

L'attività di ricerca prevista è stata orientata sulla realizzazione di supporti nanostrutturati idonei per misure di « biosensing » e caratterizzazione magneto-plasmonica.

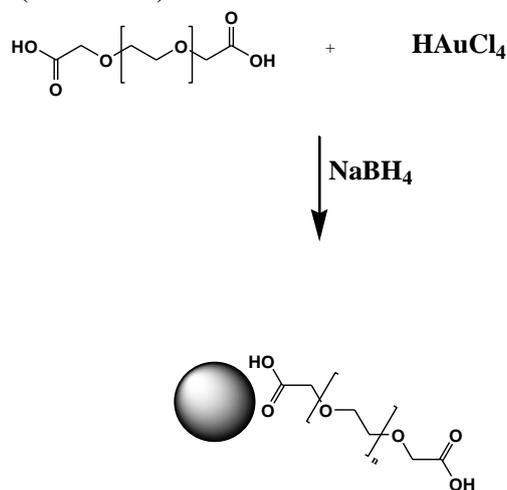
Il piano di lavoro nell'ambito del programma è consistito in :

- Sintesi di due tipi di nanoparticelle di Oro con diversa forma e dimensione aventi un intorno chimico differente: Nanoparticelle Ibride
- Caratterizzazione UV Visibile delle nanoparticelle in fase liquida e Microscopia Elettronica (TEM) al fine di valutare la forma e dimensione e lo spettro di assorbimento della banda plasmonica caratteristica
- Caratterizzazione PM-IRRAS , XPS , XRD delle nanoparticelle sintetizzate per valutare la presenza dei gruppi funzionali che sono serviti da “intorno chimico delle nanoparticelle”
- Preparazione di Substrati di Quarzo e funzionalizzazione chimica dei due tipi di Nanoparticelle : Nanostrutturazione
- Caratterizzazione Spettroscopica UV –VIS in trasmittanza su strato solido
- Misure di biosensing e Magnetoplasmonica
- Conclusioni e Prospettive Future

1. Sintesi di Nanoparticelle Ibride :

1.1. Sintesi di Nanoparticelle di oro pegilate (AuPEG)

La sintesi di nanoparticelle di oro « ibride » è stata condotta a temperatura ambiente e sotto agitazione magnetica, attraverso sintesi chimica a un solo stadio (one step) che prevede la riduzione di un sale di oro di acido tetracloroaurico (HAuCl_4) in presenza di un agente riducente forte di Boroidrato di Sodio (NaBH_4), utilizzando come surfattante molecole di Polietilenglicole dicarbossilato (PEG-COOH). Le molecole di polimero hanno la particolarità di essere biocompatibili e biomobili, pertanto possono essere usate in campo biomedico e biosensoristico per l'assenza di tossicità e per l'eliminazione di adsorbimenti aspecifici da parte di altre biomolecole. La reazione chimica prevede la partecipazione di molecole di Polimero carbossilico in presenza di Sali di oro e riducente in maniera tale da intervenire nella crescita della nanoparticella (schema 1)



Schema 1 : schema di sintesi delle nanoparticelle di Oro pegilate

Dopo circa 4h dalla riduzione dei Sali di oro, con cambiamento di colore da giallo paglierino a rosso corallo, la soluzione colloidale è stata analizzata per spettroscopia UV Visibile in assorbanza, osservando il caratteristico picco a 530 nm (figura 1a) caratteristico di nanoparticelle sferiche la cui forma e dimensione è stata confermata per microscopia elettronica (TEM) (figura 1b). L'analisi microscopica mostra delle nanoparticelle omogenee e uniformi con una distribuzione di sezione 7 nm (figura 1c).

