimento HP-wSTD (Fig. 26), che va a saturare anche delle porzioni di spettro diverse dalla sola risonanza dell'acqua (4.79 ppm).

Per verificare a questo punto se i segnali della 3-MT che appaiono negli spettri siano frutto di un allargamento del profilo di saturazione, oppure se la sequenza sia effettivamente valida per svolgere test di *chemosensing*, è stato eseguito un esperimento in presenza di un controllo negativo. Quest'ultimo è rappresentato da una specie che non interagisce con la

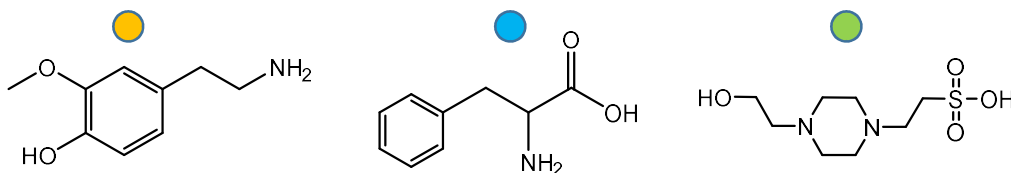
nanoparticella e i cui segnali risuonano vicini a quelli dell'analita interagente. Nel caso specifico di questo lavoro di Tesi si è scelto come controllo negativo la fenilalanina (Fig. 47).

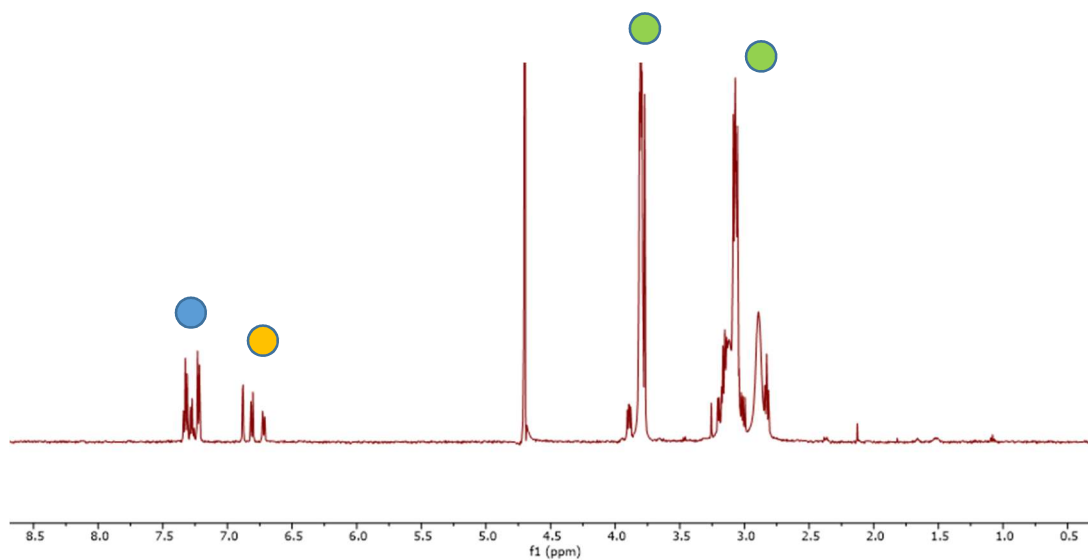


**Figura 47:** Struttura della fenilalanina.

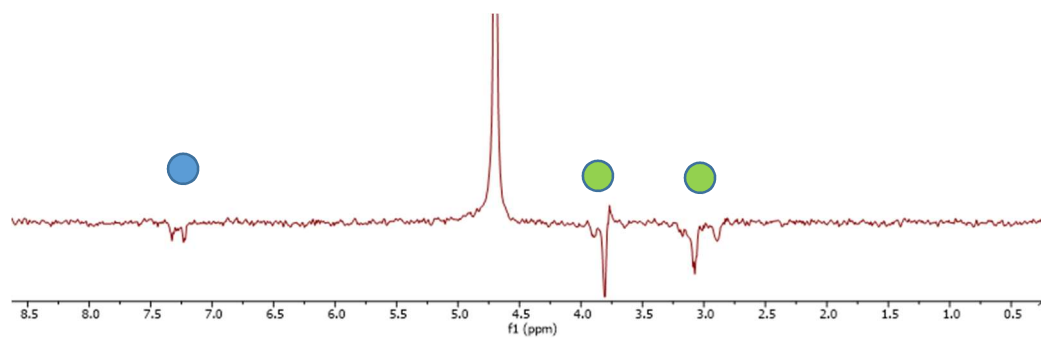
L'esperimento consiste nel verificare se nello spettro *HP-wSTD* siano presenti i segnali del controllo negativo (con fase positiva), oltre a quelli dell'analita di interesse. Se così fosse allora la sequenza non permetterebbe di svolgere test di *chemosensing*, in quanto i segnali che si vedono potrebbero non essere conseguenti ad un'interazione con la nanoparticella, bensì frutto di un allargamento del profilo di saturazione tipico della sequenza di impulsi utilizzata. Per verificare questo la procedura standard consiste nell'acquisire prima uno spettro <sup>1</sup>H, successivamente uno spettro *LP-wSTD* ed infine uno spettro *HP-wSTD*, al fine di verificare che effetti ha sullo spettro un aumento della potenza degli impulsi di saturazione. Viene riportato il risultato di un solo test eseguito con le nanoparticelle **2-AuNP**, questo perché i risultati ottenuti con le altre sono identici. I campioni per l'analisi erano così costituiti:

- AuNPs concentrazione in tiolo 0.05 mM;
- 3-MT 100 μM;
- Fenilalanina 100 μM;
- HEPES 1 mM;
- H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O 9:1.

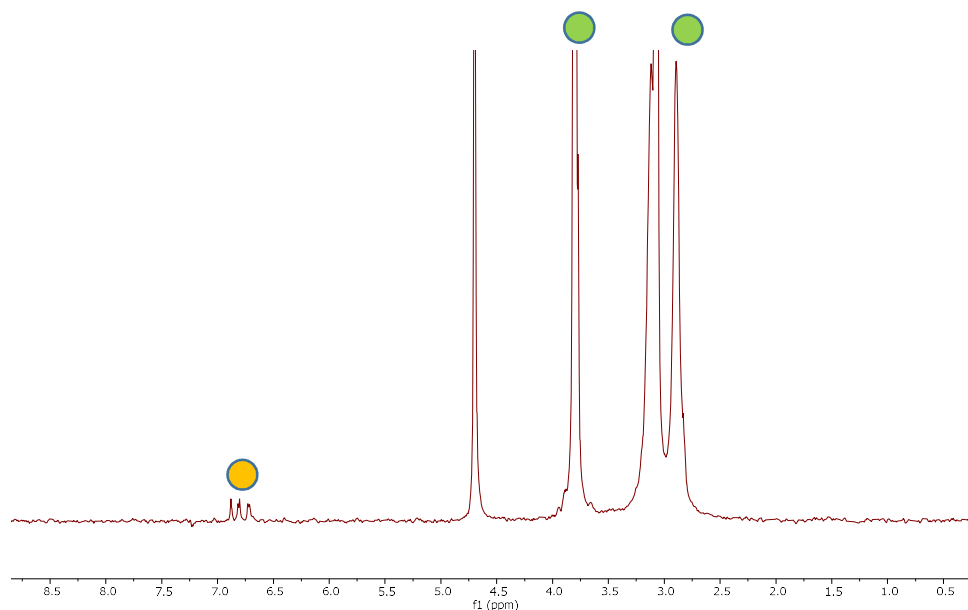




**Figura 48:** Spettro  $^1\text{H}$  NMR in  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$  9:1 con soppressione del solvente, i segnali sono relativi a 3-MT (cerchio arancione), fenilalanina (cerchio azzurro) e HEPES (cerchi verdi).



**Figura 49:** Spettro *LP-wSTD* in  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$  9:1 e relative assegnazioni dei segnali della fenilalanina (cerchio blu) e HEPES (cerchi verdi).

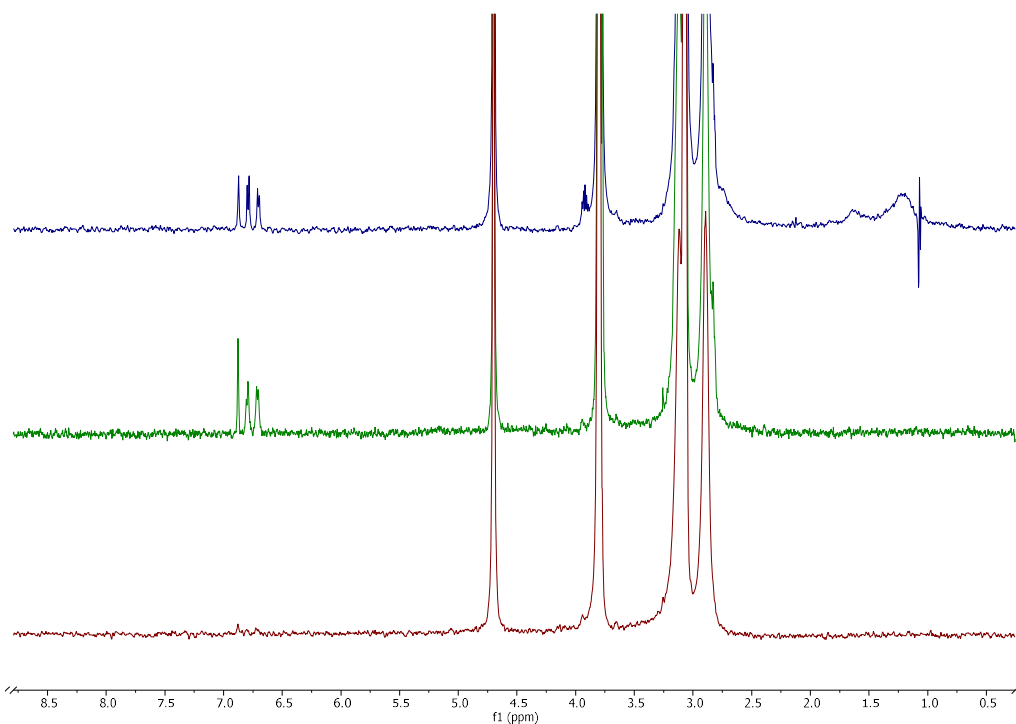


**Figura 50:** Spettro *HP-wSTD* in  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$  9:1 e relative assegnazioni dei segnali della 3-MT (cerchio arancione) e HEPES (cerchi verdi).

Dal confronto tra gli spettri *LP-wSTD* e *HP-wSTD* si possono notare delle notevoli differenze: innanzitutto nello spettro *LP-wSTD* si possono verificare le limitazioni di questa sequenza riportate nella sezione “Esperimento *WaterSTD*”, ovvero che la accidentale sovrapposizione dei segnali della 3-MT appartenenti a regimi NOE differenti, portano ad una sua effettiva cancellazione dallo spettro differenza (falso negativo). Nello spettro *LP-wSTD* si vedono i segnali del controllo negativo e dell’HEPES, entrambi con fase negativa. Il fatto che anche la fenilalanina si presenti con fase negativa conferma che essa non interagisce con la nanoparticella e che, quindi, risente di NOE positivo tipico di analiti presenti nel *bulk* della soluzione. Questo risultato peraltro conferma la scelta della fenilalanina come controllo negativo. Aumentando la potenza degli impulsi di saturazione si passa da un esperimento *LP-wSTD* ad un *HP-wSTD*, nello spettro *HP-wSTD* riportato in Fig. 50 si può notare subito che i segnali del controllo negativo non sono più presenti, mentre sono comparsi quelli della 3-MT. Come mostrato in Fig. 27, nel quale si mostra la traiettoria della magnetizzazione longitudinale all’aumentare della potenza degli impulsi di saturazione, un aumento della potenza di questi ultimi provoca il raggiungimento della condizione di equilibrio (se la potenza degli impulsi è correttamente calibrata) per gli analiti non interagenti, mentre non ha alcuna influenza sugli analiti interagenti (che risentono di un NOE negativo). Il raggiungimento della condizione di equilibrio per la magnetizzazione longitudinale equivale alla scomparsa dei segnali dallo spettro differenza, ed è proprio quello che accade per la fenilalanina. Possiamo quindi validare la sequenza di impulsi utilizzata (e che quindi i segnali della 3-MT non sono frutto di un difetto

della sequenza di impulsi) poiché se così non fosse, nello spettro *HP-wSTD* dovrebbero comparire anche i segnali del controllo negativo con fase positiva, a causa appunto dell'allargamento del profilo di saturazione. La presenza dei segnali dell'HEPES positivi nello spettro *HP-wSTD* è legata al fatto che, essendo questi segnali molto vicini (in termini di ppm) all'acqua, vengono inevitabilmente saturati a causa dell'allargamento del profilo di saturazione. In conclusione possiamo dire che il problema di cui soffre la sequenza *HP-wSTD*, ovvero che all'aumentare della potenza degli impulsi si assista ad un allargamento del profilo di saturazione, è tanto maggiore quanto più i segnali si trovano in prossimità della risonanza dell'acqua (Fig. 26).

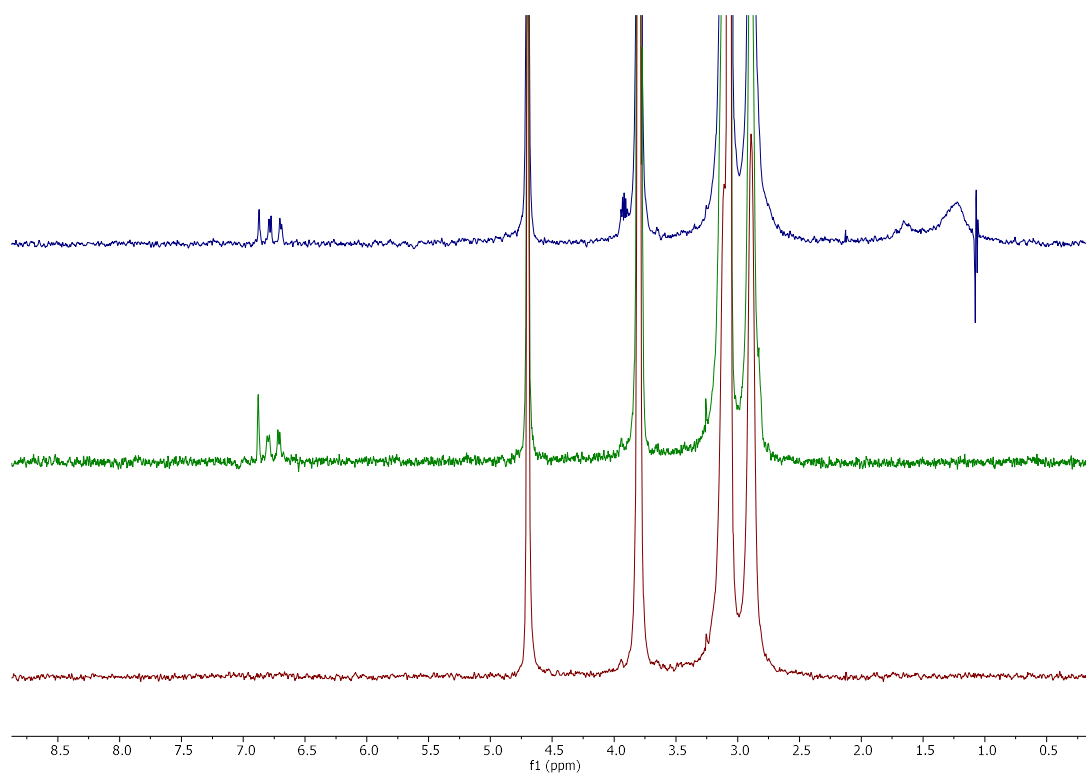
Dopo aver verificato l'efficacia della sequenza di impulsi utilizzata, vengono riportati gli spettri *HP-wSTD* in presenza di AuNPs con concentrazione in tiolo pari a 0.05 mM.



**Figura 51:** Spettri *HP-wSTD* in presenza di HEPES 1 mM, 3-MT 100  $\mu$ M e 0.05 mM in tiolo di **1-AuNP** (blu), **2-AuNP** (verde), **3-AuNP** (rosso).

Tabella 4: Rapporti segnale rumore relativi al segnale a 6.85 ppm della 3-MT 100  $\mu$ M in presenza di **1-AuNP**, **2-AuNP** e **3-AuNP**.

S/N
18.85
24.58
3.09

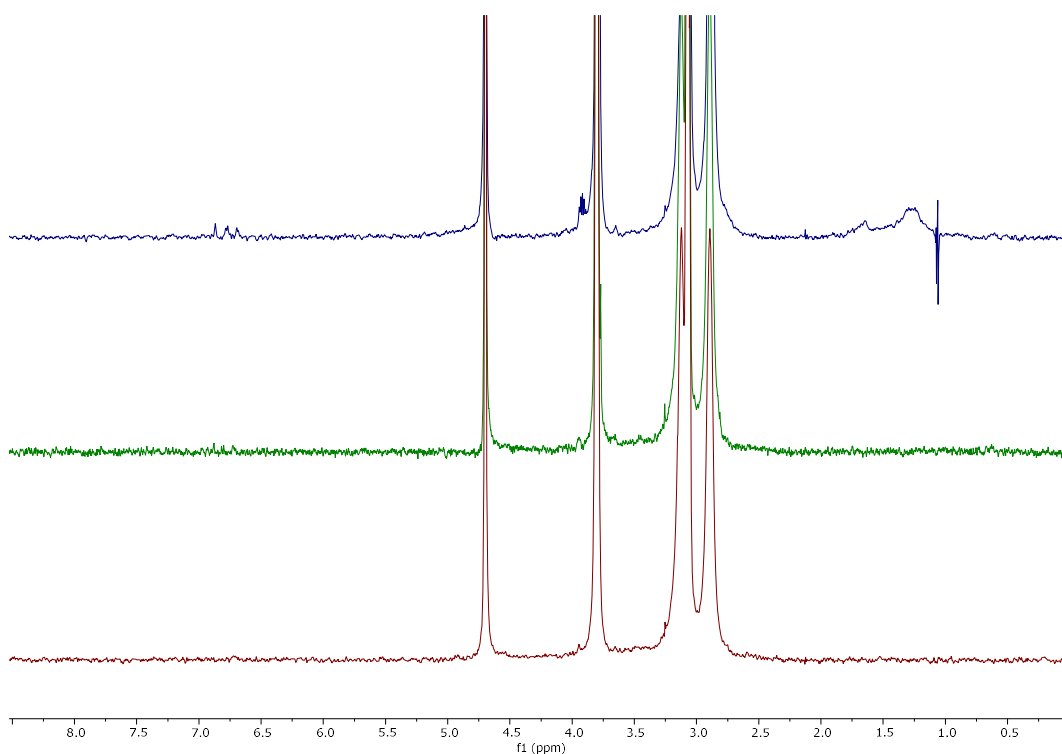


**Figura 52:** Spettri *HP-wSTD* in presenza di HEPES 1 mM, 3-MT 50  $\mu$ M e 0.05 mM in tiolo di **1-AuNP** (blu), **2-AuNP** (verde), **3-AuNP** (rosso).

Tabella 5: Rapporti segnale rumore relativi al segnale a 6.85 ppm della 3-MT 50  $\mu$ M in presenza di **1-AuNP**, **2-AuNP** e **3-AuNP**.

S/N
9.23
16.42
N.D.





**Figura 53:** Spettri *HP-wSTD* in presenza di HEPES 1 mM, 3-MT 25  $\mu$ M e 0.05 mM in tiolo di **1-AuNP** (blu), **2-AuNP** (verde), **3-AuNP** (rosso).

Tabella 6: Rapporti segnale rumore relativi al segnale a 6.85 ppm della 3-MT 25  $\mu$ M in presenza di **1-AuNP**, **2-AuNP** e **3-AuNP**.

S/N
5.78
N.D.
N.D.

I risultati *HP-wSTD* in presenza di AuNPs con concentrazione in tiolo pari a 0.05 mM mostrano un andamento sorprendente. A concentrazioni di 3-MT 100  $\mu$ M il rapporto S/N più elevato è relativo a **2-AuNPs**; lo stesso andamento si ha anche quando la concentrazione scende a 50  $\mu$ M. A concentrazioni di 3-MT pari a 25  $\mu$ M, **2-AuNP** non fornisce più alcun segnale per l'analita, dimostrando un andamento non lineare del rapporto S/N al diminuire della concentrazione. Sebbene **1-AuNP** non permetta di avere dei rapporti S/N elevati come **2-AuNP** a concentrazioni più elevate, si rivela essere utilizzabile per test di *chemosensing* anche a concentrazione di analita 25  $\mu$ M. Ancora una volta **3-AuNP** non si rivela in pratica utilizzabile per questa tipologia di esperimento: ciò è legato, come affermato precedentemente, all'interazione troppo forte tra analita e nanoparticella. **3-AuNP** permette la comparsa di un debole segnale dell'analita nello spettro solo passando da AuNPs in concentrazione di tiolo

pari a 0.5 mM fino a 0.05 mM, questo è legato al fatto che al diminuire della concentrazione del sensore vi è una maggior presenza di analita in soluzione. Dal valore del rapporto S/N (3.09) si può tuttavia presumere che il segnale dell'analita non sia presente nello spettro a causa di un effetto di allargamento che si estende dalla frazione legata a quella non legata, non permettendo quindi la buona riuscita dell'esperimento *HP-wSTD*.

È interessante notare il fatto che **1-AuNP** fornisce dei risultati migliori di **2-AuNP** a concentrazioni in tiolo pari a 0.5 mM, ma a concentrazione pari a 0.05 mM succede l'opposto. Questo è legato ancora una volta all'affinità analita/nanoparticella: a concentrazione di sensore pari a 0.5 mM la maggior affinità di **2-AuNP** permette di avere una minor presenza di analita in soluzione e quindi dei peggiori valori del rapporto S/N. Per **1-AuNP** invece la minor affinità fa sì che a bassa concentrazione la frazione legata cominci a diventare troppo bassa, diminuendo l'intensità del segnale prodotto. Per **2-AuNP** a concentrazione in tiolo pari a 0.05 mM si hanno dei risultati migliori rispetto al caso 0.5 mM, questo perché, avendo diminuito la presenza di nanoparticella, l'equilibrio di associazione/dissociazione si è spostato permettendo di avere una maggior presenza di analita in soluzione.

### 6.3 Spettri *DOSY*

La tecnica *DOSY* permette di ricavare l'affinità tra analita e nanoparticella, grazie alla variazione del coefficiente di diffusione apparente della 3-MT in assenza e in presenza del sensore.

Il coefficiente di diffusione che viene ricavato da questa tipologia di esperimento è il risultato della seguente espressione:

$$D_{app} = D_{free}P_{free} + D_{bound}P_{bound} \quad (20)$$

Il coefficiente di diffusione ottenuto sperimentalmente risulta essere pari alla media dei coefficienti di diffusione delle specie libere in soluzione ( $D_{free}$ ) e di quelle legate alla nanoparticella ( $D_{bound}$ ), pesate sulle popolazioni libere e legate ( $P_{free}$  e  $P_{bound}$ ).

