

POLITECNICO DI TORINO

Collegio di Ingegneria Chimica e dei Materiali

**Corso di Laurea Magistrale
in Ingegneria Chimica e dei Processi Sostenibili**

Tesi di Laurea Magistrale

**Immobilizzazione dell'*h*LDH-A su MCM-41
per lo screening di farmaci antitumorali**



Relatori

prof. Marco Piumetti

prof.ssa Valentina Alice Cauda

Candidato

Maria Chiara Rosa

Luglio 2022

Indice

1. Introduzione	1
1.1 <i>Lattato deidrogenasi: classificazione e struttura</i>	2
1.2 <i>Glicolisi e glicolisi aerobica: effetto Warburg</i>	3
2. Processi enzimatici	7
2.1 <i>Cinetica enzimatica</i>	7
2.1.1 <i>Cinetica ed equazione di Michaelis-Menten</i>	7
2.1.2 <i>Linearizzazioni dell'equazione di Michaelis-Menten</i>	9
2.1.3 <i>LDH: proprietà allosteriche e modelli cinetici</i>	10
2.2 <i>Tecniche di immobilizzazione enzimatica</i>	11
2.2.1 <i>Immobilizzazione covalente su supporti funzionalizzati</i>	13
2.2.2 <i>Supporti per l'immobilizzazione enzimatica: il ruolo delle silici mesoporose</i>	13
2.3 <i>Inibizione enzimatica</i>	14
2.3.1 <i>Inibitori dell'LDH a base di N-idrossiindoli come agenti antitumorali</i>	15
3. Materiali e metodi	17
3.1 <i>Funzionalizzazione del supporto</i>	17
3.1.1 <i>Mono-funzionalizzazione: generazione di gruppi amminici</i>	18
3.1.2 <i>Etero-funzionalizzazione: generazione di gruppi amminici ed aldeidici</i>	18
3.1.3 <i>Quantificazione dei gruppi aldeidici</i>	20
3.1.4 <i>Quantificazione dei gruppi amminici</i>	20
3.2 <i>Caratterizzazione del materiale</i>	21
3.2.1 <i>Spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier (FTIR)</i>	21
3.2.2 <i>Fisisorbimento di azoto a -196 °C</i>	22
3.2.3 <i>Diffrazione a raggi X (XRD)</i>	24
3.3 <i>Caratterizzazione dell'LDH</i>	27
3.3.1 <i>Saggio di attività dell'enzima libero</i>	27
3.3.2 <i>Test di concentrazione, pH e temperatura ottimale dell'enzima libero</i>	28
3.4 <i>Immobilizzazione dell'LDH</i>	29
3.4.1 <i>Immobilizzazione su supporto etero-funzionalizzato</i>	29
3.4.2 <i>Immobilizzazione su supporto mono-funzionalizzato</i>	31
3.4.3 <i>Saggio di attività dell'enzima immobilizzato</i>	32
3.4.4 <i>Test di pH e temperatura ottimale dell'enzima immobilizzato</i>	33
3.4.5 <i>Immobilizzazione dell'LDH marcata con fluorescenza</i>	33
3.5 <i>Inibizione dell'LDH</i>	34
3.5.1 <i>Inibizione dell'enzima libero</i>	34
3.5.2 <i>Inibizione dell'enzima immobilizzato</i>	35

4. Discussione dei risultati	37
<i>4.1 Risultati della caratterizzazione dei supporti</i>	37
4.1.1 Risultati della spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier (FTIR).....	37
4.1.2 Risultati del fisisorbimento di azoto a -196 °C	39
4.1.3 Risultati della diffrattometria a raggi X (XRD)	40
<i>4.2 LDH libero</i>	41
4.2.1 Concentrazione, pH e temperatura ottimale dell'enzima libero.....	42
4.2.2 Parametri cinetici.....	45
<i>4.3 Efficienza della funzionalizzazione e dell'immobilizzazione</i>	47
4.3.1 Quantificazione dei gruppi aldeidici ed amminici	47
4.3.2 Resa di immobilizzazione e attività relativa percentuale	48
4.3.3 pH e temperatura ottimale dell'enzima immobilizzato	49
4.3.4 Immagini della microscopia a fluorescenza	50
<i>4.4 Efficienza dell'inibizione enzimatica</i>	52
5. Conclusioni e prospettive future	55
Lista dei simboli	57
Elenco delle figure	59
Elenco delle tabelle	63
Riferimenti bibliografici	65
Ringraziamenti	71

1. Introduzione

Secondo il rapporto stilato dall'IARC (*International Agency for Research on Cancer*) in collaborazione con l'ACS (*American Cancer Society*), nel 2020, i nuovi casi di tumore a livello mondiale sono stati circa 19,3 milioni con un totale di decessi dovuti a questa malattia di 10 milioni. Nel report vengono analizzati i dati relativi a 36 tumori in 185 differenti Paesi del Mondo e si afferma che una persona su cinque svilupperà un tumore nel corso della propria vita [1].

In Italia, invece, si stima che ci siano circa 1000 nuovi casi di cancro al giorno per un totale di 377 mila nuove diagnosi di tumore in un anno con percentuali di sopravvivenza a cinque anni dalla diagnosi del 65% per le donne e del 59,4% per gli uomini. A confermarlo sono i dati relativi al 2021 provenienti dalla collaborazione tra l'AIOM (*Associazione Italiana di Oncologia Medica*), l'AIRTUM (*Associazione Italiana Registri Tumori*), la fondazione AIOM e PASSI (*Progressi nelle Aziende Sanitarie per la Salute in Italia*) [2].

I dati statistici mostrano come la lotta contro il cancro e la continua ricerca scientifica per la sua cura rappresenti, tutt'oggi, una delle principali sfide per l'umanità. La Fondazione AIRC (*Associazione Italiana per la Ricerca sul Cancro*) suddivide le cure fino ad ora conosciute in strumenti di attacco, quando la malattia è già comparsa, e di difesa, prima che questa compaia e mostra come l'attuale ricerca oncologica si stia concentrando su quattro aree cruciali: comprensione e sfruttamento del ruolo anticancro del sistema immunitario, prevenzione della malattia, studio della relazione tra tumore ed organismo ed, infine, miglioramento della precisione da parte dei farmaci nel raggiungere il bersaglio. È proprio in quest'ultimo ambito che si colloca questo lavoro di tesi.

La glicolisi aerobica è la via metabolica alterata tramite cui le cellule tumorali, a differenza di quelle normali, metabolizzano glucosio per produrre energia. Nello specifico, nella seconda fase di questo percorso, il piruvato viene convertito, in presenza di ossigeno, in L-lattato ad opera dell'enzima lattato (o lattico) deidrogenasi (LDH) come mostrato in Figura 1.1 [3], [4].

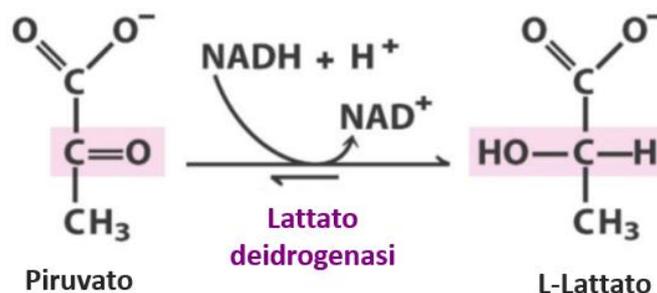


Figura 1.1 Schema di reazione catalizzata dalla lattato deidrogenasi

Gli enzimi e i trasportatori coinvolti nella glicolisi aerobica rappresentano degli ottimi bersagli per lo sviluppo di farmaci antitumorali. In particolare, l'inibizione della lattato deidrogenasi umana rappresenta una strategia promettente per lo sviluppo di una terapia anticancro mirata in grado di ostacolare la crescita e la proliferazione delle cellule tumorali. L'isoenzima umano costituito dalla sola subunità A di questo enzima glicolitico, *h*LDH-A, è difatti un comune denominatore tra diverse tipologie di cancro in quanto, ad esempio, viene

sovraespresso con il cancro al seno, ai polmoni, al pancreas, alla prostata, allo stomaco e all'endometrio [3], [4].

Al giorno d'oggi esistono già diversi farmaci antitumorali basati sull'inibizione della lattato deidrogenasi. Ad esempio, esponenti dei gruppi N-idrossiindoli (NHI) inibiscono la subunità A dell'*hLDH* e sono competitivi nei confronti del substrato (piruvato) e del cofattore NADH (nicotinammide adenina dinucleotide in forma ridotta) [5]. La galloflavina, invece, inibisce le isoforme costituite da entrambe le subunità (A e B) dell'*hLDH* in quanto si lega preferenzialmente all'enzima libero senza competere con il substrato o il cofattore [6].

Questa tesi è inserita all'interno di un progetto più ampio il cui obiettivo finale consiste nella realizzazione di un prototipo di biosensore stabile a base di *hLDH-A* in grado di testare l'efficacia di diversi farmaci antitumorali attraverso un processo rapido ed economico. In particolare, l'attività sperimentale svolta rappresenta l'inizio dell'intero lavoro e può essere suddivisa in due parti. Nella prima sono state valutate le condizioni ottimali di attività dell'enzima libero (concentrazioni, pH e temperatura ideali) e si è studiata la cinetica enzimatica della reazione diretta mentre, nella seconda, si è posta l'attenzione sull'immobilizzazione covalente dell'enzima su materiali inorganici opportunamente funzionalizzati e sull'inibizione della proteina.

L'MCM-41, silice mesoporosa scelta come supporto per le immobilizzazioni, è stata sia etero-funzionalizzata con gruppi amminici ed aldeidici sia mono-funzionalizzata con soli gruppi amminici. Tra i diversi risultati ottenuti, il più interessante e promettente è l'immobilizzazione, condotta in presenza del 5% v/v del polietilenglicole (PEG), dell'*hLDH-A* sulla silice etero-funzionalizzata con cui si è ottenuta una resa di immobilizzazione del 71%, un'attività relativa del 7,3% e una percentuale di inibizione da parte del farmaco NHI-2 del 16,6%. Infatti, nonostante questi risultati possano essere sicuramente migliorati ottimizzando l'intero processo, l'immobilizzazione della lattato deidrogenasi umana su silici mesoporose rappresenta una promettente strategia per l'ottenimento di un biosensore stabile a base di *hLDH-A* per lo screening di farmaci antitumorali.

1.1 Lattato deidrogenasi: classificazione e struttura

La L-lattato deidrogenasi o L-lattico deidrogenasi o LDH (EC 1.1.1.27) è un enzima appartenente al gruppo delle deidrogenasi, sottoclasse delle ossidoreduttasi, le quali catalizzano reazioni di ossidoriduzione tramite il trasferimento di atomi di idrogeno e di elettroni da un substrato donatore ad uno accettore.

Le isoforme umane dell'LDH sono cinque, tutte tetrameriche (*hLDH1-5*). I tetrameri sono formati dalla combinazione di due differenti tipi di subunità, A (o M, *muscle*) e B (o H, *heart*), codificate dai due diversi geni *ldh-a* e *ldh-b*. In particolare, dalla combinazione dei diversi monomeri si ottengono due isoforme omotetramiche chiamate *hLDH-A4* (o *hLDH5*) e *hLDH-B4* (o *hLDH1*) e tre isoforme eterotetramiche identificate con le sigle *hLDH-A3B1* (o *hLDH4*), *hLDH-A2B2* (o *hLDH3*) e *hLDH-A1B3* (o *hLDH2*). Un'ulteriore sesta isoforma è nota come *hLDH-X* (o *hLDH6*) il cui monomero viene codificato dal gene *ldh-c*.

Le subunità A e B sono simili in dimensione ma presentano differenti proprietà catalitiche. L'omotetramero *hLDH5* (*hLDH-A4* o *hLDH-A*) è costituito dalla sola subunità A. Quest'ultima è presente prevalentemente nei tessuti soggetti a condizioni di anaerobiosi come i muscoli scheletrici, il fegato e i tessuti neoplastici dove favorisce cineticamente la conversione del piruvato in L-lattato. Invece, l'*hLDH1* (*hLDH-B4* o *hLDH-B*) è formato dalla sola subunità B che è principalmente distribuita nel muscolo del cuore ed altri tessuti ossigenati dove risulta

più efficiente nel catalizzare la reazione inversa di conversione dell'L-lattato in piruvato [3], [5], [7].

La Figura 1.2 mostra la struttura cristallina dell'*h*LDH5. Un monomero di un singolo tetramero comprende 330 amminoacidi e presenta due siti di legame (o tasche di legame). Il primo è il sito di legame del cofattore NADH ed è situato in una scanalatura contenente alcuni residui amminoacidici (Asp165, Arg168, His192 e Thr247) importanti per l'attività catalitica enzimatica. Invece, in prossimità del gruppo nicotinammide del cofattore NADH, vi è il secondo sito attivo, quello del substrato, che è coperto da un'altra importante struttura chiamata anello mobile. Quest'ultimo è costituito dai residui 98-110 tra cui Arg105 che è direttamente coinvolto nell'attività catalitica. L'anello mobile viene chiuso dal sito di legame del substrato quando il cofattore e il substrato sono legati ai rispettivi siti mentre è aperto quando deve accettare il substrato. Nello specifico, nell'arco temporale di pochi millisecondi, si ha che l'NADH si lega al sito di legame del cofattore, il piruvato si lega a quello del substrato ed infine si ha la chiusura dell'anello mobile. Nel sito attivo, Arg105 blocca il piruvato legato con conseguente trasferimento dello ione idruro dall'NADH al substrato [3].

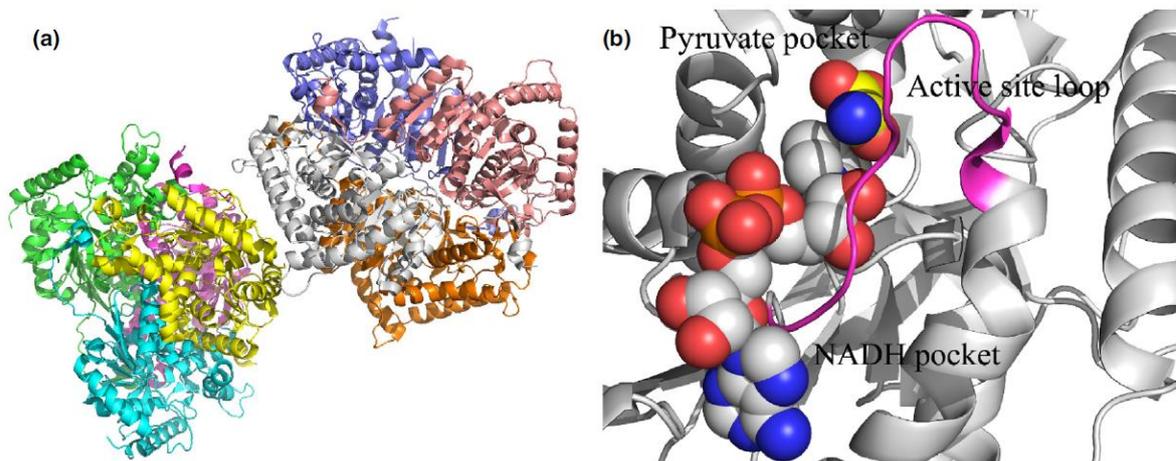


Figura 1.2 Struttura cristallina dell'*h*LDH5. Ottamero dell'*h*LDH5 costituito da un dimero di tetrameri (a). Rappresentazione dell'anello mobile e dei siti di legame del cofattore (NADH) e del substrato (piruvato) (b) [3]

1.2 Glicolisi e glicolisi aerobica: effetto Warburg

Il glucosio è uno zucchero a sei atomi di carbonio relativamente ricco di energia potenziale e, pertanto, rappresenta un'ottima sostanza nutriente per il metabolismo di piante, animali e molti microorganismi. Tra le principali vie di utilizzo del glucosio vi è la sua degradazione. Quest'ultima può essere suddivisa in due fasi la prima delle quali, simile sia nelle cellule normali che in quelle tumorali, è la glicolisi.

La glicolisi è un processo metabolico tramite cui, in condizioni di anaerobiosi non stretta, una molecola di glucosio viene degradata a due molecole di piruvato, composto a tre atomi di carbonio, con conseguente generazione di due molecole di ATP e due molecole di NADH. In Figura 1.3 si riporta lo schema dell'intero processo. Esso avviene in dieci tappe raggruppate in due fasi: fase preparatoria e fase di recupero energetico. Nelle prime cinque, che costituiscono la fase preparatoria, viene spesa energia sotto forma di ATP mentre, nelle successive, inizia il guadagno energetico [8].

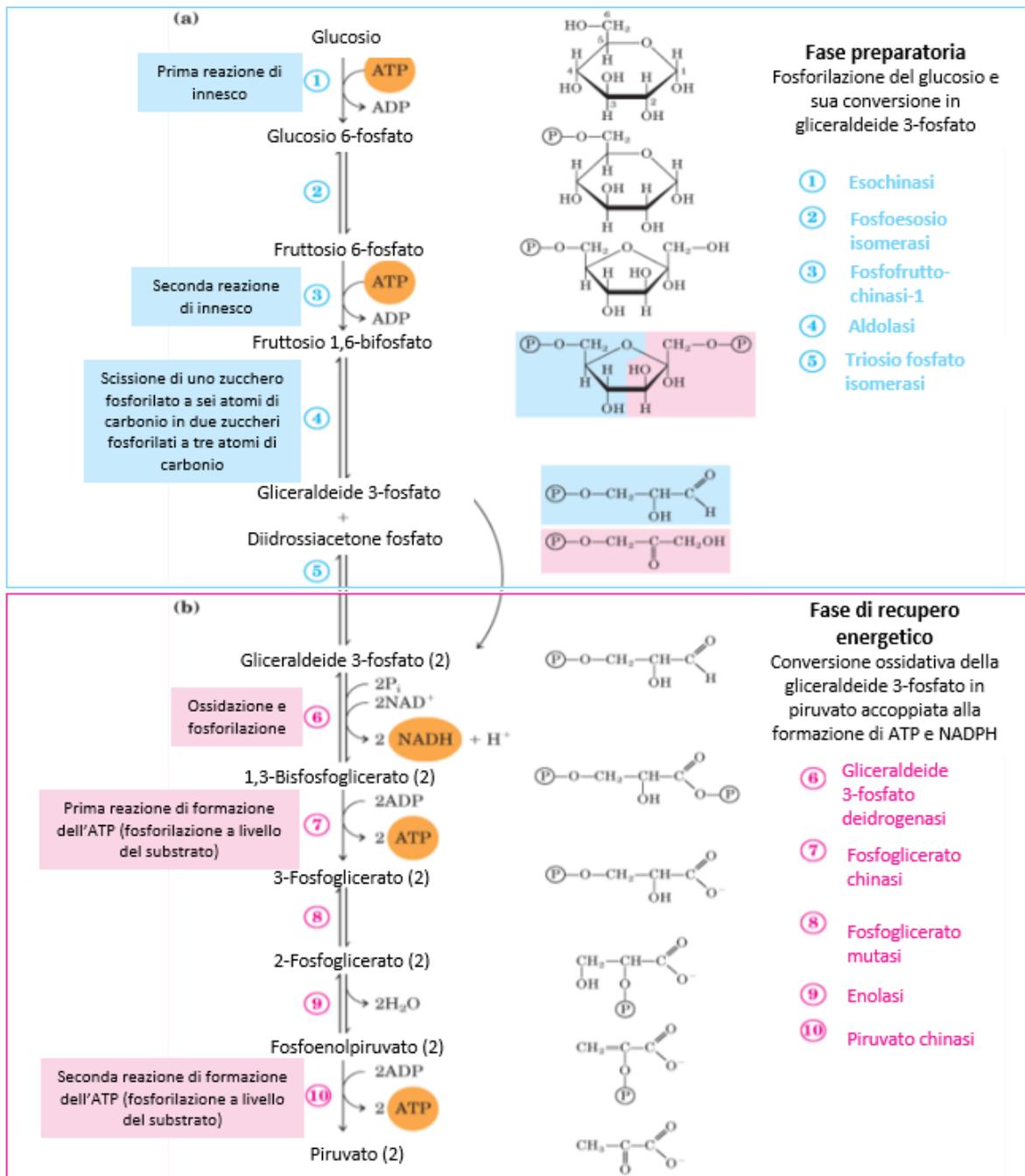


Figura 1.3 Le due fasi della glicolisi: fase preparatoria (a) e fase di recupero energetico (b) [8]

Nella seconda fase del metabolismo del glucosio, il piruvato che si è formato nella glicolisi viene metabolizzato ulteriormente attraverso una delle vie cataboliche mostrate in Figura 1.4. In condizioni aerobiche, l'acido piruvico viene ossidato ad acetato (acetil-coenzima A o acetil-CoA) che entra nel ciclo di Krebs (o ciclo dell'acido citrico) per essere ossidato a CO₂ e H₂O. Il NADH, invece, viene riossidato a NAD⁺ (nicotinammide adenina dinucleotide in forma ossidata) e gli elettroni sottratti vengono trasferiti all'O₂ nel processo della respirazione mitocondriale [8]. In questo modo, tramite la glicolisi, il ciclo dell'acido citrico e la catena respiratoria mitocondriale si ottengono circa 32 molecole di ATP da una singola molecola di glucosio [5].

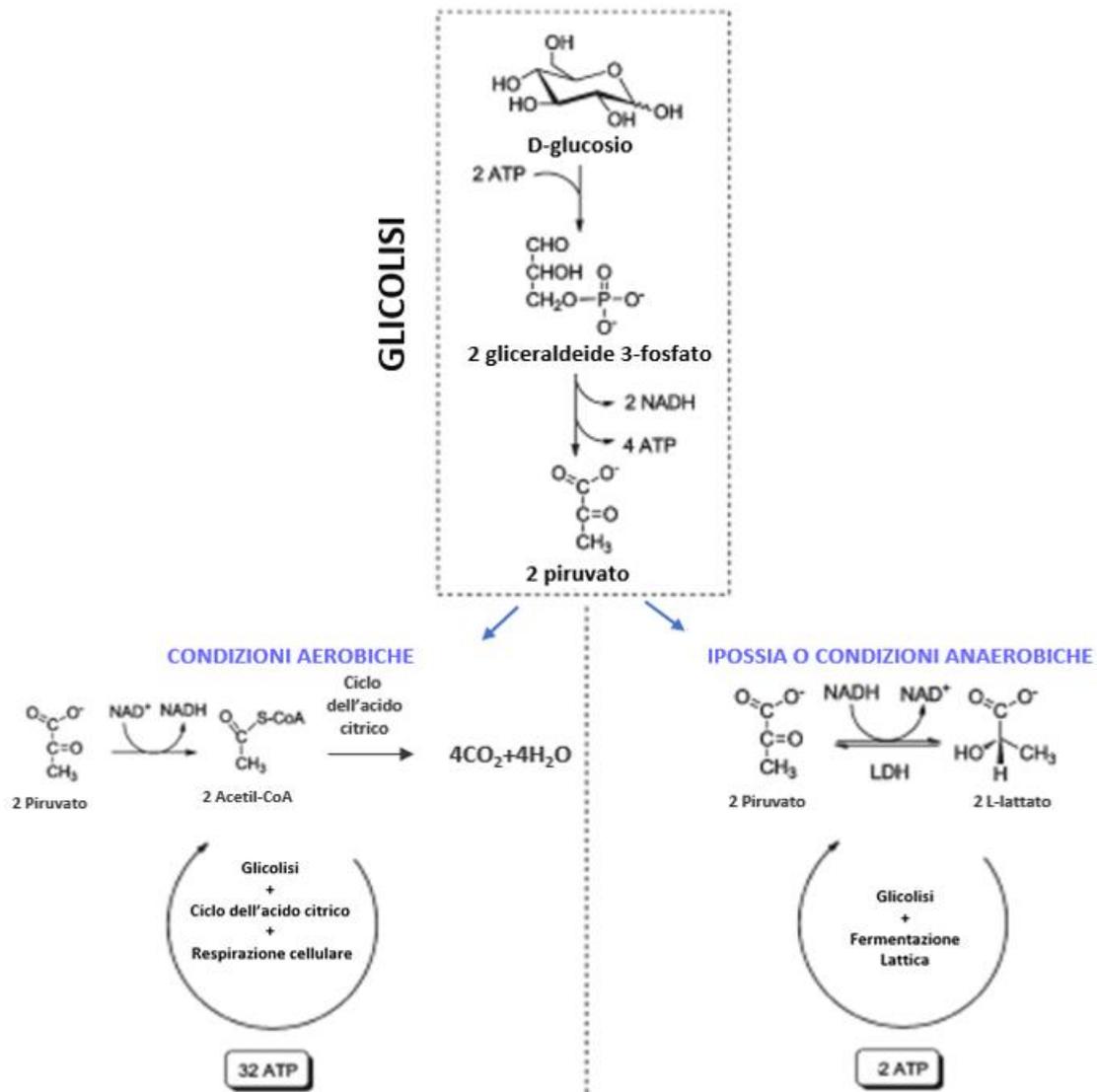


Figura 1.4 Due possibili destini catabolici del piruvato formato nella glicolisi. Figura tratta da [5] con modifiche

Però nei casi di insufficiente apporto di ossigeno (ipossia) dovute, ad esempio, ad un'iperattività del muscolo che si contrae violentemente, il NADH che si genera nella glicolisi non può essere riossidato a NAD⁺ dall'ossigeno. La mancata rigenerazione dell'NAD⁺ bloccherebbe le reazioni della glicolisi coinvolte nella fase del recupero energetico in quanto lascerebbe la cellula priva dell'accettore di elettroni necessario per l'ossidazione della gliceraldeide 3-fosfato. Pertanto, per rigenerare il NAD⁺ in queste condizioni, il piruvato prodotto dalla glicolisi subisce il processo di fermentazione lattica in cui viene convertito nell'isomero L del lattato ad opera dell'enzima LDH con contemporanea rigenerazione dell'NAD⁺ [8]. Attraverso questa via catabolica si ottengono 2 molecole di ATP per ogni molecola di glucosio metabolizzata [5].