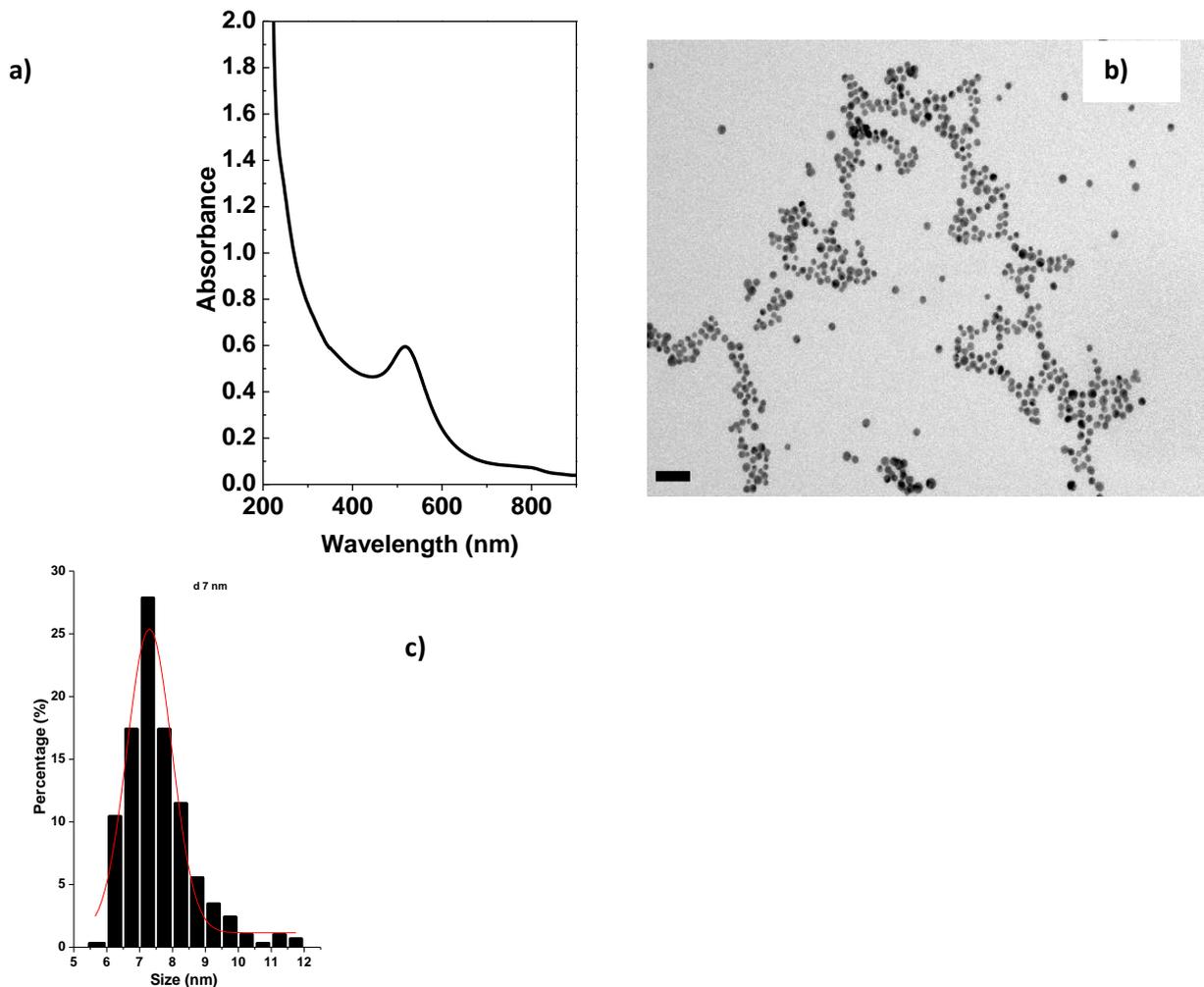


Figura.1 (a) Spettro UV Visibile delle nanoparticelle di oro aventi un picco di assorbanza a 530 nm (b) Microscopia elettronica (TEM) (c) Distribuzione delle dimensioni delle nanoparticelle di oro

Al fine di caratterizzare il comportamento ibrido delle nanoparticelle pegilate, abbiamo eseguito un'analisi XRD della sospensione colloidale estratta sottovuoto che ha evidenziato la presenza di picchi di oro e Polimero all'interno delle faccette cristallografiche dell'oro (figura 2); L'analisi XPS ha confermato la presenza delle bande caratteristiche dell'oro e della funzionalità carbossilica all'interno della nanoparticella

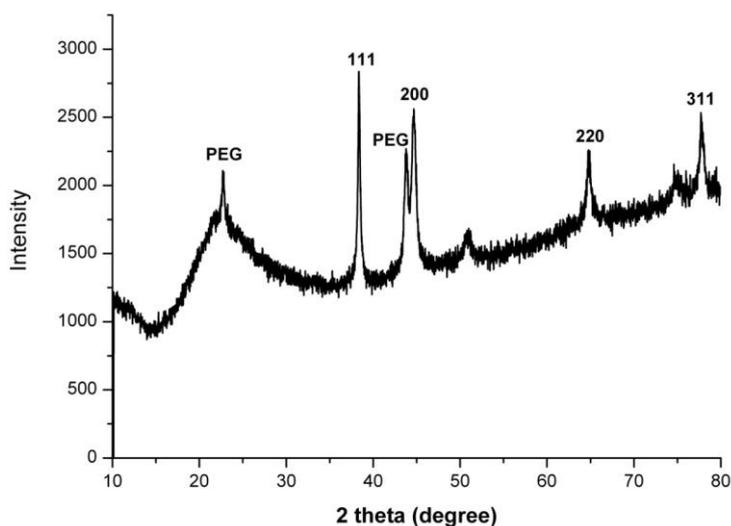
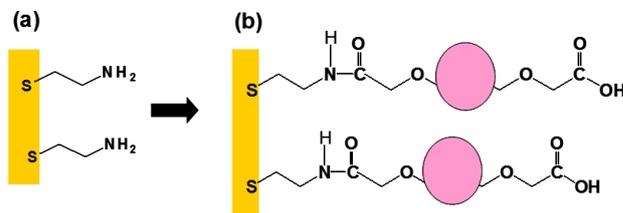


Figura.2 : Analisi XRD delle Nanoparticelle di oro Pegilate (AuPEG)

PM-IRRAS e caratterizzazione microscopica (SEM) di PEG Au NPs su un substrato di oro previa funzionalizzazione chimica :

Le nanoparticelle di Oro-PEG sono state funzionalizzate su un supporto di oro previamente funzionalizzato da cisteamina (schema 2) e caratterizzate per spettroscopia infrarossa (PM-IRRAS) , e microscopia elettronica su supporto solido (SEM). La microscopia in fase solida (SEM) (figura 3) ha confermato la natura non dispersa e omogenea della nanoparticelle anche dopo funzionalizzazione chimica, indicando uno strato sottile e ordinato delle stesse. L’analisi infrarossa ha mostrato i gruppi funzionali caratteristici del PEG COOH con picco a 1100 cm^{-1} caratteristico della catena legame C-O-C, il picco a 1251 cm^{-1} è caratteristico del gruppo carbonilico e il picco a 1735 cm^{-1} conferma l’esterificazione in seguito all’attivazione del gruppo carbossilico del polimero.(figura 3a)



Schema 2 : Funzionalizzazione chimica delle AuPEG NPs su un substrato di oro previa attivazione di cisteamina