L'esperimento *DOSY* per fornire dei risultati attendibili necessita che vengano soddisfatte delle condizioni stringenti: l'interazione tra analita e nanoparticella deve essere sì sufficientemente forte da poter generare una variazione apprezzabile del coefficiente di diffusione della specie

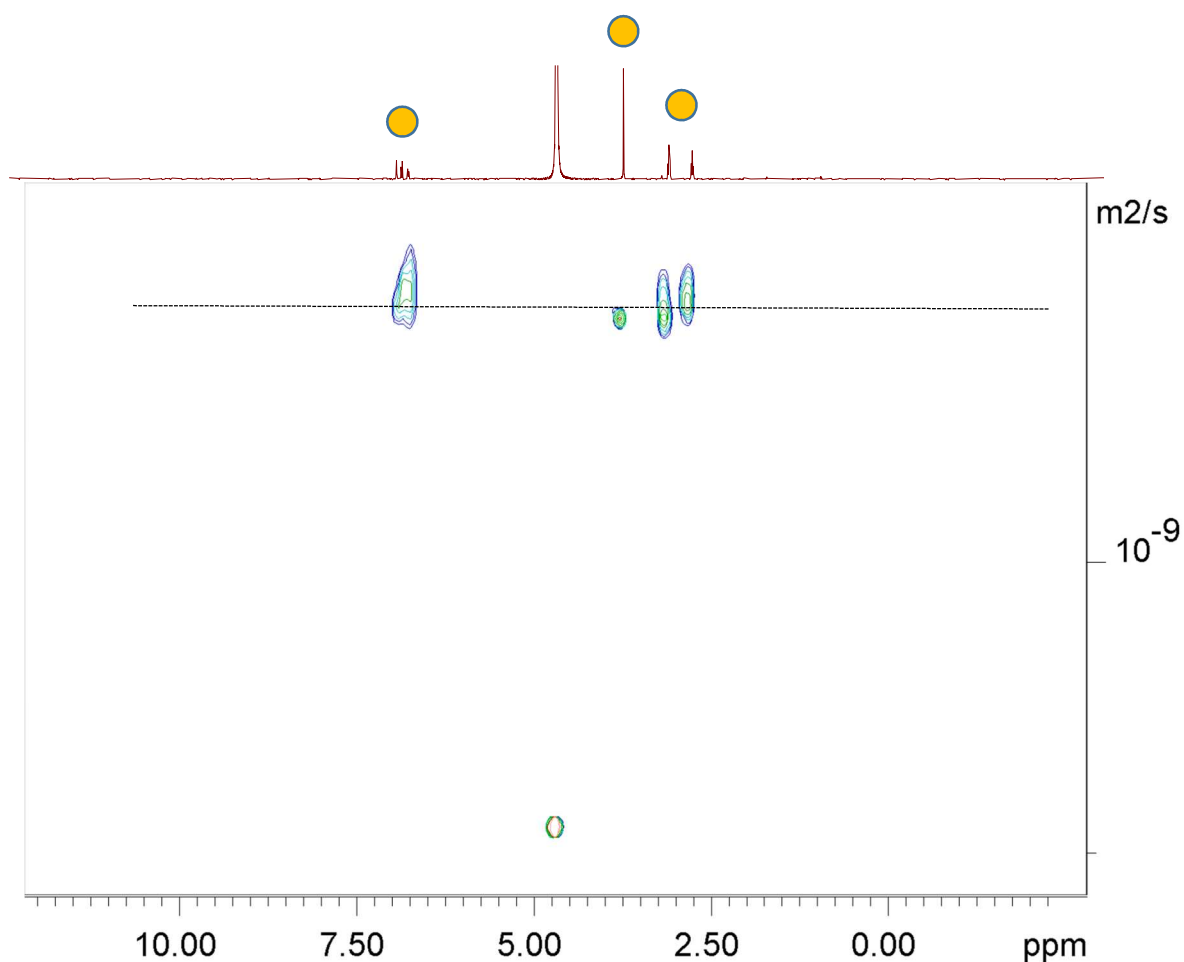
(avere quindi una notevole presenza di popolazione che si trovi in stato legato), ma non eccessivamente forte per evitare problematiche nella la misura. Se l'interazione è troppo debole, nell'espressione (20) si avrà solo una minima variazione di  $D_{bound}$  rispetto a  $D_{free}$  e conseguentemente, non si riuscirà ad ottenere una stima veritiera di  $D_{app}$  che tenderà ad approssimare  $D_{free}$ . Viceversa, se l'interazione risulta essere eccessivamente forte, si ha che il rilassamento associato provoca l'allargamento dei segnali con conseguente riduzione del rapporto S/N e quindi, si ottiene un peggioramento della qualità del fitting.

Il problema dell'eccessiva interazione tra analita e nanoparticella è stato osservato proprio nel caso delle **3-AuNP**. In questo caso, come già evidenziato negli spettri HP-wSTD, la nanoparticella interagisce in maniera così forte con la 3-MT da far scomparire i segnali corrispondenti dallo spettro. Per questo motivo l'analisi *DOSY* non può essere effettuata con **3-AuNP**. Per le altre due nanoparticelle i campioni per questa tipologia di analisi erano così costituiti:

- AuNPs concentrazione in tiolo 1 mM;
- 3-MT in concentrazione 0.25 mM;
- Tampone fosfato in concentrazione 1 mM;
- D<sub>2</sub>O.

La scelta di utilizzare il tampone fosfato anziché l'HEPES è legata al fatto che il fosfato non fornisce segnali nello spettro NMR, permettendo quindi di sfruttare per il fitting il segnale più intenso della 3-MT (singoletto appartenente al gruppo -OCH<sub>3</sub>) che normalmente viene coperto dai segnali dell'HEPES.

Per prima cosa viene eseguita l'analisi in assenza di nanoparticella, al fine di ottenere il valore di riferimento del coefficiente di diffusione della 3-MT nelle date condizioni sperimentali.



**Figura 54:** Mappa *DOSY* in  $D_2O$  ottenuta con 3-MT 0.25 mM, fosfato 1 mM. Nella dimensione diretta viene riportato il chemical shift, mentre nell'altra dimensione viene riportato il coefficiente di diffusione delle specie. I segnali della 3-MT sono marcati con dei cerchi arancioni.

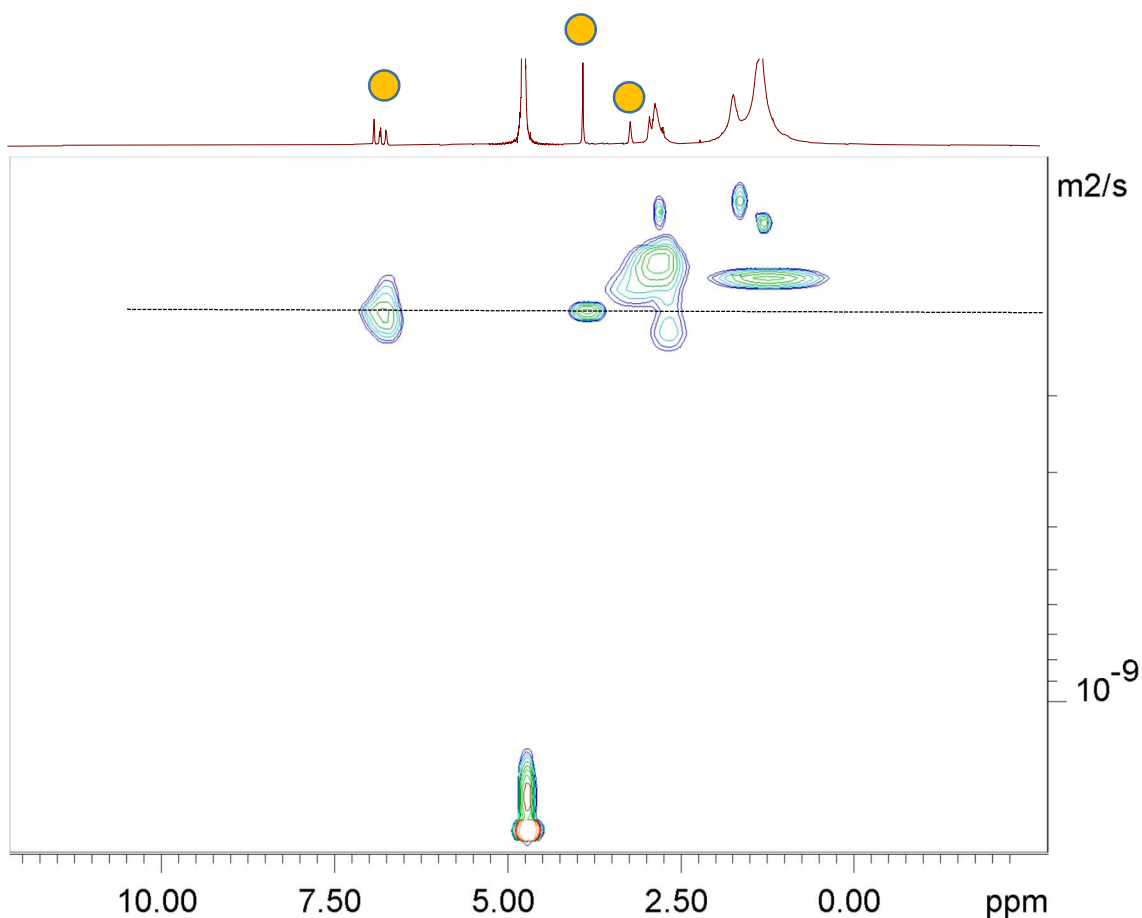
Nella mappa *DOSY* il centro dei segnali nella dimensione indiretta corrisponde al valore del coefficiente di diffusione, mentre la larghezza rappresenta l'entità dell'errore associato al fitting. La linea tratteggiata in Fig. 54 è riportata al fine di mostrare che i segnali appartengono tutti alla stessa specie (entro l'errore sperimentale).

Considerando ora il segnale della 3-MT con il maggior rapporto *S/N*, ovvero il singoletto a 3.79 ppm appartenente al gruppo metossi ( $-OCH_3$ ), il fitting con l'equazione di Stejskal-Tanner (19) ha restituito il seguente coefficiente di diffusione:

Tabella 7: Coefficiente di diffusione ottenuto attraverso il fitting con l'equazione di Stejskal-Tanner del singoletto a 3.79 ppm della 3-MT.

Chemical shift (ppm)	D ( $m^2/s$ )	Errore
3.79	$5.63 \times 10^{-10}$	$0.04 \times 10^{-10}$

Diversamente, in presenza di **1-AuNP**, il risultato ottenuto è il seguente:



**Figura 55:** Mappa *DOSY* in  $D_2O$  ottenuto con 3-MT 0.25 mM, fosfato 1 mM e **1-AuNP** 1 mM. I segnali della 3-MT sono marcati con dei cerchi arancioni.

Considerando sempre il singoletto della 3-MT per il fitting, il coefficiente di diffusione ottenuto è il seguente:

Tabella 8: Coefficiente di diffusione ottenuto attraverso il fitting con l'equazione di Stejskal-Tanner del singoletto a 3.84 ppm della 3-MT.

Chemical shift (ppm)	D ( $m^2/s$ )	Errore
3.84	$1.29 \times 10^{-10}$	$0.03 \times 10^{-10}$

Come si può notare dai risultati sperimentali ottenuti per il coefficiente di diffusione, possiamo dire che in presenza di **1-AuNP** vi è stato un rallentamento della diffusione dell'analita di 4.4 volte a causa dell'interazione con la nanoparticella. Questo risultato ci permette di verificare quanto detto nella sezione "Esperimento *DOSY*", ovvero che grazie all'interazione tra

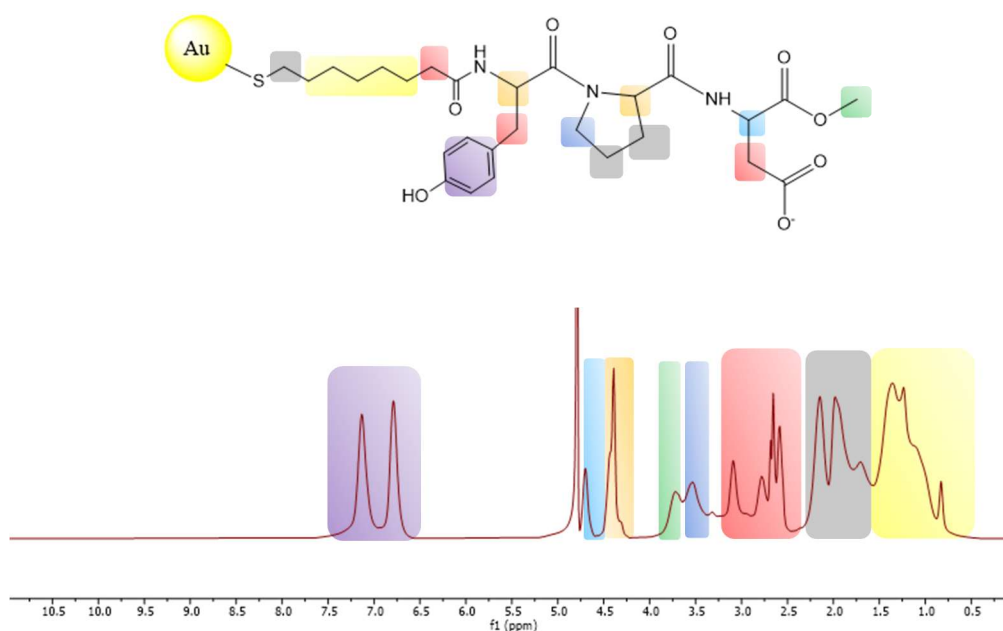
nanoparticella e analita si può misurare una variazione del coefficiente di diffusione di quest'ultimo. Tanto più forte è l'interazione, tanto maggiore sarà la variazione del coefficiente di diffusione della 3-MT rispetto al caso isolato.

Il risultato ottenuto invece in presenza di **2-AuNP** non permette di fare una stima dell'affinità tra analita e nanoparticella, questo è legato al fatto che con le concentrazioni di 3-MT utilizzate per l'analisi, il rapporto S/N non è sufficientemente elevato da poter effettuare un fitting soddisfacente. Questo risultato dimostra come la tecnica *DOSY* richiede determinate condizioni sia per quel che riguarda la forza di interazione, che in termini di sensibilità al fine di restituire risultati attendibili. Il motivo per il quale non è stato provato un ulteriore aumento di concentrazione di 3-MT in presenza di **2-AuNP** è legato al fatto che un'eccessiva presenza di analita provoca la saturazione della nanoparticella, condizione che porterebbe a misurare non più il coefficiente di diffusione apparente della specie di interesse, bensì in pratica il coefficiente di diffusione della sola nanoparticella. Questo si vede anche graficamente quando i picchi nella mappa *DOSY* relativi alla 3-MT iniziano ad avvicinarsi troppo (rispetto alla dimensione di diffusione) a quelli della nanoparticella. Già con **1-AuNP** (Fig. 55) si è raggiunto in pratica il limite al di sopra del quale si sarebbe ricaduti nella problematica citata poc'anzi, per questo motivo la concentrazione di 3-MT non poteva essere ulteriormente aumentata al di sopra di 0.25 mM.

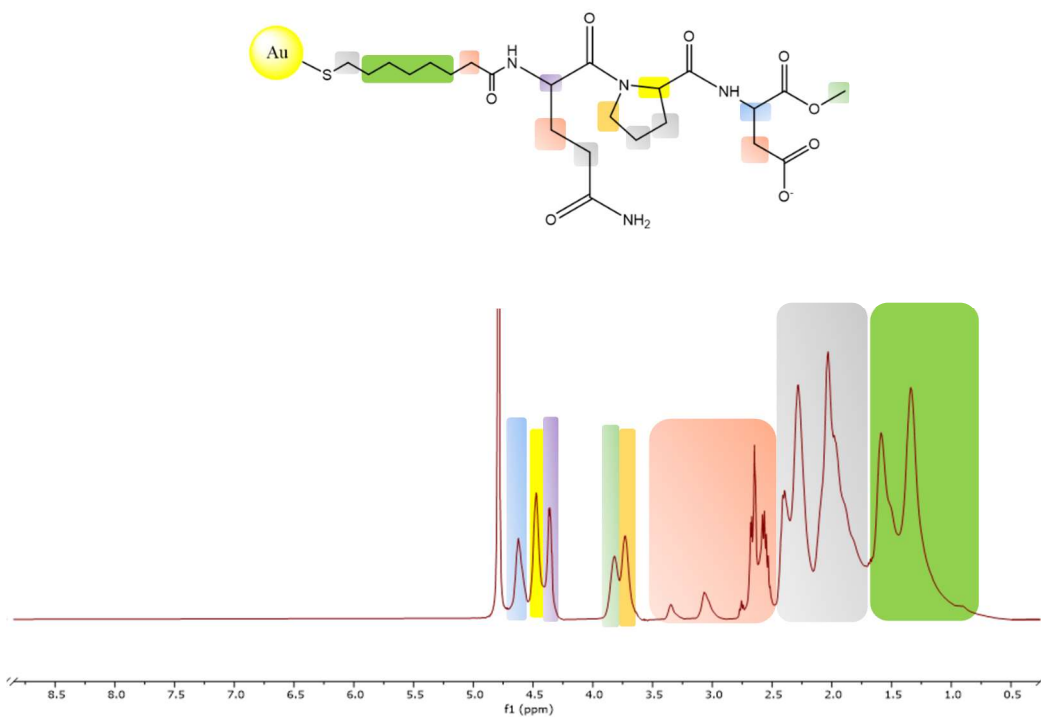
## 7. Nanoparticelle d'oro tripeptidiche

### 7.1 Spettri $^1\text{H-NMR}$

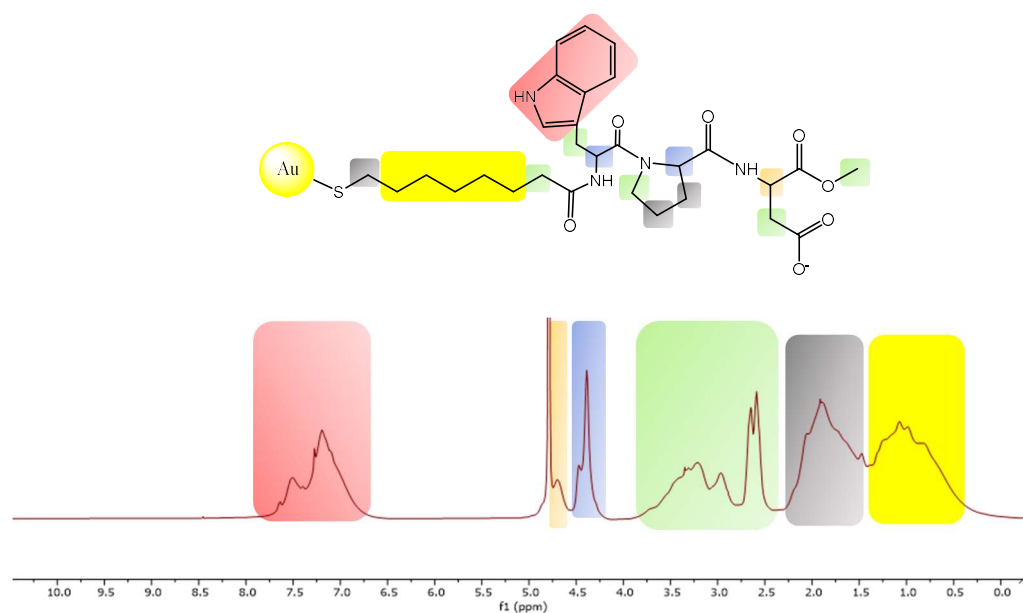
I dettagli della sintesi dei tripeptidi e delle successive nanoparticelle sono riportati nelle sezioni 10.1.4 e 10.2.1. Di seguito vengono riportati gli spettri  $^1\text{H-NMR}$ , con le relative assegnazioni, delle nanoparticelle ottenute. I tre tripeptidi sono costituiti da due amminoacidi esterni fissi Asp(OMe) e Pro, mentre quello che cambiava era l'amminoacido interno: Tyr, Gln e Trp.



**Figura 56:** Spettro  $^1\text{H}$  in  $\text{D}_2\text{O}$  di **4-AuNP** costituite partendo dall'esterno da Asp (OMe), Pro, Tyr e *spacer* alchilico C-8.



**Figura 57:** Spettro  $^1\text{H}$  in  $\text{D}_2\text{O}$  di **5-AuNP** costituite partendo dall'esterno da Asp(OMe), Pro, Gln e *spacer* alchilico C-8.



**Figura 58:** Spettro  $^1\text{H}$  in  $\text{D}_2\text{O}$  di **6-AuNP** costituite partendo dall'esterno da Asp(OMe), Pro, Trp e *spacer* alchilico C-8.

Si fa notare la maggior complessità degli spettri rispetto alle nanoparticelle solfonate.

Anche in questo caso, l'allargamento dei segnali e la conseguente perdita della struttura iperfine nel legante sono caratteristiche tipiche del grafting sulle nanoparticelle.

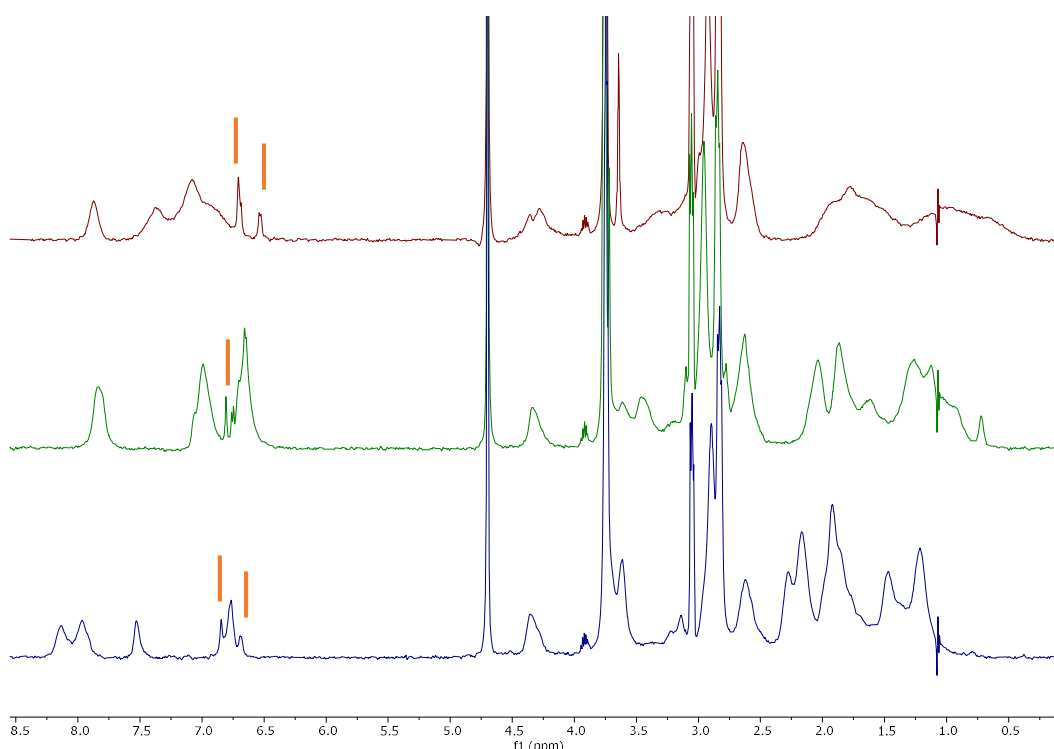


## 7.2 Spettri *HP-wSTD*

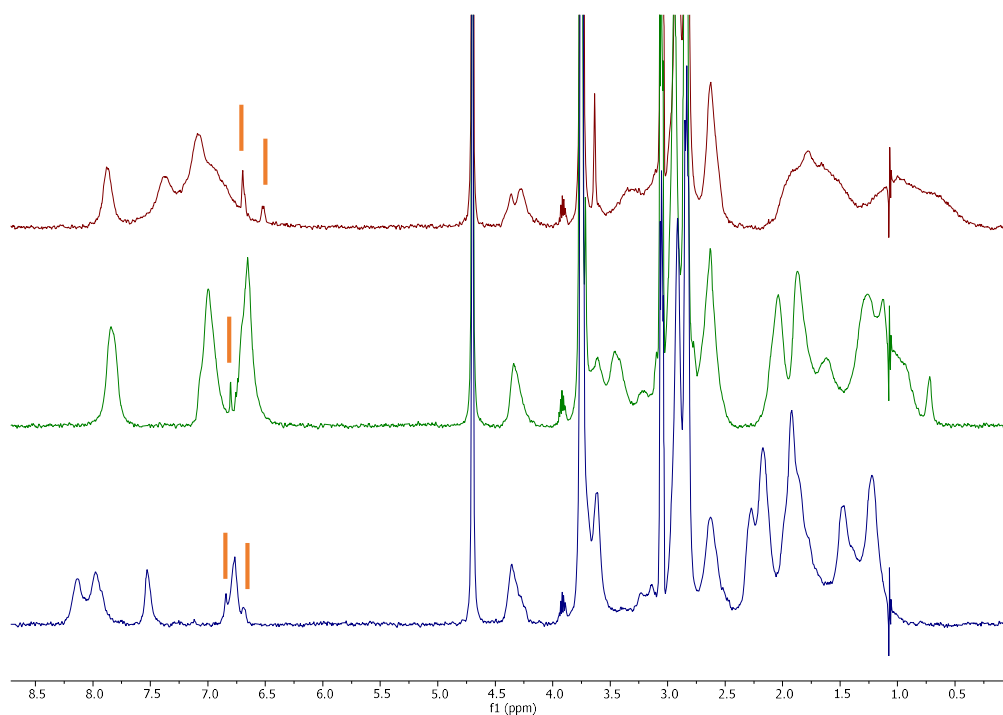
In questa sezione vengono riportati i risultati ottenuti da esperimenti *HP-wSTD* per le nanoparticelle tripeptidiche. Sono state testate, come nel caso delle nanoparticelle solfonate, sia diverse concentrazioni in tiolo, che diverse concentrazioni di analita. I campioni erano così costituiti:

- AuNPs tripeptidiche, concentrazioni in tiolo 0.5 mM e 0.05 mM;
- 3-MT, concentrazioni 100, 50 e 25  $\mu$ M;
- HEPES, concentrazione 1 mM;
- H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O 9:1.