Il processo metabolico di conversione del piruvato in L-lattato appena descritto, avviene anche nelle cellule tumorali ma in condizioni di buona ossigenazione. Nello specifico, nelle cellule cancerose, l'85% del piruvato viene fermentato in lattato in condizioni aerobiche mentre solo il 5% viene ossidato ad acetil-CoA. Nonostante la sua bassa resa energetica, questa via

metabolica alterata, nota come glicolisi aerobica o effetto Warburg, fornisce almeno tre vantaggi per la proliferazione delle cellule tumorali. Infatti, tramite essa si ha il mantenimento di uno stato di ossidoriduzione cellulare appropriato, un aumento dei precursori usati per la biosintesi di macromolecole necessarie per la moltiplicazione delle cellule tumorali e una rapida generazione di molecole di ATP essenziali per il mantenimento dello stato energetico [3].

2. Processi enzimatici

Gli enzimi sono proteine altamente specializzate in grado di catalizzare molte delle reazioni chimiche che avvengono nei sistemi biologici. Essi possiedono eccellenti proprietà, come un'elevata specificità per i loro substrati ed un alto potere catalitico, che solo pochi catalizzatori non biologici hanno. Per questi motivi, gli enzimi sono sempre più frequentemente impiegati come biocatalizzatori nei processi industriali. Essi, però, presentano alcune caratteristiche che li rendono non perfetti per tale applicazione: sono solubili, instabili, possono essere fortemente inibiti dai substrati e dai prodotti e non lavorano bene se sottoposti a condizioni operative differenti da quelle fisiologiche. La scelta di un opportuno enzima, la conoscenza e il miglioramento delle sue proprietà rappresentano il punto di partenza per l'utilizzo di queste sono stanze organiche a livello industriale [9], [10].

2.1 Cinetica enzimatica

Grazie al loro elevato potere catalitico gli enzimi, similmente ai catalizzatori, sono in grado di incrementare sensibilmente la cinetica del processo. Lo studio della velocità di reazione di un processo enzimatico e la sua variazione in funzione di alcuni parametri sperimentali prende il nome di cinetica enzimatica.

2.1.1 Cinetica ed equazione di Michaelis-Menten

Le basi della cinetica enzimatica furono poste, nel 1913, dall'equazione di Michaelis-Menten che permise di elaborare un modello cinetico idoneo per l'interpretazione di molte reazioni enzimatiche. Innanzitutto, Leonor Michaelis e Maud Menten ripresero gli studi di Henri e ipotizzarono che l'enzima si legasse velocemente e reversibilmente con il substrato formando il complesso enzima-substrato ES il quale, successivamente, si trasforma in enzima libero e prodotto attraverso una seconda reazione più lenta [8], [11]. L'Equazione (2.1) mostra gli equilibri della reazione appena descritta.



L'Equazione di Michealis-Menten (2.2) permette di descrivere empiricamente la cinetica di conversione di un singolo substrato S in un prodotto P.

$$-R_S = R_P = k \frac{C_{ET}C_S}{K_M + C_S} = \frac{R_{P,max}C_S}{K_M + C_S} \quad (2.2)$$

R_S	Velocità molare di scomparsa del substrato
R_P	Velocità molare di formazione del prodotto
C_{ET}	Concentrazione molare totale dell'enzima E
C_S	Concentrazione del substrato
K_M	Costante di Michaelis

$R_{P,max}$ Velocità molare massima di formazione del prodotto

L'Equazione (2.2) esprime la relazione tra la velocità di formazione del prodotto e la concentrazione del substrato dimostrando la proporzionalità tra la velocità e la concentrazione dell'enzima. Graficamente, corrisponde ad un ramo di iperbole rettangolare mostrato in Figura 2.1. Quando la concentrazione di substrato è molto bassa ($C_S \ll K_M$), la cinetica del processo tende ad andamento lineare simile ad una reazione irreversibile di ordine uno. Al contrario, per concentrazioni di substrato elevate ($C_S \gg K_M$) la velocità di formazione del prodotto è indipendente dalla concentrazione di substrato (cinetica di ordine zero) e il comportamento che si manifesta è definito di saturazione. Il valore massimo asintotico prende il nome di velocità di reazione massima $R_{P,max}$ ed è pari al prodotto kC_{ET} .

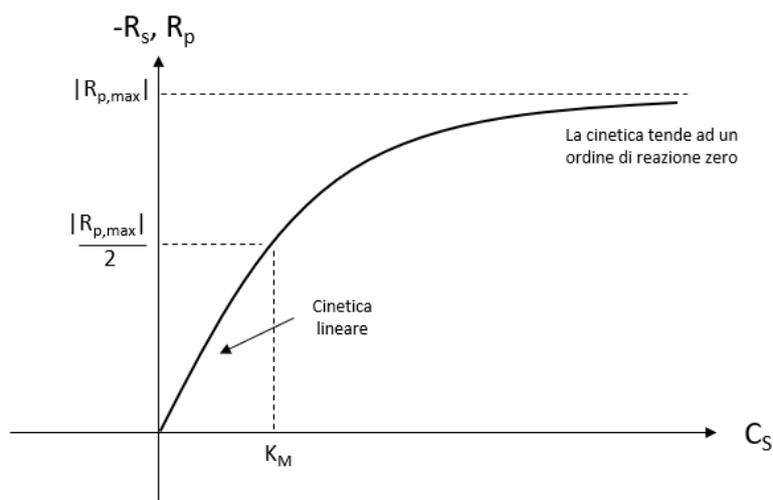


Figura 2.1 Rappresentazione grafica dell'equazione di Michaelis-Menten. Figura tratta da [8] con modifiche

La curva mostrata in Figura 2.1 presenta due asintoti: $R_{P,max}$ e K_M . Si dimostra che quest'ultimo è la concentrazione di substrato alla quale la velocità della reazione è uguale alla metà di quella massima. Il valore di K_M è specifico per ogni coppia enzima-substrato. Infatti, esso può variare considerevolmente non solo da un enzima all'altro ma anche per substrati diversi per uno stesso enzima. Da un punto di vista fisico K_M viene spesso usata impropriamente per avere un'indicazione dell'affinità tra l'enzima e il substrato: più piccola è la costante di Michaelis, più alta è l'affinità. In realtà, il significato reale di K_M dipende da aspetti specifici del meccanismo di reazione quali il numero e la velocità relativa degli stadi di equilibrio che costituiscono la reazione. Infatti, K_M è una misura dell'affinità dell'enzima solo se $k_2 \ll k_{-1}$.

Un'altra importante costante è quella catalitica K_{cat} , detta anche numero di turnover. Essa è data dal rapporto tra la velocità massima e la concentrazione enzimatica totale e rappresenta il numero di molecole di substrato che vengono convertite in prodotto nell'unità di tempo da una singola molecola enzimatica quando l'enzima è saturo con il substrato.

Si definisce, invece, costante di specificità il rapporto tra K_{cat} e K_M . Tale parametro consente di confrontare l'efficienza catalitica di enzimi diversi o dello stesso enzima con diversi substrati. La specificità di un enzima per un determinato substrato sarà tanto più alta quanto più è elevato il valore della costante di specificità.

L'approccio cinetico di Michaelis-Menten si basa su alcune ipotesi. Al fine di semplificare la sequenza degli equilibri, la velocità di reazione viene valutata per un tempo durante il quale si ha poca formazione di prodotto e, pertanto, la reazione inversa del secondo equilibrio è fisicamente trascurabile ($k_{-2} \approx 0$). Secondo tale ipotesi, nota come assunzione della velocità iniziale, l'equazione (2.1) può essere semplificata nella (2.3)



Per ricavare l'Equazione (2.2) si parte dal principio di conservazione di massa dell'enzima secondo cui la concentrazione totale dell'enzima C_{ET} è pari alla somma della concentrazione dell'enzima libero C_E e quella del complesso enzima-substrato C_{ES} . Successivamente si combinano le equazioni dei singoli stadi di equilibrio cercando di eliminare le grandezze di difficile misura come la concentrazione del complesso enzima substrato C_{ES} . Ci sono anche altre ipotesi semplificative che vengono applicate. Tra di esse si trova l'assunzione del quasi equilibrio (o dell'equilibrio rapido) secondo cui la velocità di formazione del prodotto a partire dal complesso enzima-substrato è molto più piccola rispetto a quella con cui il complesso ES si scinde in E+S ($k_2 \ll k_{-1}$). Ovvero, il primo equilibrio della (2.3) non può essere perturbato dalla formazione del prodotto. Dunque, la dissociazione del complesso ES nell'enzima libero e nel prodotto è lo stadio più lento e anche quello cineticamente controllante. Secondo un'altra ipotesi si considera la concentrazione di substrato molto maggiore rispetto a quella dell'enzima. In questo modo la formazione del complesso ES non altera significativamente la concentrazione di substrato. Infine, un'ulteriore importante ipotesi fu introdotta successivamente da Briggs e Haldane ed è nota come assunzione dello stato stazionario. Essa è particolarmente utile nel caso in cui non si possa definire lo stadio cineticamente controllante e afferma che il processo si sviluppa in un regime di stazionarietà. In altri termini, tale condizione, impone che la velocità netta di generazione di materia riferita al complesso ES sia nulla ovvero che il complesso ES abbia una concentrazione costante durante tutto il periodo in cui si possono misurare le velocità iniziali [8].

2.1.2 Linearizzazioni dell'equazione di Michaelis-Menten

Come già discusso, K_M è la concentrazione di substrato in corrispondenza della quale la velocità molare di formazione del prodotto è pari a metà del suo valore massimo. Quindi, teoricamente, attraverso una procedura grafica, è semplice determinarne il valore sperimentale se si conosce $R_{P,max}$. Ma, quest'ultimo, non può essere valutato accuratamente poiché rappresenta la velocità ad una concentrazione di substrato infinita. Pertanto, l'equazione di Michaelis-Menten viene manipolata algebricamente al fine di ricavare i parametri cinetici sperimentali.

Tra le trasformazioni più comuni vi è l'equazione di Lineweaver-Burk la quale corrisponde ad una linearizzazione dell'equazione di Michaelis-Menten. Infatti, facendo il reciproco dell'Equazione (2.2) si ottiene l'Equazione (2.4):

$$\frac{1}{R_P} = \frac{K_M + C_S}{R_{P,max} C_S} = \frac{K_M}{R_{P,max} C_S} + \frac{1}{R_{P,max}} \quad (2.4)$$

La (2.4) corrisponde all'equazione di una retta la cui rappresentazione grafica, mostrata in Figura 2.2a, prende il nome di grafico dei doppi reciproci o di Lineweaver-Burk. La determinazione dei parametri cinetici con questo metodo risulta, dunque, più semplice in quanto

il reciproco della velocità massima e della costante di Michaelis corrispondono, rispettivamente, all'intercetta della retta sull'asse y e sull'asse x [8], [12].

Il modello dei doppi reciproci, però, è caratterizzato da un'elevata sensibilità agli errori sperimentali causati dalla procedura di linearizzazione che amplifica piccoli errori nella misura della velocità di reazione. Esistono linearizzazioni meno sensibili agli errori sperimentali [13]. Ne è un esempio quella di Hanes-Woolf che modifica l'Equazione (2.2) nella (2.5) la cui rappresentazione grafica è riportata in Figura 2.2b.

$$\frac{C_S}{R_P} = \frac{K_M}{R_{P,max}} + C_S \frac{1}{R_{P,max}} \quad (2.5)$$

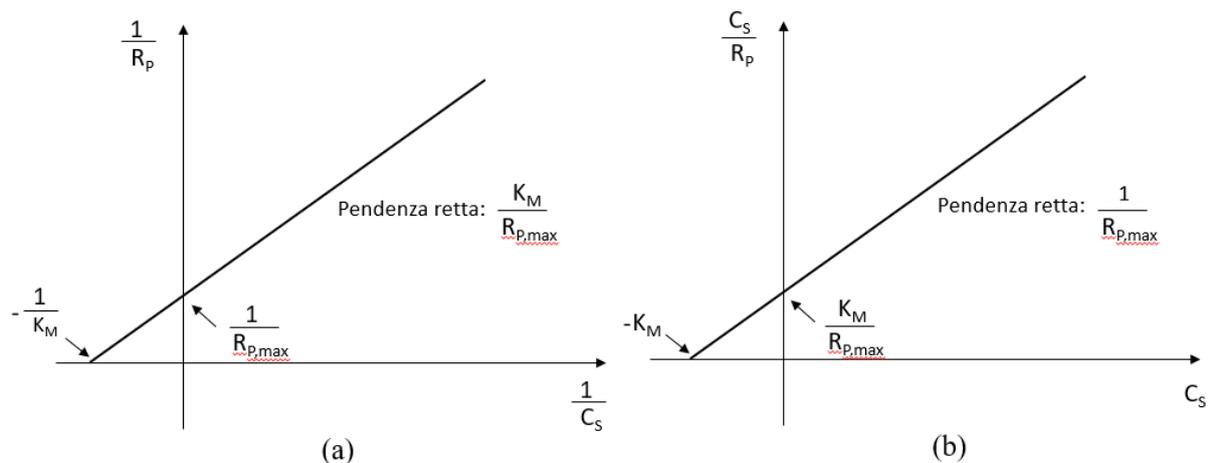


Figura 2.2 Diagramma dei doppi reciproci o di Lineweaver-Burk (a) e di Hanes-Woolf (b). Figura tratta da [8] con modifiche

2.1.3 LDH: proprietà allosteriche e modelli cinetici

Gli enzimi allosterici sono generalmente costituiti da più subunità e possiedono, oltre ai siti attivi, anche dei siti regolatori (o allosterici) capaci di legare composti chiamati modulatori (o effettori) come, ad esempio, piccoli metaboliti e cofattori. Il legame del modulatore con i siti allosterici è reversibile e non covalente e può provocare variazioni conformazionali dell'enzima interconvertendolo in forme più o meno attive. Gli enzimi allosterici per i quali il substrato e il modulatore sono identici sono detti omotropici e in essi il sito attivo e quello regolatore coincidono. Generalmente, gli enzimi allosterici non obbediscono alla cinetica di Michaelis-Menten. Infatti, in molti casi, essi presentano curve di velocità di formazione del prodotto con andamenti sigmoidali invece che iperbolici come mostrato in Figura 2.3 [8].

Il comportamento cinetico degli enzimi allosterici può essere spiegato mediante due modelli: modello ad interazione sequenziale (KNF) e modello a simmetria concentrata (MWC). Entrambi si basano sull'ipotesi dell'equilibrio rapido ed ipotizzano che le subunità di un enzima esistano in due conformazioni, tesa (T) e rilassata (R), che sono rispettivamente a bassa e ad alta affinità con il substrato. Le due teorie differiscono principalmente per le ipotesi di interazione tra le subunità.

Come descritto nella sottosezione 1.1, ad ogni molecola di hLDH si possono legare quattro molecole di substrato e quattro di cofattore in quanto questo enzima è un tetramero formato dalla combinazione di quattro monomeri ciascuno dei quali presenta un sito di legame per il

cofattore ed uno per il substrato. Il legame di una o più molecole di substrati e cofattori regola il ripiegamento proteico (struttura terziaria) con conseguente possibile modificazione dell'attività catalitica enzimatica. La lattato deidrogenasi presenta, quindi, delle proprietà allosteriche e dei processi interattivi complessi che potrebbero rendere inadatti i classici modelli enzimatici come quelli di Michaelis-Menten o a simmetrica concentrata [14].

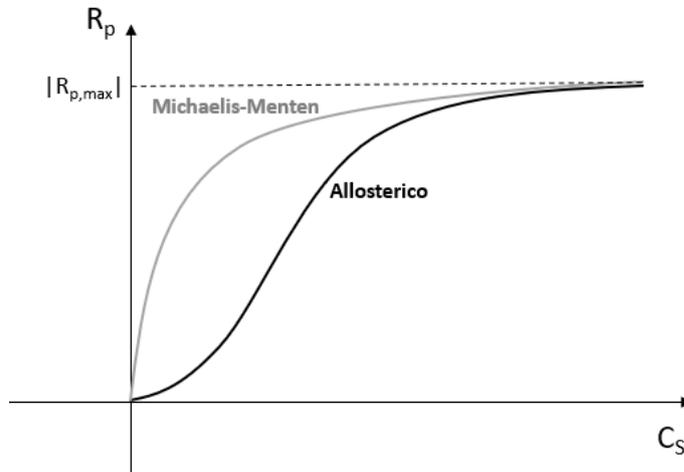


Figura 2.3 Confronto della velocità molare di formazione del prodotto in funzione della concentrazione di substrato tra un enzima che segue la cinetica di Michaelis-Menten ed un enzima allosterico

Pasti et al. [15] hanno però dimostrato che l'*h*LDH-A espresso in *E.Coli* ed esposto ad un ambiente neutro o debolmente acido, ovvero a valori di pH compresi tra 5 e 7, è soggetto a transizioni allosteriche omotropiche innescate dal piruvato e mostra una cinetica con andamento sigmoidale. Al contrario, l'attività del medesimo enzima sottoposto ad ambienti di reazione con pH di 7,5 e 8 segue il modello cinetico di Michaelis-Menten. Risultati simili si sono ottenuti anche l'*h*LDH-A naturale isolato dal fegato con l'unica eccezione che la cinetica di Michaelis-Menten si osserva anche per valori di pH pari a 7.

Inoltre, *Tang et al.* [14] hanno sviluppato un modello cinetico specifico per la lattato deidrogenasi ricavando un'equazione la cui struttura è simile a quella di Michaelis-Menten. In particolare, viene dimostrato che l'equazione di Michaelis-Menten può essere utilizzata per simulare, in modo approssimativo, il processo cinetico a basse concentrazioni di substrato.

2.2 Tecniche di immobilizzazione enzimatica

Per motivi economici, tecnici ma anche sostenibili gli enzimi vengono sottoposti a procedure di immobilizzazione enzimatica prima del loro utilizzo come biocatalizzatori industriali. Infatti, nonostante il loro uso sia sempre più frequente, il costo per il loro isolamento risulta tutt'oggi ancora molto elevato. Inoltre, la necessità di mantenere nel tempo l'attività catalitica dell'enzima e il loro uso continuo o riutilizzo nei processi industriali, rendono necessario il confinamento fisico di queste sostanze in una determinata regione di spazio e, dunque, la loro immobilizzazione su opportune matrici [9], [10]

Gli innumerevoli protocolli di immobilizzazione enzimatica presenti in letteratura sono strettamente collegati ai principi di semplicità, economicità e stabilizzazione enzimatica. Lo

sviluppo di questi è solitamente legato ad alcuni criteri fondamentali quali il limitato utilizzo di reagenti tossici e pericolosi durante e dopo l'immobilizzazione, l'uso di matrici altamente stabili, possibilmente pre-attivate e commercializzate da aziende competenti e la possibilità di associare all'immobilizzazione enzimatica il miglioramento delle proprietà funzionali dell'enzima. Per quest'ultimo scopo, ma non solo, anche le tecniche di post immobilizzazione possono essere molto utili [9].

La Figura 2.4 mostra la classificazione delle diverse tecniche di immobilizzazione enzimatica. Queste possono essere principalmente distinte in irreversibili, quando il biocatalizzatore non può essere staccato dal supporto senza distruggere l'attività biologica dell'enzima o della matrice, e reversibili se l'enzima può essere separato dal supporto. La scelta di uno tra questi metodi o l'applicazione contemporanea di più di uno dipende, ovviamente, dal tipo di processo in esame e dalle caratteristiche dell'enzima e del supporto ma anche da ragioni di carattere finanziario. L'uso di metodi reversibili, ad esempio, permette la rigenerazione del supporto quando l'attività enzimatica decade completamente con conseguente risparmio economico. Una diversa classificazione prevede, invece, la suddivisione dei metodi di immobilizzazione sulla base del tipo di reazione chimica usata per la formazione del legame.

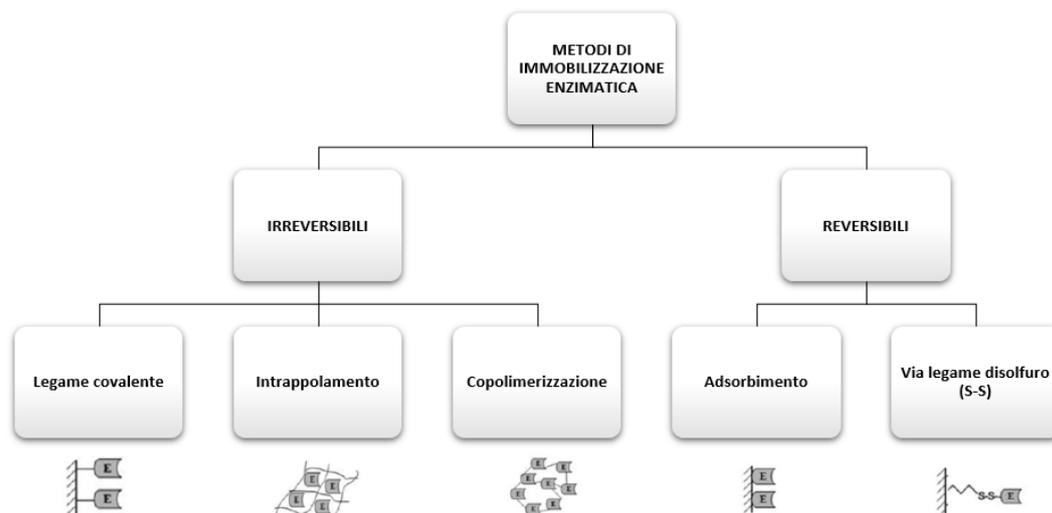


Figura 2.4 Classificazione dei differenti metodi di immobilizzazione enzimatica. Figura tratta da [10] con modifiche

I metodi irreversibili possono essere suddivisi in tecniche di immobilizzazione basate sulla formazione di un legame covalente tra l'enzima e il supporto e metodi che limitano il trasferimento di massa. Esempi di quest'ultimi sono l'intrappolamento o l'incapsulamento del biocatalizzatore all'interno di una rete polimerica e l'utilizzo di aggregati enzimatici (CLEAs®) o reagenti polifunzionali come la glutaraldeide che permettono la formazione di legami intermolecolari tra molecole di enzima senza l'utilizzo di alcun supporto. Tra le tecniche reversibili, invece, vi è l'adsorbimento non specifico. Esso è basato o sull'adsorbimento fisico in cui l'enzima è debolmente legato alla matrice tramite legami ad idrogeno ed interazioni di Van Der Waals o sul legame ionico ed è sicuramente il metodo di immobilizzazione più semplice ed economico. Infine, molto particolare è l'immobilizzazione enzimatica reversibile data dalla formazione di un legame stabile, quello disolfuro, tra la matrice e l'enzima che però può essere rotto per reazione con un opportuno agente come il ditiotreitolo (DTT) [10].