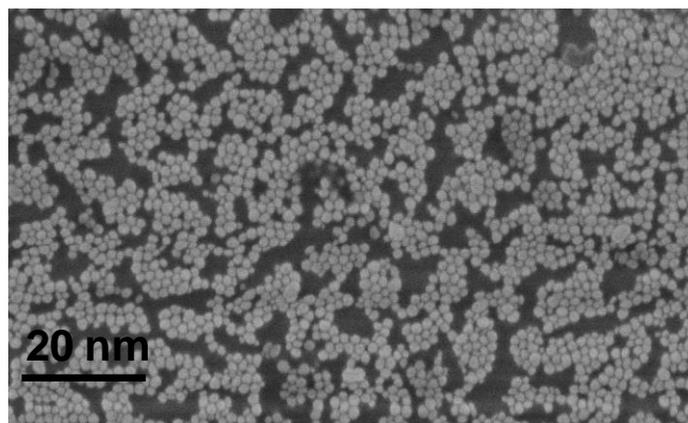


Figura 3 : SEM di nanoparticelle di oro dopo funzionalizzazione chimica

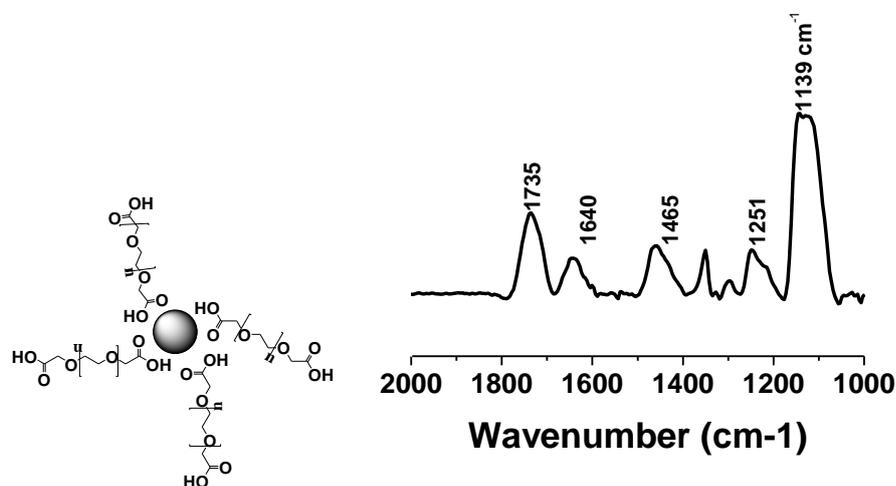


Figura 3a :Caratterizzazione Infrarossa PM-IRRAS delle nanoparticelle pegilate dopo funzionalizzazione chimica

XPS (X-Ray Photoelectron spectroscopy)Analisi :

L'analisi XPS è stata eseguita dopo nanostrutturazione delle nanoparticelle funzionalizzate con PEG su un substrato di oro previa funzionalizzazione chimica con cysteamina . La presenza del PEG molecolare è stata messa in evidenza dal picco C1s a 286 eV, caratteristico del legame C-O. Il picco a più bassa intensità' (289eV) è dovuto al carbonio del gruppo carbossilico terminale del PEG (Figure 4 a1).Il singolo picco a 533 eV , è dovuto all'ossigeno O1s nel legame C-O-C del PEG (Figure 4 a1). Il forte abbassamento del picco di azoto e la contribuzione del picco dello zolfo è ascrivibile alla formazione del layer ordinate di nanoparticelle di circa 10 nm sul substrato di oro.

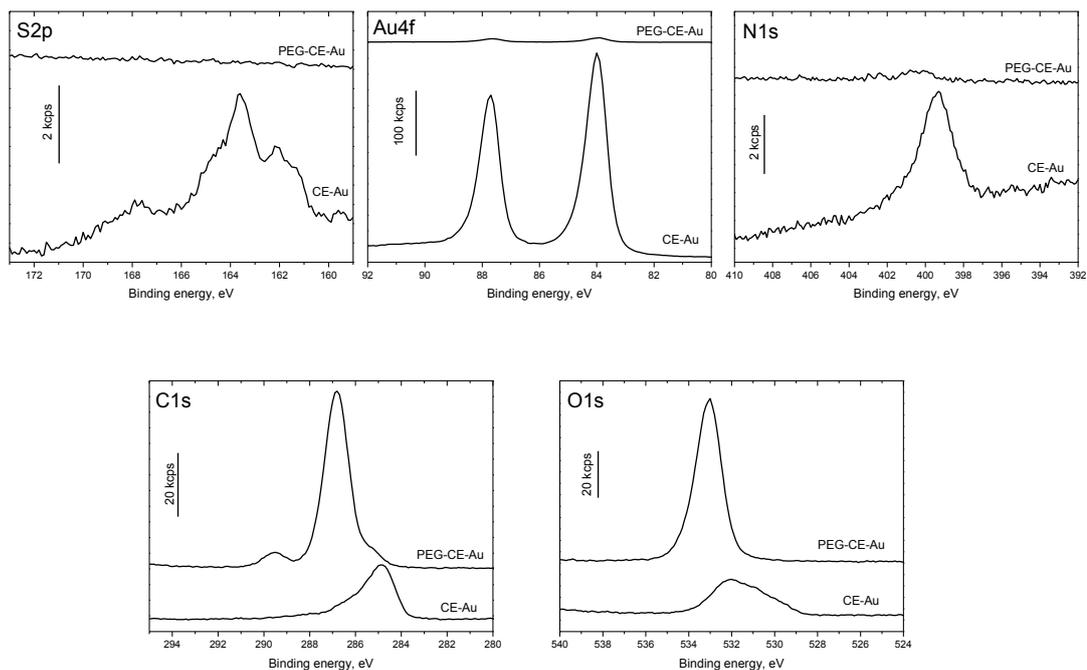
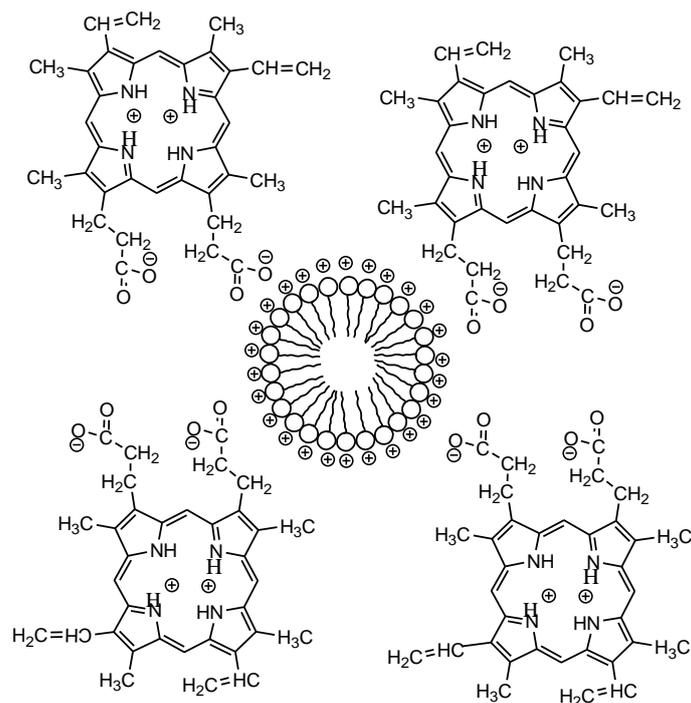


Figure 4: Analisi XPS di un substrato di oro funzionalizzato con cysteamina prima e dopo immobilizzazione con nanoparticelle di oro.