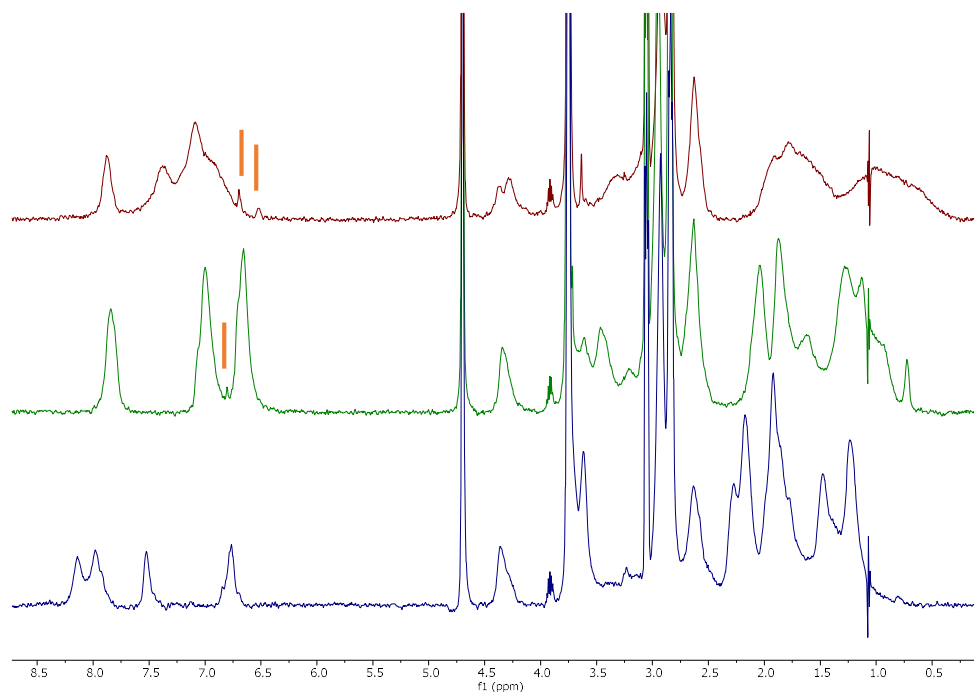
Verranno prima riportati gli spettri relativi ad AuNPs con concentrazione in tiolo pari a 0.5 mM e successivamente quelli relativi alla concentrazione 0.05 mM. Si fa notare che nel caso 0.5 mM non è stato possibile riportare il rapporto segnale rumore a causa della sovrapposizione tra i segnali della 3-MT e quelli del tripeptide, in particolar modo appartenenti ai gruppi –NH che non erano presenti (a causa dello scambio chimico) nello spettro registrato in sola D<sub>2</sub>O.



**Figura 59:** Spettri *HP-wSTD* in presenza di HEPES 1 mM, 3-MT 100  $\mu$ M e 0.5 mM in tiolo di **6-AuNP** (rosso), **4-AuNP** (verde), **5-AuNP** (blu). I segnali della 3-MT sono indicati da stanghette arancioni.



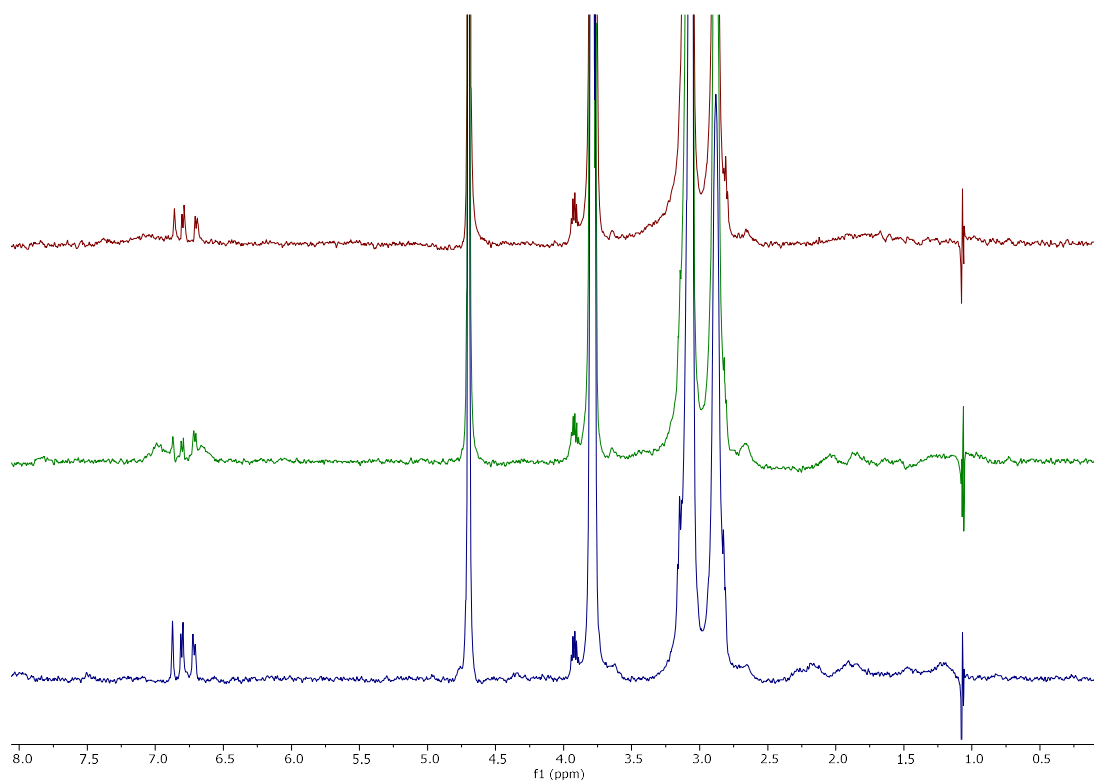
**Figura 60:** Spettri *HP-wSTD* in presenza di HEPES 1 mM, 3-MT 50  $\mu$ M e 0.5 mM in tiolo di **6-AuNP** (rosso), **4-AuNP** (verde), **5-AuNP** (blu). I segnali della 3-MT sono indicati da stanghette arancioni.



**Figura 61:** Spettri *HP-wSTD* in presenza di HEPES 1 mM, 3-MT 25  $\mu$ M e 0.5 mM in tiolo di **6-AuNP** (rosso), **4-AuNP** (verde), **5-AuNP** (blu). I segnali della 3-MT sono indicati da stanghette arancioni.

Questa problematica sovrapposizione tra i segnali dell'analita e delle nanoparticelle non era prevedibile a priori, in quanto non si conosceva il valore di chemical shift dei segnali dei gruppi -NH in queste specifiche condizioni sperimentali.

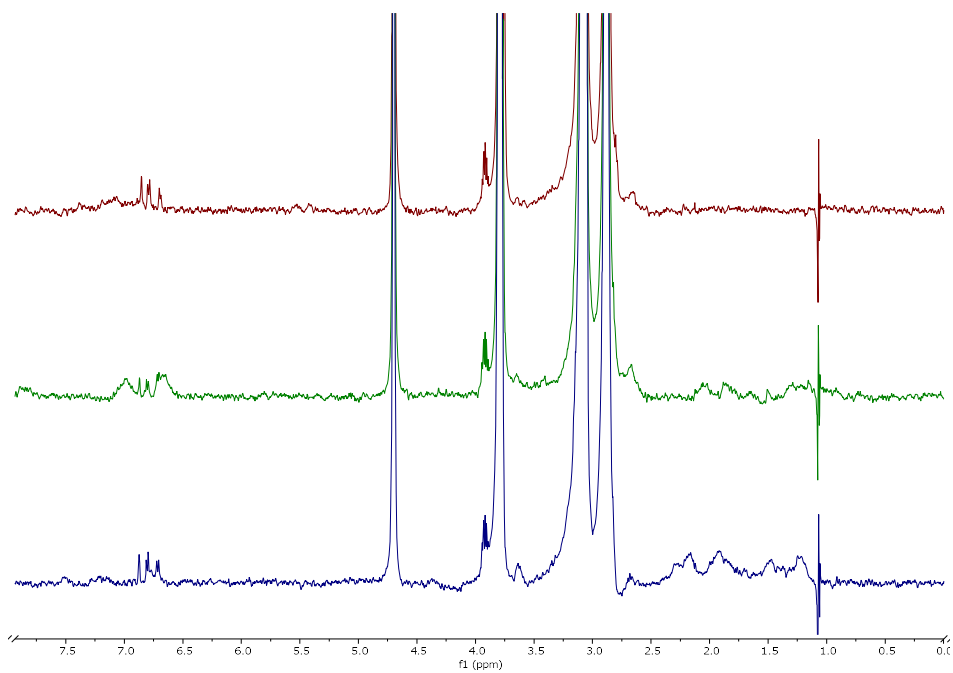
Vengono riportati di seguito gli spettri *HP-wSTD* con nanoparticella in concentrazione di tiolo pari a 0.05 mM.



**Figura 62:** Spettri *HP-wSTD* in presenza di HEPES 1 mM, 3-MT 100  $\mu$ M e 0.05 mM in tiolo di **6-AuNP** (rosso), **4-AuNP** (verde), **5-AuNP** (blu).

Tabella 9: Rapporti segnale rumore relativi al segnale a 6.85 ppm della 3-MT 100  $\mu$ M in presenza di **6-AuNP**, **4-AuNP** e **5-AuNP**.

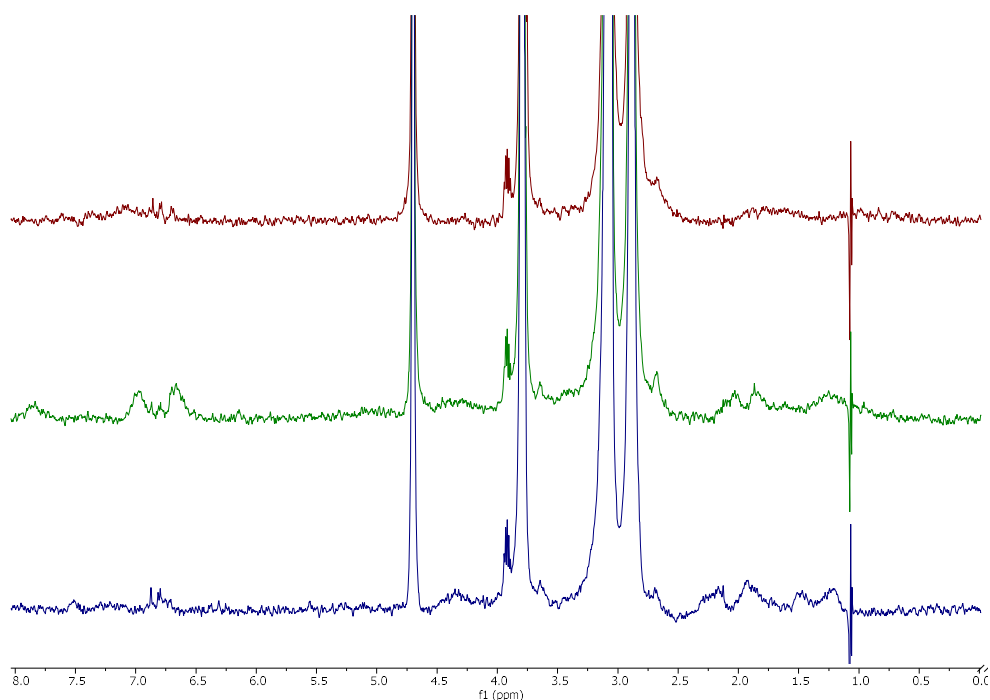
S/N
15.76
12.77
20.69



**Figura 63:** Spettri *HP-wSTD* in presenza di HEPES 1 mM, 3-MT 50  $\mu$ M e 0.05 mM in tiolo di **6-AuNP** (rosso), **4-AuNP** (verde), **5-AuNP** (blu).

Tabella 10: Rapporti segnale rumore relativi al segnale a 6.85 ppm della 3-MT 50  $\mu$ M in presenza di **6-AuNP**, **4-AuNP** e **5-AuNP**.

S/N
10.41
6.10
8.41



**Figura 64:** Spettri *HP-wSTD* in presenza di HEPES 1 mM, 3-MT 25  $\mu$ M e 0.05 mM in tiolo di **6-AuNP** (rosso), **4-AuNP** (verde), **5-AuNP** (blu).

Tabella 11: Rapporti segnale rumore relativi al segnale a 6.85 ppm della 3-MT 25  $\mu$ M in presenza di **6-AuNP**, **4-AuNP** e **5-AuNP**.

S/N
5.11
N.D.
4.44

Come si può apprezzare dai valori dei rapporti S/N relativi al picco più intenso della 3-MT situato a 6.85 ppm, tutte e tre le nanoparticelle tripeptidiche mostrano dei buoni risultati a concentrazioni di analita pari a 100  $\mu$ M, in particolar modo le **5-AuNP**. Scendendo di concentrazione, **5-AuNP** perde in termini di valore del rapporto S/N maggiormente rispetto a **4-AuNP** e **6-AuNP**, anche se mostra comunque dei risultati migliori rispetto a **4-AuNP**. **6-AuNP** è la nanoparticella che mostra i risultati più incoraggianti a concentrazione di 3-MT 50  $\mu$ M. Arrivando a concentrazione 25  $\mu$ M di analita le uniche due nanoparticelle che mostrano ancora dei segnali per 3-MT sono **6-AuNP** e **5-AuNP**. Si può notare ancora, come nel caso delle nanoparticelle solfonate, che al diminuire della concentrazione di 3-MT la diminuzione del rapporto S/N non abbia un andamento perfettamente lineare, specialmente passando da 100 a 50  $\mu$ M. Riassumendo, a concentrazione pari a 100  $\mu$ M **5-AuNP** è la nanoparticella che

fornisce i risultati migliori, mentre alle altre concentrazioni funziona meglio **6-AuNP**. **4-AuNP** risulta essere la nanoparticella meno promettente fra le tre per esperimenti di questo tipo.

Confrontando le nanoparticelle solfonate e tripeptidiche, entrambe con concentrazioni in tiolo pari a 0.05 mM, possiamo dire che: a concentrazione di 3-MT pari a 100  $\mu$ M, la nanoparticella che mostra il maggior rapporto S/N è **2-AuNP**. A concentrazioni di 50  $\mu$ M la migliore risulta essere ancora una volta **2-AuNP**, ed infine a concentrazioni di 25  $\mu$ M **1-AuNP**, che mostra in pratica lo stesso valore del S/N di **6-AuNP**.

Sebbene non sia possibile il confronto con le nanoparticelle tripeptidiche con concentrazione in tiolo pari a 0.5 mM, i risultati migliori in termini di rapporto S/N a tutte le concentrazioni di 3-MT si hanno utilizzando **1-AuNP** con concentrazione in tiolo appunto a 0.5 mM.

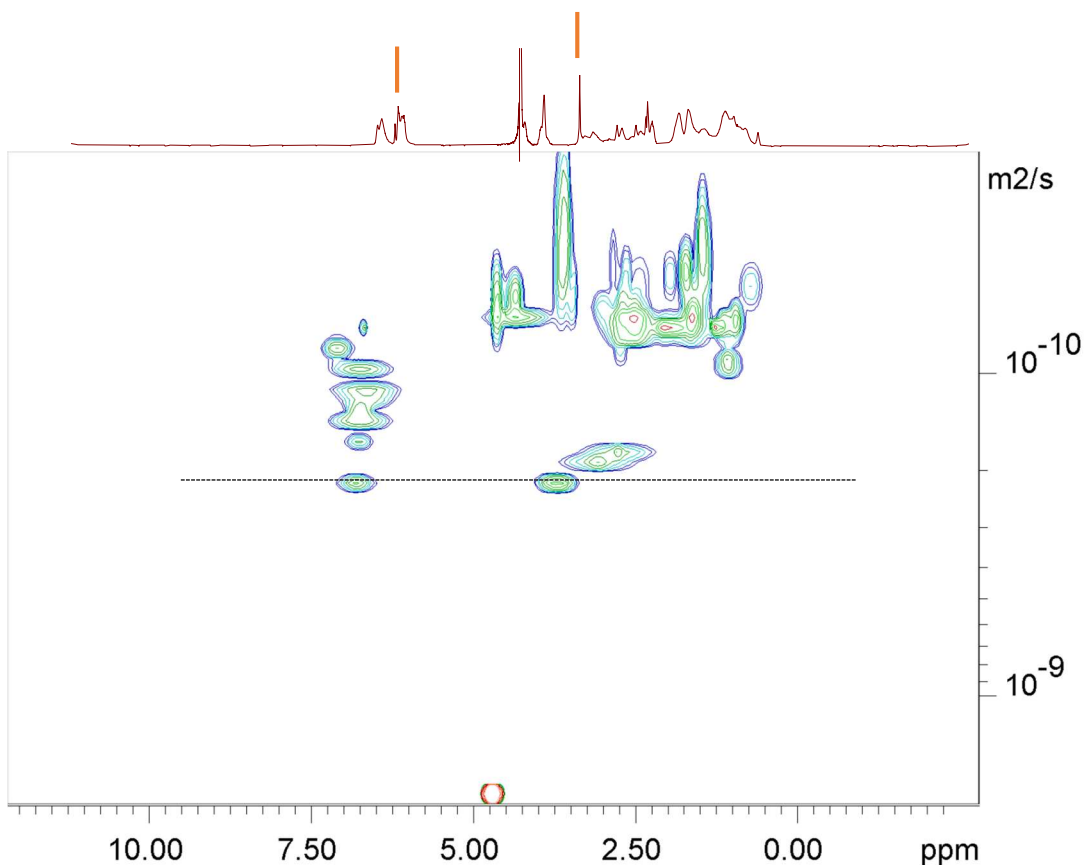
### 7.3 Spettri *DOSY*

Come nel caso delle nanoparticelle solfonate, anche con le nanoparticelle tripeptidiche sono stati registrati gli spettri *DOSY*. Questa volta però la difficoltà maggiore riscontrata, come si vedrà a breve, non è dovuta tanto alla sensibilità, bensì alla sovrapposizione tra i segnali dell'analita con quelli della nanoparticella. Una delle maggiori problematiche della tecnica *DOSY* è appunto legata alla sovrapposizione tra i segnali, condizione che provoca l'ottenimento di un coefficiente di diffusione "mediato" che non rappresenta quello effettivo della specie di interesse. I campioni per questa tipologia di analisi erano così costituiti:

- AuNPs concentrazione in tiolo 2 mM;
- 3-MT in concentrazione 0.5 mM;
- Tampone fosfato in concentrazione 1 mM;
- D<sub>2</sub>O.

La scelta del tampone fosfato è legata di nuovo al fatto che non esibisce segnali nello spettro NMR, condizione favorevole vista la già notevole presenza di segnali relativi alla nanoparticella.

Lo spettro *DOSY* relativo alla 3-MT in assenza di nanoparticelle è riportato nella sezione 6.3. Il primo spettro ottenuto in presenza di **4-AuNP** è riportato di seguito:



**Figura 65:** Mappa *DOSY* in  $D_2O$  ottenuto con 3-MT 0.5 mM, fosfato 1 mM e **4-AuNP** 2 mM. I segnali della 3-MT sono marcati con delle stanghette arancioni.

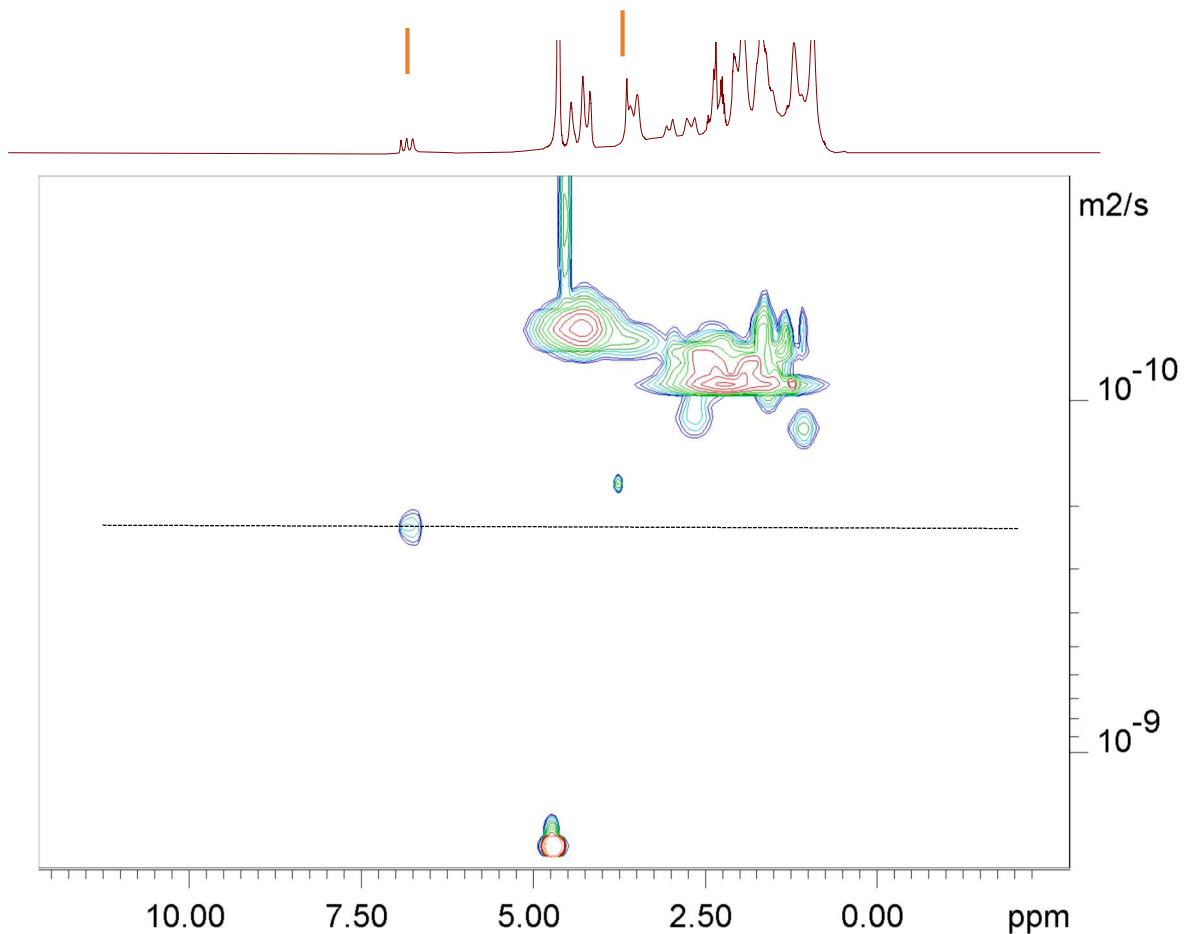
Considerando il segnale a 3.71 ppm appartenente al  $CH_3$  del metossido della 3-MT, il fitting con l'equazione di Stejskal-Tanner ha restituito il seguente coefficiente di diffusione:

Tabella 12: Coefficiente di diffusione ottenuto attraverso il fitting con l'equazione di Stejskal-Tanner del segnale a 3.71 ppm della 3-MT.

Chemical shift (ppm)	D ( $m^2/s$ )	Errore
3.71	$2.25 \times 10^{-10}$	$0.02 \times 10^{-10}$

La scelta di utilizzare il segnale della 3-MT a 3.71 ppm anziché quello a 6.69 per il fitting, è legata al maggior rapporto S/N del segnale e alla minor sovrapposizione con i segnali della nanoparticella.

Il risultato ottenuto in presenza di **5-AuNP** è:



**Figura 66:** Mappa *DOSY* in  $D_2O$  ottenuto con 3-MT 0.5 mM, fosfato 1 mM e 5-AuNP 2 mM. I segnali della 3-MT sono marcati con delle stanghette arancioni.