2.2.1 Immobilizzazione covalente su supporti funzionalizzati

Tra le varie tecniche di immobilizzazione, quella irreversibile basata sulla formazione del legame covalente tra l'enzima e il supporto è sicuramente la più utilizzata. Contrariamente ad altri metodi che coinvolgono la formazione di legami più deboli come, ad esempio, l'adsorbimento non specifico e l'intrappolamento, l'immobilizzazione covalente è altamente specifica e ha il principale vantaggio di evitare il rilascio indesiderato dell'enzima nella soluzione. Tuttavia, al fine di evitare il più possibile la perdita dell'attività dell'enzima legato, i residui amminoacidici essenziali nella catalisi non devono essere coinvolti nel legame covalente con il supporto. Inoltre, il legame non può apportare modifiche configurazionali all'enzima in quanto queste possono essere potenzialmente negative per l'attività. È opportuno osservare che non sempre tali requisiti sono semplici da soddisfare.

Solitamente, sulla superficie del supporto, si introducono uno o più gruppi funzionali come aldeidi, epossidi, ammine e tioli che facilitano la formazione del legame covalente tra il biocatalizzatore e la matrice. Questi gruppi reattivi, infatti, sono in grado di reagire con altrettanti gruppi presenti sui residui amminoacidici dell'enzima come la lisina, la cisteina, l'aspartato e il glutammato [10].

2.2.2 Supporti per l'immobilizzazione enzimatica: il ruolo delle silici mesoporose

Le caratteristiche del supporto scelto per l'immobilizzazione enzimatica sono di fondamentale importanza per l'efficacia di quest'ultima. Basso costo, resistenza alla compressione e agli attacchi biologici, diametro e distribuzione dei pori, bassa reattività e biocompatibilità verso l'enzima e il medium, rappresentano alcune delle proprietà ideali che una matrice di immobilizzazione, organica o inorganica, deve avere [10].

Le silici mesoporose sono materiali inorganici caratterizzati da una dimensione dei pori generalmente compresa tra 2 e 50 nm. Esse vengono sintetizzate in presenza di un surnatante e, a seconda delle condizioni di sintesi (sorgente di silice, tipo di surnatante utilizzato, forza ionica, pH e composizione della miscela di reazione), si possono ottenere diversi tipi di mesostruttura (volume e diametro dei pori) e morfologia macroscopica. Ad esempio, le silici mesoporose MCM (*Mobile Crystalline Material*) come MCM-41, MCM-48, MCM-50 sono sintetizzate utilizzando alchilammonio, TEOS e silicato di sodio in un medium basico e hanno, rispettivamente, una mesostruttura esagonale, cubica e lamellare con uno spessore di parete che non supera i 2 nm. Usando, invece, tensioattivi non ionici si preparano le silici SBA-15 e SBA-16 (*SBA: Santa Barbara University*) caratterizzate da un diametro e uno spessore della parete più grande rispetto alle MCM-tipo. In ogni caso, regolando alcuni parametri come la temperatura, il tempo di reazione e la concentrazione di tensioattivo, si può modulare la dimensione dei pori che, nel caso dei materiali menzionati, non supera generalmente i 10 nm [16].

Le silici mesoporose sono particolarmente adatte all'immobilizzazione enzimatica per diversi motivi. Innanzitutto, esse presentano sulla superficie gruppi silanoliche che permettono al materiale di essere modificato chimicamente tramite un trattamento di funzionalizzazione post-sintesi. Inoltre, la struttura porosa consente di fornire un'elevata carica enzimatica. La possibilità del confinamento dell'enzima nei pori, invece, permette al biocatalizzatore di tollerare ambienti di reazione più estremi rispetto alle sue condizioni fisiologiche favorendone la stabilità e l'attività. Bisogna scegliere, però, supporti la cui dimensione dei pori non sia eccessiva rispetto a quella dell'enzima in modo da evitare fenomeni di resistenza al trasporto del substrato e dei prodotti da e verso il biocatalizzatore. Generalmente, si sconsiglia l'utilizzo di MCM-41, SBA-15 e SBA-16 per enzimi con dimensione superiore ai 10 nm [16], [17].

2.3 Inibizione enzimatica

Si definisce inibitore enzimatico qualsiasi composto in grado di rallentare o bloccare la catalisi enzimatica. A seconda del tipo di interazione che l'inibitore instaura con l'enzima, si possono avere due tipi di inibizione: irreversibile e reversibile. Nel primo caso si ha, generalmente, la formazione di legami covalenti e l'inibitore prende il nome di inattivatore enzimatico. Nel secondo caso, invece, si hanno prevalentemente interazioni non covalenti.

La tipologia di inibizione più comune è quella competitiva reversibile in cui l'inibitore presenta una struttura simile a quella del substrato e compete con questo per legarsi al sito attivo dell'enzima impedendo, così, la formazione del complesso enzima-substrato. Un inibitore competitivo, però, può essere anche un prodotto di reazione o una sostanza che funge da nuovo substrato e che porta alla formazione di nuovi composti. Quest'ultimo caso è solitamente sfavorevole in un contesto farmaceutico in quanto i nuovi prodotti possono essere tossici o possono portare a metaboliti tossici. In generale, gli inibitori competitivi reversibili stabiliscono rapidamente i loro equilibri di legame con l'enzima permettendo l'osservazione dell'inibizione con l'analisi dell'attività enzimatica [18]. Nell'ottica del modello cinetico di Michaelis-Menten, un inibitore competitivo aumenta il valore di K_M poiché interferisce con il substrato ma non influisce su $R_{p,max}$ in quanto non può legarsi al complesso enzima-substrato influenzandone la catalisi. Un inibitore che si lega ad un sito diverso da quello del substrato, come un sito allosterico o un sito di legame, prende il nome di inibitore reversibile non competitivo. In questo caso l'inibitore può indurre un cambiamento della conformazione dell'enzima dando luogo ad una nuova forma della proteina che non lega correttamente il substrato [18]. Poiché l'inibitore non competitivo non influisce sul legame enzima-substrato, il valore di K_M non si modifica ma diminuisce $R_{p,max}$ a causa dell'inibitore che ostacola la catalisi enzimatica. Invece, si parla di inibizione acompetitiva quando la sostanza si lega reversibilmente al complesso enzima-substrato creando il complesso non produttivo enzima-substrato-inibitore. Tale inibizione è rara e, per quanto possa essere elevata la concentrazione di substrato rispetto a quella dell'inibitore, l'enzima non può mai legarsi da solo con il substrato.

La Figura 2.5 mostra come si modificano i parametri cinetici a seconda del tipo di inibizione.

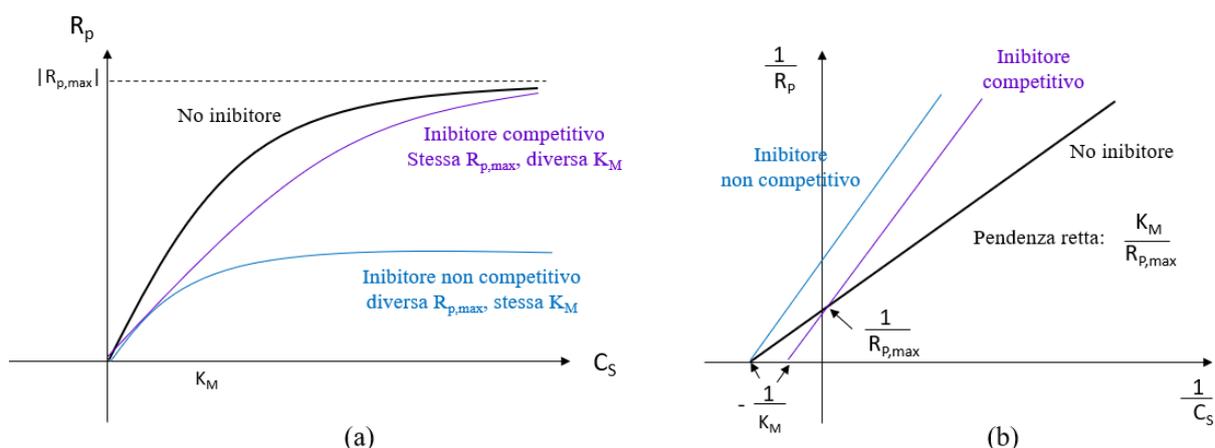


Figura 2.5 Effetto di un inibitore competitivo (viola) e non competitivo (blu) sui parametri cinetici dell'equazione di Michaelis-Menten (a) e nel grafico dei doppi reciproci di Lineweaver-Burk (b)

2.3.1. Inibitori dell'LDH a base di N-idrossiindoli come agenti antitumorali

Gli inibitori e gli inattivatori enzimatici hanno un ruolo chiave nella progettazione e nello sviluppo di nuovi farmaci compresi quelli antitumorali. Ad oggi, infatti, diversi composti sono conosciuti come inibitori della lattato deidrogenasi. Ad esempio, gli indoli N-idrossi-2-carbossi-sostituiti sono inibitori della dell'enzima LDH-A e vengono deliberatamente studiati e sintetizzati per svolgere la funzione di agenti antitumorali. Essi mostrano un comportamento competitivo nei confronti del substrato (piruvato) e del cofattore (NADH) [5].

3. Materiali e metodi

Il primo passo da compiere per soddisfare uno degli scopi di questo lavoro di tesi consiste nella determinazione delle dimensioni dell'enzima e nella scelta di un opportuno supporto per la sua immobilizzazione.

Tutte le proteine hanno approssimativamente la medesima densità pari a $1,37 \text{ g/cm}^3$ ed un volume specifico parziale, dato dall'inverso della densità, uguale a $0,73 \text{ cm}^3/\text{g}$. Utilizzando l'Equazione (3.1) è possibile calcolare il volume occupato da una proteina. Successivamente, sfruttando la (3.1) ed approssimando l'enzima ad una sfera, tramite la (3.2) si valuta il raggio minimo della sfera che può contenere l'enzima [19].

$$V_{prot} = \frac{v_2}{N_A} * M \quad (3.1)$$

$$R_{min} = \left(\frac{3}{4\pi} * V \right)^{\frac{1}{3}} = 0,066 * M^{1/3} \quad (3.2)$$

V_{prot}	Volume occupato da una proteina
v_2	Volume specifico parziale
N_A	Numero di Avogadro
M	Peso totale medio dell'enzima
R_{min}	Raggio minimo dell'enzima

L'enzima utilizzato in questa tesi è l'LDH-A umano ricombinante espresso in *Escherichia Coli* acquistato in soluzione acquosa da Merck. Da letteratura, la subunità A di questo enzima pesa circa 35 kDa per un peso totale medio del tetramero pari a 140 kDa [20]. Da ciò si ricava un raggio minimo pari a 3,43 nm.

L'MCM-41 è un solido inorganico mesoporoso e, per i motivi descritti nella sottosezione 2.2, rappresenta un'ottima matrice per l'immobilizzazione enzimatica. Come già accennato, dal punto di vista strutturale questo materiale appare ordinato in quanto formato da un insieme di canali esagonali organizzati in una struttura a nido d'ape. Inoltre, è caratterizzato da un'elevata area superficiale (maggiore di $700 \text{ m}^2/\text{g}$), da una ristretta distribuzione dei pori dell'ordine di 1,5-10 nm e da uno spessore delle pareti che non supera i 2 nm [16], [21].

3.1 Funzionalizzazione del supporto

Per permettere all'LDH di legarsi covalentemente al supporto, è necessario generare degli opportuni gruppi funzionali sulla superficie di quest'ultimo in grado di interagire con i residui amminoacidici dell'enzima. L'MCM-41 viene quindi sottoposto a trattamenti di funzionalizzazione attraverso i quali è possibile creare gruppi amminici ed epossidici sulla sua superficie grazie alla reazione che avviene tra i gruppi silanolici della silice e determinati reagenti quali l'APTES E GPTMS.

3.1.1 Mono-funzionalizzazione: generazione di gruppi amminici

In un pallone e sotto cappa chimica si inseriscono per ogni grammo di supporto, 30 mL di toluene e 1,5 mL di APTES (3-amminopropiltrirossisilano). Il tutto, mantenuto in vigorosa agitazione tramite un'ancoretta, viene posto in un bagno d'olio a 105 °C per 5 ore e collegato ad una colonna di raffreddamento per il recupero del toluene evaporato. La generazione dei gruppi amminici sulla superficie dell'MCM-41 avviene grazie alla reazione riportata in Figura 3.1. Al termine di questa il supporto viene raffreddato, filtrato sottovuoto e lavato prima con acetone e poi con acqua deionizzata [22], [23].

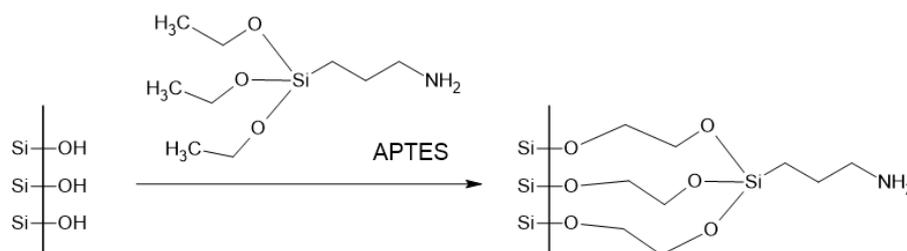


Figura 3.1 Generazione dei gruppi amminici sulla superficie del supporto tramite la reazione dei gruppi silanoliche con l'APTES

3.1.2 Etero-funzionalizzazione: generazione di gruppi amminici ed aldeidici

Etero-funzionalizzando la matrice si creano gruppi amminici ed aldeidici sulla sua superficie. La generazione dei gruppi aldeidici prevede tre reazioni in serie. La prima consente la formazione dei gruppi epossidici, la seconda permette la trasformazione dei gruppi epossidici in dioli i quali, tramite la terza reazione, vengono ossidati a gruppi aldeidici alifatici (detti anche gruppi gliossilici) [22], [24].

In un pallone e sotto cappa chimica si inseriscono un grammo di supporto, 30 mL di toluene, 1,5 mL di APTES (3-amminopropiltrirossisilano) e 1,5 mL di GPTMS (3-glicidilossipropiltrimetossisilano). Il pallone viene collegato ad una colonna di raffreddamento e posto in un bagno d'olio a 105 °C per 5 ore. Come mostrato in Figura 3.2, mentre l'APTES genera i gruppi amminici sulla superficie, i gruppi alcossi (-OR') del GPTMS reagiscono con i gruppi silanoliche dell'MCM-41 generando su quest'ultimo i gruppi epossidici.

Al termine delle cinque ore il supporto viene raffreddato, filtrato e lavato prima con acetone e poi con acqua deionizzata. Il materiale ottenuto viene successivamente messo in contatto in un pallone con 30 mL di una soluzione acquosa 0,1 M di H₂SO₄. Il tutto, mantenuto sempre in vigorosa agitazione e collegato ad una colonna di raffreddamento sotto cappa chimica, viene inserito in un bagno d'olio a 85 °C per 2 ore. Durante questo tempo, l'acido solforico apre la struttura ad anello ed idrolizza i gruppi epossidici a dioli secondo lo schema di reazione riportato in Figura 3.3. Al termine della reazione il materiale viene raffreddato, filtrato sottovuoto e lavato con abbondante acqua distillata.

Infine, per generare i gruppi aldeidici, si fa reagire il supporto precedentemente ottenuto con 30 mL di una soluzione acquosa di periodato di sodio 0,1 M per due ore a temperatura ambiente e in gentile agitazione. Grazie al periodato di sodio, i dioli vengono ossidati a gruppi aldeidici come mostrato nella Figura 3.4. Al termine della reazione il supporto viene filtrato sottovuoto, lavato e lasciato asciugare.

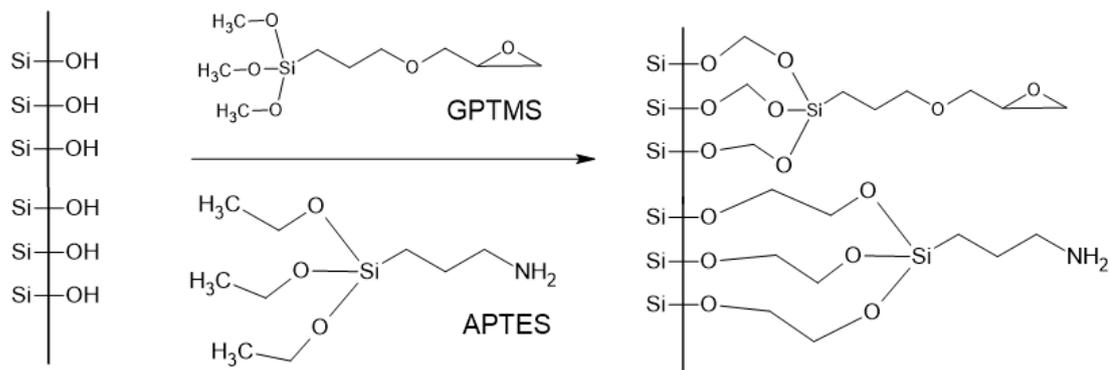


Figura 3.2 Generazione dei gruppi epossidici ed amminici sulla superficie del supporto tramite la reazione dei i gruppi silanoliche della silice con il GPTMS e l'APTES

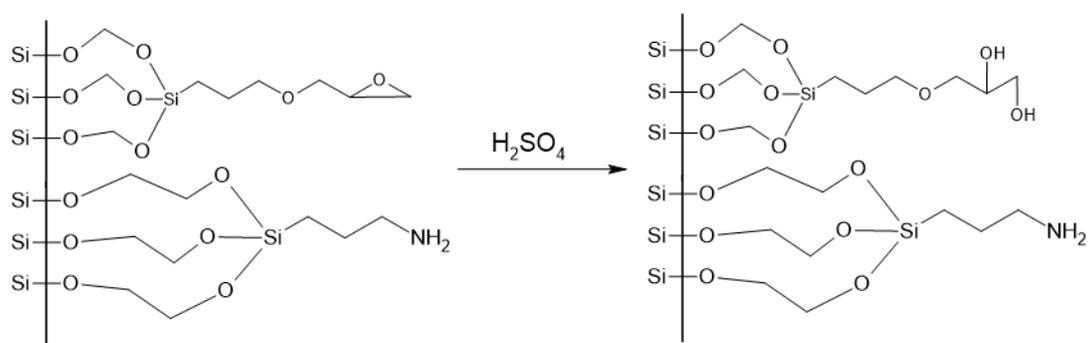


Figura 3.3 Generazione dei dioli tramite la reazione di idrolisi dei gruppi epossidici

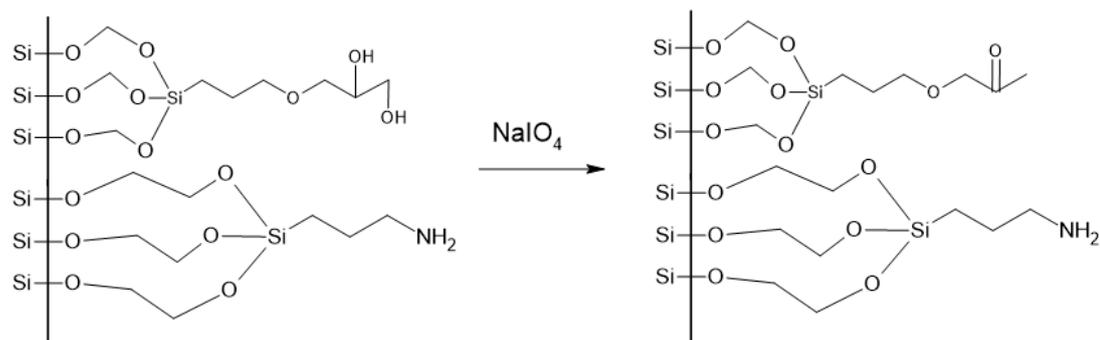


Figura 3.4 Generazione dei gruppi aldeidici alifatici (gliossilici) tramite la reazione di ossidazione dei dioli

Per una migliore comprensione, in Figura 3.5 si riporta lo schema dell'intero processo di etero-funionalizzazione.

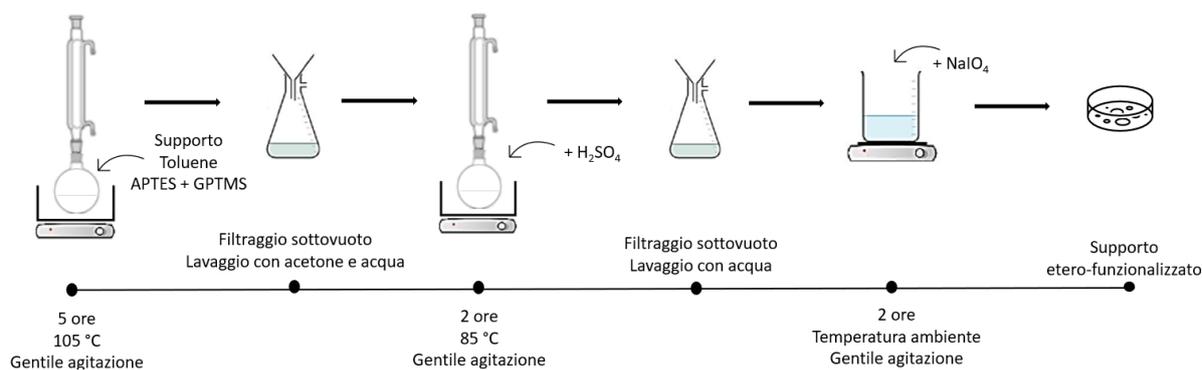


Figura 3.5 Schema del processo di etero-funzionalizzazione del supporto

3.1.3 Quantificazione dei gruppi aldeidici

È possibile valutare parte dell'efficacia della funzionalizzazione quantificando i gruppi gliossilici generati sulla superficie del supporto attraverso una retrotitolazione. A tal scopo, 4,08 μL di due campioni prelevati all'inizio e al termine della reazione di ossidazione dei dioli a gruppi aldeidici vengono prima diluiti con acqua deionizzata (rapporto 1:50) e successivamente miscelati con 1 mL di una soluzione di ioduro di potassio al 10% ed 1 mL di una soluzione satura di bicarbonato di sodio. L'interazione tra il periodato di sodio e lo ioduro di potassio forma un composto il cui massimo di assorbanza a 420 nm viene rilevato mediante lo spettrofotometro Jasco V-730. Tramite l'Equazione (3.3) si è poi calcolata la quantità di gruppi generati sulla silice [25].

$$\frac{mol_{ald}}{g_{sup}} = \frac{V_{IO_4^-} * C_{IO_4^- in} * \left(1 - \frac{Abs_{fin}}{Abs_{in}}\right)}{g_{sup}} \quad (3.3)$$

mol_{ald}	Quantità di gruppi aldeidici (gliossilici) formati sulla superficie del supporto
g_{sup}	Massa del supporto
$V_{IO_4^-}$	Volume della soluzione iniziale di periodato di sodio
$C_{IO_4^- in}$	Concentrazione iniziale della soluzione di periodato di sodio
Abs_{fin}	Assorbanza a 420 nm della soluzione al termine della reazione
Abs_{in}	Assorbanza a 420 nm della soluzione prima della reazione

3.1.4 Quantificazione dei gruppi amminici

L'interazione tra il solfato di rame e i gruppi amminici permette di quantificare i gruppi reattivi che genera l'APTES. Operativamente, 50 mg di supporto funzionalizzato vengono aggiunti a 1,5 mL di soluzione di solfato di rame 300 mM. Il tutto, mantenuto in agitazione per un'ora a temperatura ambiente, viene poi centrifugato a 1000 rpm per tre minuti in modo da separare la fase solida da quella liquida. La procedura di caratterizzazione prevede la costruzione di una retta di taratura con soluzioni acquose di solfato di rame a diverse concentrazioni. Ogni punto di tale curva è ottenuto mediante la misura dell'assorbanza 750 nm, eseguita con lo spettrofotometro DR 500, della miscela di 100 μL di soluzione di solfato di rame ad una

concentrazione nota e 900 μL di acqua distillata. Successivamente, viene misurata l'assorbanza del campione costituito dal 100 μL della soluzione centrifugata e 900 μL di acqua distillata da cui, grazie alla retta di taratura, si ricavano le moli di gruppi amminici generati per grammo di supporto.