2. Sintesi di Nanoparticelle ibride di diversa dimensione

2.1. Sintesi di Nanoparticelle di Oro-Protoporfirina :

Un altro metodo per ottenere nanoparticelle di diversa forma e dimensione è il metodo « seed mediated synthesis » che consiste in un processo chimico di reazione a due stadi (two step) nel quale c'è una prima fase di sintesi di germi di oro (seed) e una seconda fase di accrescimento dei germi di oro (growth) in base al quale, il rapporto dei reagenti e dei riducenti di reazione, influenza la forma e la dimensione finale delle nanoparticelle. Abbiamo realizzato la sintesi di nanoparticelle di oro ibride con protoporfirina nelle quali la protoporfirina è una macromolecola utilizzata in terapia fotodinamica e come strato attivo, per le sue proprietà ottiche e di fluorescenza, gioca un ruolo fondamentale nei processi di « binding » di biomolecole. Nel processo di formazione delle nanoparticelle di oro, la protoporfirina forma un complesso con le molecole di surfattante (CTAB) (schema 3) e tale complesso partecipa attivamente al processo di riduzione dei sali di oro in presenza di NaBH_4 .



Schema 3 : Rappresentazione del complesso fra protoporfirina e micella di CTAB

In figura 5 sono rappresentate le caratterizzazioni spettroscopiche e microscopiche di germi di oro semplici (figura 5a) e germi di oro con protoporfirina (figura 5 b) ; è possibile osservare la netta differenza tra i due tipi di micrografia dovuta alla complessazione della protoporfirina nella nanoparticella di oro durante la formazione dei germi di oro. La presenza della protoporfirina all'interno della nanoparticella di oro in fase « seed » conferisce proprietà spettroscopiche differenti. In figura 5c vengono riportati gli spettri UV VIS della protoporfirina libera (figura 5c linea nera) nella quale sono caratteristici i 4 picchi corrispondenti alle bande Q1-Q4 e la banda tipica di Soret a 400 nm. La curva blu rappresenta i germi di oro complessati con protoporfirina nei quali sono evidenti la banda di soret e le bande Q shiftate nella regione blu Uv VIS e la zona a 420 nm corrispondente al plasmone dell'oro che indica l'avvenuta formazione di nanoparticelle ibride. La curva rossa in figura 5c indica il plasmone di riferimento relativo ai germi di oro senza porfirina.

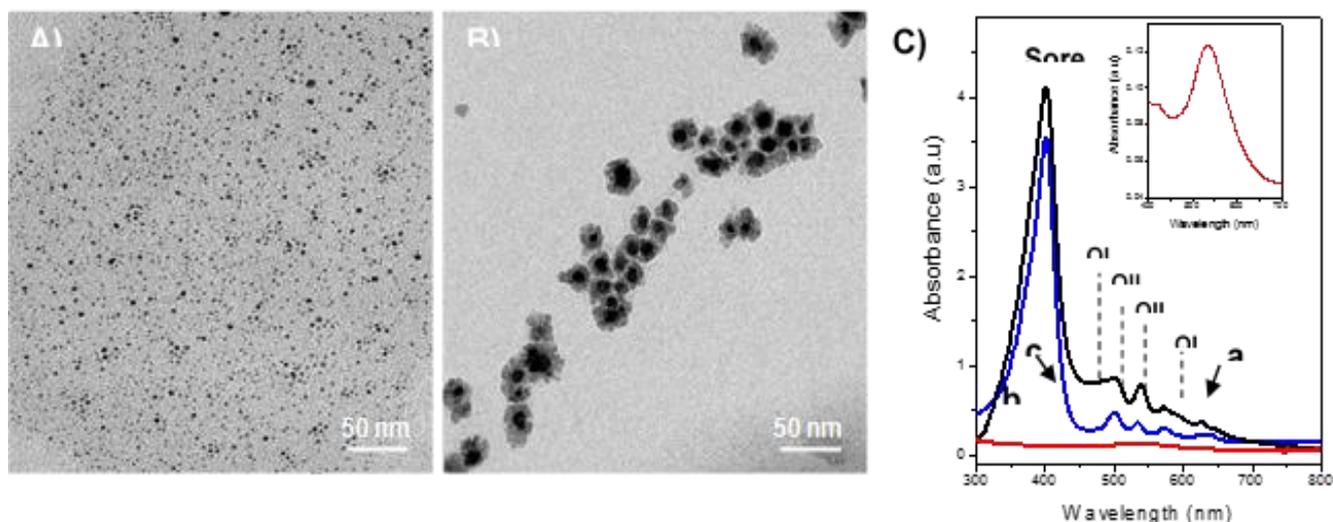


Figura 5: TEM di germi di oro prima (5a) e dopo complessazione con protoporfirina (5b); UV VIS delle soluzioni di protoporfirina libera (curva nera) protoporfirina complessata ai germi di oro (curva blu); germi .di oro senza protoporfirina (curva rossa)

2.2. Sintesi e Caratterizzazione di nanoparticelle di Protoporfirina a forma di stella

La sintesi delle nanostar a base di porfirina è stata eseguita facendo reagire i germi di oro complessati con protoporfirina, con la soluzione «growth » di accrescimento in presenza della macromolecola in oggetto. Il risultato di questa sintesi è stata la realizzazione di particolari e originali nanostrutture a forma di stella (Nanostar) (figura 6 a-b). Queste nanostrutture hanno una dimensione di 50 nm e sono polidisperse. Lo spettro UV VIS conferma la presenza della protoporfirina all'interno della struttura poliedrica, dalla banda di soret a 400 nm e i 4 picchi (Qband) nella zona del blu. Inoltre il plasmone dovuto alle nanostar cade nell'intorno 600-700 nm confermando l'avvenuta sintesi della nanoparticella ibrida (figura 6 c)