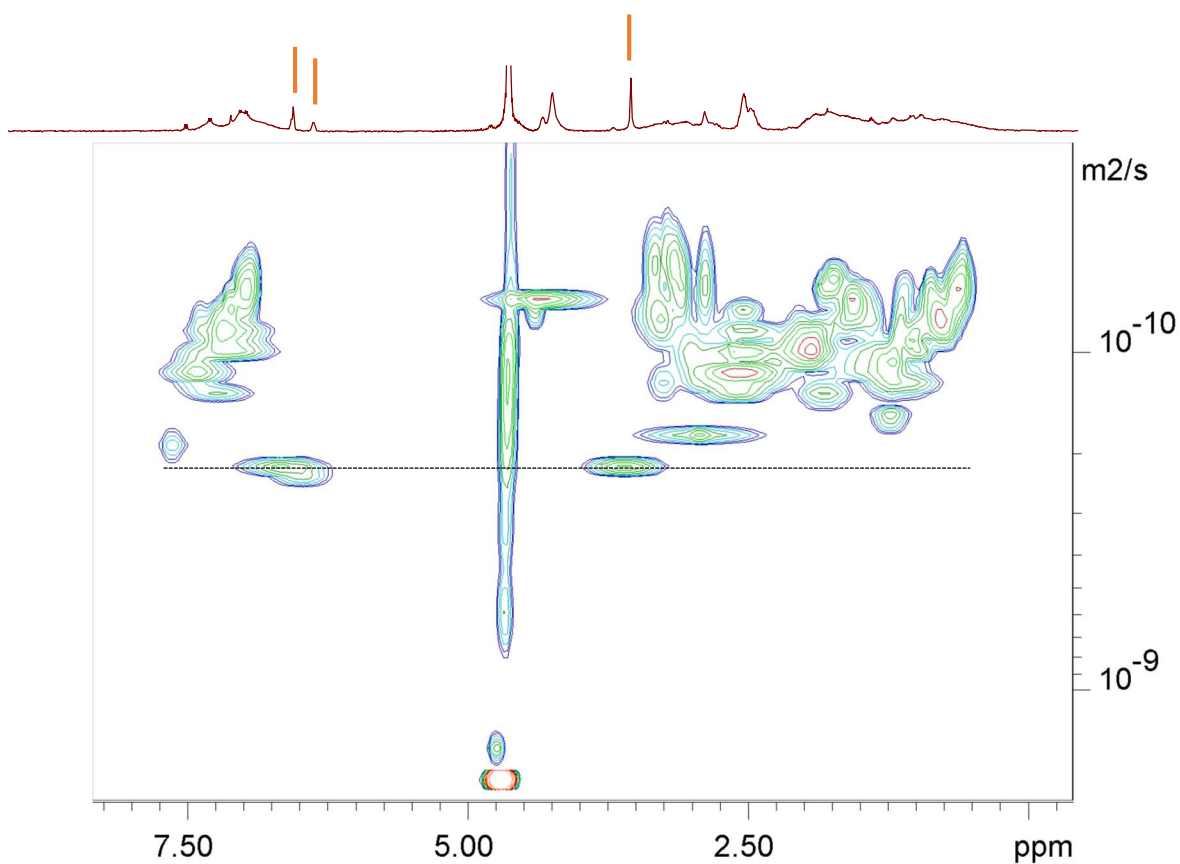
È evidente che in questo caso per il fitting non può essere utilizzato il segnale del metossido della 3-MT a circa 3.7 ppm, in quanto la sovrapposizione con i segnali della nanoparticella è tale da fornire un coefficiente di diffusione mediato, che non rispecchia quello effettivo dell'analita (si noti di quanto si discosta la posizione rispetto alla dimensione di diffusione di tale segnale, rispetto a quelli della regione aromatica 6.69 ppm). Sfruttando quindi il segnale a 6.69 ppm appartenente al protone aromatico dell'analita, il fitting con l'equazione di Stejskal-Tanner ha restituito il seguente coefficiente di diffusione:



Tabella 13: Coefficiente di diffusione ottenuto attraverso il fitting con l'equazione di Stejskal-Tanner del segnale a 6.69 ppm della 3-MT.

Chemical shift (ppm)	D (m <sup>2</sup> /s)	Errore
6.69	$2.31 \times 10^{-10}$	$0.23 \times 10^{-10}$

Il risultato in presenza di **6-AuNP** è:



**Figura 67:** Mappa *DOSY* in D<sub>2</sub>O ottenuto con 3-MT 0.5 mM, fosfato 1 mM e **6-AuNP** 2 mM. I segnali della 3-MT sono marcati con delle stanghette arancioni.

Considerando il segnale a 3.60 ppm appartenente al CH<sub>3</sub> del metossido della 3-MT, il fitting con l'equazione di Stejskal-Tanner ha restituito il seguente coefficiente di diffusione:

Tabella 14: Coefficiente di diffusione ottenuto attraverso il fitting con l'equazione di Stejskal-Tanner del segnale a 3.60 ppm della 3-MT.

Chemical shift (ppm)	D (m <sup>2</sup> /s)	Errore
3.60	2.19 x 10 <sup>-10</sup>	0.02 x 10 <sup>-10</sup>

La scelta di utilizzare il segnale della 3-MT a 3.60 ppm anziché quello a 6.69 per il fitting, è legata al maggior rapporto S/N e quindi, al minor errore associato.

Confrontando i coefficienti di diffusione per l'analita ottenuti in presenza delle tre nanoparticelle tripeptidiche con quello relativo alla 3-MT in assenza di nanoparticelle ( $5.63 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ ), si può dire che l'analita è stato rallentato all'incirca 2.5 volte nella sua diffusione. Da questi risultati ottenuti sperimentalmente possiamo trarre alcune conclusioni: visti i valori molto simili dei coefficienti di diffusione dell'analita in presenza delle tre nanoparticelle tripeptidiche si può dire che l'affinità tra quest'ultime e la 3-MT è circa la stessa. Confrontando questi valori ottenuti per le AuNPs tripeptidiche, con quello ottenuto per **1-AuNP** ( $1.29 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ ), si può notare come per la nanoparticella solfonata vi sia una maggiore affinità per l'analita. Questa maggiore affinità, come ribadito in precedenza, si traduce in una maggiore variazione del coefficiente di diffusione dell'analita. Questa marcata affinità tra la nanoparticella solfonata e la 3-MT potrebbe spiegare le migliori prestazioni dal punto di vista del *chemosensing* (ottenute negli spettri *HP-wSTD*) di **1-AuNP**.

## 8. Conclusioni

Lo scopo di questo progetto di Tesi era quello di affermare l'utilizzo della tecnica NMR *chemosensing* assistita da nanoparticelle d'oro opportunamente funzionalizzate, per la profilazione di marker del neuroblastoma; tale malattia allo stato attuale viene diagnosticata con tecniche di imaging, ed istopatologiche.

Lo studio si è concentrato sulla 3-MT, un metabolita promettente che permetterebbe non solo di capire la risposta dell'organismo alla terapia, bensì anche di discriminare in maniera non ambigua lo stato più avanzato della malattia. Il fatto che questo analita in soluzioni a pH=7 presenti il gruppo amminico protonato risulta essere un vantaggio, poiché si può sfruttare l'interazione elettrostatica con un opportuno sensore carico negativamente ai fini della sua rivelazione. Sono state sintetizzate e testate sei nanoparticelle d'oro funzionalizzate: tre presentavano un gruppo solfonato terminale e una diversa lunghezza della catena alchilica (9,12 e 15 atomi di carbonio), mentre le altre tre presentavano diversi tripeptide legati alla nanoparticella tramite un opportuno spacer alchilico di otto atomi di carbonio. I tre tripeptidi sono costituiti da due amminoacidi fissi, partendo dall'esterno Asp(OMe), Pro e quello che cambiava era l'amminoacido più interno legato allo spacer alchilico, rispettivamente Tyr, Gln e Trp. La scelta precisa di testare queste nanoparticelle rispetto ad altre, è frutto di studi di dinamica molecolare curati dal Dr. De Vivo (IIT Genova).

Le nanoparticelle ottenute sono state per prima cosa sottoposte a test di *chemosensing* sfruttando l'esperimento *HP-wSTD*; tali esperimenti sono stati eseguiti sia in condizioni di diversa concentrazione di 3-MT, che di diversa concentrazione in tiolo delle nanoparticelle. I risultati sperimentali hanno dimostrato che la nanoparticella più promettente dal punto di vista dei valori del rapporto S/N per test di *chemosensing*, con concentrazione in tiolo di 0.5 Mm e a tutte e tre le concentrazioni di 3-MT, risulta essere **1-AuNP**. A concentrazioni minori in tiolo (0.05 mM) anche le altre nanoparticelle hanno mostrato dei valori incoraggianti del rapporto S/N per la 3-MT. In particolare, a concentrazione di analita 100 e 50  $\mu$ M, quella che fornisce i migliori risultati è **2-AuNP**. Invece a concentrazione di analita pari a 25  $\mu$ M **1-AuNP**, **5-AuNP** e **6-AuNP** forniscono dei risultati molto simili tra loro. **3-AuNP** si è rivelata essere non adeguata per test di *chemosensing* a causa dell'eccessiva interazione con la 3-MT, condizione che ha portato a non avere alcuna presenza dei segnali di quest'ultima nello spettro *HP-wSTD*.

Le nanoparticelle sono state successivamente sottoposte ad esperimenti *DOSY* al fine di ricavare l'affinità tra il sensore e la 3-MT. I risultati hanno mostrato che **1-AuNP** risulta avere una affinità molto maggiore con l'analita rispetto alle nanoparticelle tripeptidiche, questa informazione è stata ottenuta grazie alla variazione del coefficiente di diffusione della 3-MT in assenza e in presenza delle nanoparticelle. **2-AuNP** non ha fornito risultati attendibili in questo tipo di esperimento a causa di problemi di sensibilità, situazione che non poteva essere risolta con il semplice aumento della concentrazione di 3-MT. Infine **3-AuNP** non è stato testato a causa dell'eccessiva interazione con l'analita. Il *DOSY*, oltre che a soffrire di problemi di sensibilità, si è rivelata essere una tecnica che richiede un elevato controllo delle condizioni al fine di ottenere dei risultati attendibili; in particolar modo la limitazione maggiore consiste nell'aver una forza di interazione ben precisa tra analita e nanoparticella, che deve essere né troppo forte e né troppo debole. Per tali motivazioni l'implementazione effettiva di questa tecnica per l'analisi di miscele complesse assistita da nanoparticelle d'oro funzionalizzate, risulta essere complicata e lontana dall'utilizzo di *routine*.

Visti i risultati incoraggianti ottenuti per le nanoparticelle oggetto di studio per questo lavoro di Tesi, si auspica la possibilità di testarle non in campioni costruiti ad *hoc*, bensì in campioni reali di urina di pazienti affetti da neuroblastoma. Questo per verificare sia la capacità delle nanoparticelle di essere selettive nei confronti della 3-MT in presenza di altre specie, che di riuscire a mostrare dei segnali dell'analita nello spettro *HP-wSTD* alle concentrazioni effettive in cui è presente nelle urine.

## 9. Materiali e metodi

Tutti i reagenti ed i solventi disponibili commercialmente sono stati utilizzati senza ulteriore purificazione. I reagenti sono stati acquistati dalla Merck, ad eccezione dell'1,15 dibromopentadecano e degli amminoacidi protetti che sono stati acquistati da BLDpharm, infine la resina Amberlite™ IR120 H che viene venduta da Fischer Scientific.

Le analisi con TLC (Cromatografia su strato sottile) sono state effettuate utilizzando lastre con supporto di alluminio precaricate con gel di silice Merck 60 F<sub>254</sub>. Le colonne cromatografiche sono state caricate con silice Kieselgel 60M (230-400 mesh).

Tutti gli spettri NMR sono stati acquisiti utilizzando lo spettrometro Bruker Avance III 500 che opera a 500.13 MHz per il <sup>1</sup>H e 125.8 MHz per il <sup>13</sup>C. La molteplicità dei segnali viene riportata come: s= singoletto, d= doppietto, t= tripletto, q= quartetto, p= quintetto, dd= doppietto di doppietti, ddt= doppietto di doppietti di tripletto, m=multipletto.

Gli spettri *DOSY* sono stati ottenuti grazie al software *dync (dynamic center)* della Bruker.

Le analisi ESI-MS sono state effettuate utilizzando uno spettrometro di massa Agilent Technologies LC/MSD Trap SL.

Gli spettri UV-Vis sono stati registrati utilizzando uno spettrometro Agilent Technologies Cary 60 e cuvette in quarzo da 1 cm. Il campione per l'analisi è costituito da una soluzione 0.1 mg/mL delle nanoparticelle d'oro in acqua Milliq.

Le analisi TGA sono state effettuate utilizzando lo strumento Q5000 IR model TA, con riscaldamento da 30 °C a 1000 °C sotto flusso d'aria e con un pan in platino. Il campione per l'analisi è stato preparato partendo da una soluzione a concentrazione nota di AuNPs in D<sub>2</sub>O. Da tale soluzione sono stati prelevati 20 µL e sono stati depositati sul pan, successivamente il solvente è stato allontanato per riscaldamento ad una temperatura di 80 °C. Il residuo rimasto sul pan è costituito da nanoparticelle funzionalizzate che andranno sottoposte ad analisi TGA. Generalmente la massa di nanoparticelle caricate sul pan variava da 0.2 a 0.5 mg.

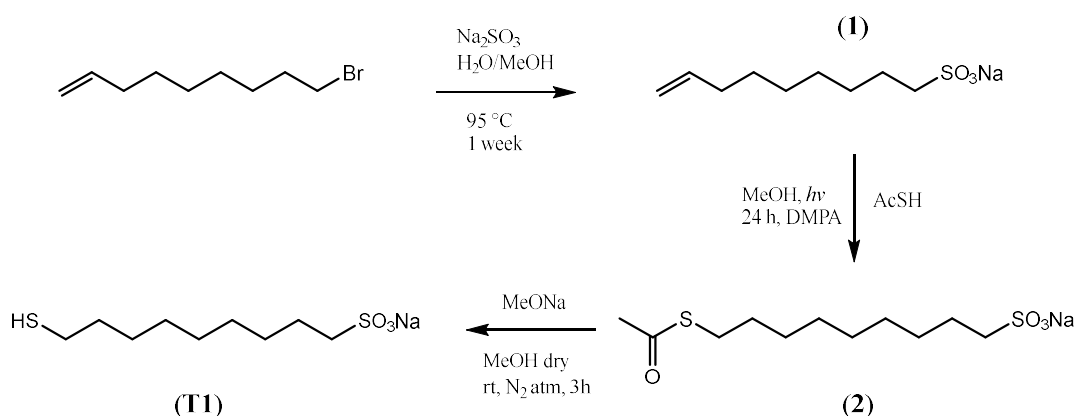
Le immagini TEM sono state registrate tramite uno strumento Jeol JEM-2100 Plus *electron microscope* che lavora a 200 kV. Il campione per l'analisi è stato preparato depositando una goccia di soluzione diluita di nanoparticelle in H<sub>2</sub>O Milliq (concentrazione circa 5 mM) su una

griglia di rame conduttiva, lasciando evaporare il solvente all'aria. Le immagini sono state successivamente analizzate con il software ImageJ per misurare le dimensioni delle nanoparticelle.

## 10. Parte sperimentale

### 10.1 Sintesi tioli

#### 10.1.1 Sintesi tiolo solfonato T1



#### Non-8-ene-1-solfonato di sodio (1)

In un provettone da 20 mL con tappo a vite è stato disciolto il 9-bromo-1-nonene (0.446 mL, 2.473 mmol, 1 equiv.) in una miscela di 4.5 mL di MeOH e 10 mL di H<sub>2</sub>O, successivamente è stato aggiunto Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> (0.6144 g, 4.875 mmol, 2 equiv.). Il provettone opportunamente chiuso con il tappo a vite è stato immerso in un bagno di sabbia alla temperatura di 95 °C per 1 settimana sotto agitazione magnetica. Dopo aver controllato che la reazione fosse andata a completezza tramite TLC, il solvente è stato rimosso tramite evaporazione a pressione ridotta. Il solido bianco ottenuto è stato sciolto in MeOH a caldo e successivamente filtrato, questo al fine di permettere la separazione del prodotto (solubile in MeOH a caldo) dai sali prodotti

dalla reazione (principalmente NaBr, insolubile in MeOH a caldo). La soluzione è stata successivamente evaporata a pressione ridotta fornendo il prodotto **(1)** (0.429 g, 77%).

**<sup>1</sup>H NMR** (500 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 5.93 (ddt, *J* = 17.0, 10.2, 1H, H<sub>2</sub>C=CH-R), 5.06 (dd, *J* = 17.0, 1H, H<sub>2</sub>C=CH-R), 4.96 (dd, *J* = 10.2, 1H, H<sub>2</sub>C=CH-R), 2.90 (t, 2H, R-CH<sub>2</sub>-SO<sub>3</sub><sup>-</sup> Na<sup>+</sup>), 2.06 (q, *J* = 7.0 Hz, 2H, H<sub>2</sub>C=CH-CH<sub>2</sub>-R), 1.73 (p, 2H, R-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-SO<sub>3</sub><sup>-</sup> Na<sup>+</sup>), 1.45 – 1.30 (m, 8H, catena alifatica).

**<sup>13</sup>C-NMR** (126 MHz, DMSO) δ 139.3 (1C, H<sub>2</sub>C=CH-R), 115.1 (1C, H<sub>2</sub>C=CH-R), 52.0 (1C, R-CH<sub>2</sub>-SO<sub>3</sub><sup>-</sup> Na<sup>+</sup>), 33.6 (1C, H<sub>2</sub>C=CH-CH<sub>2</sub>-R), 25.6 (1C, R-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-SO<sub>3</sub><sup>-</sup> Na<sup>+</sup>), 29.2, 28.9, 28.8, 8.0 (4C, CH<sub>2</sub> catena alifatica).

**MS** (ESI) *m/z*: 204.9 ([M-Na]<sup>-</sup>).

### 9-(acetiltio)nonan-1-solfonato di sodio (**2**)

Il composto **(1)** (0.1 g, 0.438 mmol, 1 equiv.) è stato inserito all'interno di una cuvetta in quarzo da reazione e successivamente sciolto in 2 mL di MeOH preventivamente degasato. Dopodiché sono stati aggiunti il fotoiniziatore DMPA (2,2-dimetossi-2-fenilacetofenone, 27 mg, 0.105 mmol, 0.24 equiv.) e l'acido tioacetico (0.274 mL, 3.942 mmol, 9 equiv.). Il tutto è stato successivamente esposto ad una lampada UV per 19 ore sotto agitazione magnetica. Al termine della reazione il solvente è stato rimosso per evaporazione a pressione ridotta, fornendo un solido bianco con delle sfumature gialle. Il prodotto è stato successivamente purificato lavando più volte il solido con Et<sub>2</sub>O e, attraverso filtrazione con gooch, è stato possibile isolare un solido bianco (97 mg, 73%).

**<sup>1</sup>H NMR** (500 MHz, DMSO) δ 2.82 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H, CH<sub>3</sub>-C(O)-S-CH<sub>2</sub>-R), 2.39 (t, *J* = 7.7 Hz, 2H, Na<sup>+</sup> SO<sub>3</sub><sup>-</sup>-CH<sub>2</sub>-R), 2.31 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-C(O)-S-CH<sub>2</sub>-R), 1.58 – 1.44 (m, 4H, CH<sub>3</sub>-C(O)-S-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-R + Na<sup>+</sup> SO<sub>3</sub><sup>-</sup>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-R), 1.31 – 1.20 (m, 10H, catena alifatica).

**<sup>13</sup>C-NMR** (126 MHz, DMSO) δ 195.8 (1C, CH<sub>3</sub>-C(O)-S-R), 51.9 (1C, R-CH<sub>2</sub>-SO<sub>3</sub><sup>-</sup> Na<sup>+</sup>), 31.1 (1C, CH<sub>3</sub>-C(O)-S), 28.8 (1C, CH<sub>3</sub>-C(O)-S-CH<sub>2</sub>-R), 29.5, 29.1 (2C, CH<sub>3</sub>-C(O)-S-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-R + Na<sup>+</sup> SO<sub>3</sub><sup>-</sup>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-R), 28.9, 28.8, 28.7, 28.5, 28.1 (5C, CH<sub>2</sub> catena alifatica).

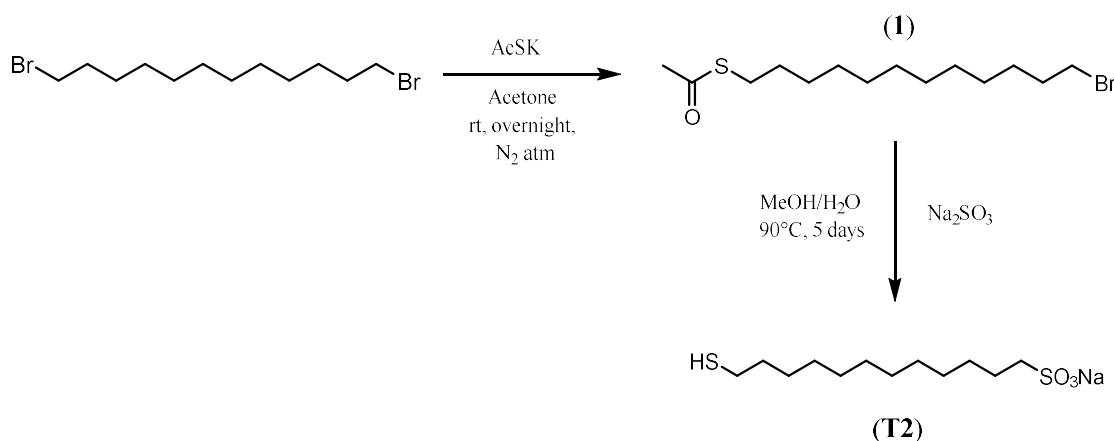
**MS** (ESI) *m/z*: 280.9 ([M-Na]<sup>-</sup>).

### 9-mercaptononan-1-solfonato di sodio (T1)

Il composto (2) (37.6 mg, 0.123 mmol, 1 equiv.) è stato sciolto all'interno di un pallone in 3 mL di MeOH dry. È stato poi aggiunto MeONa (20 mg, 0.370 mmol, 3 equiv.) e la miscela di reazione è stata lasciata in atmosfera di N<sub>2</sub> sotto agitazione magnetica per 3 ore. Al termine del quale la reazione è stata interrotta dall'aggiunta di una punta di spatola della resina a scambio cationico Amberlite™ IR120 H. Dopo l'aggiunta la miscela di reazione è stata lasciata reagire per 15 minuti in assenza di agitazione magnetica onde evitare la rottura della resina. Quest'ultima, trascorso il tempo prefissato, è stata rimossa per filtrazione e il solvente è stato evaporato a pressione ridotta.

MS (ESI) m/z: 238.9 ([M-Na]<sup>-</sup>)

#### 10.1.2 Sintesi tiolo solfonato T2



### 12-(acetiltio)dodecan-1-bromo (1)

1,12-dibromododecane (4g, 12.17 mmol, 1 equiv.) è stato sciolto in 40 mL di acetone all'interno di un pallone e a seguito di ciò è stato aggiunto il potassio tioacetato (1.3903 g, 12.17 mmol, 1 equiv.). La miscela di reazione è stata lasciata sotto agitazione magnetica e in atmosfera di azoto per tutta la notte. Il solvente è stato successivamente rimosso per evaporazione a pressione ridotta, lasciando un solido di colore marrone. Il prodotto è stato poi sciolto in DCM ed estratto 4 volte con acqua, la fase organica è stata poi anidrificata usando Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Dopo la rimozione del solvente tramite evaporazione a pressione ridotta, il prodotto



grezzo è stato purificato mediante colonna cromatografica flash (Hex:Et<sub>2</sub>O 98:2) permettendo di ottenere il prodotto (**1**) puro (1.853 g, 47%).

**<sup>1</sup>H NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 3.40 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H, R-CH<sub>2</sub>-Br), 2.88 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, CH<sub>3</sub>-C(O)-S-CH<sub>2</sub>-R), 2.33 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-C(O)-R), 1.87 (p, *J* = 7.0 Hz, 2H, R-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-Br), 1.55 (p, *J* = 7.2 Hz, 2H, CH<sub>3</sub>-C(O)-S-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-R), 1.52 – 1.10 (m, 16H, catena alifatica).

**<sup>13</sup>C NMR** (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 194.11 (1C, CH<sub>3</sub>-C(O)-S-R), 33.05 (1C, R-CH<sub>2</sub>-Br), 31.50 (1C, R-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-Br), 30.60 (1C, R-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-Br), 30.00 (1C, CH<sub>3</sub>C(O)-S-CH<sub>2</sub>-R), 29.04 – 28.86 (8C, catena alifatica), 28.57 (1C, CH<sub>3</sub>-C(O)-S-R).