3.2 Caratterizzazione del materiale

I campioni di supporto non funzionalizzato e funzionalizzato vengono sottoposti a differenti tipi di analisi. Quest'ultime hanno non solo lo scopo di valutare qualitativamente i gruppi chimici che si sono generati sulla superficie dei supporti ma anche di verificare che i trattamenti di funzionalizzazione non modifichino le caratteristiche strutturali naturali della silice.

3.2.1 Spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier (FTIR)

La spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier (FTIR) è una tecnica di analisi qualitativa e non distruttiva utilizzata per identificare i gruppi caratteristici di un materiale grazie all'interazione di questi con la radiazione infrarossa (IR). La regione IR, compresa tra quella caratteristica della luce visibile e quella delle onde radio, è generalmente suddivisa in tre porzioni: IR-vicino ($1400\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$), IR-medio ($4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$) e IR-lontano ($400\text{-}40\text{ cm}^{-1}$). All'interno dell'intervallo IR sono presenti le frequenze caratteristiche delle vibrazioni di *stretching* (stiramento) e di *bending* (piegamento) dei legami covalenti riportate in Figura 3.6. Vibrazioni simmetriche e asimmetriche sono tipiche delle vibrazioni di stretching ovvero del movimento ritmico lungo l'asse di legame che causa un aumento o una diminuzione della distanza interatomica. Le vibrazioni di bending, invece, consistono in una variazione dell'angolo di legame e possono essere classificate in *wagging* e *twisting* se le vibrazioni sono fuori dal piano e in *scissoring* e *rocking* se le vibrazioni sono sul piano. Generalmente, le vibrazioni di *stretching* si verificano ad un'energia più elevata rispetto a quelle di *bending*.

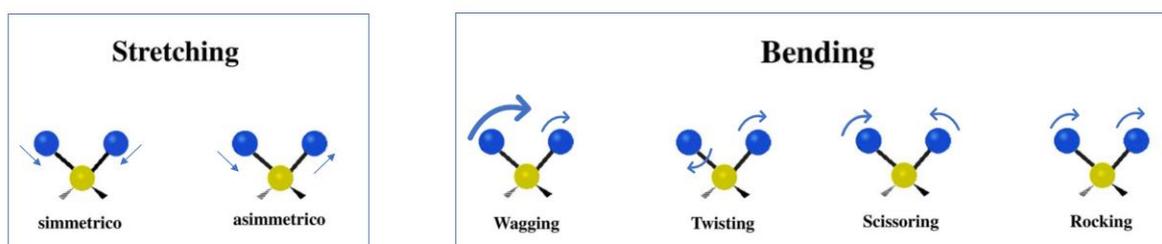


Figura 3.6 Vibrazioni di *stretching* e di *bending* del legame covalente

Quando la radiazione infrarossa interagisce con il legame covalente del campione che ha un dipolo elettrico, la molecola assorbe energia e il legame inizia ad oscillare secondo le diverse modalità a causa della variazione del dipolo. Sperimentalmente, grazie alla frequenza alla quale avviene l'assorbimento della radiazione IR, è possibile determinare i vari tipi di legami presenti [29].

Generalmente, lo spettro IR viene visualizzato come assorbanza in funzione del numero d'onda compreso tra 4000 cm^{-1} e 600 cm^{-1} o, in alternativa, come trasmittanza in funzione del numero d'onda. Esso è suddiviso in due intervalli: $4000\text{-}1400\text{ cm}^{-1}$ e $1400\text{-}600\text{ cm}^{-1}$. Il primo

range è noto come la regione dei gruppi funzionali e permette di ottenere informazioni qualitative sulla presenza o meno di determinati gruppi. Il secondo intervallo, invece, consente l'identificazione univoca di un composto ed è chiamato regione delle impronte digitali.

La silice di partenza e quelle funzionalizzate vengono sottoposte all'analisi. Ogni campione viene prima macinato e successivamente inserito in una pressa idraulica in modo da ottenere una pastiglia sottile, uniforme, compatta e del peso di pochi mg. In seguito, la pastiglia viene posta in un portacampione forato costituito da lamine d'oro ed inserito nella cella dello spettrofotometro Equinox 55 Bruker che è trasparente alla radiazione IR e collegato ad una linea a vuoto. Il materiale viene pretrattato a diverse temperature in vuoto al fine di evidenziare i gruppi funzionali.

3.2.2 Fisisorbimento di azoto a -196 °C

Quando un flusso gassoso interagisce con un solido, le molecole di gas possono essere adsorbite sulla superficie secondo un fenomeno superficiale noto come adsorbimento. Generalmente, quest'ultimo viene classificato in fisisorbimento e chemisorbimento. Il primo è un processo reversibile, non specifico ed è dovuto alla formazione di legami deboli (forze di Van der Waals). Solitamente avviene a basse temperature, è caratterizzato da basse energie di adsorbimento (< 30 kJ/mol) e porta alla creazione di più strati di molecole adsorbite sulla superficie.

Mediante fisisorbimento di azoto a -196 °C è possibile valutare la superficie specifica, il volume e il diametro medio dei pori di un materiale. L'analisi viene rappresentata attraverso delle curve chiamate isoterme di adsorbimento. Quest'ultime mostrano il volume di gas adsorbito in funzione del rapporto tra la pressione di adsorbato e quella di saturazione e sono classificate dalla IUPAC in sei tipi:

- l'isoterma di tipo I o isoterma di Langmuir è caratteristica dei materiali microporosi (dimensione dei pori < 2 nm). Quando la pressione relativa raggiunge valori prossimi all'unità, la curva raggiunge un valore asintotico e si ha la formazione di un singolo strato;
- le isoterme di tipo II e III sono tipiche di materiali non porosi caratterizzate, rispettivamente, da una forte e una debole interazione tra adsorbato ed adsorbente. Inoltre, mentre nel tipo II si ha il raggiungimento di un plateau con possibile formazione di un multistrato, in quella di tipo III non si ha la creazione di un monostrato;
- le isoterme di tipo IV e V sono caratteristiche dei materiali mesoporosi (dimensione dei pori compresa tra 2 e 50 nm) e avvengono, rispettivamente, per forti e deboli interazioni tra adsorbato ed adsorbente. Inoltre, a differenza del tipo V in cui non si raggiunge un plateau, nel tipo IV si ha la formazione di un monostrato. Entrambe, però, presentano un coppia di isteresi ovvero la presenza di differenti cammini tra la fase di adsorbimento e quella di desorbimento dovuti a fenomeni di condensazione capillare. Quest'ultimi si manifestano quando, nella fase di adsorbimento, la pressione di vapore è inferiore a quella di saturazione e il gas inizia a condensare. Nella fase di desorbimento, invece, l'adsorbente rilascia l'adsorbato a pressioni relativamente più basse provocando così il fenomeno di isteresi;
- l'isoterma di tipo IV è tipica di alcuni materiali con interazioni adsorbato-adsorbente relativamente forti e può portare alla formazione di più strati [26].

Inoltre, a seconda della forma che assume il ciclo di isteresi, è possibile classificare ulteriormente la struttura porosa del materiale solido analizzato in quattro tipologie:

- Le tipologie H1 e H4 rappresentano due estremi. La prima è caratteristica di materiali con una distribuzione stretta e regolare dei pori mentre la seconda fa riferimento alla condensazione capillare in pori a fessura stretta.
- Le tipologie H2 e H3 sono situazioni intermedie. La H2 è associata a materiali con pori di diversa forma e dimensione ma interconnessi mentre la H3 tipica di pori in posizione interstiziale e dovuti ad aggregati di particelle disposti in foglietti [27].

In Figura 3.7 si riporta la classificazione IUPAC dei diversi tipi di isoterme e dei cicli di isteresi.

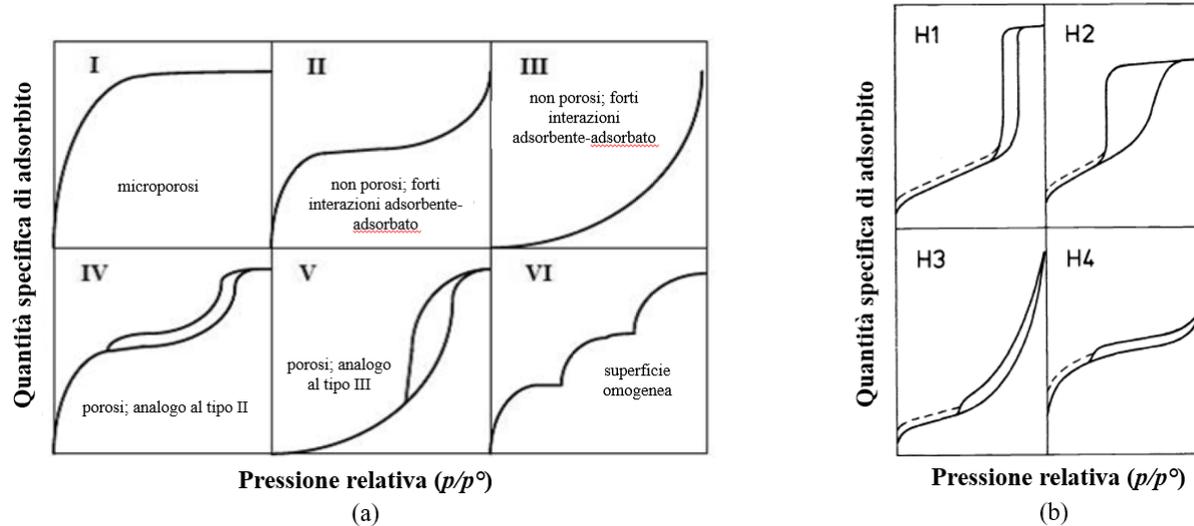


Figura 3.7 Classificazione delle isoterme di adsorbimento (a) e dei cicli di isteresi (b) secondo IUPAC. Figura tratta da [25], [26] con modifiche

Prima di essere analizzato, i campioni di MCM-41 e MCM-41 funzionalizzato vengono pretrattati per due ore a 200 °C con azoto in modo da eliminare le molecole di acqua ed altri contaminanti atmosferici che possono essere presenti sulla superficie del materiale. Il ciclo di adsorbimento-desorbimento viene poi effettuato alla temperatura di liquefazione dell'N₂ (-196 °C) con Micrometrics TriStar II. Il valore dell'area superficiale viene ricavato dal software dell'apparecchiatura mediante l'Equazione (3.4) del modello BET (*Brunauer-Emmett-Teller*) riportata in forma grafica in Figura 3.8 [26].

$$\frac{p}{v * (p^0 - p)} = \frac{c - 1}{v_m * c} \left(\frac{p}{p^0} \right) + \frac{1}{v_m * c} \quad (3.4)$$

- p Pressione di equilibrio dinamico
- p^0 Pressione di saturazione
- v Quantità specifica di gas adsorbito
- c Costante BET
- v_m Quantità specifica di gas adsorbito in un monostrato

Per completezza, l'Equazione (3.5) mostra il calcolo del valore della costante BET:

$$C = \exp\left(\frac{E_1 - E_L}{RT}\right) \quad (3.5)$$

E_1 Calore di adsorbimento del primo strato

E_L Calore di adsorbimento degli strati successivi al primo o calore di liquefazione

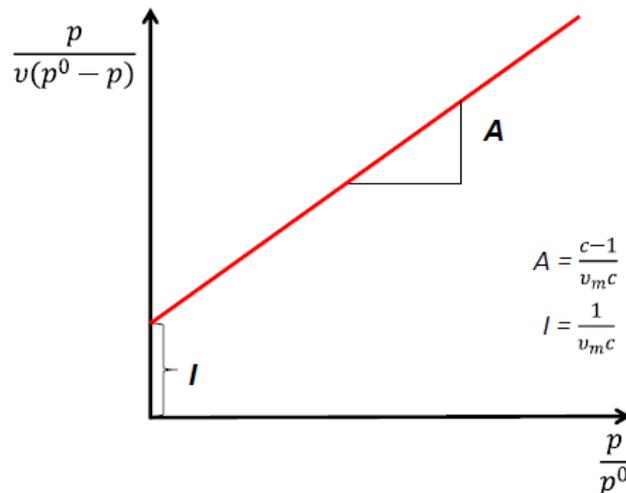


Figura 3.8 Rappresentazione grafica modello BET [25]

Dal valore dell'intercetta e della pendenza della retta si ottiene il volume del gas adsorbito in un monostrato (v_m) necessario per valutare la superficie specifica tramite l'Equazione (3.6) [26]

$$S_{BET} = \frac{v_m * N_A * S}{\tilde{V}} * \frac{1}{m} \quad (3.6)$$

S_{BET} Superficie specifica

N_A Numero di Avogadro

S Sezione di adsorbimento della specie adsorbente

\tilde{V} Volume molare del gas adsorbito

m Massa del solido adsorbente

3.2.3 Diffrazione a raggi X (XRD)

La diffrazione a raggi X è una tecnica utilizzata per l'analisi delle polveri e dei solidi cristallini. Essa permette la stima della grandezza dei micro-cristalli, l'identificazione dei difetti cristallini e la valutazione delle fasi. Quando un fascio di elettroni accelerato dall'applicazione di un alto voltaggio viene fatto collidere su una lamina di rame, si ha la generazione dei raggi X ovvero

di radiazioni elettromagnetiche ad alta energia la cui lunghezza d'onda è comparabile alla distanza tra gli atomi di un solido cristallino. Il fascio incidente provoca, infatti, l'espulsione di elettroni dagli atomi di rame ed un riarrangiamento degli elettroni da un guscio più esterno ad uno più interno con conseguente emissione di energia sotto forma di raggi X. Quest'ultimi vengono filtrati per produrre una radiazione monocromatica e, una volta indirizzati con un certo angolo di incidenza sul solido da analizzare, vengono diffratti dalla struttura del campione in accordo con l'Equazione (3.7) nota come equazione di Bragg [26].

$$n * \lambda = 2 * d * \sin\theta \quad (3.7)$$

- n Ordine di diffrazione ($n = 1, 2, \dots, d$)
- λ Lunghezza d'onda del raggio incidente
- d Distanza tra i piani cristallini adiacenti
- θ Angolo di diffrazione

L'equazione di Bragg è valida solo se l'interferenza è di tipo costruttivo ovvero se la differenza di percorso ottico in seguito alla diffrazione è un multiplo intero della lunghezza d'onda come mostrato in Figura 3.9.

Anche se non cristallino, l'MCM-41 viene sottoposto a diffrazione a raggi X in quanto, come già evidenziato, è una materiale ordinato e formato da un insieme di canali esagonali organizzati in una struttura a nido d'ape. In questo caso, la lunghezza d'onda delle radiazioni elettromagnetiche è comparabile alla distanza tra i centri dei canali. L'analisi del campione è eseguita con il diffrattometro Empyrean 3.0. Per la misura si sono usate radiazioni Cu $K\alpha$, un range angolare 2θ di $0,75^\circ$ - 5° ed uno step angolare di $0,013$. Ruotando il campione, si varia dell'angolo θ con la quale i raggi X collidono e, di conseguenza, si modifica l'intensità del segnale diffratto che viene a sua volta misurato attraverso un rilevatore. Quest'ultimo è montato su un braccio che ruota con un angolo 2θ come mostrato in Figura 3.10.

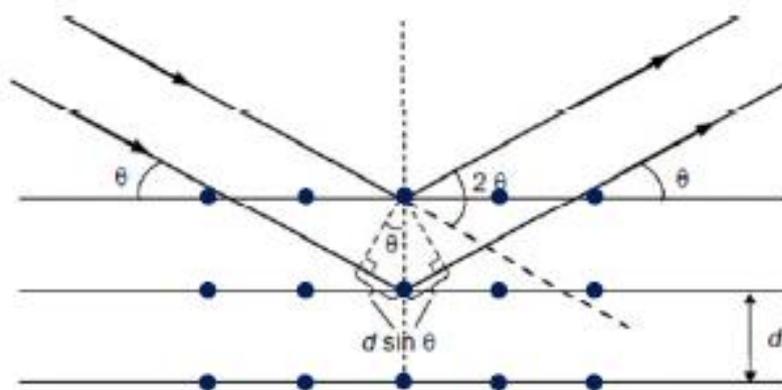


Figura 3.9 Interferenza costruttiva per l'equazione di Bragg [25]

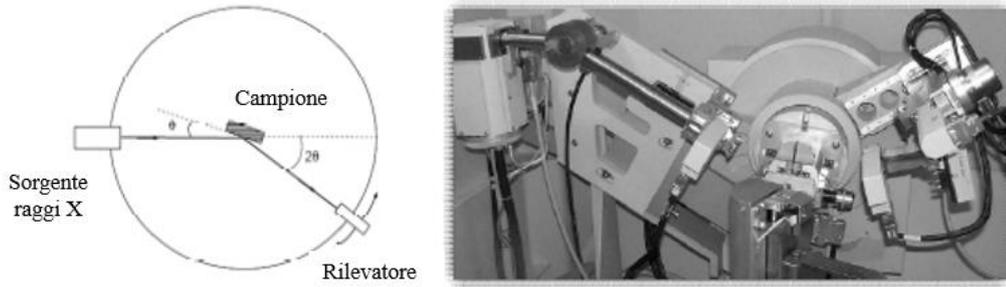


Figura 3.10 Schematizzazione di un diffrattometro a raggi X. Figura tratta da [25] con modifiche

Inoltre, la struttura regolare dell'MCM-41 permette di valutare tramite le Equazioni (3.8), (3.9) e (3.10) alcuni parametri di cella mostrati in Figura 3.11 [28]

$$d_0 = \frac{\lambda}{2 * \text{sen}\theta} \quad (3.8)$$

$$a_0 = \frac{2 * d_0}{\sqrt{3}} \quad (3.9)$$

$$\delta = a_0 - d_{p,BJH} \quad (3.10)$$

- d_0 Distanza inter-reticolare
- λ Sorgente $K_{\alpha 1}$ (1,540598 Å)
- θ Angolo di diffrazione in corrispondenza del picco
- a_0 Parametro di cella
- δ Spessore della parete
- $d_{p,BJH}$ Diametro dei pori valutato con il metodo BJH

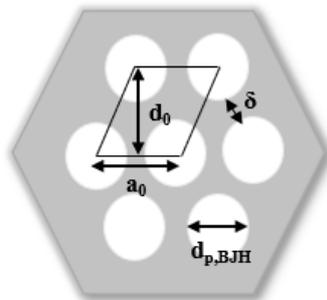


Figura 3.11 Schema dei parametri di cella (100)

3.3 Caratterizzazione dell'LDH

La valutazione della concentrazione della soluzione acquosa enzimatica acquistata da Merck viene eseguita con un saggio proteico colorimetrico di Bradford in cui si sfrutta la capacità del colorante Coomassie Brilliant Blu G-250 di instaurare legami non covalenti con le proteine [30]. Nello specifico, l'assorbanza del colorante si sposta da 465 nm a 595 nm quando questa sostanza è legata ad una proteina. È necessario costruire una retta di taratura con una proteina di riferimento. A tal scopo, vengono create soluzioni di fosfato buffer (0,1 M e pH 7) a diverse concentrazioni di albumina di serbo bovino (BSA). Ogni punto di tale curva è ottenuto mediante la misura dell'assorbanza a 595 nm, eseguita con lo spettrofotometro DR 500, della miscela di 100 μ L di soluzione proteica standard con 1 mL di colorante. Successivamente, viene misurata l'assorbanza dell'*h*LDH-A e, mediante la retta di taratura costruita, si ricava la concentrazione enzimatica della soluzione acquistata.

3.3.1 Saggio di attività dell'enzima libero

Prima di procedere con l'immobilizzazione, è necessario svolgere un saggio enzimatico in modo da avere un'idea dell'attività dell'enzima libero. Quest'ultima viene espressa in IU (*International Units*) e rappresenta la quantità di enzima che catalizza la conversione di 1 micromole di substrato, o la formazione di una micromole di prodotto, in un minuto e in condizioni operative definite.

L'LDH è una ossidoreduttasi che catalizza la reazione reversibile riportata in Figura 3.12 la cui attività enzimatica viene determinata tramite l'Equazione (3.11) misurando la variazione di assorbimento nel tempo a 340 nm del cofattore che si consuma. L'NADH, infatti, presenta un picco di assorbimento a 340 nm rilevabile mediante lo spettrofotometro Jasco V-730.

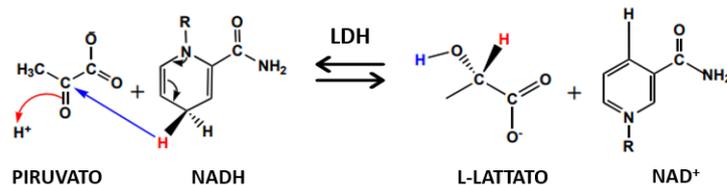


Figura 3.12 Reazione reversibile catalizzata dalla lattico deidrogenasi. Figura tratta da [31] con modifiche

$$A_{FE} = \frac{\Delta Abs}{\Delta t} * \frac{1}{\epsilon} * \frac{V}{m_{enz}} \quad (3.11)$$

A_{FE}	Attività dell'enzima libero
ΔAbs	Variazione di assorbimento tra l'ultimo e il primo campione
Δt	Variazione di tempo tra la fine e l'inizio della reazione
ϵ	Coefficiente di estinzione molare (6,22 mM ⁻¹ *cm ⁻¹ *1 cm)
V	Volume della soluzione del becher di reazione
m_{enz}	Massa dell'enzima nella soluzione

Operativamente, in un becher inserito all'interno di un bagno d'acqua si aggiungono 8,1 mL di una soluzione di fosfato buffer 0,1 M pH 7,5, 300 μ L di soluzione NADH 7 mM, 300 μ L di soluzione piruvato 49 mM e 300 μ L di una soluzione di LDH di concentrazione 0,01 mg_{enzima}/mL. Il tutto viene miscelato attraverso un'ancoretta e portato alla temperatura operativa ottimale di 40 °C. Al tempo iniziale e a quello finale si prelevano campioni di 100 μ L che, dopo essere stati miscelati con 2 mL di fosfato buffer 0,1 M pH 7,5, vengono inseriti nello spettrofotometro per la misura dell'assorbanza a 340 nm e la successiva valutazione dell'attività enzimatica.

3.3.2 Test di concentrazione, pH e temperatura ottimale dell'enzima libero

È noto che variabili come la concentrazione di substrato, di cofattore e di enzima, la temperatura e il pH dell'ambiente di reazione sono in grado di modificare notevolmente l'attività enzimatica. Il saggio di attività dell'enzima libero descritto nella sottosezione 3.1.1, infatti, è condotto nelle condizioni operative ottimali determinate grazie ad una serie di saggi enzimatici. Questi, però, sono svolti in modo leggermente diverso a quanto visto. Operativamente, in una cuvette si inseriscono 2,7 mL della soluzione buffer impiegata, 100 μ L di substrato, 100 μ L di cofattore e 100 μ L di una soluzione 0,01 mg/mL di LDH e si misura l'assorbanza in *Time Course* su un minuto a 340 nm dell'NADH che si ossida o dell'NAD⁺ che si riduce secondo lo schema di reazione reversibile riportato in Figura 3.11. La misura viene eseguita con lo spettrofotometro Jasco V-730 collegato allo strumento Julabo mostrato in Figura 3.13.

Si sottolinea che la scelta della concentrazione enzimatica è del tutto arbitraria. È bene notare, però, che un suo aumento comporta un maggiore utilizzo di enzima con conseguente incremento del costo economico dell'intero processo mentre, una sua diminuzione, potrebbe rendere difficile la rilevazione di una variazione di assorbanza.

I test di valutazione della concentrazione ideale di substrato e cofattore vengono svolti ad una temperatura di 30 °C utilizzando una soluzione di fosfato buffer 0,1 M pH 7,5. Una volta individuate le concentrazioni ottimali di substrato e cofattore, si procede con i test di pH e temperatura. Vengono utilizzate soluzioni di HCl e NaOH per correggere i pH delle soluzioni tampone 0,1 M che costituiscono gli ambienti di reazione. In particolare, si utilizza del fosfato buffer per gli ambienti acidi e debolmente basici (da pH 5 a pH 8,5) e una soluzione di carbonato buffer per gli ambienti alcalini con un pH compreso tra 9 e 11. Per tutti i test, i buffer ai relativi pH sono portati alle temperature desiderate grazie ad un bagno d'acqua riscaldato tramite lo strumento Julabo. Inoltre, la presenza dei tubi siliconici che collegano le due strumentazioni, permette la termostatazione della camera dello spettrofotometro.