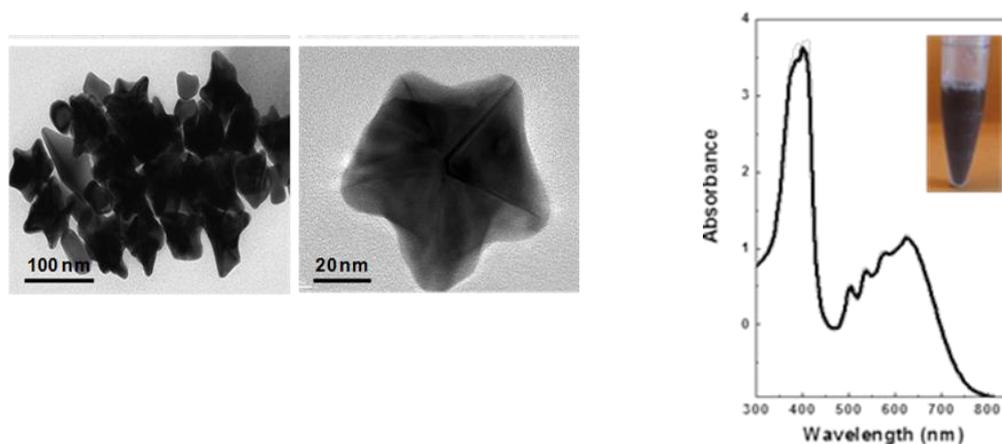


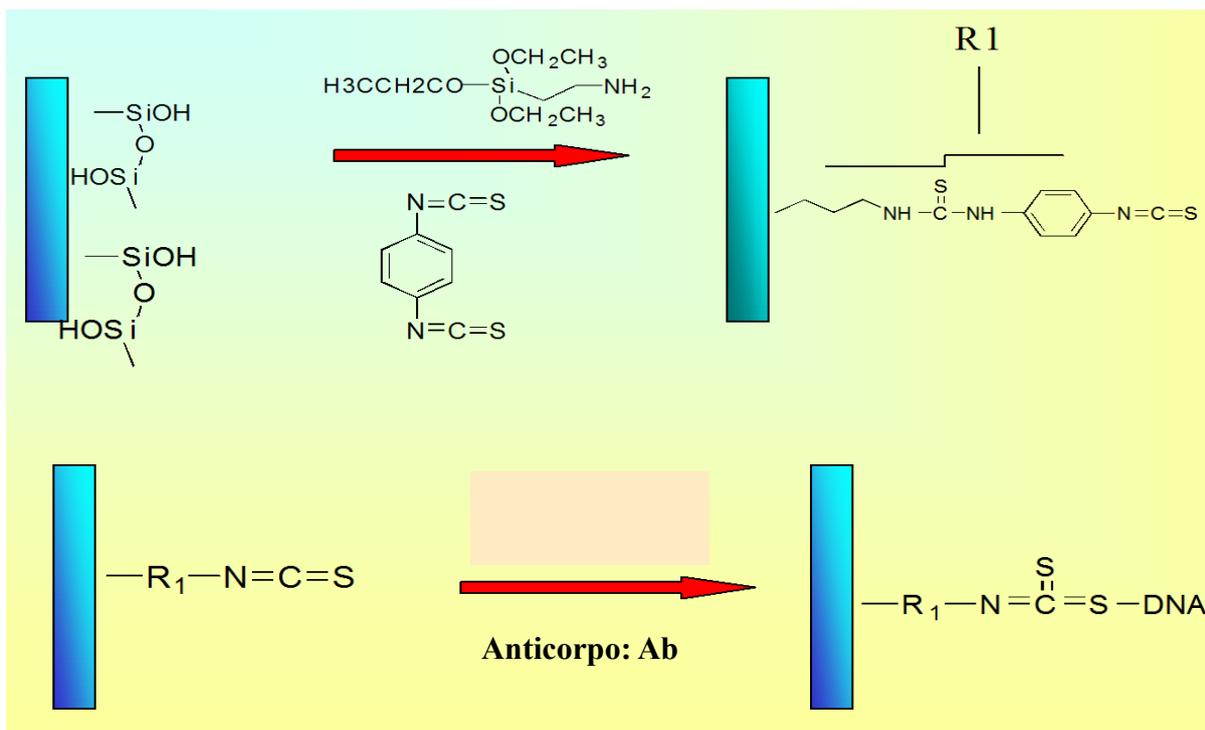
Figura 6 : TEM di Nanostar con protoporfirina (a-b) e spettro UV VIS della Nanostar in soluzione

3. Preparazione di Substrati di Quarzo e funzionalizzazione chimica dei due tipi di Nanoparticelle : Nanostrutturazione

La Nanostrutturazione dei due tipi di nanoparticelle è stata effettuata secondo due metodi : Metodo chimico e Metodo di Adsorbimento elettrostatico attraverso polimeri di diversa carica elettrostatica. Per ambedue i metodi, i substrati di Quarzo sono stati lavati con una soluzione di Acqua ossigenata (H_2O_2), Ammoniaca (NH_3) al 30% e acqua milli Q e in una seconda fase con etanolo e acqua milli Q per rimuovere i restanti residui organici.

3.1. Metodo Chimico :

La nanostrutturazione di nanoparticelle per via chimica è stata eseguita su substrato di quarzo previa silanizzazione con APTES (trimetossietilsilano) e acidificazione con HCl al 37% . L'ancoraggio delle nanoparticelle e delle biomolecole è stato eseguito dopo trattamento della superficie silanizzata con PDITC (p-fenildiisotiocianato) (schema 4).



Schema 4 : Processo di funzionalizzazione di substrati di Quarzo per via chimica.