### **12-mercaptododecan-1-solfonato di sodio (T2)**

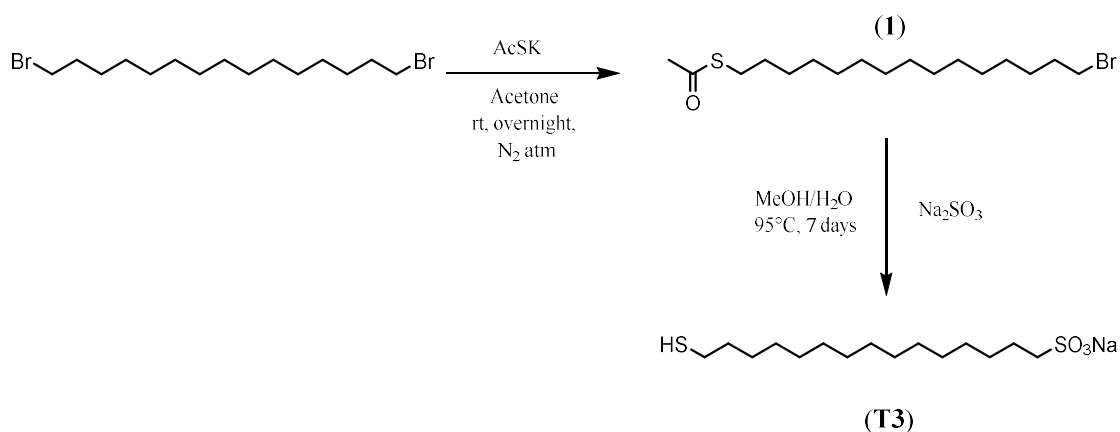
Il composto (**1**) (0.8 g, 2.477 mmol, 1 equiv.) è stato sciolto all'interno di un provettone con tappo a vite in una miscela di 10 mL di MeOH e 21 mL di H<sub>2</sub>O. A seguito di ciò è stato aggiunto Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> (0.6244 g, 4.953 mmol, 2 equiv.) e la miscela di reazione è stata immersa in un bagno di sabbia alla temperatura di 90°C per cinque giorni. Dopo aver controllato con TLC che la reazione fosse andata a completezza, il solvente è stato rimosso tramite evaporazione a pressione ridotta. Il solido bianco ottenuto è stato sciolto in EtOH a caldo e successivamente filtrato con carta da filtro. Questo è stato fatto per fare in modo di eliminare la maggior parte dei sali formati durante la reazione, alla fine è stato ottenuto (**T2**) puro (0.617 g, 81%).

**<sup>1</sup>H NMR** (500 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 2.90 (t, *J* = 8.0 Hz, 2H, R-CH<sub>2</sub>-SO<sub>3</sub><sup>-</sup> Na<sup>+</sup>), 2.55 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H, R-CH<sub>2</sub>-SH), 1.72 (p, *J* = 7.5 Hz, 2H, R-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-SO<sub>3</sub><sup>-</sup> Na<sup>+</sup>), 1.60 (p, *J* = 7.3 Hz, 2H, R-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-SH), 1.50 – 1.23 (m, 16H, catena alifatica).

**<sup>13</sup>C-NMR** (126 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 51.1 (1C, R-CH<sub>2</sub>-SO<sub>3</sub><sup>-</sup> Na<sup>+</sup>), 34.1 (1C, R-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-SH), 31.1-28.3 (8C, catena alifatica), 24.1 (1C, R-CH<sub>2</sub>-SH), 23.9 (1C, R-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-SO<sub>3</sub><sup>-</sup> Na<sup>+</sup>).

**MS** (ESI) *m/z*: 304.45 ([M-Na]).

### 10.1.3 Sintesi tiolo solfonato T3



#### 15-(acetiltio)pentadecan-1-bromo (1)

1,15-dibromododecane (3.046 mL, 10.80 mmol, 1 equiv.) è stato sciolto in 40 mL di acetone all'interno di un pallone e a seguito di ciò è stato aggiunto il potassio tioacetato (1.2345 g, 10.80 mmol, 1 equiv.). La miscela di reazione è stata lasciata sotto agitazione magnetica e in atmosfera di azoto per tutta la notte. Il solvente è stato successivamente rimosso per evaporazione a pressione ridotta, lasciando un solido di colore marrone. Il prodotto è stato poi sciolto in DCM ed estratto 4 volte con acqua, la fase organica è stata poi anidrificata usando Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Dopo la rimozione del solvente tramite evaporazione a pressione ridotta, il prodotto grezzo è stato purificato due volte mediante colonna cromatografica flash (Hex:Et<sub>2</sub>O 99:1) permettendo di ottenere il prodotto (1) puro (1.18 g, 30%).

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 3.41 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H, R-CH<sub>2</sub>-Br), 2.86 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, CH<sub>3</sub>-C(O)-S-CH<sub>2</sub>-R), 2.32 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-C(O)-S-R), 1.85 (p, *J* = 7.0 Hz, 2H, R-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-Br), 1.55 (p, *J* = 7.2 Hz, 2H, CH<sub>3</sub>-C(O)-S-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-R), 1.48 – 1.12 (m, 22H, catena alifatica).

<sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 194.21 (1C, CH<sub>3</sub>-C(O)-S-R), 33.03 (1C, R-CH<sub>2</sub>-Br), 31.54 (1C, R-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-Br), 30.61 (1C, R-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-Br), 30.12 (1C, CH<sub>3</sub>C(O)-S-CH<sub>2</sub>-R), 29.04 – 28.86 (m) (11C, catena alifatica), 28.62 (1C, CH<sub>3</sub>-C(O)-S-R).

#### 15-mercaptopentadecan-1-solfonato di sodio (T3)

Il composto (1) (0.8 g, 2.271 mmol, 1 equiv.) è stato sciolto all'interno di un provettone con tappo a vite in una miscela di 10 mL di MeOH e 21 mL di H<sub>2</sub>O. A seguito di ciò è stato aggiunto Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> (0.5749 g, 4.542 mmol, 2 equiv.) e la miscela di reazione è stata immersa in un bagno

di sabbia alla temperatura di 95°C per sette giorni. Dopo aver controllato con TLC che la reazione fosse andata a completezza, il solvente è stato rimosso tramite evaporazione a pressione ridotta. Il solido bianco ottenuto è stato sciolto in EtOH a caldo e successivamente filtrato con carta da filtro. Questo è stato fatto per fare in modo di eliminare la maggior parte dei sali formati durante la reazione, alla fine è stato ottenuto (**T3**) puro (0.650 g, 74%).

$^1\text{H NMR}$  (500 MHz, MeOD)  $\delta$  2.78 (t,  $J = 7.9$  Hz, 2H, R-CH<sub>2</sub>-SO<sub>3</sub><sup>-</sup> Na<sup>+</sup>), 2.50 (t,  $J = 7.1$  Hz, 2H, 2H, R-CH<sub>2</sub>-SH), 1.80 (p,  $J = 7.5$  Hz, 2H, R-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-SO<sub>3</sub><sup>-</sup> Na<sup>+</sup>), 1.56 (p,  $J = 7.1$  Hz, 2H, R-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-SH), 1.47 – 1.18 (m, 22H, catena alifatica).

$^{13}\text{C-NMR}$  (126 MHz, MeOD)  $\delta$  51.2 (1C, R-CH<sub>2</sub>-SO<sub>3</sub><sup>-</sup> Na<sup>+</sup>), 34.4 (1C, R-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-SH), 31.8-25.2 (11C, catena alifatica), 24.0 (1C, R-CH<sub>2</sub>-SH), 24.8 (1C, R-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-SO<sub>3</sub><sup>-</sup> Na<sup>+</sup>).

**MS** (ESI)  $m/z$ : 323.54 ([M-Na]<sup>-</sup>).

#### 10.1.4 Sintesi tioli tripeptidici T4, T5 e T6

La struttura del legante tripeptidico con cui la nanoparticella d'oro verrà funzionalizzata è schematicamente riportata in Fig. 68:

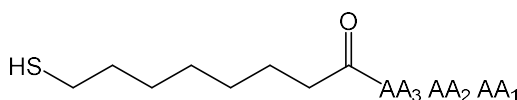
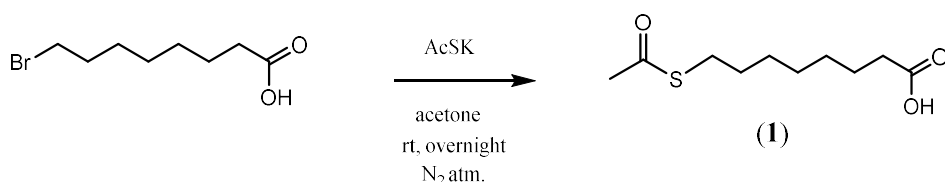


Figura 68: Struttura generale del tiolo tripeptidico.

Dal punto di vista della sintesi i diversi step prevedono: sintesi del linker, in questo caso costituito da una catena di otto atomi di carbonio, che permetterà l'ancoraggio del tripeptide alla nanoparticella. Dopodiché vi sarà la sintesi del tripeptide a partire dall'amminoacido più esterno rispetto alla catena alchilica (AA<sub>1</sub> in Fig. 68). Infine, sintetizzati linker e tripeptide, ci sarà il *coupling* tra questi ultimi e la successiva deprotezione dal gruppo protettore tioacetato presente nel linker, in modo da ottenere il tiolo deprotezionato che si legherà alla nanoparticella d'oro. Di seguito viene prima riportata la sintesi del linker e successivamente, in maniera schematica, quella per i tre diversi tripeptidi.



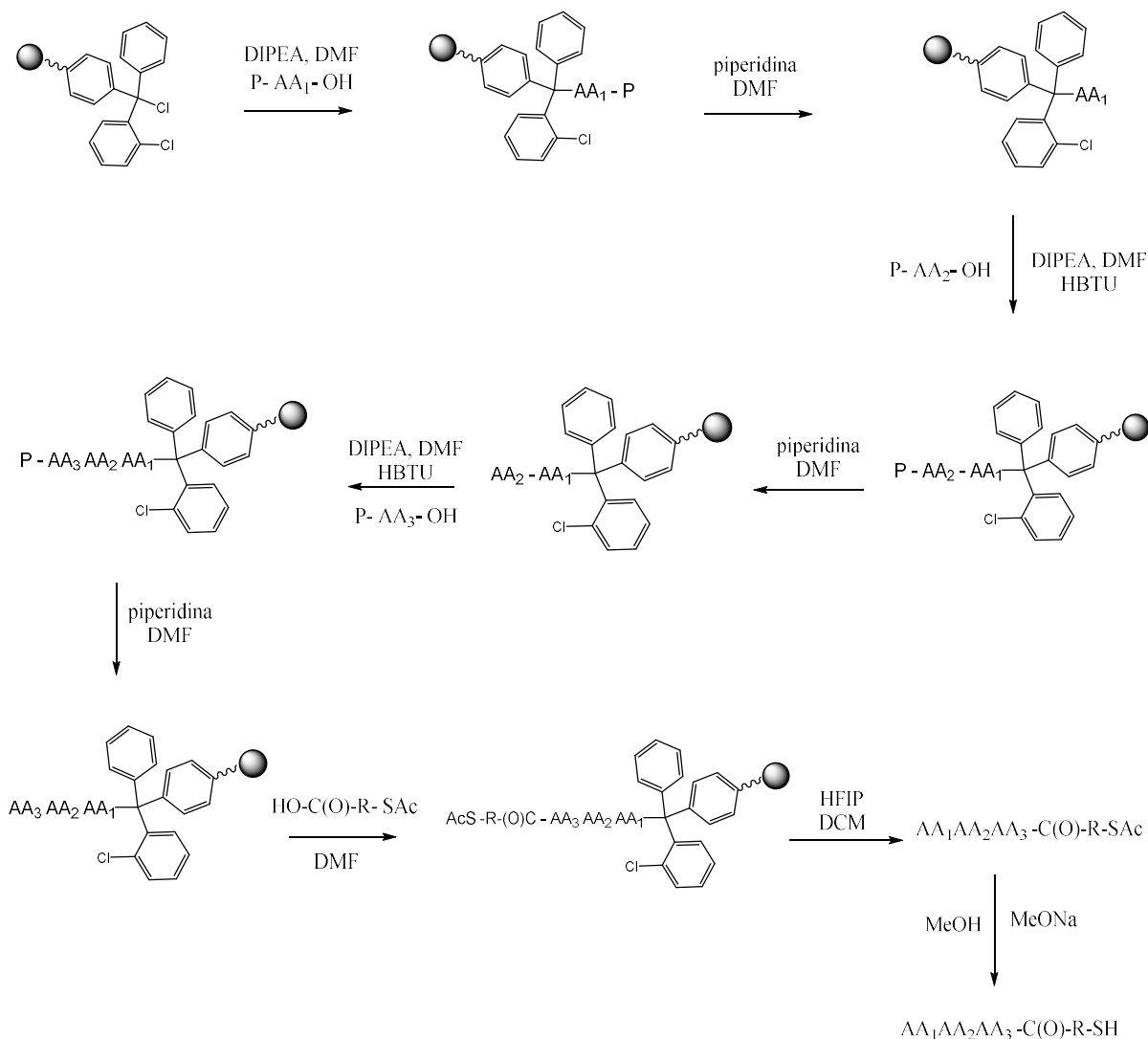
### Acido 8-(acetiltio)ottanoico (**1**)

Acido 8-bromoottanoico (5.0213 g, 22.51 mmol, 1 equiv.) è stato sciolto in 180 mL di acetone all'interno di un pallone e a seguito di ciò è stato aggiunto il potassio tioacetato (3.8455 g, 33.67 mmol, 1.5 equiv.). La miscela di reazione è stata lasciata sotto agitazione magnetica e in atmosfera di azoto per tutta la notte. Il solvente è stato successivamente rimosso per evaporazione a pressione ridotta. Il prodotto solido è stato poi sciolto in DCM ed estratto 4 volte con acqua, la fase organica è stata poi anidrificata usando MgSO<sub>4</sub>. Dopo la rimozione del solvente tramite evaporazione a pressione ridotta, il prodotto grezzo è stato purificato mediante colonna cromatografica flash (DCM: MeOH da 99:1 fino 95:5) permettendo di ottenere il prodotto (**1**) puro sotto forma di un solido di color ambrato (3.757 g, 77%).

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 2.85 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H, R-CH<sub>2</sub>-COOH), 2.34 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, CH<sub>3</sub>-C(O)-S-CH<sub>2</sub>-R), 2.32 (s, 1H, CH<sub>3</sub>-C(O)-S-R), 1.63 (p, *J* = 7.3 Hz, 2H, CH<sub>3</sub>-C(O)-S-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-R), 1.56 (p, 2H, R-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-COOH), 1.41 – 1.31 (m, 6H, catena alifatica).

<sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 194.1 (1C, CH<sub>3</sub>-C(O)-S-R), 177.1 (1C, R-COOH), 33.9 (1C, CH<sub>3</sub>-C(O)-S-CH<sub>2</sub>-R), 30.8 (1C, CH<sub>3</sub>-C(O)-S-R), 29.3 (1C, R-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-COOH), 29.0 (1C, R-CH<sub>2</sub>-COOH), 24.5 (1C, CH<sub>3</sub>-C(O)-S-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-R), 28.8-24.7 (3C, catena alifatica).

## Schema generale di sintesi dei tripeptidi

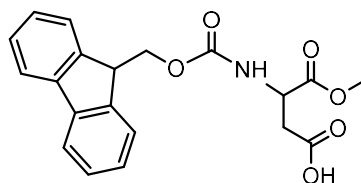


I dettagli della sintesi vengono mostrati successivamente.

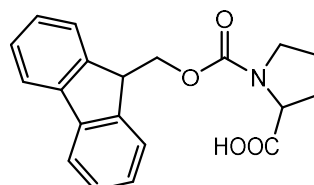
Il metodo di sintesi utilizzato per ottenere i tripeptidi d'interesse consiste in una sintesi in fase solida sfruttando la resina 2-CTC (2-clorotritil cloruro) ancorata a un *core* di polistirene. Nello schema generale di sintesi il gruppo protettore (P nello schema precedente) degli amminoacidi è Fmoc (Fluorenilmetilossicarbonil), che viene rimosso prima del *coupling* con l'amminoacido successivo, per permettere chiaramente la formazione del legame peptidico. Sebbene Asp(OMe) e Pro presentassero solo Fmoc come gruppo protettore, Tyr, Gln e Trp oltre a quest'ultimo, presentavano anche degli ulteriori gruppi protettori per le altre

funzionalità presenti nella molecola. Le strutture degli amminoacidi utilizzati, con i relativi gruppi protettori, sono riportate di seguito:

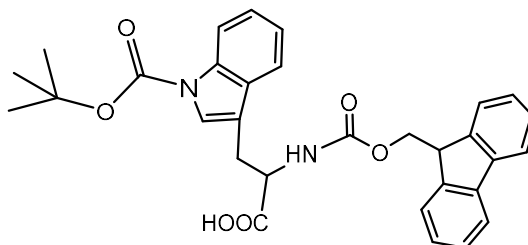
Fmoc-Asp-OMe



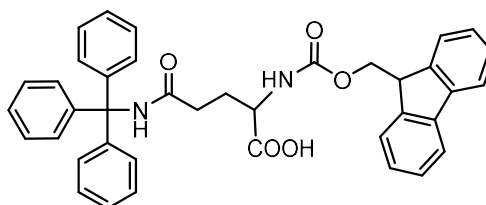
Fmoc-Pro-OH



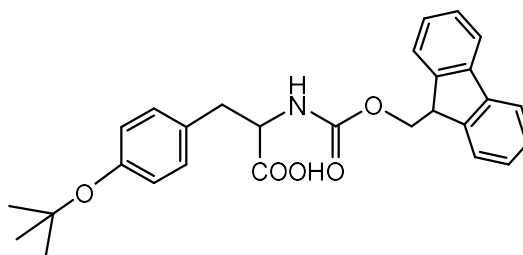
Fmoc-Trp(Boc)-OH



Fmoc-Gln(Trt)-OH



Fmoc-Tyr(tBu)-OH



### **Coupling del primo amminoacido AA<sub>1</sub> e deprotezione**

La resina 2-CTC (400 mg, 0.54 mmol, 1 equiv.) è stata inserita in una siringa di plastica priva di ago, munita di un setto (onde evitare la fuoriuscita della resina) e di due tappi. Sono stati successivamente aggiunti 9 mL di DMF dry, DIPEA (N,N-diisopropilettilammina, 0.8 mL, 4.59 mmol, 5.3 equiv.) e Fmoc-L-Asp-OMe (398.93 mg, 1.08 mmol, 2 equiv.). La miscela è stata mescolata per tre ore a temperatura ambiente. Successivamente la resina è stata filtrata e

lavata con 3 x 6 mL di DMF dry. Per bloccare le funzionalità libere della resina sono stati inseriti DCM (7 mL), MeOH (1 mL) e DIPEA (0.5 mL), la miscela viene mescolata per un'ora. La soluzione è poi rimossa per filtrazione e la resina viene lavata con 3 x 6 mL di DCM dry.

A seguito di ciò è stata aggiunta alla resina una soluzione al 20% di 4-metilpiperidina in DMF (7mL), la miscela è stata mescolata per 5 minuti, al termine dei quali il solvente è stato rimosso per filtrazione. Questa procedura è stata ripetuta una seconda volta e alla fine la resina è stata lavata con 3 x 6 mL di DMF dry.

### ***Coupling del secondo amminoacido AA<sub>2</sub>***

Fmoc-L-Pro-OH (346.39 mg, 1.08 mmol, 2 equiv.) è stato sciolto in 2 mL di DMF dry, sono stati poi aggiunti DIPEA (0.376 mL, 4 equiv.) e HBTU (Esafluorofosfato benzotriazolo tetrametil uronio, 409.5 mg, 1.08 mmol, 2 equiv.). La miscela è stata mescolata per 5 minuti e poi aggiunta alla resina, il tutto è stato poi mescolato per l'intera notte. Il giorno seguente la resina è stata filtrata e lavata con 3 x 6 mL DMF dry. A seguito di ciò è stata aggiunta alla resina una soluzione al 20% di 4-metilpiperidina in DMF (7mL), la miscela è stata mescolata per 5 minuti, al termine dei quali il solvente è stato rimosso per filtrazione. Questa procedura è stata ripetuta una seconda volta e alla fine la resina è stata lavata con 3 x 6 mL di DMF dry.

### ***Coupling del terzo amminoacido AA<sub>3</sub>***

La procedura per gli amminoacidi Tyr, Gln e Trp è la stessa, verranno riportate quindi solo le diverse quantità di reagente di partenza.

Fmoc-Trp(Boc)-OH (568.71 mg, 1.08 mmol, 2 equiv.), Fmoc-Gln(Trt)-OH (659.56 mg, 1.08 mmol, 2 equiv.) e Fmoc-Tyr(tBu)-OH (496.29 mg, 1.08 mmol, 2 equiv.) sono stati sciolti in tre vial di vetro diverse in 2 mL di DMF dry; sono stati poi aggiunti DIPEA (0.376 mL, 4 equiv.) e HBTU (409.5 mg, 1.08 mmol, 2 equiv.). La miscela è stata mescolata per 5 minuti e poi aggiunta alla resina, il tutto è stato poi mescolato per 3 ore. A seguito di ciò è stata aggiunta alla resina una soluzione al 20% di 4-metilpiperidina in DMF (7mL), la miscela è stata mescolata per 5 minuti, al termine dei quali il solvente è stato rimosso per filtrazione. Questa procedura è stata ripetuta una seconda volta e alla fine la resina è stata lavata con 3 x 6 mL di DMF dry.

### **Coupling del linker (1)**

Acido 8-bromooottanoico (236 mg, 1.08 mmol, 2 equiv.) è stato sciolto in 2 mL di DMF dry in una vial di vetro, dopodiché sono stati aggiunti DIPEA (0.376 mL, 4 equiv.) e HBTU (409 mg, 1.08 mmol, 2 equiv.). La miscela è stata mescolata per 5 minuti e poi aggiunta alla resina, il tutto è lasciato sotto agitazione per l'intera notte. La resina è stata poi lavata con 3 x 6 mL di DMF dry e 3 x 6 mL di DCM dry.

### **Rottura della resina**

Una soluzione al 20% di HFIP (alcol esafluoroisopropilico) in DCM dry (8 mL) è stata aggiunta alla resina e lasciata mescolare per un'ora. Il liquido è stato raccolto ed evaporato. Questo passaggio è stato ripetuto una seconda volta, ed infine la resina è stata lavata con 3 x 6 ml di DCM dry. Tutte le frazioni di filtrato sono raccolte, combinate con le precedenti, ed infine evaporate a pressione ridotta.

**MS** (ESI) m/z: 662.2 ([M]<sup>-</sup>) Asp (OMe)/Pro/Tyr (tBu)-R-SAc

**MS** (ESI) m/z: 813.3 ([M]<sup>-</sup>) Asp (OMe)/Pro/Gln (Trt)-R-SAc

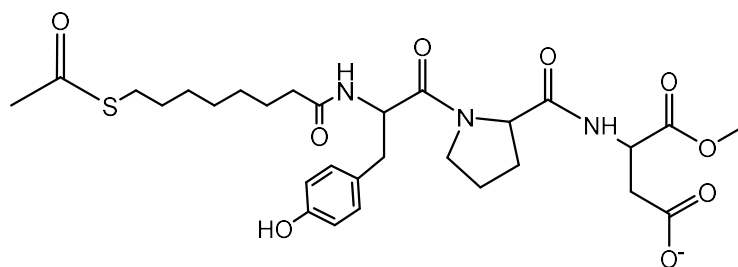
**MS** (ESI) m/z: 729.3 ([M]<sup>-</sup>) Asp (OMe)/Pro/Trp (Boc)-R-SAc

### **Rimozione dei gruppi protettori tBu, Trt e Boc**

Ai tioli tripeptidici protetti con tBu, Trt, Boc è stata aggiunta una soluzione al 50 % di TFA (acido trifluoroacetico) in DCM (4mL), le miscele sono state agitate per 30 minuti e poi il solvente è stato evaporato lasciando dei prodotti di color ambrato con la consistenza di gel molto viscosi.



## Asp(OMe)/Pro/Tyr-R-SAc

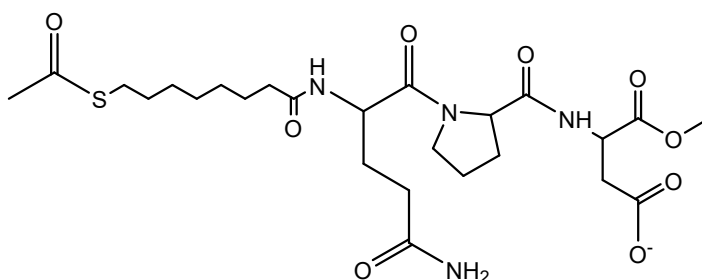


**<sup>1</sup>H NMR** (500 MHz, MeOD)  $\delta$  7.12 – 7.08 (m, 1H, CH aromatico), 7.07 – 7.03 (m, 1H, CH aromatico), 6.77 – 6.72 (m, 1H, CH aromatico), 6.72 – 6.68 (m, 1H, CH aromatico), 4.81 – 4.73 (m, 2H, CH Asp + CH Tyr), 4.52 – 4.43 (m, 1H, CH Pro), 3.87 – 3.77 (m, 2H, NCH<sub>2</sub> Pro), 3.73 (s, 3H, OCH<sub>3</sub> Asp), 3.06 (dd,  $J = 15.0, 4.8$  Hz, 1H,  $\frac{1}{2}$  CH<sub>2</sub> Asp), 2.91 (dd,  $J = 5.7, 2.4$  Hz, 1H,  $\frac{1}{2}$  CH<sub>2</sub> Tyr), 2.89 – 2.84 (m, 3H,  $\frac{1}{2}$  CH<sub>2</sub> Tyr + CH<sub>3</sub>C(O)S-CH<sub>2</sub>), 2.76 (dd,  $J = 14.3, 9.5$  Hz, 1H,  $\frac{1}{2}$  CH<sub>2</sub> Asp), 2.30 (s, 3H, CH<sub>3</sub>C(O)S), 2.22 – 2.16 (m, 2H, CH<sub>2</sub> Pro), 2.13 (t,  $J = 7.4$  Hz, 2H, R-CH<sub>2</sub>C(O)N), 2.09 – 1.92 (m, 2H, CH<sub>2</sub> Pro), 1.62 – 1.42 (m, 4H, R-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(O)N + CH<sub>3</sub>C(O)S-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-R), 1.41 – 1.10 (m, 6H, catena alifatica).