Figura 3.13 Spettrofotometro Jasco V-730 collegato a Julabo

3.4 Immobilizzazione dell'LDH

Nella sezione 2.2 sono state descritte le diverse tecniche di immobilizzazione e i motivi per cui, quella covalente multipunto, è la più utilizzata. In particolare, essa mostra un elevato effetto stabilizzante tra i gruppi generati sulla superficie dell'MCM-41 e i residui amminoacidici della lattato deidrogenasi.

3.4.1 Immobilizzazione su supporto etero-funzionalizzato

Per l'immobilizzazione enzimatica su supporti funzionalizzati con gruppi amminici ed aldeidici si è leggermente modificata la procedura riportata da Pietricola *et al.* [28], [32]. Nella prima parte della reazione un'opportuna quantità di enzima viene posta in una fiala e disciolta in 9 mL di carbonato buffer 25 mM pH 9. Successivamente vengono aggiunti 200 mg di supporto etero-funzionalizzato in modo da ottenere una carica enzimatica di $1 \text{ mg}_{\text{enz}}/\text{g}_{\text{sup}}$. La reazione, condotta in gentile agitazione ad una temperatura compresa tra 4 °C e 10 °C, procede fino a quando o la misura dell'attività enzimatica in soluzione tende a zero o, in alternativa, finché non si ottengono due misure successive uguali. L'attività enzimatica viene valutata, alla temperatura ottimale, come assorbanza in *Time Course* su un minuto a 340 nm. Per il test si utilizzano 2,7 mL di fosfato buffer 0,1 M pH 7,5, 100 μL di soluzione piruvato 49 mM, 100 μL di soluzione NADH 7 mM e 100 μL di campione prelevato ad intervalli regolari di tempo e centrifugato a 500 rpm per 2 minuti in modo da separare il surnatante dal supporto. La scelta del pH di questa fase è legata al punto isolettrico dell'LDH-A pari a 8,4 [33] ovvero al valore di pH al quale l'enzima presenta una carica netta nulla. È buona pratica, infatti, utilizzare un mezzo di reazione il cui pH sia al massimo un punto al di sopra o al di sotto del punto isoelettrico dell'enzima. Durante questa fase, i gruppi amminici generati sulla superficie del supporto, favoriscono l'adsorbimento fisico dell'enzima creando dei legami deboli che, da soli, non sarebbero in grado di legare l'enzima al vettore per lungo tempo [34], [35].

Al termine della prima fase, il supporto viene filtrato e ridisperso, per 30 minuti e in gentile agitazione, in 10 mL di soluzione carbonato buffer 25 mM pH 9 al 20% di glicerolo il cui ruolo consiste nello stabilizzare l'enzima [28], [32]. Ad un pH alcalino, la maggior parte dei residui amminici della proteina vengono deprotonati permettendo ai gruppi gliossilici di generare delle immine, dette anche base di Schiff ($\text{C}=\text{N}$), instabili e reversibili [34], [35].

Alla fine di questa seconda fase si aggiunge, nella fiala contenente i 10 mL di buffer e il supporto, boridruro di sodio in concentrazione 0,4 mg/mL e si lascia reagire per circa 10 minuti sempre in gentile agitazione e ad una temperatura compresa tra 4 °C e 10 °C [28], [32]. Grazie all'aggiunta del NaBH_4 , le basi di Schiff vengono ridotte in un singolo legame e i gruppi gliossilici rimanenti vengono convertiti in gruppi inerti come mostrato in Figura 3.14. In questo modo, non solo si è certi di modificare poco dal punto di vista chimico e fisico la superficie enzimatica ma si riduce drasticamente anche il rischio di rilascio indesiderato dell'enzima immobilizzato [34], [35].

Un differente tipo di immobilizzazione su supporto etero-funzionale viene condotta utilizzando una soluzione di carbonato buffer 25 mM al 5 % v/v di polietilenglicole (PEG) in modo da avere un maggiore effetto stabilizzante [36].

3.4.2 Immobilizzazione su supporto mono-funzionalizzato

Per l'immobilizzazione enzimatica di supporti funzionalizzati con gruppi amminici, si sfrutta la reattività della glutaraldeide nei confronti dei residui di Lisina dell'enzima. A tal proposito, si possono eseguire due differenti procedure: la prima consiste nell'utilizzo della glutaraldeide durante l'immobilizzazione mentre, nella seconda, c'è una fase di pre-immobilizzazione in cui la matrice mono-funzionalizzata viene attivata con la glutaraldeide [37].

Per il primo caso si esegue un metodo che, nella prima fase, è simile a quello descritto per i supporti etero-funzionali. Infatti, in una fiala si inseriscono 200 mg di enzima, 9 mL di una soluzione di fosfato buffer 5 mM pH 7 e sufficiente enzima per ottenere una carica enzimatica di $2 \text{ mg}_{\text{enz}}/\text{g}_{\text{sup}}$. La temperatura dell'immobilizzazione è compresa tra 4°C e 10°C . L'attività enzimatica e la resa di immobilizzazione sono valutate in maniera analoga a quanto descritto nel paragrafo 3.4.1. Al termine della prima fase il supporto viene filtrato e posto per 30 minuti, alla stessa temperatura dell'immobilizzazione, in una soluzione di fosfato buffer 5 mM pH 7 allo 0,1% di glutaraldeide [38]. Con questa procedura, la glutaraldeide può svolgere due differenti tipi di ruolo. Essa può fungere o da agente stabilizzante per l'adsorbimento dell'enzima sul supporto o da agente reticolante tra la proteina e la matrice come mostrato nella Figura 3.15 [37].

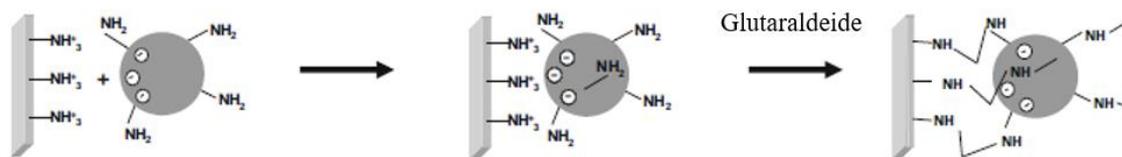


Figura 3.15 Schema di reazione del processo di immobilizzazione su supporto mono-funzionale.
Figura tratta da [36] con modifiche

Nel caso di pre-attivazione del supporto, 200 mg di MCM-41 mono-funzionalizzato vengono messi in contatto con una soluzione di fosfato buffer 25 o 50 mM pH 7 ad una percentuale nota di glutaraldeide. Il tutto viene mantenuto in gentile agitazione per due ore a temperatura ambiente [39]. Successivamente, il supporto attivato, filtrato e lavato viene posto in una fiala insieme all'enzima e disciolto in una soluzione di 9 mL di fosfato buffer 5 mM pH 7 in modo da raggiungere una carica enzimatica di $2 \text{ mg}_{\text{enz}}/\text{g}_{\text{sup}}$. Anche in questo caso, l'attività enzimatica e la resa di immobilizzazione sono valutate nello stesso modo descritto nella sottosezione 3.4.1 [38]. La reazione di immobilizzazione è condotta ad una temperatura compresa tra 4 e 10°C e, con questa procedura, l'interazione del supporto con l'enzima risulta governata prima dall'adsorbimento (interazioni ioniche) e poi dal legame covalente che si instaura tra la matrice attivata con la glutaraldeide e l'enzima come riportato nella Figura 3.16 [37].

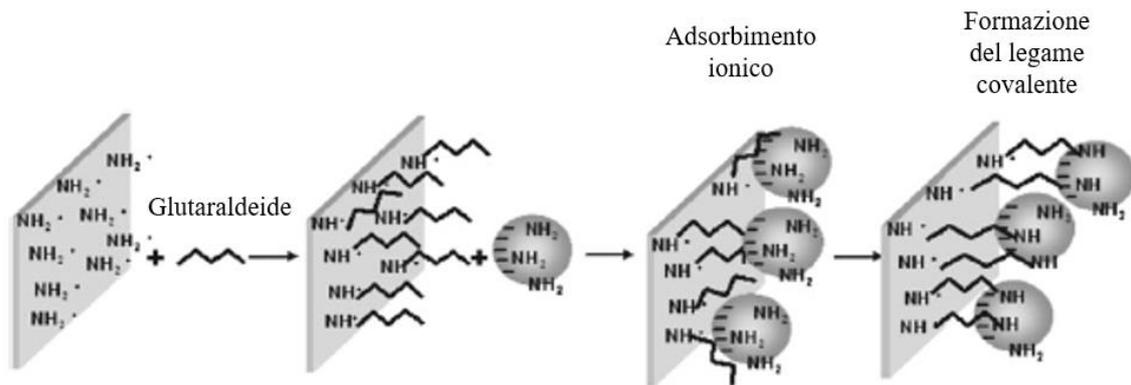


Figura 3.16 Schema di reazione dell'immobilizzazione su supporto mono-funzionale pre-attivato con glutaraldeide. Figura tratta da [36] con modifiche

3.4.3 Saggio di attività dell'enzima immobilizzato

L'attività dell'enzima immobilizzato viene valutata tramite l'Equazione (3.13). Operativamente, il saggio enzimatico è eseguito nelle medesime condizioni indicate nella sottosezione 3.3.1 per l'enzima libero con le uniche differenze di aver sostituito i 300 μL di LDH con 15 mg di enzima immobilizzato su MCM-41 e di aver utilizzato dei filtri capaci di filtrare particelle fino a 0,22 μm per il prelievo dei 100 μL di campione. In questo modo si evitano problemi di interferenza causati dal supporto durante la misura.

$$A_{IE} = \frac{\Delta Abs}{\Delta t} * \frac{1}{\varepsilon} * \frac{V}{m_{sup}} \quad (3.13)$$

A_{IE}	Attività dell'enzima immobilizzato
ΔAbs	Variazione di assorbanza tra l'ultimo e il primo campione
Δt	Variazione di tempo tra la fine e l'inizio della reazione
ε	Coefficiente di estinzione molare ($6,22 \text{ mM}^{-1} * \text{cm}^{-1} * 1 \text{ cm}$)
V	Volume della soluzione del becher di reazione
m_{sup}	Massa del supporto

Di solito, a causa dei legami covalenti che l'enzima instaura con il supporto e che possono modificare la struttura dei siti attivi, l'attività dell'enzima immobilizzato risulta essere minore di quella dell'enzima libero. Pertanto, al fine di confrontare diverse immobilizzazioni, risulta utile valutare l'attività enzimatica relativa percentuale, nota come *Retained Activity*, secondo l'Equazione (3.14) [28]

$$R_{act} = \frac{A_{IE}}{q * A_{FE}} * 100 \quad (3.14)$$

R_{act}	Attività enzimatica relativa percentuale
A_{IE}	Attività dell'enzima immobilizzato
q	Carica enzimatica sul supporto
A_{FE}	Attività dell'enzima libero

3.4.4 Test di pH e temperatura ottimale dell'enzima immobilizzato

Gli ambienti di reazione ai differenti pH sono stati creati correggendo le soluzioni tampone 0,1 M in modo analogo a quanto descritto nella sezione 3.3.2. Il saggio enzimatico viene poi condotto come un semplice test di attività sull'enzima immobilizzato descritto nella sottosezione 3.4.3. Nello specifico, 8,1 mL di soluzione buffer 0,1 M sono messi in contatto con 300 μ L di soluzione piruvato 49 mM, 300 μ L di soluzione di NADH 7 mM e 5 mg di enzima immobilizzato. Si prelevano e filtrano nel tempo campioni di 100 μ L che, dopo essere stati miscelati con 2 mL di fosfato buffer 0,1 M pH 7,5, vengono misurati mediante uno spettrofotometro a lunghezza d'onda fissa pari a 340 nm. Infine, l'attività enzimatica viene valutata come semplice differenza di assorbanza tra la fine e l'inizio della reazione di durata pari ad un minuto. Si fa presente che, per i test di pH, si è mantenuta durante la reazione una temperatura operativa di 40 °C mentre, per quelli di temperatura, un pH di 7,5 della soluzione buffer 0,1 M.

3.4.5 Immobilizzazione dell'LDH marcata con fluorescenza

Al fine di analizzare l'enzima immobilizzato con il microscopio a fluorescenza Nikon Eclipse Ti, la lattato deidrogenasi è stata colorata secondo la procedura indicata nel kit per la marcatura ATTO 488 acquistato su Merck. In Figura 3.17 si riporta la struttura chimica del marcatore fluorescente utilizzato. Esso appartiene alla famiglia delle rodamine e possiede un'ottima solubilità in acqua, un forte assorbimento, una resa quantica di fluorescenza molto elevata ed un'alta stabilità fotochimica. L'eccitazione della fluorescenza avviene nell'intervallo 480-515 nm [40].

Inizialmente, l'enzima e il colorante vengono incubati per due ore ed in gentile agitazione in una soluzione tampone di carbonato buffer pH 9,5 al fine di consentire alle molecole reattive del colorante di stabilire dei legami con i gruppi amminici della proteina. Si specifica che, poiché la soluzione enzimatica di LDH è ad un pH di 7,5 e presenta una concentrazione di 2,67 mg/mL, al fine di non modificare eccessivamente il pH del tampone utilizzato si è utilizzata una concentrazione proteica di 1,335 mg/mL. Tale valore è inferiore a quello suggerito dalla procedura e potrebbe causare una diminuzione dell'efficienza della colorazione. Successivamente, l'enzima marcato con fluorescenza viene prima purificato attraverso una colonna di separazione e successivamente immobilizzato in presenza del 5% di PEG sull'MCM-41 etero-funzionalizzato come descritto nella sottosezione 3.4.1.

Per non ridurre le prestazioni del colorante, entrambe le procedure di colorazione ed immobilizzazione enzimatica vengono eseguite al buio.

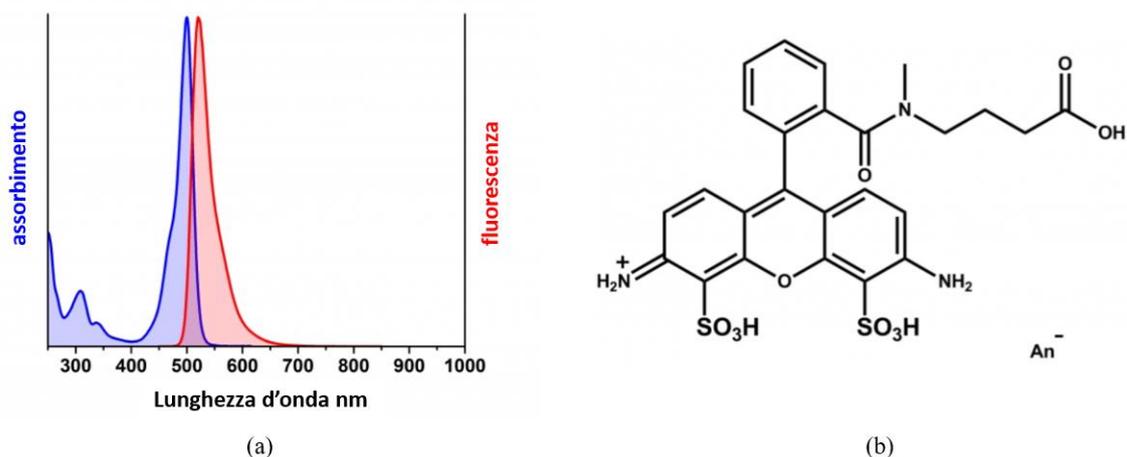


Figura 3.17 ATTO 488: lunghezze d'onda di assorbimento e fluorescenza (a) e struttura chimica della molecola reattiva del colorante (b) [40]

3.5 Inibizione dell'LDH

Come già discusso nella sottosezione 2.3.1, i composti a base NHI sono inibitori della reazione di conversione del piruvato in lattato ad opera dell'LDH-A. Nello specifico l'NHI-2, la cui formula di struttura è riportata in Figura 3.18, è un inibitore reversibile e competitivo nei confronti del piruvato e dell'NADH.

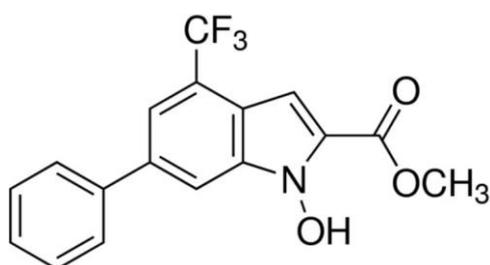


Figura 3.18 Formula di struttura dell'NHI-2

3.5.1 Inibizione dell'enzima libero

Per valutare la percentuale di inibizione sull'enzima libero ad opera dell'NHI-2, in una cuvette termostata alla temperatura di 40 °C, vengono miscelati 2,778 mL di fosfato buffer 0,1 M pH 7,5, 100 µL di piruvato 60 mM, 100 µL di NADH 8,58 mM, 20 µL di LDH. All'inizio e al termine della reazione della durata pari ad un minuto, 100 µL della miscela vengono prelevati, miscelati con 2 mL di fosfato buffer 0,1 M pH 7,5 ed analizzati con lo spettrofotometro Jasco V-730 al fine di ottenere degli spettri di assorbimento. Si specifica che le soluzioni di substrato e cofattore si ottengono miscelando queste con un opportuno volume di fosfato buffer 0,1 M pH 7,5, mentre quella di NHI-2 viene ottenuta sciogliendo il farmaco in dimetilsolfossido (DMSO) in quanto solubile o in questo o in etanolo.

La stessa reazione viene condotta anche in assenza di farmaco, aumentando di 20 µL la soluzione tampone in modo da poter utilizzare l'Equazione (3.15) per calcolare la percentuale di inibizione enzimatica dell'LDH libero in soluzione.

$$I = \frac{\mu\text{mol} - \mu\text{mol}_{\text{NHI-2}}}{\mu\text{mol}} * 100 \quad (3.15)$$

I Inibizione relativa percentuale

μmol μmol di NADH convertite durante la reazione in assenza di NHI-2

$\mu\text{mol}_{\text{NHI-2}}$ μmol di NADH convertite durante la reazione in presenza di NHI-2

Inoltre, al fine di valutare le moli di NADH convertite in assenza e presenza di farmaco, è necessario costruire una retta di taratura a concentrazioni variabili di cofattore. Pertanto, 100 μL di soluzione NADH a concentrazione nota vengono miscelati con 2 mL di fosfato buffer 0,1 M pH 7,5 ed analizzati mediante lo spettrofotometro ottenendo, anche in questo caso, degli spettri di assorbimento.

3.5.2 Inibizione dell'enzima immobilizzato

In modo analogo a quanto visto nella sottosezione 3.5.1, in una cuvette termostata alla temperatura di circa 40 °C, vengono miscelati 2,68 mL di fosfato buffer 0,1 M pH 7,5, 100 μL di piruvato 60 mM, 100 μL di NADH 8,58 mM, 20 μL di NHI-2 3,75 mM e 10 mg di LDH immobilizzato su eMCM-41 in presenza del 5% di PEG. Due campioni di 100 μL vengono prelevati all'inizio e al termine della reazione e miscelati con 2 mL di fosfato buffer 0,1 M pH 7,5. Anche in questo caso, la stessa reazione viene condotta in assenza di NHI-2 aumentando di 20 μL il volume di fosfato buffer utilizzato. Tutti i campioni vengono analizzati in modo da poter calcolare, sempre tramite l'Equazione (3.15), l'inibizione relativa percentuale dell'enzima immobilizzato a causa dell'NHI-2.

4. Discussione dei risultati

4.1 Risultati della caratterizzazione dei supporti

La presenza dei gruppi reattivi sui supporti funzionalizzati e l'effetto che i trattamenti di funzionalizzazione hanno sulla silice di partenza sono stati osservati attraverso analisi FTIR, di fisisorbimento di azoto a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ e XRD.

4.1.1 Risultati della spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier (FTIR)

In Figura 4.1 si riportano gli spettri FTIR effettuati sulla silice di partenza e su quelle funzionalizzate a diverse temperature. I pretrattamenti a $150\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $300\text{ }^{\circ}\text{C}$ a cui vengono sottoposti i campioni prima dell'analisi, mettono in evidenza picchi nell'intervallo $4000\text{-}1300\text{ cm}^{-1}$ che altrimenti sarebbero nascosti dalla presenza delle molecole di acqua o di altre impurità.

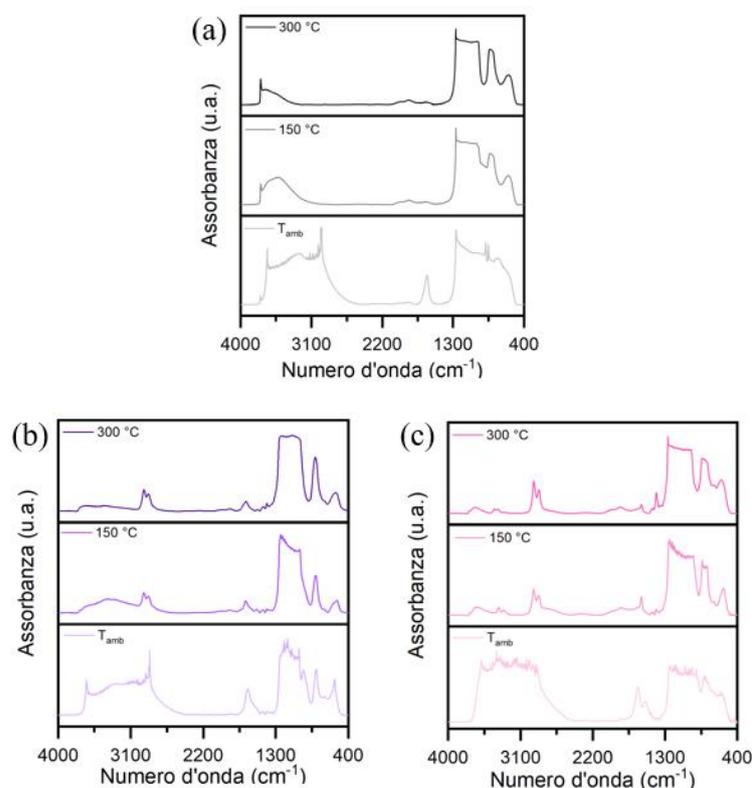


Figura 4.1 Spettri FTIR dell'MCM-41 (a), eMCM-41 (b), mMCM-41 (c)

La Figura 4.2 mostra gli spettri dei tre campioni dopo il pretrattamento a $300\text{ }^{\circ}\text{C}$. L'assenza del picco attribuito ai gruppi silanolicci isolati (3744 cm^{-1}) per eMCM-41 e mMCM-41 e la presenza di tutti gli altri picchi (ad eccezione di quello a 1860 cm^{-1}), mostrati in Figura 4.2 e riassunti in Tabella 4.1, sono indice dell'avvenuta etero e mono-funzionalizzazione.

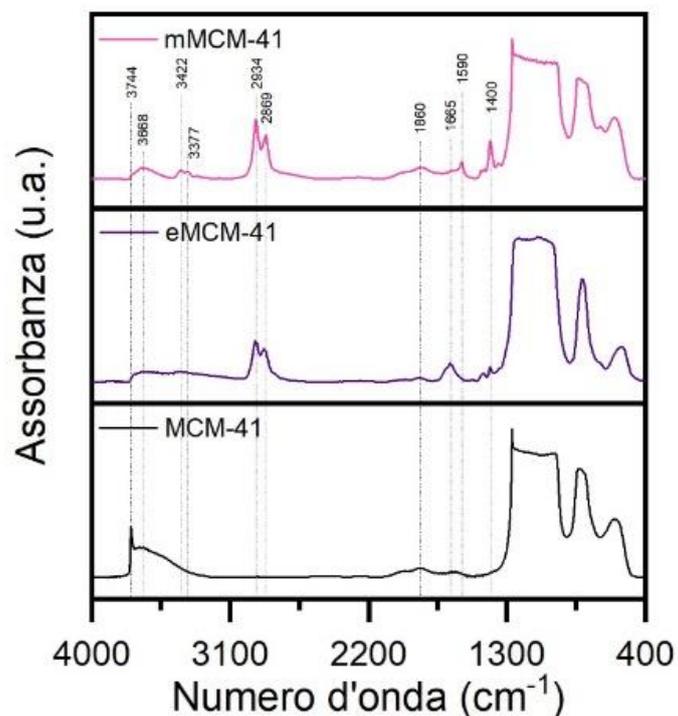


Figura 4.2 Spettri FTIR dell'MCM-41 (nero), eMCM-41 (viola) e mMCM-41 (rosa) pretrattati a 300 °C

Tabella 4.1 Assegnamento delle bande degli spettri FTIR dei campioni pretrattati a 300 °C

Numero d'onda (cm^{-1})	Assegnazione della banda	Riferimenti
3744	Si-OH isolati	[43]
3668, 3422 e 3377	<i>Stretching</i> -OH di Si-OH coinvolti nei fenomeni di adsorbimento	[44]
3000-2800	<i>Stretching</i> -CH di APTES e GPTMS	[45]
2934 e 2869	<i>Stretching</i> -CH in -CH ₂ - e -CH ₃ -	[46]
1860	<i>Vibration</i> Si-O-Si	[47]
1665	<i>Bending</i> -NH e <i>Stretching</i> C=O	[48]
1590	<i>Bending</i> -NH	[46]
1400	<i>Bending</i> CH in -CH ₂ - e -CH ₃	[46]

4.1.2 Risultati del fisisorbimento di azoto a -196 °C

In Tabella 4.2 si riassumono i dati relativi all'area superficiale specifica (S_{BET}) calcolata con l'Equazione (3.6) del modello BET (*Brunauer-Emmett-Teller*), il volume cumulativo dei pori (V_p) e il diametro medio dei pori (d_p) valutati con il metodo BJH (*Barrett-Joyner-Halenda*) ottenuti con i test di fisisorbimento di azoto sui campioni di MCM-41 e di silice funzionalizzata.