Dopo la deposizione, i substrati nanostrutturati sono stati analizzati attraverso Tecnica di Risonanza Plasmonica di Superficie (SPR) allo stato solido e Tecnica Magneto Plasmonica (MO) in diversi punti del campione. In figura 7-8, sono schematizzati gli spettri SPR relativi a campioni di nanoparticelle pegilate di 10 nm (AuPEG-NH₂) e Gold Nanostar con protoporfirina di 50 nm di dimensione immobilizzate su substrati vetro corning.

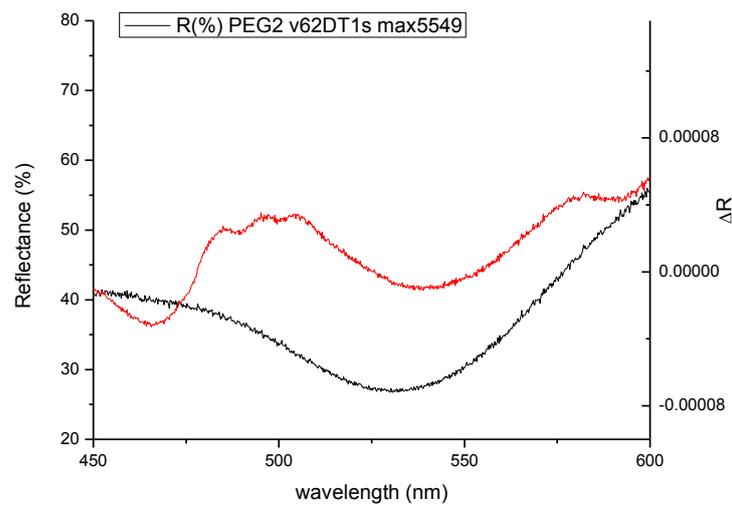
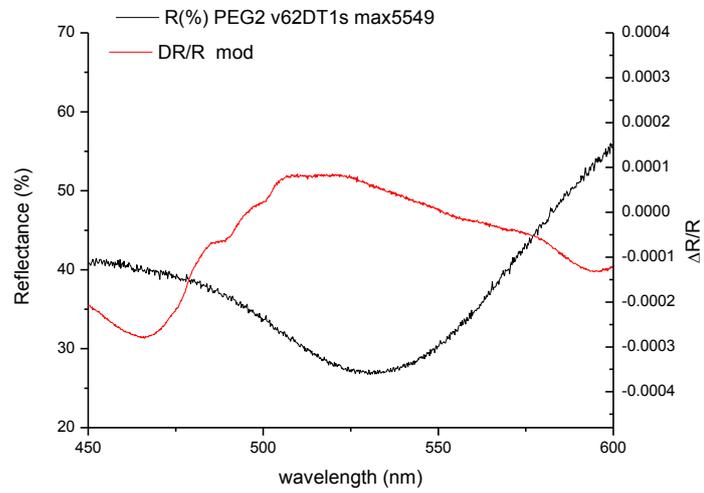
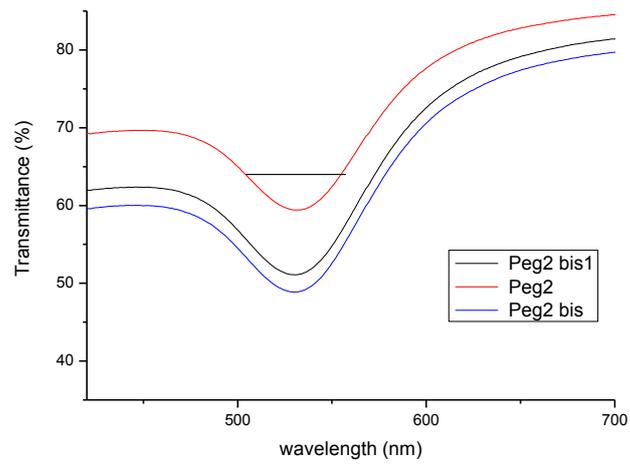


Figura 7 : Spettri di MO e SPR relativi a substrati di Quarzo funzionalizzati con dots di Au PEG NH₂