**<sup>13</sup>C-NMR** (126 MHz, MeOD)  $\delta$  196.36 (1C, C(O)S), 174.58, 172.63, 172.41, 171.60, 171.31 (5C, C=O), 130.1, 129.8, 127.7, 126.5, 115.0, 114.7 (6C, C aromatici), 53.5 (1C, CH Pro), 52.4 (1C, CH Tyr), 51.1 (1C, OCH<sub>3</sub> Asp), 48.9 (1C, CH Asp), 47.1 (1C, NCH<sub>2</sub> Pro), 37.8 (1C, CH<sub>2</sub> Asp), 35.8 (1C, CH<sub>2</sub> Tyr), 35.4 (1C, CH<sub>3</sub>C(O)SCH<sub>2</sub>-R), 35.2 (1C, R-CH<sub>2</sub>C(O)N), 29.1 (1C, CH<sub>3</sub>C(O)S-R), 28.9 (1C, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(O)N), 28.6 (1C, CH<sub>2</sub> Pro), 25.1 (1C, CH<sub>3</sub>C(O)SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-R), 24.3 (1C, CH<sub>2</sub> Pro), 29.1, 28.4, 28.1 (3C, catena alifatica).

**MS** (ESI)  $m/z$ : 606.2 ([M]).

### Asp(OMe)/Pro/Gln-R-SAc

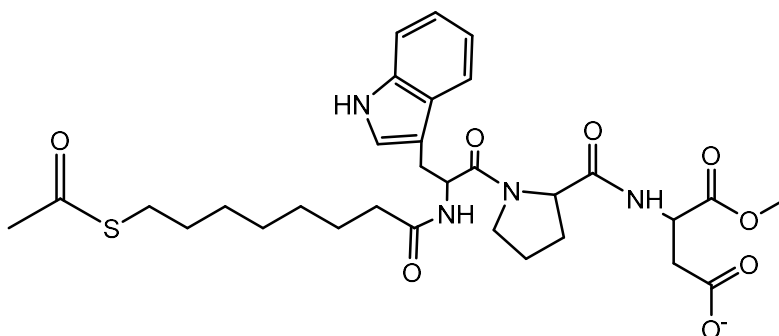


**<sup>1</sup>H NMR** (500 MHz, MeOD)  $\delta$  4.77 (t,  $J$  = 5.8 Hz, 1H, CH Asp), 4.63 (t,  $J$  = 7.8 Hz, 1H, CH Pro), 4.47 (dd,  $J$  = 9.2, 4.0 Hz, 1H, CH Gln), 3.92 – 3.73 (m, 2H, CH<sub>2</sub>N Pro), 3.72 (s, 3H, OCH<sub>3</sub> Asp), 2.93 – 2.79 (m, 4H, CH<sub>3</sub>C(O)S-CH<sub>2</sub> + CH<sub>2</sub> Asp), 2.38 – 2.32 (m, 2H, R-CH<sub>2</sub>C(O)N), 2.30 (s, 3H, CH<sub>3</sub>C(O)S), 2.25 – 2.16 (m, 2H, CH<sub>2</sub> Gln), 2.14 – 1.86 (m, 6H, CH<sub>2</sub>C(O)NH<sub>2</sub> Gln + 2 CH<sub>2</sub> Pro), 1.64 – 1.51 (m, 4H, R-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(O)N + CH<sub>3</sub>C(O)S-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-R), 1.33 – 1.20 (m, 6H, catena alifatica).

**<sup>13</sup>C-NMR** (126 MHz, MeOD)  $\delta$  196.3 (1C, C(O)S), 176.46, 174.74, 172.71, 172.45, 171.34, 163.50 (6C, C=O), 59.9 (1C, CH Gln), 51.4 (1C, OCH<sub>3</sub> Asp), 50.3 (1C, CH Pro), 48.9 (1C, CH Asp), 47.4 (1C, NCH<sub>2</sub> Pro), 35.3 (1C, CH<sub>3</sub>C(O)S-CH<sub>2</sub>), 35.1 (1C, CH<sub>2</sub>C(O)NH<sub>2</sub> Gln), 29.7 (1C, CH<sub>3</sub>C(O)S-R), 29.3 (1C, R-CH<sub>2</sub>C(O)N), 29.2 (1C, CH<sub>2</sub> Gln), 28.9 (1C, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(O)N), 28.4 (1C, CH<sub>2</sub> Asp), 26.7 (1C, CH<sub>2</sub> Pro), 24.5 (1C, CH<sub>2</sub> Pro), 25.3 (1C, R-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>SH Pro), 29.1, 28.2, 27.4 (3C, catena alifatica).

**MS** (ESI)  $m/z$ : 571.2 ([M]<sup>-</sup>).

### Asp(OMe)/Pro/Trp-R-SAc



**<sup>1</sup>H NMR** (500 MHz, MeOD) δ 8.19 – 8.12 (m, 1H, CH Trp), 7.65 (dd, *J* = 21.6, 7.6 Hz, 1H, CH Trp), 7.58 (s, 1H, CH Trp), 7.28 – 7.23 (m, 1H, CH Trp), 7.06 – 7.00 (m, 1H, CH Trp), 4.83 – 4.75 (m, 1H, CH Asp), 4.74 – 4.63 (m, 1H, CH Trp), 4.54 – 4.46 (m, 1H, CH Pro), 3.92 – 3.77 (m, 2H, NCH<sub>2</sub> Pro), 3.74 (s, 3H, OCH<sub>3</sub> Asp), 3.23 – 3.11 (m, 2H, CH<sub>2</sub> Trp), 2.85 – 2.79 (m, 4H, CH<sub>2</sub> Asp + CH<sub>3</sub>C(O)S-CH<sub>2</sub>), 2.29 (s, 3H, CH<sub>3</sub>C(O)S-R), 2.26 – 1.87 (m, 6H, 2 CH<sub>2</sub> Pro + R-CH<sub>2</sub>C(O)N), 1.64 – 1.40 (m, 4H, R-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(O)N + CH<sub>3</sub>C(O)S-CH<sub>2</sub>-R), 1.39 – 1.02 (m, 6H, catena alifatica).

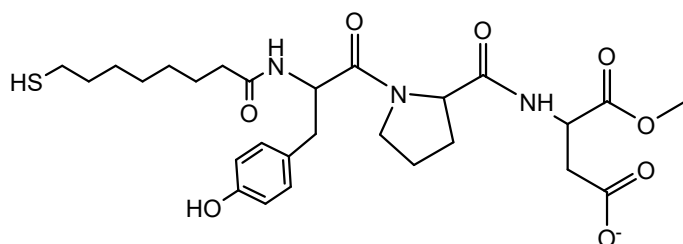
**<sup>13</sup>C-NMR** (126 MHz, MeOD) δ 196.33 (1C, C(O)S), 174.59, 174.34, 172.67, 172.43, 171.98 (5C, C=O), 136.62, 127.06, 109.44 (3C, CH quaternari Trp), 124.4, 122.6, 119.0, 117.4, 114.7 (5C, CH Trp), 60.3 (1C, CH Pro), 51.7 (1C, OCH<sub>3</sub> Asp), 49.1 (1C, CH Trp), 48.5 (1C, CH Asp), 47.1 (1C, NCH<sub>2</sub> Pro), 35.5 (1C, CH<sub>2</sub> Asp), 35.4 (1C, CH<sub>2</sub> Trp), 35.3 (1C, CH<sub>3</sub>C(O)S-CH<sub>2</sub>-R), 35.2 (1C, CH<sub>2</sub>C(O)N), 29.1 (1C, CH<sub>3</sub>C(O)S-R), 28.9, 24.5 (2C, CH<sub>2</sub> Pro), 28.7 (1C, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(O)N), 25.3 (1C, CH<sub>3</sub>C(O)S-CH<sub>2</sub>-R), 29.2, 28.9, 28.2 (3C, catena alifatica).

**MS** (ESI) *m/z*: 629.2 ([M]).

### Deprotezione del tiolo

Asp(OMe)/Pro/Tyr-R-SAc (83 mg, 0.1358 mmol, 1 equiv.), Asp(OMe)/Pro/Gln-R-SAc (79 mg, 0.1358 mmol, 1 equiv.), Asp(OMe)/Pro/Trp-R-SAc (93 mg, 0.1481 mmol, 1 equiv.) sono stati aggiunti in tre palloni differenti e sciolti in 3 mL di MeOH dry. Dopodiché è stato aggiunto MeONa rispettivamente (22.0 mg, 0.4074 mmol, 3 equiv.) per i primi due tioli tripeptidici e per l'ultimo (24 mg, 0.4443 mmol, 3 equiv.), la miscela è stata lasciata poi sotto agitazione magnetica in atmosfera di azoto per 3 ore. Successivamente la reazione è stata interrotta dall'aggiunta di una punta di spatola della resina a scambio cationico Amberlite™ IR120 H. Dopo l'aggiunta la miscela di reazione è stata lasciata reagire per 15 minuti in assenza di agitazione magnetica onde evitare la rottura della resina. Quest'ultima, trascorso il tempo prefissato, è stata rimossa per filtrazione e il solvente è stato evaporato a pressione ridotta.

### Asp(OMe)/Pro/Tyr-R-SH (T4)

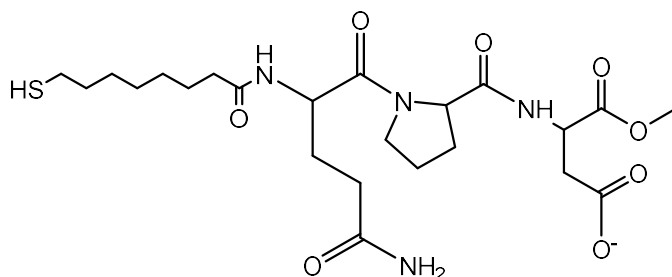


<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, MeOD)  $\delta$  6.96 – 6.89 (m, 1H, CH aromatico), 6.88 – 6.82 (m, 1H, CH aromatico), 6.60 – 6.51 (m, 2H, CH aromatici), 4.78 – 4.68 (m, 1H, CH Asp), 4.51 – 4.43 (m, 1H, CH Pro), 4.42 – 4.35 (m, 1H, CH Tyr), 3.82 – 3.67 (m, 1H, NCH<sub>2</sub> Pro), 2.97 (dd,  $J = 14.6, 6.1$  Hz, 1H,  $\frac{1}{2}$  CH<sub>2</sub> Asp), 2.89 – 2.55 (m, 3H,  $\frac{1}{2}$  CH<sub>2</sub> Asp + CH<sub>2</sub> Tyr), 2.50 – 2.42 (m, 2H, R-CH<sub>2</sub>C(O)N), 2.17 (m, 2H, SHCH<sub>2</sub>-R), 2.11 – 1.94 (m, 2H, CH<sub>2</sub> Pro), 1.94 – 1.83 (m, 2H, CH<sub>2</sub> Pro), 1.77 – 1.46 (m, 4H, R-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(O)N + CH<sub>3</sub>C(O)S-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-R), 1.43 – 1.24 (m, 6H, catena alifatica).

<sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, MeOD)  $\delta$  179.94, 175.71, 173.53, 172.94, 170.51 (5C, C=O), 129.9, 129.3, 121.85, 120.9, 118.1, 118.2 (6C, C aromatici), 60.5 (1C, CH Pro), 53.6 (1C, CH Asp), 52.8 (1C, CH Tyr), 47.5 (1C, NCH<sub>2</sub> Pro), 36.1 (1C, CH<sub>2</sub> Tyr), 35.1 (1C, SHCH<sub>2</sub>), 35.8 (1C, CH<sub>2</sub> Asp), 29.1 (1C, CH<sub>2</sub>C(O)N), 25.1 (1C, SHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 25.0 (1C, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(O)N), 28.9, 24.9 (2C, CH<sub>2</sub> Pro), 29.3, 28.8, 28.4 (3C, catena alifatica).

HRMS (negative)  $m/z$ : 564.2368 (calcolata 564.2379).

### Asp(OMe)/Pro/Gln-R-SH (T5)

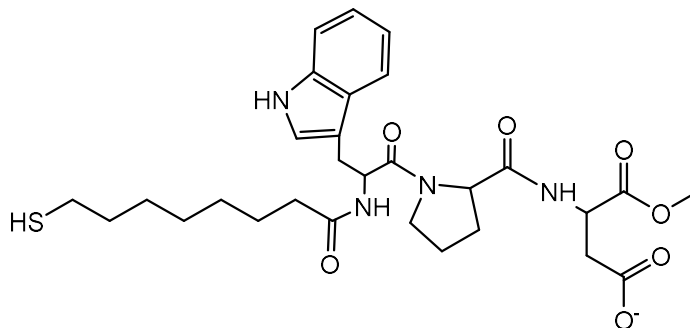


**<sup>1</sup>H NMR** (500 MHz, MeOD + DMF)  $\delta$  4.76 – 4.66 (m, 1H, CH Asp), 4.56 – 4.44 (m, 1H, CH Pro), 4.39 – 4.33 (m, 1H, CH Gln), 3.90 – 3.70 (m, 2H, CH<sub>2</sub>N Pro), 3.03 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 2.79 – 2.58 (m, 2H, CH<sub>2</sub> Gln), 2.46 (t,  $J$  = 7.7 Hz, 2H, R-CH<sub>2</sub>C(O)N), 2.33 (t,  $J$  = 7.2 Hz, 2H, SHCH<sub>2</sub>-R), 2.29 – 2.20 (m, 2H, CH<sub>2</sub> Asp), 2.19 – 2.01 (m, 2H, CH<sub>2</sub> Pro), 2.01 – 1.90 (m, 2H, CH<sub>2</sub> Pro), 1.75 (m, 2H, CH<sub>2</sub>C(O)NH<sub>2</sub> Gln), 1.71 – 1.51 (m, 4H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(O)N + HS-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-R), 1.46 – 1.24 (m, 6H, catena alifatica).

**<sup>13</sup>C-NMR** (126 MHz, MeOD + DMF)  $\delta$  174.37, 171.62, 169.02, 163.47, 163.23, 163.00 (6C, C=O), 60.2 (1C, CH Gln), 52.7 (1C, CH Pro), 50.5 (1C, OCH<sub>3</sub> Asp), 50.1 (1C, CH Asp), 47.9 (1C, NCH<sub>2</sub> Pro), 39.2 (1C, CH<sub>2</sub>C(O)NH<sub>2</sub> Gln), 30.9 (1C, SHCH<sub>2</sub>), 29.1 (1C, R-CH<sub>2</sub>C(O)N), 35.6 (1C, CH<sub>2</sub> Asp), 29.4 (1C, CH<sub>2</sub> Gln), 27.9 (1C, CH<sub>2</sub> Pro), 25.3 (1C, CH<sub>2</sub> Pro), 24.9 (1C, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(O)N), 25.3 (1C, R-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>SH Pro), 29.5, 28.8, 27.0 (3C, catena alifatica).

**HRMS** (*negative*)  $m/z$ : 529.2309 (calcolata 529.2322).

#### Asp(OMe)/Pro/Trp-R-SH (T6)



**<sup>1</sup>H NMR** (500 MHz, MeOD)  $\delta$  7.65 (dd,  $J$  = 7.9, 5.3 Hz, 1H, CH Trp), 7.35 (dd,  $J$  = 8.2, 3.2 Hz, 1H, CH Trp), 7.22 (s, 1H, CH Trp), 7.09 (t,  $J$  = 7.4 Hz, 1H, CH Trp), 7.04 (t,  $J$  = 7.4 Hz, 1H, CH Trp), 5.05 – 4.98 (m, 1H, CH Asp), 4.53 – 4.47 (m, 1H, CH Pro), 4.47 – 4.42 (m, 1H, CH Trp), 3.76 – 3.64 (m, 2H, NCH<sub>2</sub> Pro), 3.20 – 3.08 (m, 2H, CH<sub>2</sub> Trp), 2.83 – 2.75 (m, 2H, CH<sub>2</sub> Asp), 2.72 – 2.61 (m, 2H, R-CH<sub>2</sub>C(O)N), 2.18 – 2.10 (m, 2H, HS-CH<sub>2</sub>), 2.13 – 1.89 (m, 4H, 2 CH<sub>2</sub> Pro), 1.70 – 1.54 (m, 2H, R-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>C(O)N), 1.53 – 1.43 (m, 2H, HS-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 1.41 – 1.13 (m, 6H, catena alifatica).

**<sup>13</sup>C-NMR** (126 MHz, MeOD)  $\delta$  175.7, 173.9, 172.9, 172.5, 171.2 (5C, C=O), 136.9, 127.8, 109.1 (3C, CH quaternari Trp), 123.7, 120.8, 118.4, 117.7, 110.8 (5C, CH Trp), 60.2 (1C, CH Pro), 52.2

(1C, CH Trp), 51.5 (1C, CH Asp), 47.2 (1C, NCH<sub>2</sub> Pro), 39.5 (1C, CH<sub>2</sub> Asp), 39.2 (1C, CH<sub>2</sub>C(O)N), 35.4 (1C, HSCH<sub>2</sub>-R), 28.7 (1C, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(O)N), 28.6, 24.4 (2C, CH<sub>2</sub> Pro), 27.3 (1C, CH<sub>2</sub> Trp), 24.9 (1C, HSCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-R), 29.1, 28.3, 28.1 (3C, catena alifatica).

**HRMS** (negative) m/z: 587.2489 (calcolata 587.2529).

## 10.2 Sintesi e caratterizzazione di nanoparticelle d'oro

### 10.2.1 Sintesi delle nanoparticelle

Le nanoparticelle d'oro protette da un monostrato organico sono preparate attraverso un metodo *two phase, two step*, seguendo la procedura riportata da Scrimin *et al* <sup>[12]</sup>.

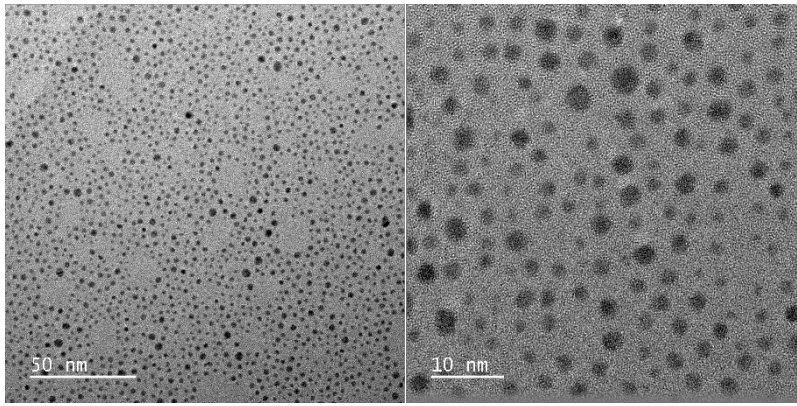
Una soluzione di H<sub>2</sub>AuCl<sub>4</sub> · 3H<sub>2</sub>O (50 mg, 0.127 mmol, 1 equiv.) in H<sub>2</sub>O (0.5 mL) è stata estratta tre volte in un imbuto separatore con una soluzione preventivamente degasata per 30 minuti di TOABr (tetraottilammonio bromuro, 174.0 mg, 0.317 mmol, 2.5 equiv.) in toluene (125 mL). Alla soluzione ottenuta, che mostra un colore rosso acceso, è stata aggiunta la diottilamina (DOA) (0.766 mL, 2.539 mmol, 20 equiv.) e la miscela è stata mantenuta sotto agitazione magnetica per tre 3 sotto atmosfera di azoto. Durante questo procedimento si ha il viraggio del colore della soluzione da rosso, a marrone dopo l'aggiunta di DOA, ed infine ad incolore. La miscela è stata raffreddata con un bagno di ghiaccio prima dell'aggiunta di una soluzione di NaBH<sub>4</sub> (48 mg, 1.267 mmol, 10 equiv.) in H<sub>2</sub>O (0.5 mL), la soluzione da incolore passa istantaneamente a color nero a seguito dell'aggiunta dell'agente riducente. Il tutto viene mantenuto sotto agitazione magnetica, in atmosfera di azoto e in bagno di ghiaccio per 3 ore. In seguito è stata rimossa la frazione acquosa tramite un imbuto separatore. Successivamente sono stati aggiunti i tioli precedentemente deprotetti sciolti nella minima quantità possibile di MeOH, rispettivamente **T1** (37.6 mg, 0.123 mmol, 2.5 equiv.), **T2** (37.6 mg, 0.123 mmol, 2.5 equiv.), **T3** (42.7 mg, 0.123 mmol, 2.5 equiv.), **T4** (83 mg, 0.136 mmol, 2.75 equiv.), **T5** (79 mg, 0.136 mmol, 2.75 equiv.) e **T6** (93 mg, 0.148 mmol, 3 equiv.), la miscela è stata lasciata sotto agitazione magnetica per tutta la notte in atmosfera di azoto. Il giorno seguente si osserva nelle pareti del pallone la precipitazione delle nanoparticelle d'oro funzionalizzate, che sono

poi state recuperate per centrifugazione (5000 rpm, 5 min). Per purificare le nanoparticelle ottenute, nella provetta da centrifuga è stata aggiunta una piccola quantità di MeOH seguita dall'aggiunta di una grande quantità di Et<sub>2</sub>O, il tutto è stato sonicato per 5 minuti al termine del quale, grazie ad un'ulteriore centrifugazione, si ha la precipitazione delle nanoparticelle sul fondo della provetta, lasciando le impurezze in fase liquida. Dopo l'eliminazione della fase liquida, questo step è stato ripetuto altre tre volte. Le nanoparticelle ottenute sono poi state sciolte nella minima quantità possibile di H<sub>2</sub>O e trasferite all'interno di una provetta da centrifuga Amicon<sup>®</sup> Ultra-15 che presenta un filtro con taglio dimensione pari a 10000 g/mol. A seguito del quale si ha l'aggiunta di acqua alla provetta al fine di raggiungere un livello prestabilito, ed infine, dopo centrifugazione (5000 rpm, 7 min) si ottengono circa 0.6 mL di soluzione di AuNPs in H<sub>2</sub>O. Questa operazione è stata ripetuta 5 volte, dopodiché le nanoparticelle sono state trasferite in un pallone tarato e il solvente è stato successivamente rimosso per evaporazione a pressione ridotta. Le masse di nanoparticelle ottenute sono rispettivamente: 21.6 mg di **T1**, 31.6 mg di **T2**, 34.0 mg **T3**, 30.9 mg **T4**, 11.2 mg **T5** e 45.7 mg **T6**.

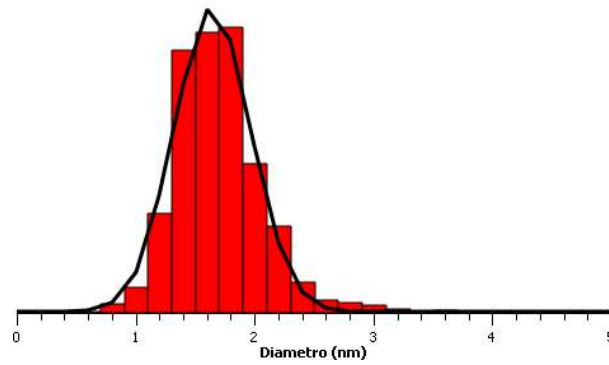
### 10.2.2 Caratterizzazione di 1-AuNP

Come riportato nella sezione 4, le nanoparticelle sono state caratterizzate mediante analisi TGA, TEM, UV-VIS e NMR.