Tabella 4.2 Proprietà dell'MCM-41 (funzionalizzata e non) derivanti dal fisisorbimento di azoto a -196 °C

	S_{BET} (m^2/g)	V_p (cm^3/g)	d_p (nm)
MCM-41	948	0,40	3,4
eMCM-41	474	0,08	2,4
mMCM-41	753	0,09	2,4

I trattamenti di etero e mono funzionalizzazione modificano la morfologia della silice di partenza causando una diminuzione di S_{BET} , V_p e di d_p . Potenzialmente, la riduzione dell'area superficiale riduce i siti su cui l'enzima può immobilizzarsi. È possibile notare, inoltre, il peso maggiore con cui il trattamento di etero-funzionalizzazione modifica tale valore. Ciò è probabilmente causato dal contatto del supporto con l'acido solforico durante la seconda del processo. Tale step è infatti mancante nel trattamento di mono-funzionalizzazione.

La distribuzione della dimensione dei pori riportata in Figura 4.3 risulta molto stretta e concentrata nell'intorno di d_p per tutti i campioni.

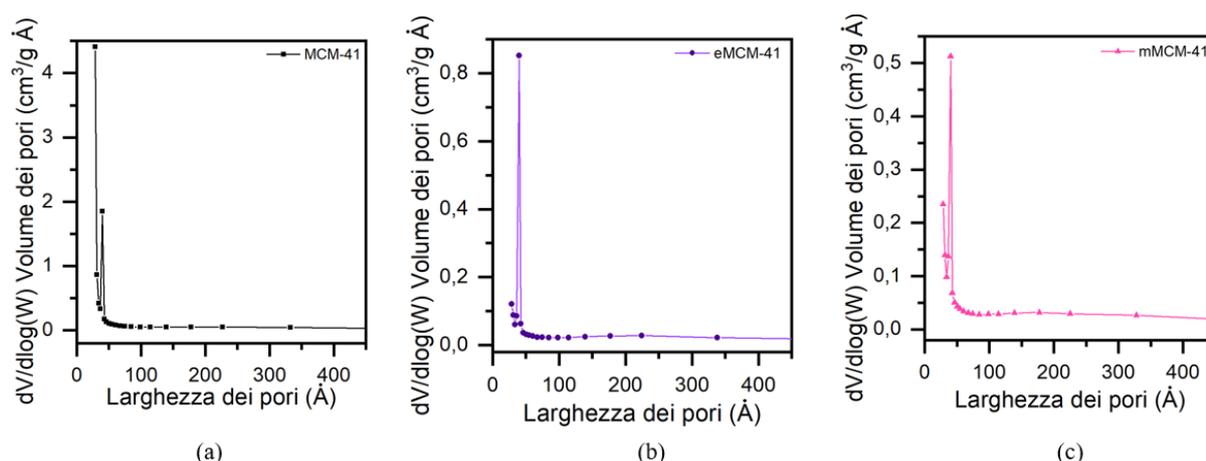


Figura 4.3 Distribuzione della dimensione dei pori per l'MCM-41 (a), eMCM-41 (b) e mMCM-41 (c)

Le Figura 4.4 mostra le isoterme di adsorbimento e desorbimento di tutti i campioni. Queste, in accordo con la classificazione IUPAC, sono di tipo IV con un ciclo di isteresi H4 tipico dei materiali mesoporosi con pori a fessura stretta [27].

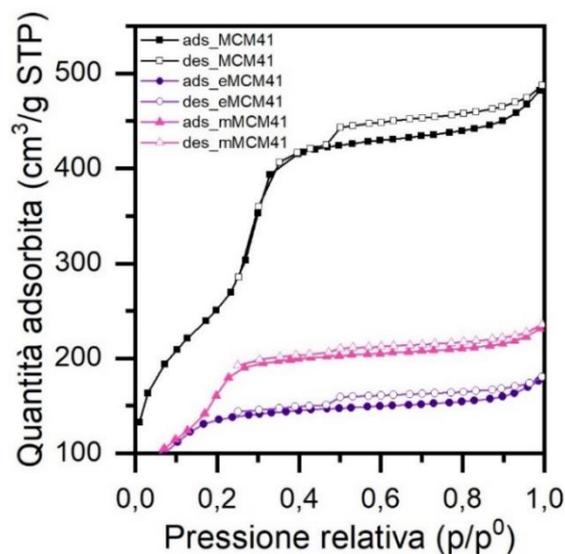


Figura 4.4 Isotherme di adsorbimento e desorbimento dell'MCM-41 (nero), dell'eMCM-41 (viola) e dell'mMCM-41 (rosa)

4.1.3 Risultati della diffrazione a raggi X (XRD)

In Figura 4.5 si riportano gli spettri XRD a bassi angoli di diffrazione dei campioni di MCM-41, eMCM-41 e mMCM-41. Nello specifico, in accordo con la letteratura, l'MCM-41 presenta nell'intervallo 2θ considerato due picchi che possono essere indicizzati con (100) e (110) e che sono caratteristici di una struttura ordinata del materiale [41], [42]. I diffrattogrammi dei materiali funzionalizzati sono il risultato di una modifica della struttura interna del materiale. In Tabella 4.3 si riassumono i valori dell'angolo di diffrazione θ di (100), della distanza interreticolare d_0 , del parametro di cella a_0 e dello spessore della parete δ calcolate, rispettivamente, secondo le Equazioni (3.8) (3.9) e (3.10).

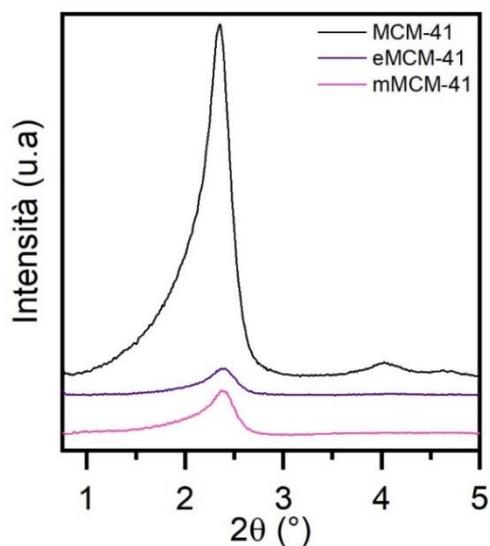


Figura 4.5 Spettro XRD dell'MCM-41 (nero), eMCM-41 (viola), mMCM-41 (rosa)

Tabella 4.3 Proprietà dei campioni di MCM-41 (funzionalizzati e non) derivanti dalle analisi XRD

	θ (°)	d_0 (nm)	a_0 (nm)	δ (nm)
MCM-41	1,18	3,8	4,3	1,0
eMCM-41	1,19	3,7	4,3	1,8
mMCM-41	1,19	3,7	4,3	1,9

4.2 LDH libero

La Figura 4.6 mostra la retta di taratura del saggio colorimetrico di Bradford eseguito secondo quanto riportato nella sezione 3.3. I punti neri del grafico rappresentano le misure di assorbanza a 595 nm dei campioni costituiti dalla miscela di 1 mL di colorante e 100 μ L di soluzione della proteina di riferimento, l'albumina di siero bovino. In magenta, invece, vi è la misura dell'assorbanza della miscela di 1 mL di colorante e 100 μ L di campione di lattato deidrogenasi costituito da 98 μ L di fosfato buffer 0,1 M pH 7 e 2 μ L di soluzione acquosa di *h*LDH-A acquistato su Merck. Grazie alla retta di taratura costruita con i dati sperimentali della proteina di riferimento, si è quindi ricavata la concentrazione della soluzione enzimatica testata. Da questa, si è successivamente calcolata la concentrazione enzimatica della boccetta di *h*LDH-A acquistata ottenendo un valore pari a 2,67 mg/mL.

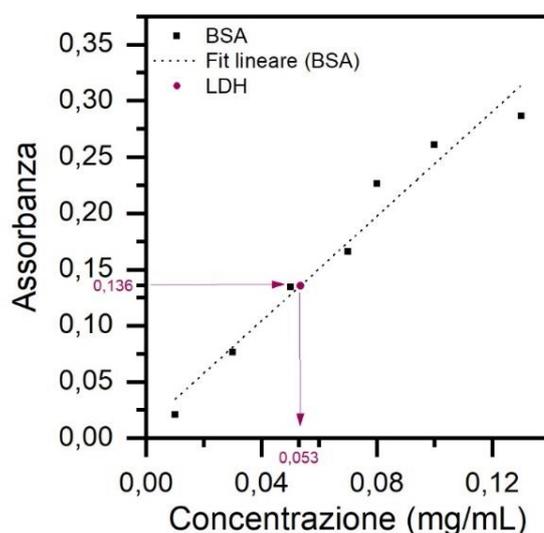


Figura 4.6 Retta di taratura del saggio proteico colorimetrico di Bradford

L'attività enzimatica delle ossidoreduttasi che consumano o producono NADH come cofattore può essere determinata direttamente tramite spettroscopia UV-vis in quanto l'NADH presenta un massimo di assorbimento a 340 nm che non si trova nel cofattore in forma ossidata (NAD⁺). Tutti i saggi enzimatici di questo lavoro di tesi, infatti, si basano sulla variazione di assorbanza a 340 nm dovuta al NADH che si consuma (o che si produce). Da letteratura, però,

anche il piruvato presenta un picco di assorbimento a questa lunghezza d'onda. La Figura 4.7 mostra gli spettri di assorbimento del substrato e del cofattore coinvolti nella conversione del piruvato in L-lattato ad opera dell'LDH. I tre campioni sottoposti a misura sono costituiti da 2,7 mL di fosfato buffer 0,1 M pH 7,5 rispettivamente miscelati con 200 μ L di soluzione piruvato 49 mM, 200 μ L di soluzione di NADH 7 mM e 100 μ L di piruvato uniti a 100 μ L di NADH. La misura viene eseguita con lo spettrofotometro Jasco V-730. Dalla Figura 4.7 si evince che l'intensità del picco di assorbimento del piruvato è praticamente trascurabile rispetto a quello del cofattore. Dunque, non si evidenziano problemi di sovrapposizione di massimi di assorbimento che renderebbero inefficace la misura dell'attività enzimatica basata sulla misura dell'assorbanza dell'NADH che si ossida a 340 nm.

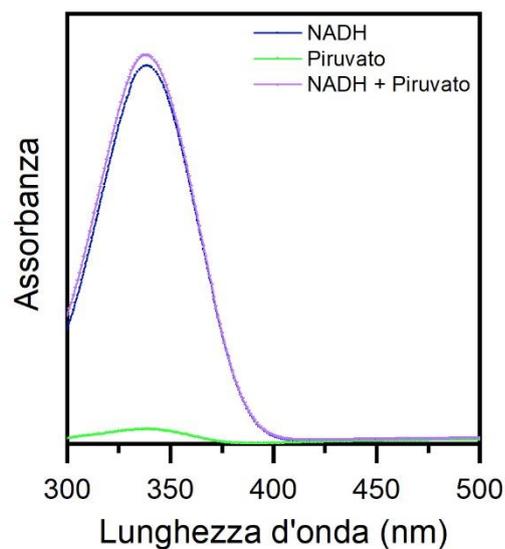


Figura 4.7 Spettri di assorbimento del NADH (blu), del piruvato (verde) e della miscela di NADH e Piruvato (lilla)

4.2.1 Concentrazione, pH e temperatura ottimale dell'enzima libero

Nelle Figure 4.8 e 4.9 si riportano i risultati dei test di concentrazione, pH e temperatura ideale svolti con l'enzima libero secondo quanto descritto nella sottosezione 3.3.2.

Per i test di concentrazione ottimale riguardanti la reazione diretta di conversione del piruvato in lattato si è utilizzato un rapporto uno a sette tra la concentrazione di cofattore e quella di substrato. Diverse prove sono state eseguite, invece, per la reazione inversa. Si è considerato prima un rapporto costante di due a uno tra le concentrazioni di substrato e cofattore e poi valori costanti di coenzima in funzione del quale si è fatto variare il substrato. Le possibili concentrazioni ottimali di cofattore e substrato sono tutti quei valori per cui si osserva un'attività percentuale massima. Nel caso della reazione diretta, dalla Figura 4.8 si evince che si ha questo per concentrazioni 7 mM di NADH e 49 mM di piruvato. Per la conversione del lattato in piruvato, invece, sono state scelte, tra le possibili concentrazioni ottimali, quelle che richiedono un minor peso in grammi di substrato e cofattore al fine di rendere l'intero processo più economico. In questo caso, infatti, vengono selezionate concentrazioni ottimali pari a 20 mM di NAD^+ e 60 mM di acido lattico.

Le mappe riportate in Figura 4.9 mostrano attività massime per una temperatura e un pH dell'ambiente di reazione rispettivamente pari a 40 °C e 7,5 per la reazione diretta e 50°C e 8

per l'inversa. I valori di pH ottimale ottenuti discostano da quelli che si hanno nelle regioni tumorali in cui solitamente si osserva un valore acido di pH pari 5,8, e nel plasma sanguigno nel quale si ha un pH di 7,4 [49].

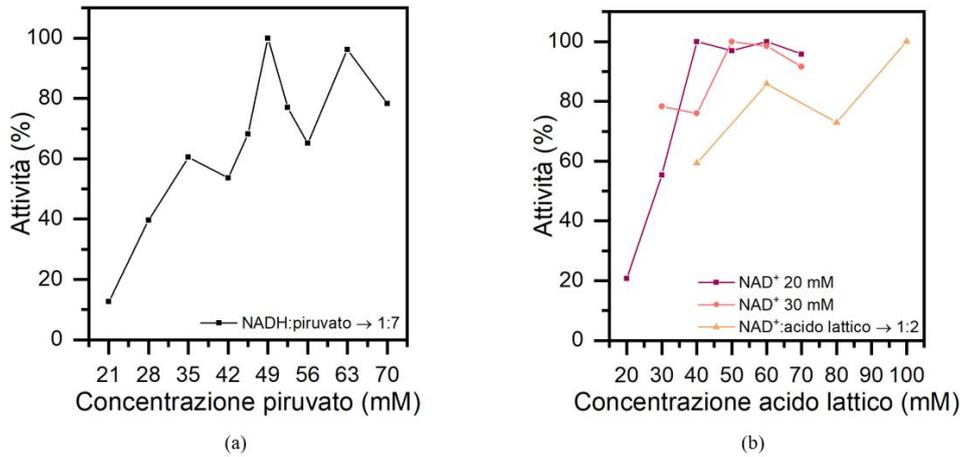


Figura 4.8 Test di concentrazione ottimale dell'enzima libero. A sinistra: reazione diretta, concentrazione di substrato sette volte quella di cofattore. A destra: reazione inversa, concentrazione costante di cofattore 20 mM (magenta), 30 mM (arancio) e concentrazione di substrato doppia rispetto a quella di cofattore (giallo)

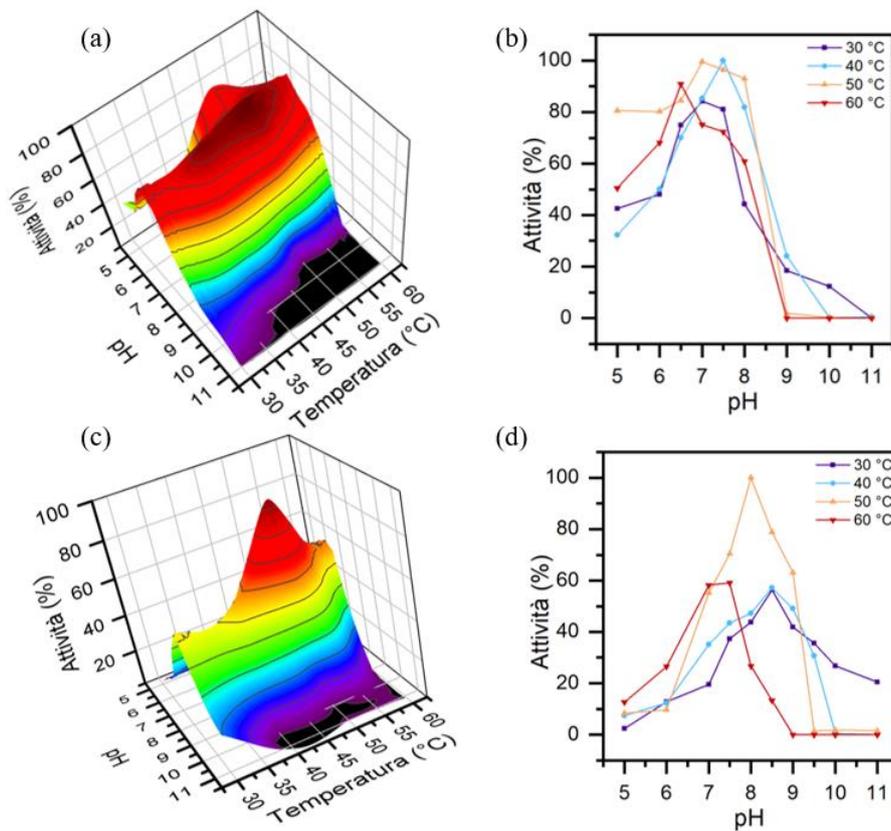


Figura 4.9 Test di pH e temperatura dell'enzima libero. In alto si riportano i risultati in 3D (a) e 2D (b) relativi alla reazione diretta. In basso si mostrano i valori 3D (c) e 2D (d) riguardanti la reazione inversa

La Tabella 4.4 riassume tutti i valori ottimali ottenuti e mostrati in questa sottosezione. Si evidenzia che tali parametri sono stati utilizzati per lo svolgimento di tutti i successivi saggi enzimatici.

Tabella 4.4 Valori ottimali di concentrazione del substrato e cofattore, di temperatura e pH della reazione diretta e inversa catalizzate dalla lattato deidrogenasi

	REAZIONE DIRETTA	REAZIONE INVERSA
	$\text{piruvato} \xrightarrow[\text{LDH}]{\text{NAD}^+} \text{lattato}$	$\text{lattato} \xrightarrow[\text{LDH}]{\text{NADH} + \text{H}^+} \text{piruvato}$
Concentrazione substrato (mM)	49	60
Concentrazione cofattore (mM)	7	20
Temperatura ambiente di reazione (°C)	40	50
pH ambiente di reazione	7,5	8

La Figura 4.10 mostra il comportamento nel tempo della reazione di conversione del piruvato in lattato catalizzata dalla lattato deidrogenasi nelle condizioni operative ottimali. La prova si svolge in due fasi. Nella prima, all'interno di un bagno d'acqua termostato alla temperatura ottimale, vengono inseriti due becher in ciascuno dei quali si mettono in contatto 8,1 mL di fosfato buffer 0,1 M pH 7,5, 300 µL di soluzione di piruvato 49 mM, 300 µL di soluzione di NADH 7 mM e 300 µL di soluzione di LDH 0,01 mg/mL. Da uno dei due becher si prelevano nel tempo dei campioni di 100 µL che, una volta miscelati con 2 mL di fosfato buffer pH 7 0,1 M, vengono sottoposti alla misura dell'assorbanza a 340 nm con lo spettrofotometro Jasco V-730. Dopo 90 minuti, essendo l'assorbanza nulla, si fa ripartire la reazione nel becher da cui non si sono prelevati campioni inserendo all'interno di questo substrato e cofattore nelle medesime concentrazioni e volumi indicati per la prima fase.

Dall'andamento delle curve riportate in Figura 4.10 si evince che l'assorbanza e, quindi, l'attività enzimatica, non si azzerano a causa della disattivazione della lattato deidrogenasi sottoposta all'ambiente di reazione indicato. Infatti, la rilevazione di un'assorbanza normalizzata rispetto al valore massimo diversa da zero all'inizio della seconda fase, dimostra che al termine della prima parte della reazione tutti i reagenti vengono convertiti in prodotti. Inoltre, la presenza di valori oscillanti presuppone il raggiungimento dell'equilibrio di reazione con conseguente parziale riconversione del lattato in piruvato.

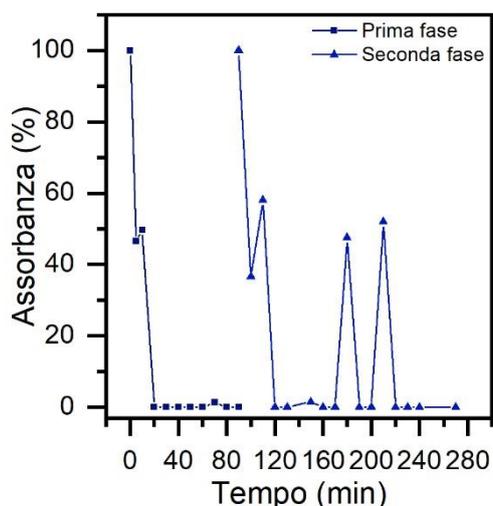


Figura 4.10 Assorbanza percentuale normalizzata al valore iniziale dell’NADH che si ossida nel tempo

4.2.2 Parametri cinetici

Gli effetti che diverse concentrazioni di piruvato hanno sull’attività dell’LDH libero si valutano attraverso una serie di saggi enzimatici in cuvette in cui si osserva la variazione di assorbanza in un minuto dell’NADH che si ossida. I test vengono effettuati alla temperatura ottimale della reazione utilizzando 2,7 mL di fosfato buffer 0,1 M pH 7,5, 100 μ L di piruvato ad una concentrazione nota, 100 μ L di NADH 7 mM e 100 μ L di LDH di concentrazione pari a 0,01 mg/mL. In Figura 4.11 si riporta la velocità molare specifica di conversione del substrato, valutata secondo l’Equazione (4.1), in funzione della concentrazione di piruvato presente nell’ambiente di reazione quando la concentrazione di NADH viene mantenuta costante e pari al suo valore ottimale (7 mM).

$$R_S = -R_P = \frac{\Delta Abs}{\Delta t} * \frac{1}{\epsilon} * \frac{V}{m_{enz}} \quad (4.1)$$

R_S Velocità molare di scomparsa del substrato

$\Delta Abs / \Delta t$ Assorbanza in *Time Course* su un minuto

ϵ Coefficiente di estinzione molare (6,22 mM⁻¹*cm⁻¹*1 cm)

V Volume della soluzione nella cuvette

m_{enz} Massa dell’enzima nella soluzione

I dati sperimentali mostrano un andamento coerente con il modello cinetico di Michaelis-Menten. La costante di Michaelis K_M , la velocità massima di formazione del prodotto $R_{p,max}$, la costante catalitica K_{cat} e quella specifica K_{cat}/K_M riportate in Tabella 4.5 sono state stimate dai grafici di Lineaweaver-Burk e di Hanes-Woolf ottenuti, rispettivamente, dalla linearizzazione dell’Equazione (2.2) di Michaelis-Menten secondo le Equazioni (2.4) e (2.5).