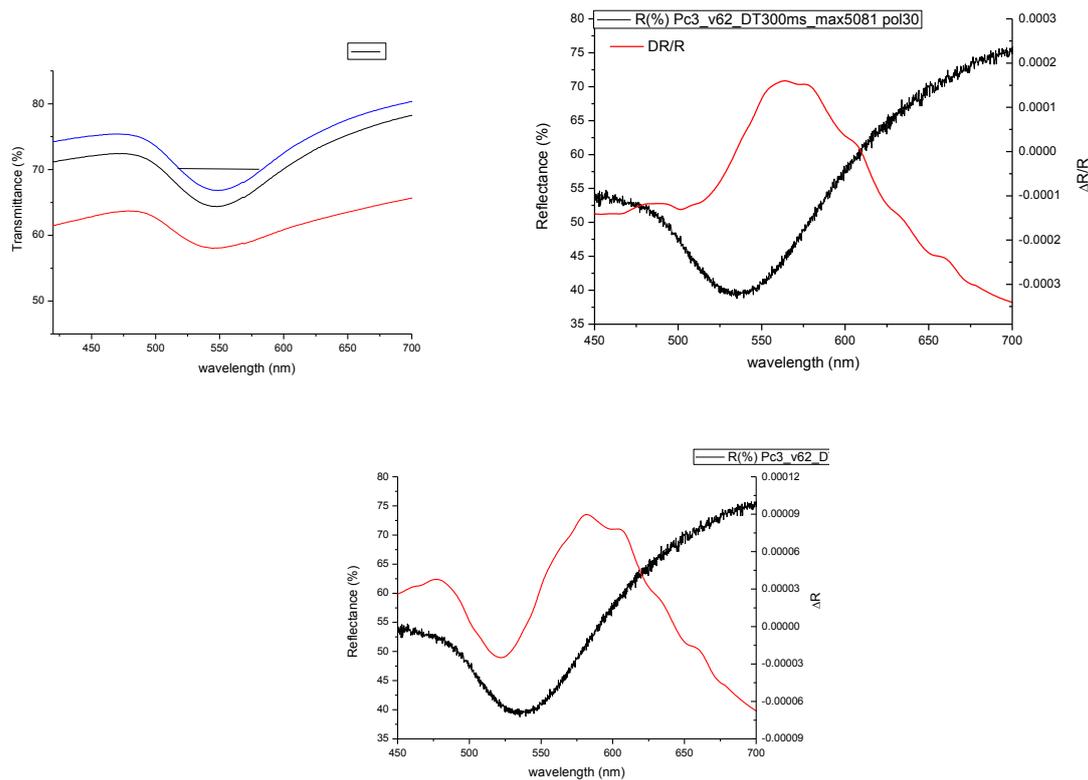
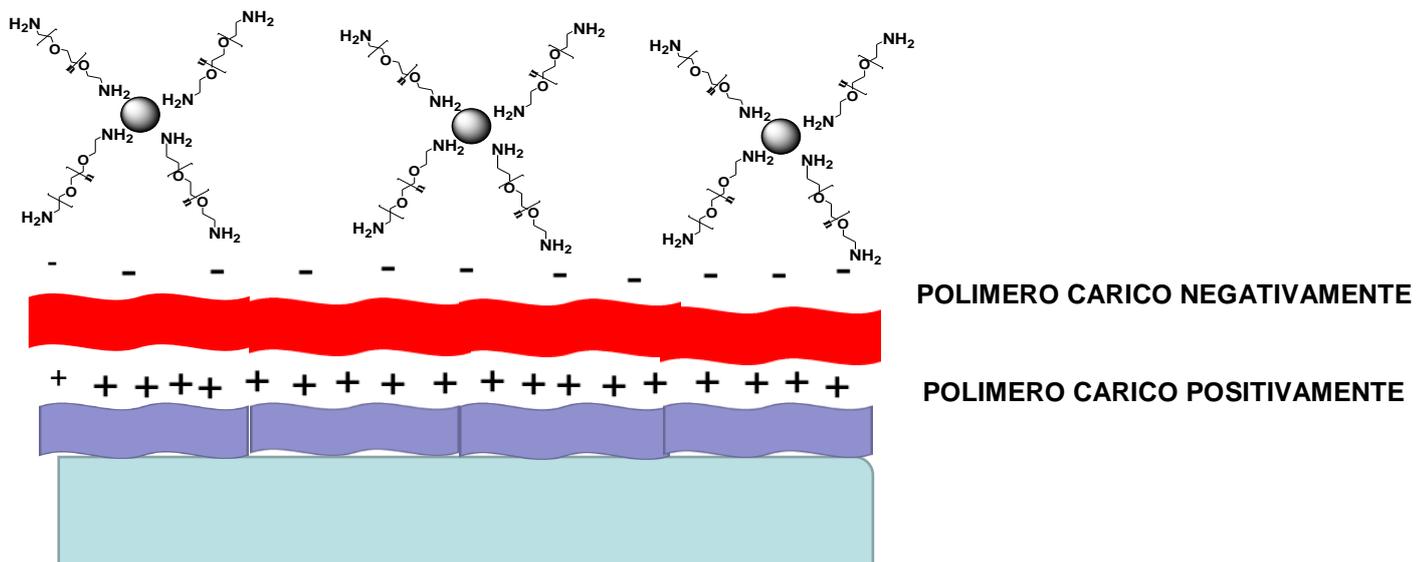


Figura 8 : Spettri di MO e SPR relativi a substrati di Quarzo funzionalizzati con Nanostar di Oro-Protoporfirina.

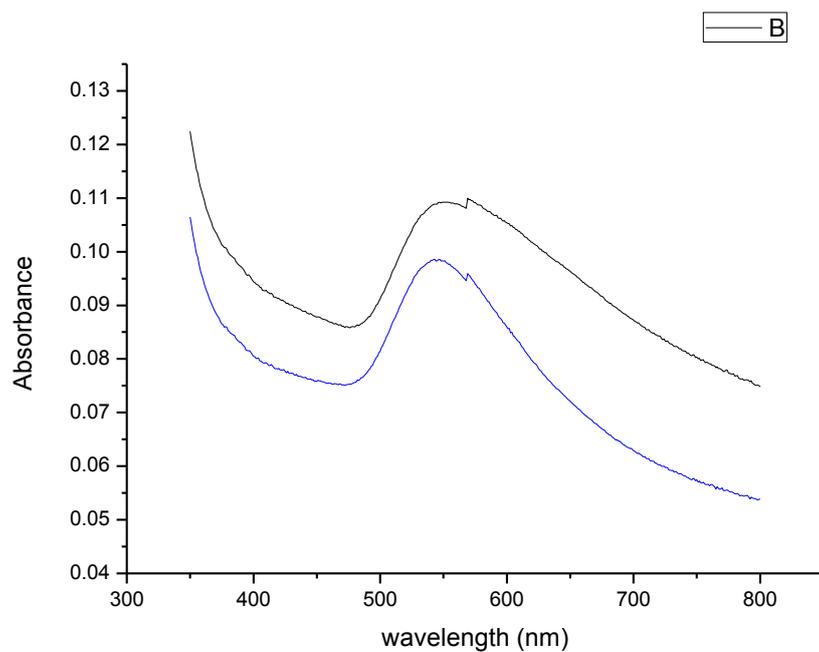
3.2. Metodo Adsorbimento Elettrostatico (LBL) per la deposizione e immobilizzazione di nanoparticelle su substrati di vetro :

Il metodo di adsorbimento elettrostatico, è stato eseguito su substrati di quarzi previamente lavati e trattati con HCl 37% per un'ora. E' stata preparata una soluzione di polimeri carichi positivamente e negativamente alla concentrazione 1% in acqua in modo da formare un doppio strato carico elettrostaticamente sul quale eseguire una funzionalizzazione di p-amminotiofenolo per 2h e successivamente deposizione delle nanoparticelle pegilate (AuPEG NH₂) e Nanostar tramite goccia oppure per immersione per 24h (schema 5).



Schema 5 : Nanostrutturazione per Metodo di adsorbimento Elettrostatico

In Figura 9, vengono riportati gli spettri di assorbimento UV VIS in fase solida, dei substrati nanostrutturati ottenuti in seguito a deposizione con goccia (spettro a)) o dopo immersione delle nanoparticelle per 24h (spettro b)).