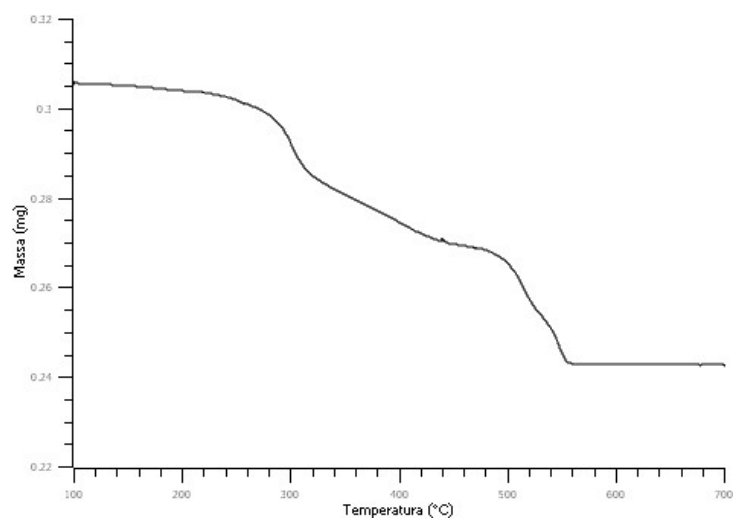
Per **1-AuNP** da analisi TEM è emerso che il diametro medio è pari a 1.65 nm (Fig. 69), da analisi TGA che la perdita di massa percentuale è pari a 21.1 % (Fig. 71) e quindi è stato ricavato che il rapporto oro tiolo è Au<sub>138</sub>(SR)<sub>28</sub>. Lo spettro UV-Vis (Fig. 72) conferma che la dimensione medie delle nanoparticelle è inferiore a 2 nm, questo è verificato dall'assenza della banda di risonanza plasmonica a 520 nm, tipica per nanoparticelle d'oro con dimensioni superiori a 2 nm. La modesta presenza della banda di risonanza a 520 nm è coerente col fatto che le dimensioni medie delle nanoparticelle sono 1.65 nm, ma nel campione sono presenti anche nanoparticelle con dimensioni maggiori (distribuzione dimensioni Fig. 70)



**Figura 69:** Immagini TEM a diversi ingrandimenti di **1-AuNP**.



**Figura 70:** Distribuzione delle dimensioni con curva di fitting per **1-AuNP**. Diametro medio  $1.65 \pm 0.32$  nm.

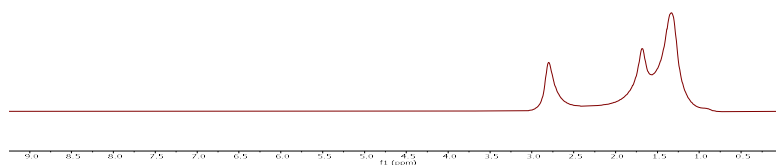


**Figura 71:** Analisi TGA di **1-AuNP** sotto flusso d'aria. Perdita di massa 21.0 %.





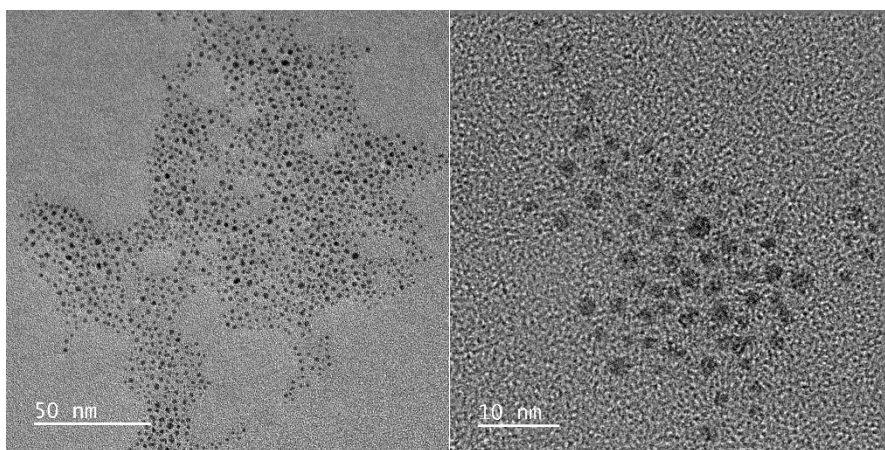
**Figura 72:** Spettro UV-Vis di una soluzione 0.1 mg/mL di **1-AuNP** in H<sub>2</sub>O.



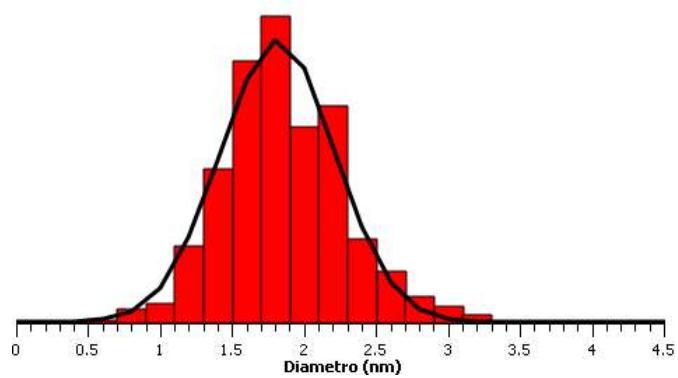
**Figura 73:** Spettro <sup>1</sup>H-NMR con filtro di diffusione di **1-AuNP** in D<sub>2</sub>O.

### 10.2.3 Caratterizzazione di 2-AuNP

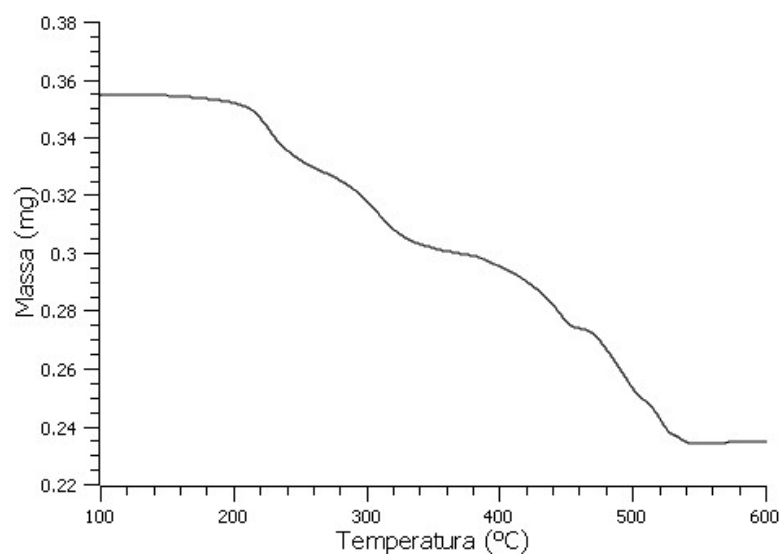
Per **2-AuNP** da analisi TEM è emerso che il diametro medio è pari a 1.82 nm (Fig. 74), da analisi TGA che la perdita di massa percentuale è pari a 34.1 % (Fig. 76) e quindi è stato ricavato che il rapporto oro tiolo è Au<sub>185</sub>(SR)<sub>62</sub>. Lo spettro UV-Vis (Fig. 77) conferma che la dimensione medie delle nanoparticelle è inferiore a 2 nm. Lo spettro ottenuto con filtro di diffusione è riportato in Fig. 38.



**Figura 74:** Immagini TEM a diversi ingrandimenti di **2-AuNP**.



**Figura 75:** Distribuzione delle dimensioni con curva di fitting per **2-AuNP**. Diametro medio  $1.82 \pm 0.39$  nm.



**Figura 76:** Analisi TGA di **2-AuNP** sotto flusso d'aria. Perdita di massa 34.1 %.

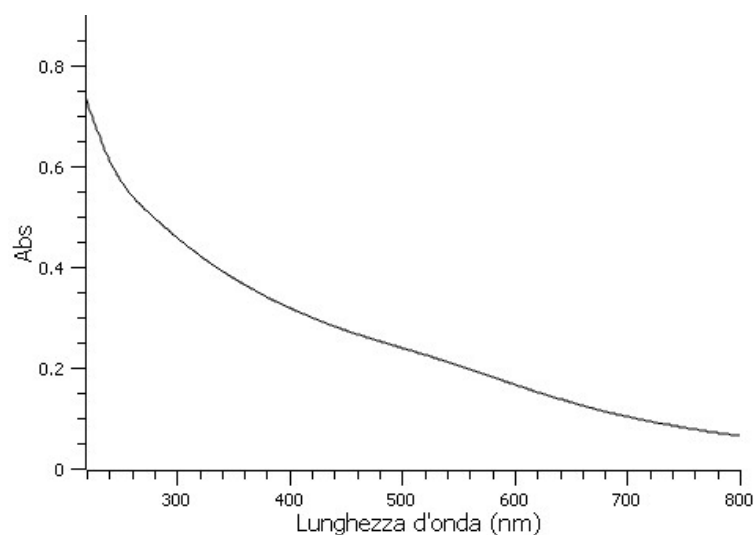


Figura 77: Spettro UV-Vis di una soluzione 0.1 mg/mL di **2-AuNP** in H<sub>2</sub>O.

#### 10.2.4 Caratterizzazione di **3-AuNP**

Per **3-AuNP** da analisi TEM è emerso che il diametro medio è pari a 1.95 nm (Fig. 78), da analisi TGA che la perdita di massa percentuale è pari a 34.1 % (Fig. 80) e quindi è stato ricavato che il rapporto oro tiolo è Au<sub>230</sub>(SR)<sub>55</sub>. Lo spettro UV-Vis (Fig. 81) conferma che la dimensione medie delle nanoparticelle è inferiore a 2 nm. Lo spettro NMR ottenuto con filtro di diffusione non viene riportato in quanto, data la bassa intensità dei segnali nello spettro per **3-AuNP** (dovuti alla rigidità strutturale), non è stato possibile ottenere un segnale soddisfacente.

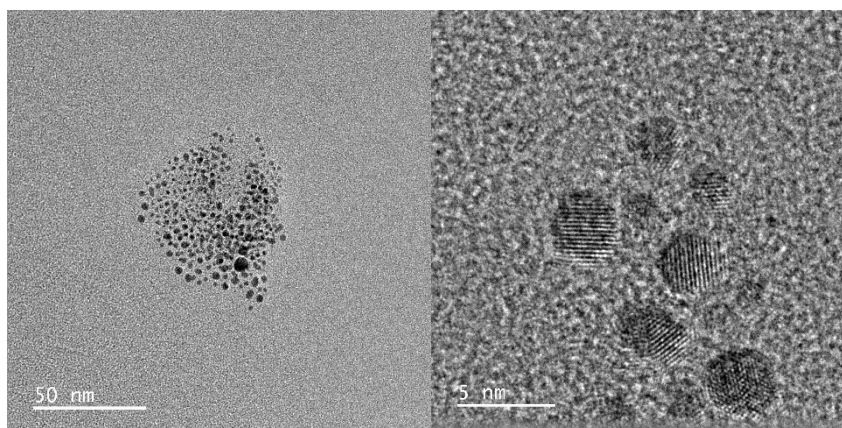
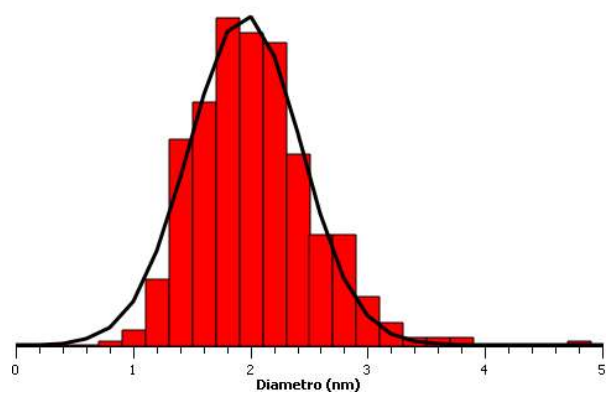
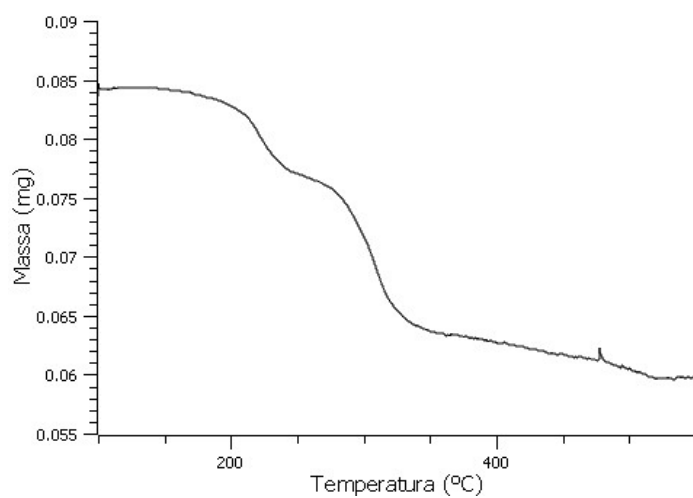


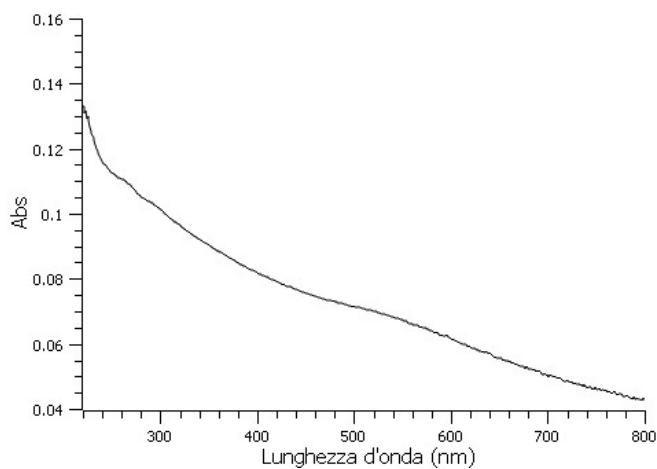
Figura 78: Immagini TEM a diversi ingrandimenti di **3-AuNP**.



**Figura 79:** Distribuzione delle dimensioni con curva di fitting per **3-AuNP**. Diametro medio  $1.95 \pm 0.47$  nm.



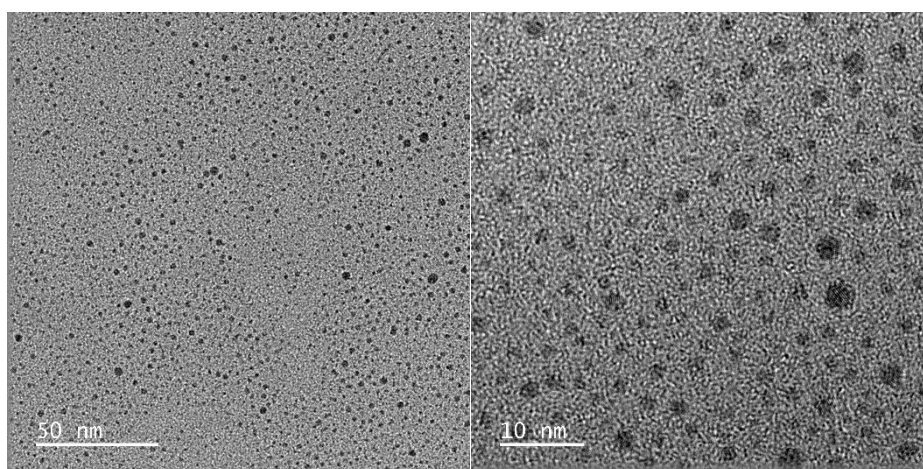
**Figura 80:** Analisi TGA di **3-AuNP** sotto flusso d'aria. Perdita di massa 29.4 %.



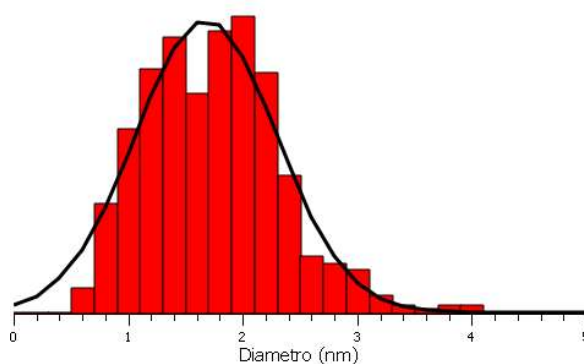
**Figura 81:** Spettro UV-Vis di una soluzione 0.1 mg/mL di **3-AuNP** in  $H_2O$ .

### 10.2.5 Caratterizzazione di 4-AuNP

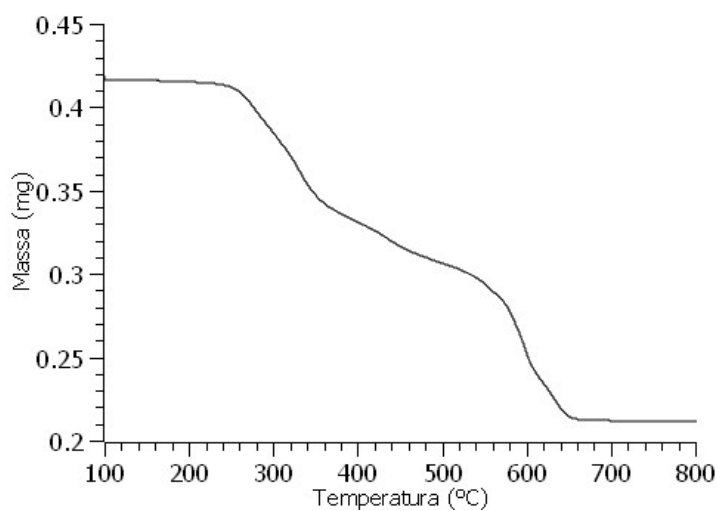
Per **4-AuNP** da analisi TEM è emerso che il diametro medio è pari a 1.68 nm (Fig. 82), da analisi TGA che la perdita di massa percentuale è pari a 49.1 % (Fig. 84) e quindi è stato ricavato che il rapporto oro tiolo è  $\text{Au}_{147}(\text{SR})_{49}$ . Lo spettro UV-Vis (Fig. 85) conferma che la dimensione medie delle nanoparticelle è inferiore a 2 nm, la banda a 277 nm deriva dall'assorbimento dell'anello aromatico della tirosina <sup>[19]</sup>. Lo spettro NMR con filtro di diffusione è riportato in Fig. 87.



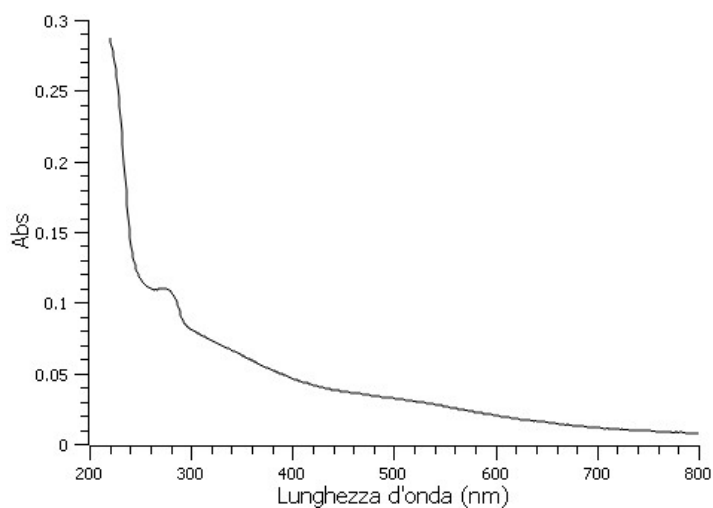
**Figura 82:** Immagini TEM a diversi ingrandimenti di **4-AuNP**.



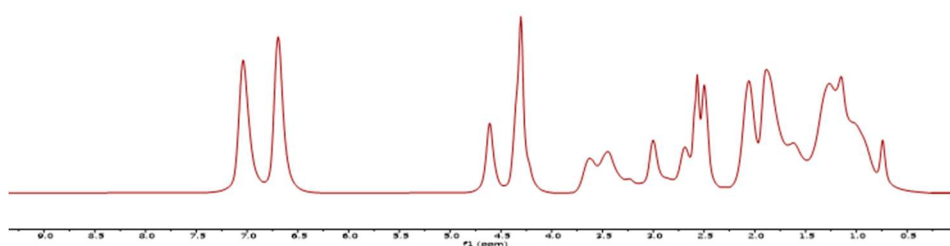
**Figura 83:** Distribuzione delle dimensioni con curva di fitting per **4-AuNP**. Diametro medio  $1.68 \pm 0.61$  nm.



**Figura 84:** Analisi TGA di **4-AuNP** sotto flusso d'aria. Perdita di massa 49.1 %.



**Figura 85:** Spettro UV-Vis di una soluzione 0.1 mg/mL di **4-AuNP** in H<sub>2</sub>O.

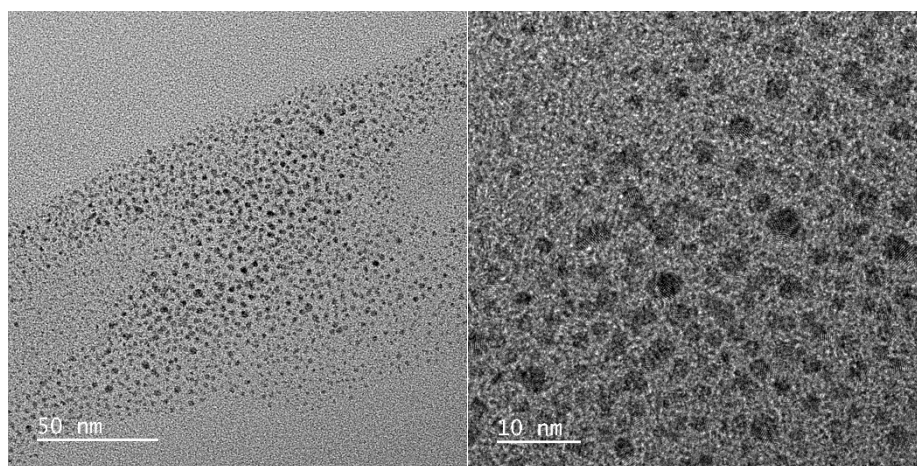


**Figura 86:** Spettro <sup>1</sup>H-NMR con filtro di diffusione di **4-AuNP** in D<sub>2</sub>O.

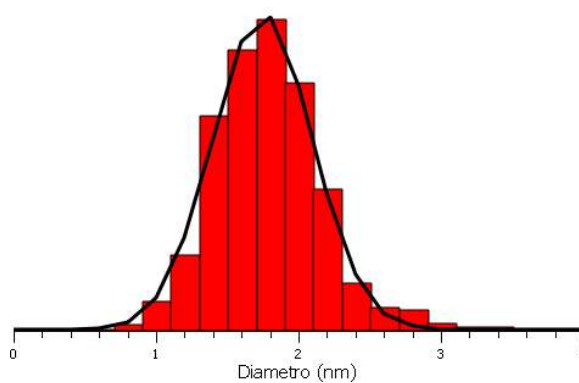


### 10.2.6 Caratterizzazione di 5-AuNP

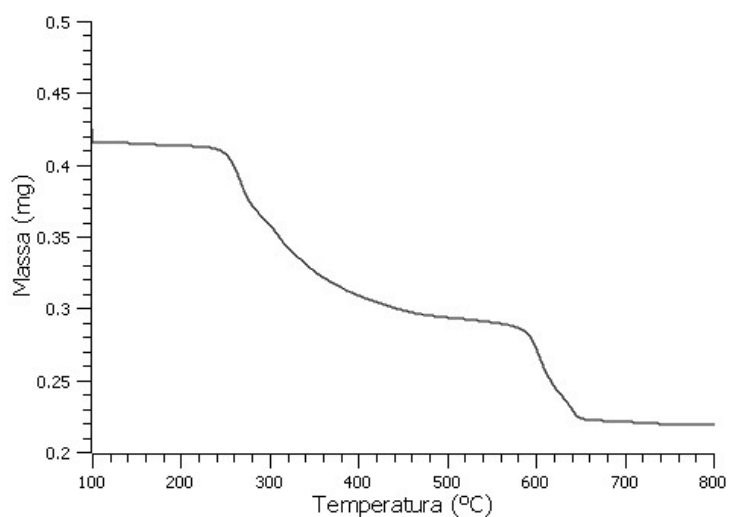
Per **5-AuNP** da analisi TEM è emerso che il diametro medio è pari a 1.75 nm (Fig. 87), da analisi TGA che la perdita di massa percentuale è pari a 46.9 % (Fig. 89) e quindi è stato ricavato che il rapporto oro tiolo è  $\text{Au}_{165}(\text{SR})_{49}$ . Lo spettro UV-Vis (Fig. 90) conferma che la dimensione medie delle nanoparticelle è inferiore a 2 nm. Lo spettro NMR con filtro di diffusione è riportato in Fig. 91.