Tabella 4.5 Parametri cinetici della conversione del piruvato in lattato catalizzata dall'LDH nelle condizioni operative ottimali

	K_M (mM)	$R_{p,max}$ (IU mg _{prot} ⁻¹)	K_{cat} (s ⁻¹)	K_{cat}/K_M (mM ⁻¹ s ⁻¹)
Lineweaver-Burk	0,04	119	278	6528
Hanes-Woolf	0,13	236	551	4268

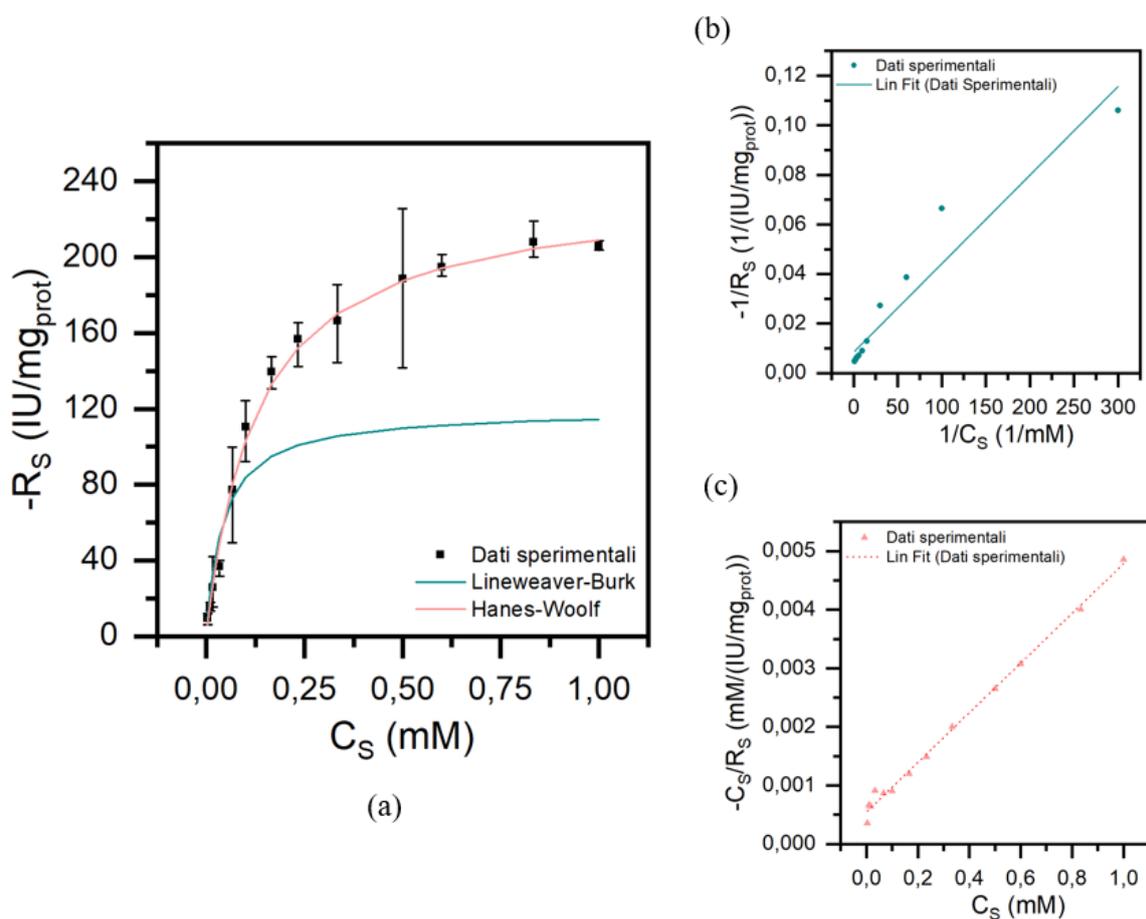


Figura 4.11 A sinistra: velocità specifica di conversione del substrato in funzione della sua concentrazione nell'ambiente di reazione e in presenza di una concentrazione costante di NADH (a) valutata tramite equazione di Lineweaver-Burk (verde) e Hanes-Woolf (arancio). A destra: grafico dei doppi reciproci (o di Lineweaver-Burk) (b) e di Hanes-Woolf (c)

Come affermato nella sottosezione 2.1.2, il modello di Hanes-Woolf è effettivamente meno soggetto ad errori sperimentali. I parametri cinetici calcolati dal suo grafico, infatti, fittano perfettamente i dati sperimentali.

4.3 Efficienza della funzionalizzazione e dell'immobilizzazione

4.3.1 Quantificazione dei gruppi aldeidici ed amminici

Al termine dei processi di funzionalizzazione sono state valutate le moli dei gruppi aldeidici ed amminici per grammo di supporto che vengono rispettivamente generate sull'eMCM-41 e sull'mMCM-41 in accordo con l'equazione (3.3) e la procedura descritta nella sottosezione 3.1.4. In Tabella 4.6 se ne riportano i valori insieme alle rispettive densità superficiali ottenute dividendo le $\mu\text{mol}/\text{g}_{\text{sup}}$ per la corrispettiva area specifica superficiale del materiale funzionalizzato (S_{BET} , Tabella 4.2). Da letteratura si stima che a $1,5 \mu\text{mol}_{\text{ald}}/\text{m}^2_{\text{sup}}$ corrispondono in media a 40-80 siti a cui l'enzima potrà legarsi durante il processo di immobilizzazione [34]. Dunque, le effettive $\mu\text{mol}/\text{m}^2_{\text{sup}}$ dei gruppi gliossilici generati sull'e-MCM-41 corrispondono a circa 64-128 siti.

Tabella 4.6 Quantificazione dei gruppi aldeidici ed amminici generati rispettivamente sui supporti etero e mono-funzionalizzati

	$\mu\text{mol}/\text{g}_{\text{sup}}$	$\mu\text{mol}/\text{m}^2_{\text{sup}}$
Gruppi aldeidici su eMCM-41	1134	2,4
Gruppi amminici su mMCM-41	657	0,9

Le Figura 4.12 mostra la retta di taratura costruita per la valutazione delle moli dei gruppi amminici generate sul supporto mono-funzionalizzato e le possibili tipologie di interazione che si possono avere tra questi gruppi e il solfato di rame. Si specifica che è stato considerato un rapporto 1:1 tra i gruppi reattivi presenti sul supporto e gli ioni rame che interagiscono con essi. Pertanto, il valore riportato in Tabella 4.6 rappresenta una sovrastima dei gruppi effettivamente generati sull'mMCM-41. La procedura di caratterizzazione dei gruppi amminici riportata nella sezione 3.1.4 è stata applicata anche per il supporto etero-funzionalizzato non ottenendo, però, un risultato attendibile probabilmente a causa di interazioni tra il solfato di rame i gruppi gliossilici presenti sull'eMCM-41.

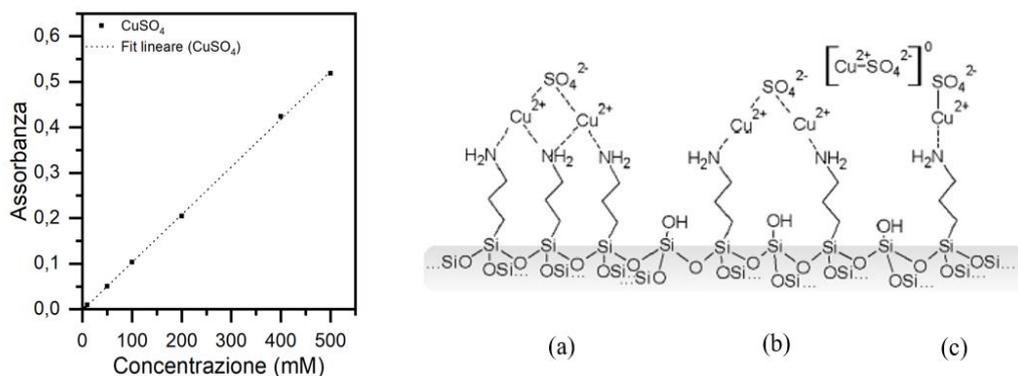


Figura 4.12 A sinistra: retta di taratura del solfato di rame usata per la quantificazione dei gruppi amminici generati su mMCM-41. A destra: possibili interazioni tra gli ioni rame e i gruppi reattivi della matrice funzionalizzata: rapporto 1:3 (a), 1:2 (b) e 1:1 (c) [50]

Le moli di gruppi reattivi generati per grammo di supporto risultano essere molto inferiori nel caso del processo di mono-funzionalizzazione che, per questo motivo, può essere considerato meno efficace.

4.3.2 Resa di immobilizzazione e attività relativa percentuale

L'enzima è stato immobilizzato sia sul supporto etero-funzionalizzato in presenza del 5% di PEG sia su quello mono-funzionalizzato e pre-attivato con l'1% di glutaraldeide. Per entrambe si sono seguite le procedure indicate rispettivamente nella sottosezione 3.4.1 e 3.4.2. In particolare, nel caso della matrice attivata solo con gruppi amminici, si specifica che 200 mg di mMCM-41 sono stati incubati per due ore a temperatura ambiente in 5 mL di fosfato buffer 50 mM pH 7 all'1% glutaraldeide (40mg/mL) prima dell'effettiva immobilizzazione.

Il pH, la molarità e la temperatura dell'ambiente di reazione influenzano il processo di immobilizzazione. Generalmente, il pH ottimale è vicino al punto isoelettrico dell'enzima (che per hLDH-A è pari a 8,4 [33]) e ha un ruolo importante sulla distribuzione delle cariche durante il processo di immobilizzazione. La molarità, invece, è legata alla forza ionica della soluzione e va mantenuta bassa nel caso di immobilizzazioni con glutaraldeide al fine di rendere il processo più rapido. Infine, i tempi di immobilizzazione dipendono dalla temperatura del processo e possono essere ridotti all'aumentare di questa. Di solito, però, essendo gli enzimi delle sostanze termolabili, si sconsiglia l'utilizzo di una temperatura di immobilizzazione superiore ai 4-10 °C [51].

In Figura 4.13 si riportano gli andamenti, per le due diverse immobilizzazioni, dell'attività residua del surnatante (linea continua) e dell'enzima solubile sottoposto alla temperatura e al pH di reazione (linea tratteggiata). Si ricorda che per l'immobilizzazione su eMCM-41 il pH e la molarità della soluzione tampone utilizzati sono rispettivamente pari a 9 e 25 mM mentre nel caso di mMCM-41 sono 7 e 5 mM. Dal confronto degli andamenti delle due diverse immobilizzazioni si evince che l'enzima libero sottoposto ad un pH di reazione più vicino al punto isoelettrico si disattiva meno velocemente nel tempo e che il tempo di immobilizzazione risulta 30 minuti più breve nel caso di immobilizzazione su supporto etero-funzionalizzato.

In Tabella 4.7 si riportano le rese di immobilizzazione IY e l'attività relativa percentuale R_{act} su 10 minuti di reazione valutate in accordo con le Equazioni (3.12) e (3.14). Nonostante la resa di immobilizzazione più bassa, l'LDH immobilizzato sul supporto etero-funzionale in presenza del 5% PEG presenta una R_{act} più elevata rispetto all'enzima immobilizzato sulla matrice monofunzionale pre-attivata con l'1% di glutaraldeide. Ciò è probabilmente legato non solo al pH di immobilizzazione prossimo al punto isoelettrico ma anche alla presenza dello stabilizzante (il polietilenglicole).

Tabella 4.7 Resa di immobilizzazione e attività relativa percentuale dell'LDH immobilizzato sull'eMCM-41 in presenza del 5% di PEG e sull'mMCM-41 pre-attivato con l'1% di glutaraldeide

	IY (%)	R_{act} (%)
LDH su eMCM-41 _{5%PEG}	71	7,3
LDH su mMCM-41 _{1%GA}	100	3,1

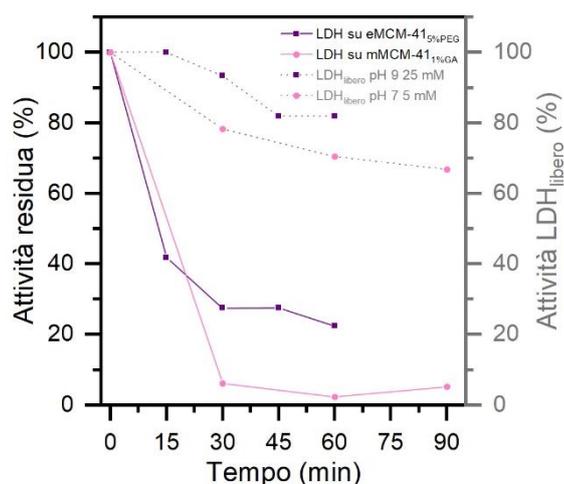


Figura 4.13 Monitoraggio dell'attività enzimatica durante i processi di immobilizzazione

I bassi valori di R_{act} ottenuti non sono legati a fenomeni di irrigidimento della proteina che ne limitano i cambiamenti strutturali o a quelli di resistenza al trasporto di materia di substrato e cofattore dovuti alla presenza dell'enzima all'interno delle porosità del supporto. Infatti, entrambi i materiali funzionalizzati, presentano un diametro dei pori inferiore a quello minimo dell'enzima. Un possibile responsabile di un basso valore di R_{act} per l'eMCM-41 è il boroidruo di sodio. È infatti noto che, se da un lato la sua presenza durante l'immobilizzazione è necessaria per ridurre i legami Schiff, dall'altro può influire negativamente sulla struttura tridimensionale dell'enzima portando ad una denaturazione dell'LDH. Invece, due possibili responsabili di un basso valore di R_{act} per mMCM-41 sono la percentuale di glutaraldeide utilizzata e il pH di immobilizzazione lontano da quello del punto isoelettrico dell'enzima. È noto che l'attività enzimatica è inversamente proporzionale alla concentrazione di glutaraldeide. Infatti, troppi legami tra glutaraldeide ed enzima possono provocare una distorsione della struttura della proteina e, in particolare della conformazione dei siti attivi, diminuendo l'accessibilità del substrato e l'attività enzimatica [51].

4.3.3 pH e temperatura ottimale dell'enzima immobilizzato

L'LDH immobilizzato su eMCM-41 in presenza del 5% di PEG presenta, come visto, la migliore attività relativa percentuale e, per tale motivo, viene sottoposto ai test di pH e temperatura ottimale i cui risultati vengono riportati in Figura 4.14. Nello specifico, nei grafici viene mostrato il confronto dell'attività normalizzata al valore massimo di ogni test tra l'enzima libero e quello immobilizzato.

Come già evidenziato nella sottosezione 4.2.1, i valori ottimali di pH e temperatura dell'enzima libero sono rispettivamente 7,5 e 40 °C. L'analisi dei grafici permette di osservare l'effetto stabilizzante dell'immobilizzazione. Il pH ottimale dell'enzima immobilizzato si sposta verso un valore leggermente più basico pari ad 8 e, in generale, è possibile notare un miglioramento dell'attività normalizzata per i pH basici compresi tra 8 e 11. È possibile presupporre che tali valori di pH favoriscono cambiamenti della conformazione dell'enzima che ne inducono un miglioramento dell'attività. Infatti, il valore del pH dell'ambiente di reazione non solo altera la carica superficiale dell'enzima e del supporto condizionando

l'interazione elettrostatica ma influisce anche sulla conformazione enzimatica [52]. L'attività dell'enzima immobilizzato è massima quando la temperatura dell'ambiente di reazione viene portata a 50°C. Tuttavia, a questo valore l'enzima libero mostra circa il 97% della sua attività massima.

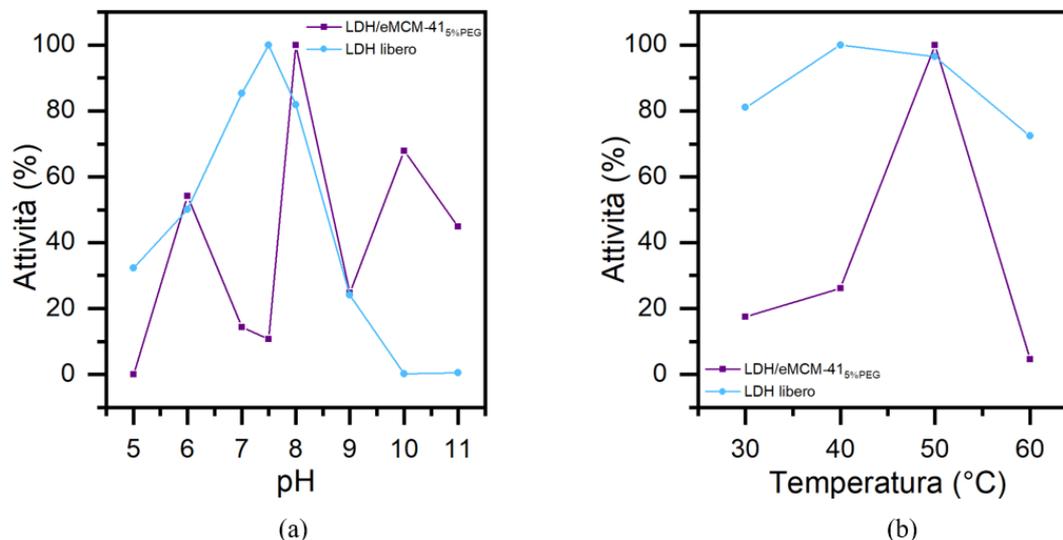


Figura 4.14 Confronto dell'attività enzimatica dell'LDH libero e di quello immobilizzato su eMCM-41 in presenza del 5% di PEG nei test di pH ottimale effettuati a 40 °C (a) e temperatura ottimale effettuati ad un pH di 7,5 (b)

4.3.4 Immagini della microscopia a fluorescenza

In Figura 4.15 si riportano le immagini, ottenute mediante il microscopio a fluorescenza, dell'LDH colorato ed immobilizzato su eMCM-41 in presenza del 5% di PEG. Prima di essere disposto sul vetrino, il campione è stato disperso in acqua Milli-q con gli ultrasuoni. Il kit utilizzato per la colorazione dell'enzima (ATTO 488) emette fluorescenza nel canale del verde. Per essere sicuri che il solo supporto etero-funzionalizzato non emettesse fluorescenza nel medesimo canale dell'LDH colorato, si è analizzato con il microscopio anche un campione di eMCM-41 con un ingrandimento di 40x. In Figura 4.16 se ne riportano le immagini.

Dalle Figure 4.15 e 4.16 si osserva che l'enzima è stato effettivamente immobilizzato ma la sua presenza sul supporto etero-funzionalizzato è in parte mascherata dalla fluorescenza che l'eMCM-41 emette nel canale del blu. L'eccesso di colorante visibile nelle immagini relative all'enzima immobilizzato è evitabile sottoponendo il campione ad ulteriori fasi di lavaggio prima della sua analisi. Le ombre presenti nelle immagini acquisite in campo chiaro sono dovute a piani che non vengono messi a fuoco dal microscopio durante l'osservazione.

Dalla Figura 4.17, che mostra le proiezioni di piani ortogonali dell'LDH immobilizzato su eMCM-41_{5%PEG}, è possibile notare la presenza di un agglomerato di particelle che circonda l'enzima immobilizzato. Nella medesima figura si riporta anche la ricostruzione 3D del campione di enzima colorato ed immobilizzato, ottenuta dalla sovrapposizione di più immagini effettuate su diversi piani.

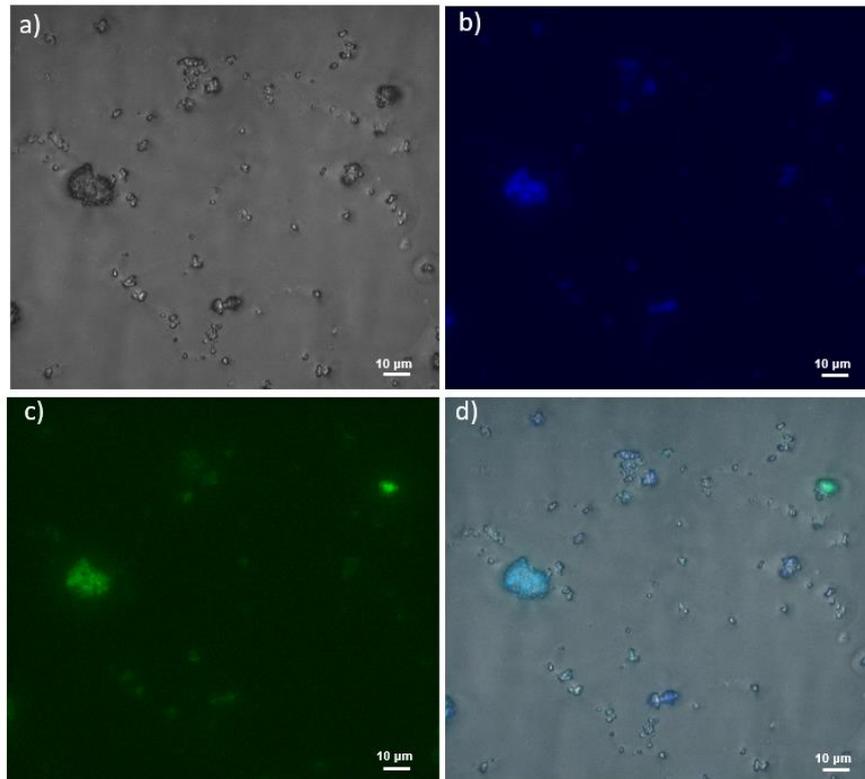


Figura 4.15 Immagini della fluorescenza dell'LDH immobilizzato su eMCM-41 in presenza del 5% di PEG: campo chiaro (a), canale del blu (b), canale del verde (c), sovrapposizione di più canali (rosso/verde/blu) (d)

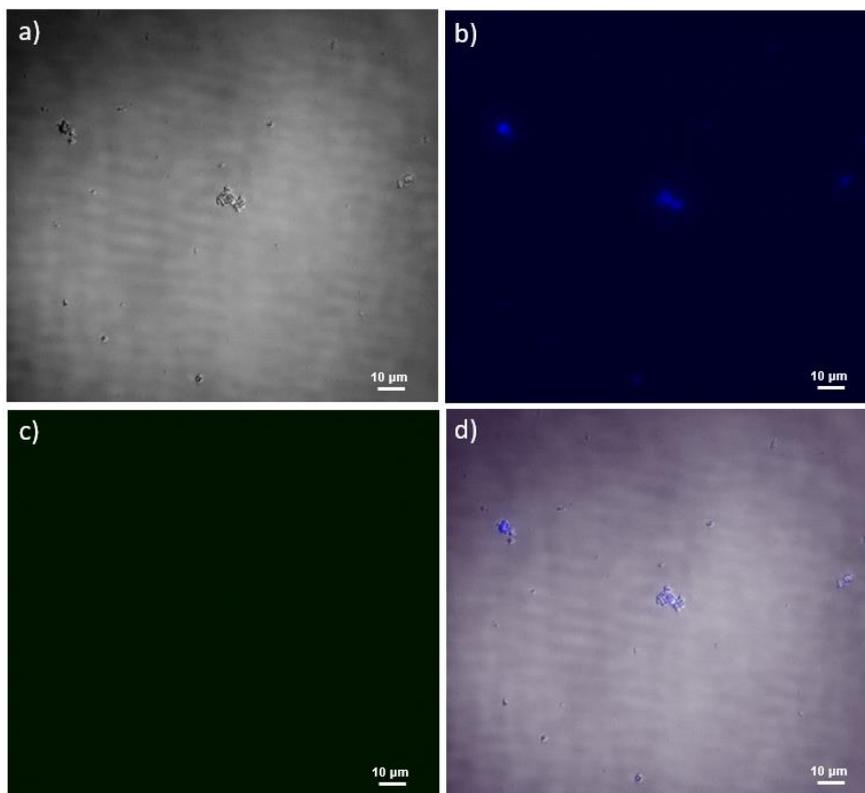


Figura 4.16 Immagini della fluorescenza dell'eMCM-41: campo chiaro (a), canale del blu (b), canale del verde (c), sovrapposizione di più canali (rosso/verde/blu) (d)

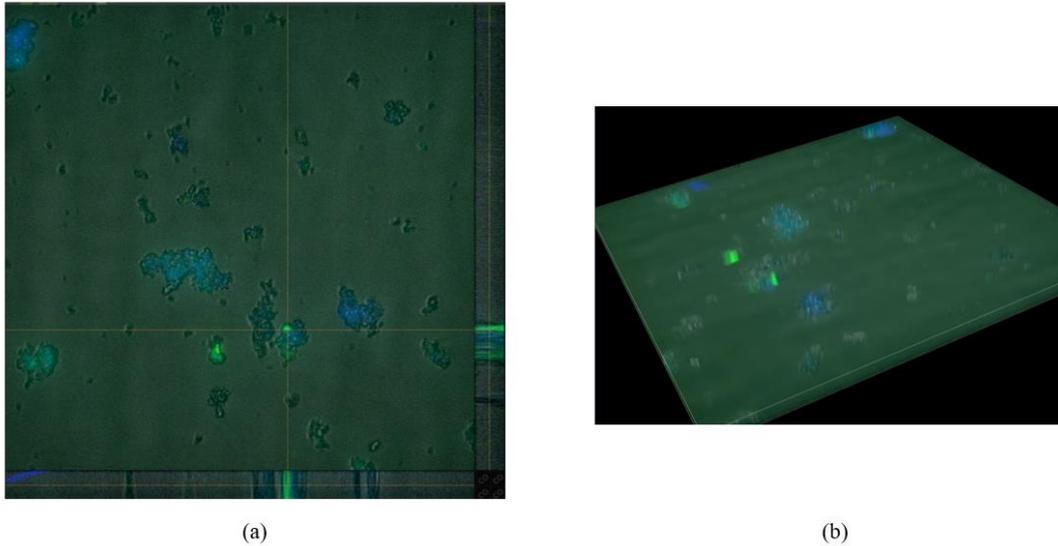


Figura 4.17 Immagini della fluorescenza dell'LDH immobilizzato su eMCM-41 in presenza del 5% di PEG: proiezioni di piani ortogonali (a), ricostruzione 3D (b)

4.4 Efficienza dell'inibizione enzimatica

La Figura 4.18 mostra gli spettri di assorbimento dell'enzima libero ed immobilizzato in presenza e in assenza di farmaco valutati secondo quanto riportato nelle sottosezioni 3.5.1 e 3.5.2. La retta di taratura del NADH, costruita per la stima delle moli di cofattore che si convertono durante ogni singola reazione della durata pari ad un minuto, viene invece riportata in Figura 4.19b. Essa mette in relazione l'area sottesa del picco, in corrispondenza della lunghezza d'onda di 340 nm, con la concentrazione di cofattore presente nell'ambiente di reazione.