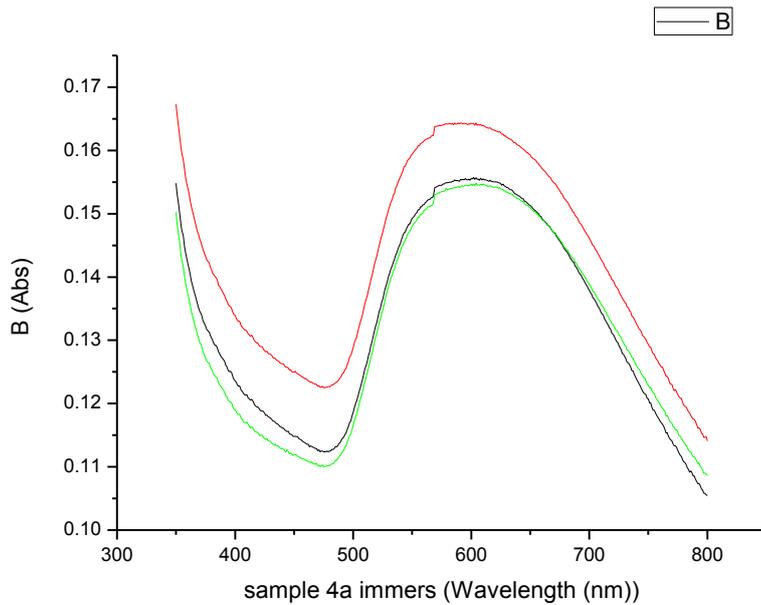


Figura 9: Spettro UV VIS in fase solida di AuPEG NH₂ nanostrutturate per via chimica

Su questi ultimi substrati nanostrutturati sono state eseguite delle prove di biosensing immobilizzando un anticorpo AntiIgG biotinilato e monitorando l'interazione con IgG complementare previa attivazione con Carbodiimide (EDC /NHS) a pH 7,2. Lo spettro UV VIS in figura 10 mostra la curva del plasmon delle nanoparticelle strutturate prima (curva nera) e dopo (curva rossa) immobilizzazione dell'anticorpo. L'innalzamento della curva di assorbanza e lo schift della curva conferma l'avvenuta immobilizzazione.

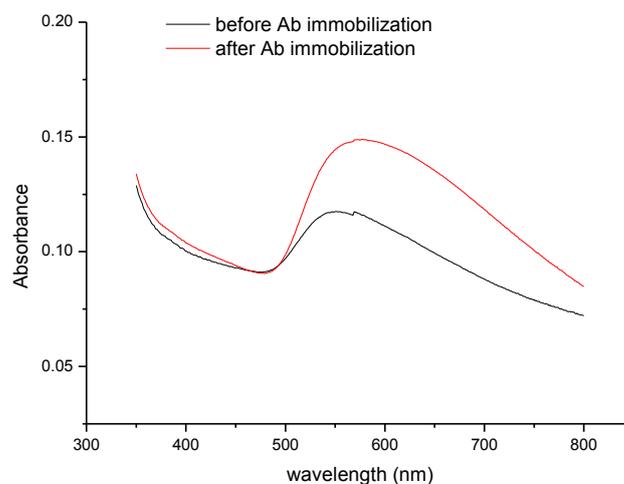


Figura 10. Spettro UV VISibile relativo all'immobilizzazione di Anticorpo AntiIgG su substrato nanostrutturato di AuPEGNH₂

Analoghi spettri di nanostrutturazione per via elettrostatica sono stati eseguiti con Nanostar ; In figura 12 si può osservare lo spettro UV Vis in statica delle nanoparticelle dopo nanostrutturazione; sono evidenti i picchi a 400 nm e le bande Q caratteristiche della porfirina shiftate dalla banda del plasmone dell'oro in seguito alla loro incorporazione all'interno delle nanoparticelle. Questi risultati preliminari confermano il successo della nanostrutturazione .

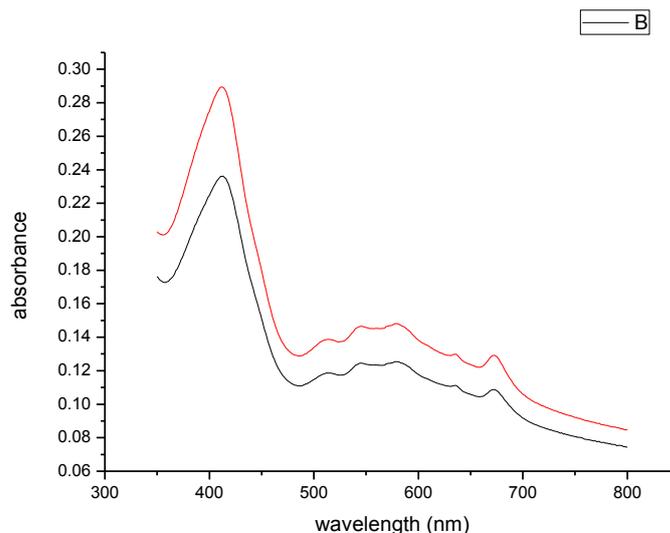


Figura 12: Spettri UV VS I due punti diversi di Nanostar con protoporfirina dopo nanostrutturazione

Conclusioni e Prospettive:

In conclusione, durante questo periodo di attività di ricerca, sono state sintetizzate e caratterizzate nuove particelle nanostrutturate idonee per applicazioni nel biosensing. Ci si propone di ottimizzare le misure di magnetoplasmonica utilizzando blend di nanoparticelle di oro pegilate e nanostar al fine di studiare il diverso comportamento ottico e magnetoplasmonico dopo miscelazione delle stesse e nanostrutturazione per via polimerica in adsorbimento elettrostatico. Ci proponiamo inoltre di eseguire misure di biosensing in dinamica monitorando l'interazione tra Anticorpo e Antigene oppure DNA:DNA a diverse concentrazioni e controllando i parametri di temperatura e pressione. Si prevede di pubblicare nei prossimi mesi i risultati ottenuti su riviste scientifiche specifiche di fattore di impatto adeguato.