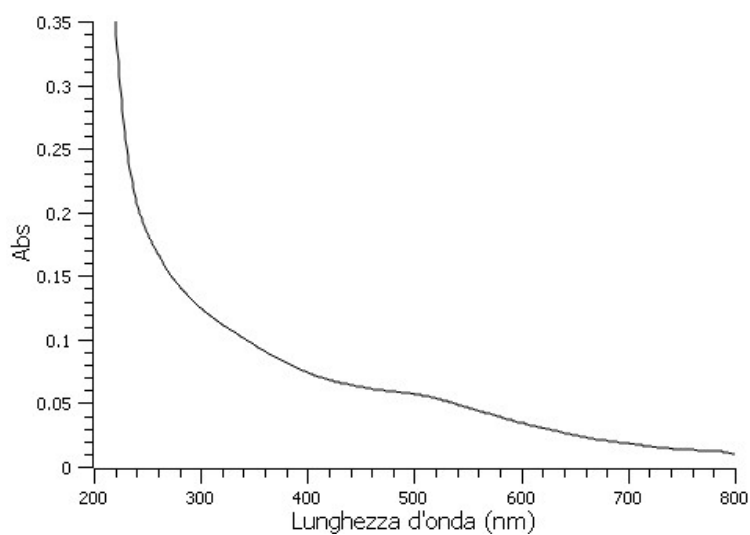
**Figura 87:** Immagini TEM a diversi ingrandimenti di **5-AuNP**.



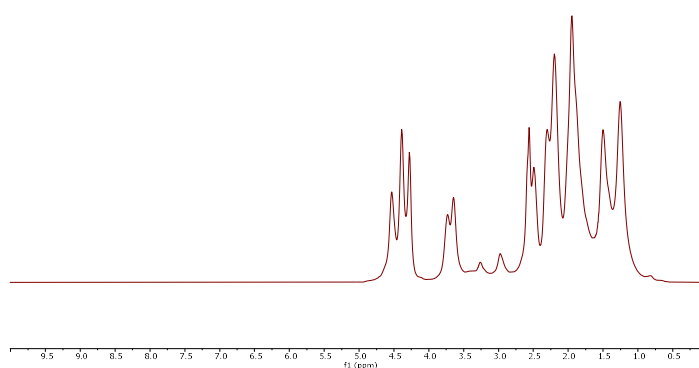
**Figura 88:** Distribuzione delle dimensioni con curva di fitting per **5-AuNP**. Diametro medio  $1.75 \pm 0.35$  nm.



**Figura 89:** Analisi TGA di **5-AuNP** sotto flusso d'aria. Perdita di massa 46.9 %.



**Figura 90:** Spettro UV-Vis di una soluzione 0.1 mg/mL di **5-AuNP** in H<sub>2</sub>O.

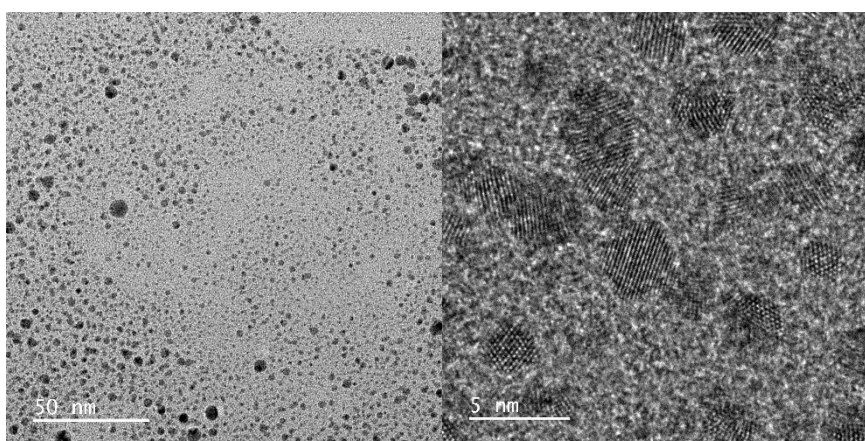


**Figura 91:** Spettro <sup>1</sup>H-NMR con filtro di diffusione di **5-AuNP** in D<sub>2</sub>O.

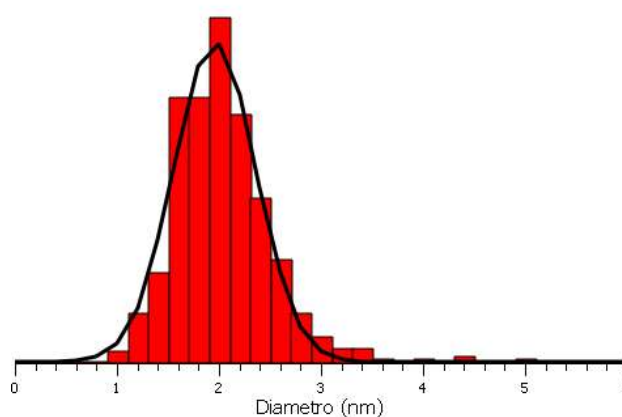


### 10.2.7 Caratterizzazione di 6-AuNP

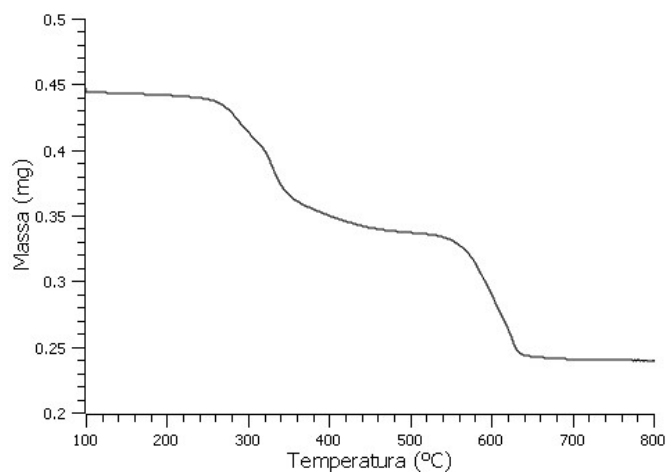
Per **6-AuNP** da analisi TEM è emerso che il diametro medio è pari a 1.96 nm (Fig. 92), da analisi TGA che la perdita di massa percentuale è pari a 45.8 % (Fig. 94) e quindi è stato ricavato che il rapporto oro tiolo è  $\text{Au}_{232}(\text{SR})_{66}$ . Lo spettro UV-Vis (Fig. 95) conferma che la dimensione medie delle nanoparticelle è inferiore a 2 nm, la banda di assorbimento situata a circa 283 nm è dovuta all'anello aromatico del triptofano [20]. Lo spettro NMR con filtro di diffusione è riportato in Fig. 96.



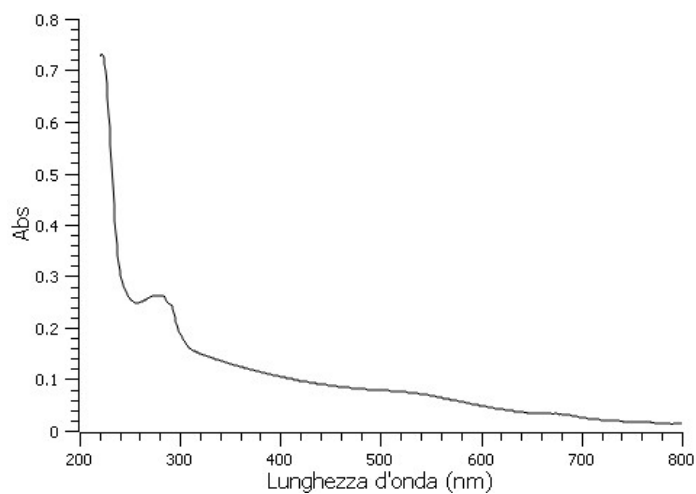
**Figura 92:** Immagini TEM a diversi ingrandimenti di **6-AuNP**.



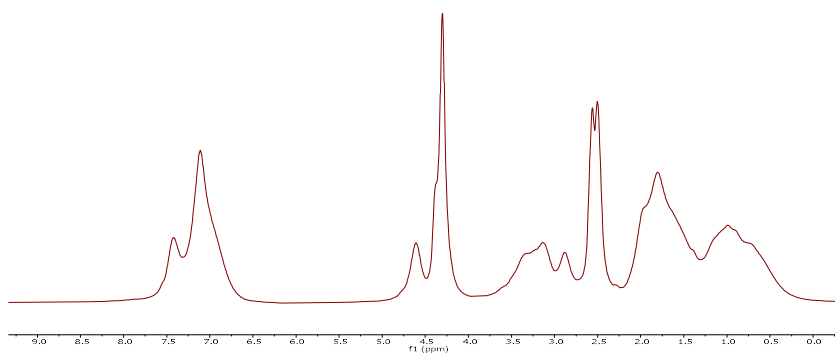
**Figura 93:** Distribuzione delle dimensioni con curva di fitting per **6-AuNP**. Diametro medio  $1.96 \pm 0.40$  nm.



**Figura 94:** Analisi TGA di **6-AuNP** sotto flusso d'aria. Perdita di massa 45.8 %.



**Figura 95:** Spettro UV-Vis di una soluzione 0.1 mg/mL di **6-AuNP** in H<sub>2</sub>O.

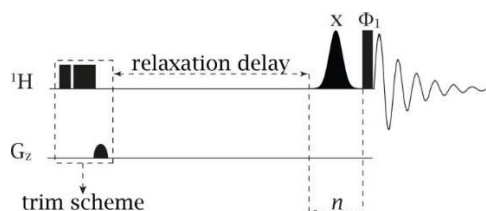


**Figura 96:** Spettro <sup>1</sup>H-NMR con filtro di diffusione di **6-AuNP** in D<sub>2</sub>O.

## 11. Appendice

### 11.1 Saturation Transfer Difference (STD)

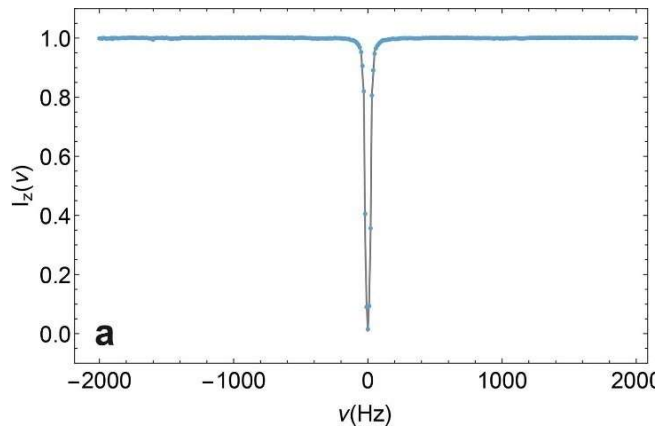
Scopo della sequenza di impulsi classica dell'STD (Fig. 97) è quello di saturare in maniera selettiva la risonanza di protoni che appartengono alla macromolecola, evitando al contempo la saturazione dell'analita. Questo può essere effettuato applicando un impulso lungo e a bassa potenza: per evitare errori indesiderati di *spillover* dell'impulso di saturazione, il protocollo standard prevede di utilizzare un treno di impulsi *shaped* selettivi anziché di un singolo impulso *hard* a bassa potenza. Gli impulsi *shaped* infatti non hanno un effetto significativo al di fuori della loro larghezza di banda operativa e permettono di irradiare solo una porzione ben precisa dello spettro. Tipicamente si utilizza una serie di impulsi Gaussiani di  $90^\circ$ , ognuno di 50 ms di durata, ripetuti per il periodo di saturazione desiderato. Lo step finale consiste nell'applicazione di un impulso *hard* prima dell'acquisizione del FID <sup>[14]</sup>.



**Figura 97:** Sequenza di impulsi standard per l'STD.

Prima di ogni scansione è inserito uno schema di *trim* che serve per riportare gli spin sempre al medesimo stato iniziale (non necessariamente all'equilibrio di Boltzmann) prima di iniziare la sequenza di impulsi.

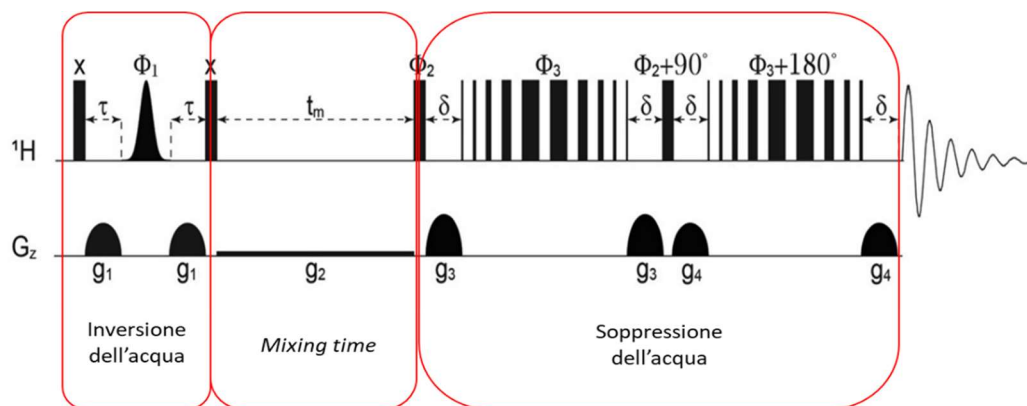
Un tipico profilo di saturazione che emerge da un treno di impulsi Gaussiani è riportato in Fig. 98:



**Figura 98:** Profilo sperimentale di saturazione (punti azzurri) di un treno di 40 impulsi Gaussiani di 50 ms (1% di troncamento). La simulazione è ottenuta con SpinDinamica dello stesso treno di impulsi (linea grigia). Il profilo è stato misurato alla frequenza  $^1\text{H}$  di Larmor a 500 MHz. Il campione contiene una soluzione di  $\text{GdCl}_3$  0.3 mM in  $\text{H}_2\text{O} : \text{D}_2\text{O} = 1 : 9$  ( $T_{1,\text{water}} = 0.210$  s,  $T_{2,\text{water}} = 0.194$  s) e muovendo il carrier di RF del treno di saturazione da -2000 Hz a 2000 Hz in step di 10 Hz rispetto alla risonanza dell'acqua [8].

## 11.2 WaterLOGSY

Il primo blocco della sequenza per un esperimento waterLOGSY consiste in un eco di spin assistito da gradienti, che permette di selezionare solo la risonanza dell' $\text{H}_2\text{O}$  defasando la magnetizzazione degli altri spin. Successivamente la magnetizzazione dell'acqua viene invertita dal un impulso di  $90^\circ$ . A questo punto l'acqua agisce come sorgente per il trasferimento di magnetizzazione via NOE durante il *mixing time*  $\tau_m$ . Il NOE che si è eventualmente sviluppato è quindi rivelato con un impulso di  $90^\circ$ , seguito un elemento di soppressione del solvente [14].



**Figura 99:** Sequenza di impulsi *e-PHOGSY* utilizzata per il *WaterLOGSY* [8].

L'impulso che permette l'inversione selettiva della magnetizzazione dell'acqua è di forma gaussiana e di durata solitamente compresa tra 5 e 15 ms. A causa dei diversi modi possibili con cui la magnetizzazione può essere trasferita, il waterLOGSY utilizza *mixing time* piuttosto lunghi, solitamente con valori di  $\tau_m$  compresi tra 0.5-1.5 s [14].

La soppressione del solvente è introdotta nella sequenza come DPGF-“perfect echo” (PE) con un cluster W5 come elemento di rifocalizzazione. A differenza del semplice spin eco, che rifocalizza solo l'evoluzione del chemical shift, il “*perfect echo*” è in grado di rifocalizzare anche l'evoluzione del J- coupling, eliminando così la magnetizzazione in antifase responsabile di distorsioni nello spettro [9].

### 11.3 WaterSTD

La sequenza di impulsi per esperimenti *WaterSTD* è riportata in Fig. 100. Essa consiste in un esperimento STD seguito da un blocco che ha lo scopo di sopprimere il segnale del solvente, nella forma di DPGF-“perfect echo” (PE) con un cluster W5 come elemento di rifocalizzazione.

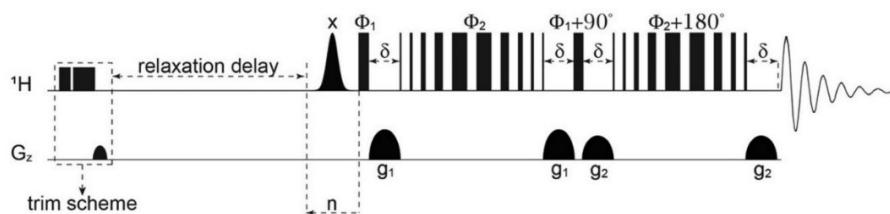


Figura 100: Sequenza di impulsi utilizzata per l'esperimento *WaterSTD* [8].

La differenza tra esperimenti HP e LP *WaterSTD* risiede nella differente potenza degli impulsi di saturazione. Come riportato in Fig. 26, è evidente il cambiamento del profilo di saturazione tra le due varianti dell'esperimento.

## 12. Bibliografia

- (1) *Neuroblastoma bambini: sintomi, diagnosi e cure.*  
<https://www.airc.it/cancro/informazioni-tumori/guida-ai-tumori-pediatrici/neuroblastoma-pediatico> (accessed 2024-05-17).
- (2) Berthold, F.; Spix, C.; Kaatsch, P.; Lampert, F. Incidence, Survival, and Treatment of Localized and Metastatic Neuroblastoma in Germany 1979–2015. *Pediatr Drugs* 2017, 19 (6), 577–593. <https://doi.org/10.1007/s40272-017-0251-3>.
- (3) Verly, I. R. N.; van Kuilenburg, A. B. P.; Abeling, N. G. G. M.; Goorden, S. M. I.; Fiocco, M.; Vaz, F. M.; van Noesel, M. M.; Zwaan, C. M.; Kaspers, G. J. L.; Merks, J. H. M.; Caron, H. N.; Tytgat, G. A. M. 3-Methoxytyramine: An Independent Prognostic Biomarker That Associates with High-Risk Disease and Poor Clinical Outcome in Neuroblastoma Patients. *European Journal of Cancer* 2018, 90, 102–110. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2017.11.025>.
- (4) Yokota, K.; Uchida, H.; Sakairi, M.; Abe, M.; Tanaka, Y.; Tainaka, T.; Shiota, C.; Sumida, W.; Oshima, K.; Makita, S.; Amano, H.; Hinoki, A. Identification of Novel Neuroblastoma Biomarkers in Urine Samples. *Sci Rep* 2021, 11 (1), 4055. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-83619-w>.
- (5) Erdelyi, D. J.; Elliott, M.; Phillips, B. Urine Catecholamines in Paediatrics. *Archives of Disease in Childhood - Education and Practice* 2011, 96 (3), 107–111. <https://doi.org/10.1136/adc.2010.207126>.
- (6) Verly, I. R. N.; van Kuilenburg, A. B. P.; Abeling, N. G. G. M.; Goorden, S. M. I.; Fiocco, M.; Vaz, F. M.; van Noesel, M. M.; Zwaan, C. M.; Kaspers, G. L.; Merks, J. H. M.; Caron, H. N.; Tytgat, G. A. M. Catecholamines Profiles at Diagnosis: Increased Diagnostic Sensitivity and Correlation with Biological and Clinical Features in Neuroblastoma Patients. *European Journal of Cancer* 2017, 72, 235–243. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2016.12.002>.
- (7) *Clinical validation of urine 3-methoxytyramine as a biomarker of neuroblastoma and comparison with other catecholamine-related biomarkers.*  
<https://doi.org/10.1177/0004563216654723>.

- (8) De Biasi, F.; Mancin, F.; Rastrelli, F. Nanoparticle-Assisted NMR Spectroscopy: A Chemosensing Perspective. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* 2020, *117*, 70–88. <https://doi.org/10.1016/j.pnmrs.2019.12.001>.
- (9) De Biasi, F.; Rosa-Gastaldo, D.; Sun, X.; Mancin, F.; Rastrelli, F. Nanoparticle-Assisted NMR Spectroscopy: Enhanced Detection of Analytes by Water-Mediated Saturation Transfer. *J. Am. Chem. Soc.* 2019, *141* (12), 4870–4877. <https://doi.org/10.1021/jacs.8b13225>.
- (10) Riccardi, L.; Gabrielli, L.; Sun, X.; De Biasi, F.; Rastrelli, F.; Mancin, F.; De Vivo, M. Nanoparticle-Based Receptors Mimic Protein-Ligand Recognition. *Chem* 2017, *3* (1), 92–109. <https://doi.org/10.1016/j.chempr.2017.05.016>.
- (11) *State of the art in gold nanoparticle synthesis - ScienceDirect.* <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0010854512002305> (accessed 2024-06-02).
- (12) Manea-et-al-2008-Expeditious-Synthesis-of-Water-Soluble-Monolayer-Protected-Gold-Nanoparticles-of-Controlled-Size-and (2).
- (13) *A Critical Size for Emergence of Nonbulk Electronic and Geometric Structures in Dodecanethiolate-Protected Au Clusters | Journal of the American Chemical Society.* <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ja5109968> (accessed 2024-06-02).
- (14) Claridge, T. D. W. High-Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry..Pdf.
- (15) Federico De Biasi; Supervisor Federico Rastrelli. Ph.D. Thesis Matrix-Assisted NMR; 2018..Docx.
- (16) Dalvit, C.; Pevarello, P.; Tato, M.; Veronesi, M.; Vulpetti, A.; Sundström, M. Identification of Compounds with Binding Affinity to Proteins via Magnetization Transfer from Bulk Water\*.
- (17) Cutting, B.; Shelke, S. v.; Dragic, Z.; Wagner, B.; Gathje, H.; Keim, S.; Ernst, B. Sensitivity Enhancement in Saturation Transfer Difference (STD) Experiments through Optimized Excitation Schemes. Magnetic Resonance.Docx.
- (18) Amendola, V.; Pilot, R.; Frasconi, M.; Maragò, O. M.; Iatì, M. A. Surface Plasmon Resonance in Gold Nanoparticles: A Review. *J. Phys.: Condens. Matter* 2017, *29* (20), 203002. <https://doi.org/10.1088/1361-648X/aa60f3>.

- (19) Hazra, C.; Samanta, T.; Mahalingam, V. A Resonance Energy Transfer Approach for the Selective Detection of Aromatic Amino Acids. *J. Mater. Chem. C* 2014, 2 (47), 10157–10163. <https://doi.org/10.1039/C4TC01954G>.
- (20) Lesniak, W. G.; Jyoti, A.; Mishra, M. K.; Louissaint, N.; Romero, R.; Chugani, D. C.; Kannan, S.; Kannan, R. M. Concurrent Quantification of Tryptophan and Its Major Metabolites. *Analytical Biochemistry* 2013, 443 (2), 222–231. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2013.09.001>.



## Ringraziamenti

*Volevo ringraziare tutte le persone che mi sono state vicine in questo periodo della mia vita.*

*Ringrazio di cuore il Professor Rastrelli per l'estrema disponibilità mostrata nei miei confronti durante tutto il lavoro di Tesi magistrale. I momenti passati in sua compagnia sono stati estremamente utili non solo per il lavoro di Tesi in sé, ma soprattutto per le numerose conoscenze trasmesse sul mondo della chimica!*

*Ai miei genitori, sebbene in questi anni le difficoltà non siano mancate, vi volevo ringraziare per avermi dato la possibilità di costruirmi un futuro migliore. Il vostro sostegno non mi è mai mancato e spero di avervi resi orgogliosi con i risultati raggiunti in questo percorso universitario.*

*Ad Erika, è difficile condensare in poche righe tutto quello che sei stata per me in questi anni. Sei stata la persona che mi ha convinto ad iscrivermi all'Università e nonostante i numerosi dubbi che nutrivo, tu sapevi già che questa sarebbe stata la scelta giusta per me... Nei momenti di sconforto universitari e non, sei sempre stata al mio fianco con l'empatia e la dolcezza che ti contraddistinguono. In questi sei anni di relazione siamo cresciuti tanto insieme e abbiamo avuto la possibilità di costruire il rapporto meraviglioso che abbiamo oggi. Ma ora che sono giunto al termine di questa parte della mia vita voglio dirti che questa non è una fine, ma l'inizio della nostra vita futura insieme...*

*Ai nonni, loro sono stati sempre i miei primi tifosi, e per aiutarmi durante gli esami la preghiera era sempre assicurata. Con loro non si poteva mai essere agitati prima di un esame perché la risposta era: "Ah beh tanto sappiamo già che voto prenderai".*

*Agli amici incontrati durante questo percorso universitario e agli amici storici di infanzia, che hanno sempre permesso di vivere delle avventure da ricordare!*