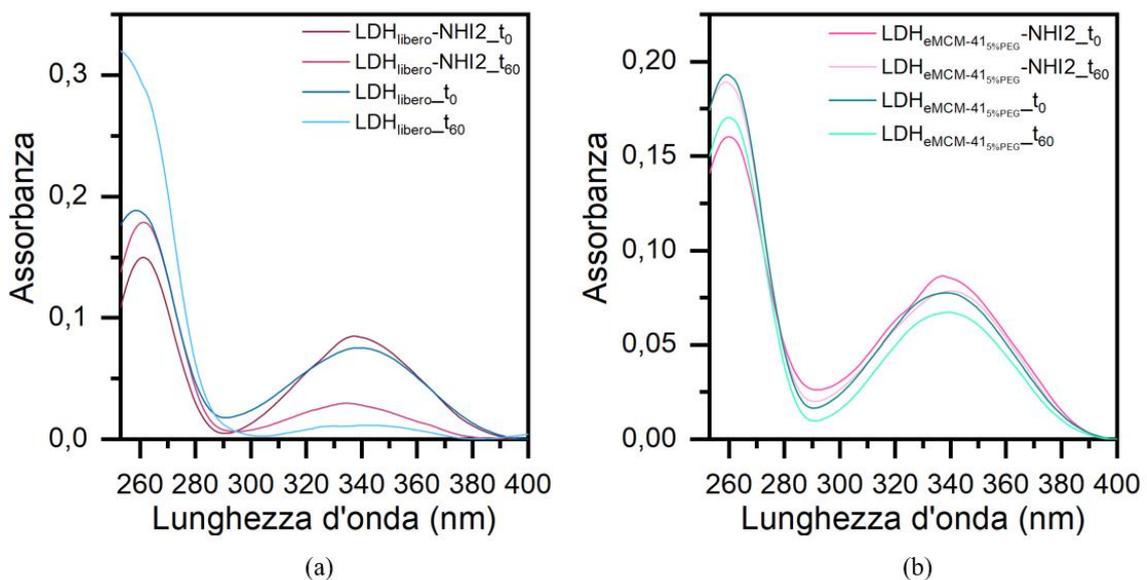


Figura 4.18 Spettri di assorbimento dell'enzima libero (a) e di quello immobilizzato con il 5% di PEG su eMCM-41 (b) in presenza e in assenza di farmaco

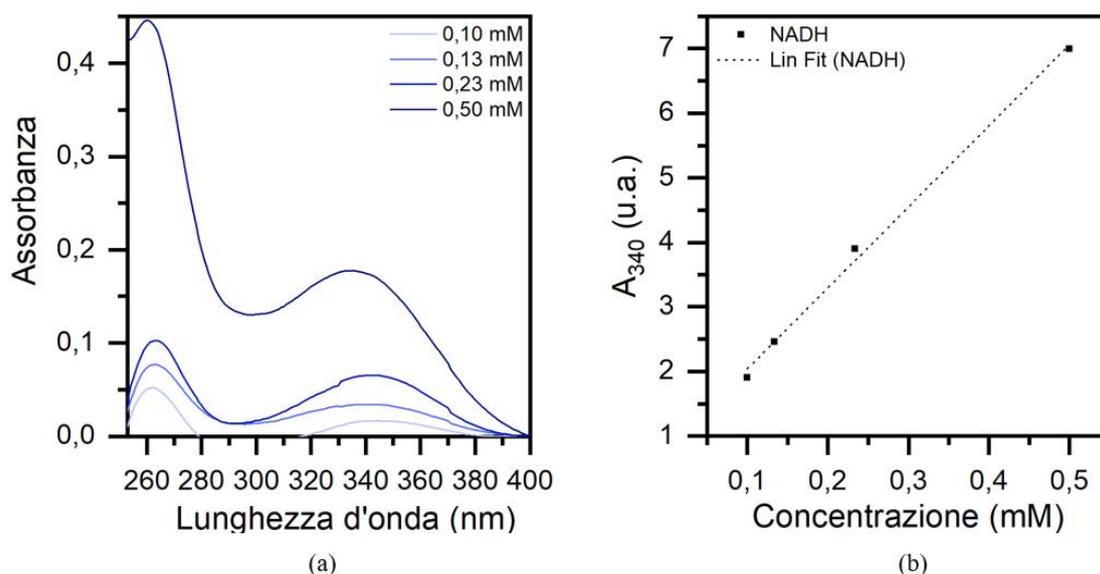


Figura 4.19 Spettri di assorbimento a concentrazione nota di NADH (a) e rispettiva retta di taratura (b)

L'abbassamento del picco corrispondente alla lunghezza d'onda di 340 tra l'inizio (t_0) e il termine di ogni singola reazione (t_{60}) è un indice qualitativo dell'ossidazione dell'NADH nel tempo. Il farmaco antitumorale utilizzato, l'NHI-2, inibisce la conversione del piruvato in lattato rallentando la catalisi enzimatica. Di conseguenza, ciò che ci si aspetta al termine delle reazioni, è un abbassamento più evidente del picco a 340 nm per le conversioni che avvengono in assenza di farmaco.

In Tabella 4.8 si riassumono i valori di area relativi al picco a 340 nm, le corrispondenti concentrazioni di cofattore presente nell'ambiente di reazione ricavate tramite la retta di taratura, le moli di NADH convertite durante il minuto di reazione e la percentuale di inibizione valutata secondo l'Equazione (3.15). Si specifica che l'utilizzo di questa tecnica di analisi quantitativa dei dati permette di ottenere risultati abbastanza precisi, necessari data la bassa attività relativa percentuale dell'enzima immobilizzato.

Tabella 4.8 Risultati dei test di inibizione enzimatica

		NHI-2	Area (u.a.)	Concentrazione NADH (mM)	NADH convertito (μ mol)	I (%)
LDH libero	t_0	no	4,27	0,35	0,97	16,0
	t_{60}		0,67	0,03		
	t_0	si	5,69	0,43		
	t_{60}		2,29	0,16		
LDH su eMCM-41 _{5%} PEG	t_0	no	5,07	0,38	0,08	16,6
	t_{60}		4,73	0,35		
	t_0	si	4,24	0,32		
	t_{60}		3,96	0,29		

In accordo con il basso valore di attività relativa percentuale ottenuto, le moli di NADH convertite dell'enzima immobilizzato sono nettamente inferiori rispetto a quelle dell'enzima solubile. Ciò nonostante, in presenza di farmaco, si osserva comunque un rallentamento della catalisi enzimatica sia per l'LDH libero che per quello immobilizzato. Le moli di cofattore convertite in assenza di NHI-2, infatti, sono sempre maggiori rispetto a quelle in presenza di farmaco. Un miglioramento delle percentuali di inibizione può essere ottenuto, probabilmente, ottimizzando le concentrazioni e i volumi dei reagenti utilizzati. Tuttavia, si suggerisce un cambiamento della tipologia di analisi quantitativa per effettuare questi test. La cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC) rappresenta una valida alternativa per l'ottenimento di risultati più precisi.

5. Conclusioni e prospettive future

In questa tesi si è valutata la conversione enzimatica del piruvato in L-lattato ad opera della lattato deidrogenasi umana immobilizzata covalentemente, attraverso due differenti metodi, su MCM-41 opportunamente funzionalizzato. Questo lavoro rappresenta l'inizio di un progetto più ampio il cui obiettivo finale consiste nella realizzazione di un prototipo di biosensore stabile a base di *h*LDH-A per lo screening dei farmaci antitumorali.

La silice MCM-41 scelta come supporto per le immobilizzazioni è stata sia etero-funzionalizzata con gruppi amminici ed aldeidici sia mono-funzionalizzata con soli gruppi amminici. L'effettiva presenza di questi gruppi reattivi sulle matrici funzionalizzate è stata valutata tramite analisi FTIR mentre, i cambiamenti delle proprietà fisiche dovuti ai trattamenti di funzionalizzazione, sono stati investigati attraverso analisi di fisisorbimento di N₂ a -196 °C e XRD. In particolare, si è osservata una diminuzione sostanziale dell'area superficiale specifica di eMCM-41 imputabile, probabilmente, alla reazione del materiale con H₂SO₄ durante il processo di etero-funzionalizzazione. Inoltre, è emersa anche una riduzione del diametro medio dei pori ed un aumento dello spessore delle pareti dei canali delle silici funzionalizzate.

Diverse procedure sono state adottate a seconda del tipo di supporto utilizzato nel processo di immobilizzazione. Infatti, l'enzima è stato immobilizzato sia su eMCM-41 in presenza del 5% di PEG sia su mMCM-41 pre-attivato con l'1% di glutaraldeide. In entrambi i casi, sono state raggiunte buone rese di immobilizzazioni rispettivamente pari al 71% e 100%. Invece 7,3% e 3,1% sono le attività relative dell'enzima immobilizzato che sono state valutate. L'utilizzo di un pH di immobilizzazione prossimo al punto isoelettrico della proteina e la presenza dell'agente stabilizzante (il PEG) hanno permesso di ottenere una R_{act} maggiore per *h*LDH-A immobilizzato covalentemente su eMCM-41_{5%PEG}. L'attività di questo enzima immobilizzato è stata comparata a quella dell'enzima libero in funzione del pH e della temperatura al fine di constatare l'effetto stabilizzante dell'immobilizzazione. In particolare, si è notato un aumento dell'attività enzimatica per tutti i pH compresi tra 8 e 11. Infine, sono stati effettuati test di inibizione enzimatica con il farmaco antitumorale NHI-2 ottenendo una percentuale di inibizione del 16,6% dell'attività dell'enzima immobilizzato su eMCM-41_{5%PEG}.

Nonostante i valori ottenuti possano essere ottimizzati, l'immobilizzazione covalente dell'*h*LDH-A su silici mesoporose rappresenta un buon punto di partenza per la realizzazione di un biosensore stabile. Diverse strategie possono essere messe in atto al fine di ottimizzare le procedure di immobilizzazione e, di conseguenza, l'intero processo. Ad esempio, una riduzione della quantità di NaBH₄ utilizzato nella terza fase di immobilizzazione dell'*h*LDH-A su eMCM-41 potrebbe portare ad un miglioramento dell'attività relativa dell'enzima immobilizzato. Infatti, è stato già evidenziato che è questo composto il principale responsabile di un basso valore di R_{act} in quanto la sua presenza durante il processo di immobilizzazione, necessaria per ridurre le basi di Schiff a singoli legami, può influire negativamente sulla struttura tridimensionale dell'enzima causandone la denaturazione. Invece, per quanto riguarda l'enzima immobilizzato su mMCM-41, potrebbe essere utile effettuare uno studio simile a quello svolto da *Alagöz et al.* [52] in cui è stato analizzato l'effetto che diverse percentuali di glutaraldeide, concentrazioni di proteina e pH e tempi di immobilizzazione hanno sull'attività dell'enzima immobilizzato.

Inoltre, la valutazione dell'effetto che diverse concentrazioni di substrato hanno sull'attività dell'enzima immobilizzato, oltre che su quello libero, permetterebbe di acquisire informazioni aggiuntive circa l'affinità tra proteina e substrato. Invece, lo svolgimento di test di stabilità

termica sull'enzima solubile e su quello immobilizzato consentirebbe di avere ulteriori informazioni sulla disattivazione dell'*h*LDH-A nel tempo.

L'attività dell'enzima immobilizzato varia a seconda del tipo di supporto utilizzato e del processo di funzionalizzazione a cui viene sottoposto. Pertanto, rimanendo sempre nell'ottica delle silici mesoporose, potrebbe essere interessante comparare l'immobilizzazione dell'*h*LDH-A su MCM-41 a quella su SBA-15. Quest'ultimo materiale, infatti, è sempre costituito da un insieme di canali organizzati in una struttura ordinata ma generalmente, presenta un diametro dei pori e uno spessore della parete più grande rispetto alle silici MCM-tipo. Ciò potrebbe comportare l'ingresso dell'enzima all'interno delle porosità del materiale ed un aumento della stabilità e dell'attività catalitica dell'enzima immobilizzato [16], [17]. Un'ulteriore alternativa sono le silici MCF conosciute anche come schiume cellulari mesoporose le quali sono costituite da celle sferiche interconnesse la cui dimensione dei pori può arrivare fino ai 15-17 nm [53]. In generale, sono molti i materiali adatti alle immobilizzazioni enzimatiche e, lo svolgimento della stessa procedura di immobilizzazione su più supporti, permetterebbe di individuare la matrice più adatta per il raggiungimento dello scopo finale di questo progetto.

Infine, la co-immobilizzazione di enzima e cofattore con conseguente rigenerazione del NADH attraverso, ad esempio, degli elettrodi o enzimi specifici potrebbe rappresentare un ulteriore passo verso uno sviluppo economicamente sostenibile del processo. Nello specifico, è sempre più diffusa a livello industriale la rigenerazione enzimatica del cofattore attraverso un sistema costituito da un substrato sacrificale combinato ad un enzima ausiliario in grado di ridurre, in una reazione separata, il NAD^+ prodotto nella reazione primaria [54].

Lista dei simboli

APTES	3-amminopropiltrirossisilano
BSA	Albumina di serbo bovino
GPTMS	3-glicidilossipropiltrimetossisilano
H ₂ SO ₄	Acido solforico
hLDH-A	Lattato deidrogenasi umana costituita dalla sola subunità A
LDH	Lattato deidrogenasi
NaBH ₄	Boroidruro di sodio
NaIO ₄	Periodato di sodio
NADH	Nicotinammide adenina dinucleotide in forma ridotta
NAD ⁺	Nicotinammide adenina dinucleotide in forma ossidata
NHI	Composti a base N-idrossiindoli
NHI-2	Estere metilico dell'acido metil 1-idrossi-6-fenil-4-(trifluorometil)-1H-indolo-2-carbossilato, 1-idrossi-6-fenil-4-(trifluorometil)-1H-indolo-2-carbossilico
PEG	Polietilenglicole
a_0	Parametro di cella (<i>nm</i>)
<i>Abs</i>	Assorbanza a lunghezza d'onda fissa
A_{IE}	Attività dell'enzima immobilizzato (IU/g_{sup})
A_{FE}	Attività dell'enzima libero (IU/mg_{enz})
ΔAbs	Variazione di assorbanza
Δt	Variazione di tempo (<i>min</i>)
$\Delta Abs / \Delta t$	Assorbanza in <i>Time course</i> ($1/min$)
C_{enz}	Concentrazione enzimatica (mg/mL)
C_S	Concentrazione del substrato (mM)
$C_{IO_4^-}$	Concentrazione della soluzione di periodato di sodio ($mmol/mL$)
d_0	Distanza inter-reticolare (<i>nm</i>)
$d_{p,BJH}$	Diametro dei pori valutato con il metodo BJH (<i>nm</i>)
δ	Spessore della parete (<i>nm</i>)
ε	Coefficiente di estinzione molare (mM^{-1})
g_{sup}	Massa del supporto (<i>mg</i>)

θ	Metà dell'angolo di diffrazione ($^{\circ}$)
I	Inibizione relativa percentuale (%)
IY	Resa di immobilizzazione (%)
K_M	Costante di Michaelis (mM)
λ	Lunghezza d'onda (nm)
M	Peso totale medio dell'enzima (Da)
m_{enz}	Massa dell'enzima nella soluzione (mg)
m_{sup}	Massa del supporto (mg)
mol_{amm}	Quantità di gruppi amminici formati sulla superficie del supporto (μmol)
mol_{ald}	Quantità di gruppi aldeidici formati sulla superficie del supporto (μmol)
q	Carica enzimatica sul supporto (mg_{enz}/g_{sup})
R_{act}	Attività enzimatica relativa percentuale (%)
R_{min}	Raggio minimo dell'enzima (nm)
$R_{p,max}$	Velocità molare massima di formazione del prodotto (IU/mg_{prot})
R_S	Velocità molare di scomparsa del substrato (IU/mg_{prot})
S_{BET}	Superficie specifica valutata tramite metodo BET (m^2/g)
V	Volume di reazione (mL)
$V_{IO_4^-}$	Volume della soluzione di periodato di sodio (mL)

Elenco delle figure

Figura 1.1 Schema di reazione catalizzata dalla lattato deidrogenasi

Figura 1.2 Struttura cristallina dell'*h*LDH5. Ottamero dell'*h*LDH5 costituito da un dimero di tetrameri (a). Rappresentazione dell'anello mobile e dei siti di legame del cofattore (NADH) e del substrato (piruvato) (b) [3]

Figura 1.3 Le due fasi della glicolisi: fase preparatoria (a) e fase di recupero energetico (b) [8]

Figura 1.4 Due possibili destini catabolici del piruvato formato nella glicolisi. Figura tratta da [5] con modifiche

Figura 2.1 Rappresentazione grafica dell'equazione di Michaelis-Menten. Figura tratta da [8] con modifiche

Figura 2.2 Diagramma dei doppi reciproci o di Lineweaver-Burk (a) e di Hanes-Woolf (b). Figura tratta da [8] con modifiche

Figura 2.3 Confronto della velocità molare di formazione del prodotto in funzione della concentrazione di substrato tra un enzima che segue la cinetica di Michaelis-Menten ed un enzima allosterico

Figura 2.4 Classificazione dei differenti metodi di immobilizzazione enzimatica. Figura tratta da [10] con modifiche

Figura 2.5 Effetto di un inibitore competitivo (viola) e non competitivo (blu) sui parametri cinetici dell'equazione di Michaelis-Menten (a) e nel grafico dei doppi reciproci di Lineweaver-Burk (b)

Figura 3.1 Generazione dei gruppi amminici sulla superficie del supporto tramite la reazione dei gruppi silanolicici con l'APTES

Figura 3.2 Generazione dei gruppi epossidici ed amminici sulla superficie del supporto tramite la reazione dei gruppi silanolicici della silice con il GPTMS e l'APTES

Figura 3.3 Generazione dei dioli tramite la reazione di idrolisi dei gruppi epossidici

Figura 3.4 Generazione dei gruppi aldeidici alifatici (gliossilici) tramite la reazione di ossidazione dei dioli

Figura 3.5 Schema del processo di etero-funzionalizzazione del supporto

Figura 3.6 Vibrazioni di *stretching* e di *bending* del legame covalente

Figura 3.7 Classificazione delle isoterme di adsorbimento (a) e dei cicli di isteresi (b) secondo IUPAC. Figura tratta da [25], [26] con modifiche

Figura 3.8 Rappresentazione grafica modello BET [25]

Figura 3.9 Interferenza costruttiva per l'equazione di Bragg [25]

Figura 3.10 Schematizzazione di un diffrattometro a raggi X. Figura tratta da [25] con modifiche

Figura 3.11 Schema dei parametri di cella (100)

Figura 3.12 Reazione reversibile catalizzata dalla lattico deidrogenasi. Figura tratta da [31] con modifiche

Figura 3.13 Spettrofotometro Jasco V-730 collegato a Julabo

Figura 3.14 Schema di reazione del processo di immobilizzazione su supporto eterofunzionalizzato

Figura 3.15 Schema di reazione del processo di immobilizzazione su supporto monofunzionale. Figura tratta da [36] con modifiche

Figura 3.16 Schema di reazione dell'immobilizzazione su supporto monofunzionale preattivato con glutaraldeide. Figura tratta da [36] con modifiche

Figura 3.17 ATTO 488: lunghezze d'onda di assorbimento e fluorescenza (a) e struttura chimica della molecola reattiva del colorante (b) [40]

Figura 4.1 Spettri FTIR dell'MCM-41 (a), eMCM-41 (b), mMCM-41 (c)

Figura 4.2 Spettri FTIR dell'MCM-41 (nero), eMCM-41 (viola) e mMCM-41 (rosa) pretrattati a 300 °C

Figura 4.3 Distribuzione della dimensione dei pori per l'MCM-41 (a), eMCM-41 (b) e mMCM-41 (c)

Figura 4.4 Isotherme di adsorbimento e desorbimento dell'MCM-41 (nero), dell'eMCM-41 (viola) e dell'mMCM-41 (rosa)

Figura 4.5 Spettro XRD dell'MCM-41 (nero), eMCM-41 (viola), mMCM-41 (rosa)

Figura 4.6 Retta di taratura del saggio proteico colorimetrico di Bradford

Figura 4.7 Spettri di assorbimento del NADH (blu), del piruvato (verde) e della miscela di NADH e Piruvato (lilla)

Figura 4.8 Test di concentrazione ottimale dell'enzima libero. A sinistra: reazione diretta, concentrazione di substrato sette volte quella di cofattore. A destra: reazione inversa, concentrazione costante di cofattore 20 mM (magenta), 30 mM (arancio) e concentrazione di substrato doppia rispetto a quella di cofattore (giallo)

Figura 4.9 Test di pH e temperatura dell'enzima libero. In alto si riportano i risultati in 3D (a) e 2D (b) relativi alla reazione diretta. In basso si mostrano i valori 3D (c) e 2D (d) riguardanti la reazione inversa

Figura 4.10 Assorbanza percentuale normalizzata al valore iniziale dell'NADH che si ossida nel tempo

Figura 4.11 A sinistra: velocità specifica di conversione del substrato in funzione della sua concentrazione nell'ambiente di reazione e in presenza di una concentrazione costante di NADH (a) valutata tramite equazione di Lineweaver-Burk (verde) e Hanes-Woolf (arancio). A destra: grafico dei doppi reciproci (o di Lineweaver-Burk) (b) e di Hanes-Woolf (c)

Figura 4.12 A sinistra: retta di taratura del solfato di rame usata per la quantificazione dei gruppi amminici generati su mMCM-41. A destra: possibili interazioni tra gli ioni rame e i gruppi reattivi della matrice funzionalizzata: rapporto 1:3 (a), 1:2 (b) e 1:1 (c) [50]

Figura 4.13 Monitoraggio dell'attività enzimatica durante i processi di immobilizzazione

Figura 4.14 Confronto dell'attività enzimatica dell'LDH libero e di quello immobilizzato su eMCM-41 in presenza del 5% di PEG nei test di pH ottimale effettuati a 40 °C (a) e temperatura ottimale effettuati ad un pH di 7,5 (b)

Figura 4.15 Immagini della fluorescenza dell'LDH immobilizzato su eMCM-41 in presenza del 5% di PEG: campo chiaro (a), canale del blu (b), canale del verde (c), sovrapposizione di più canali (rosso/verde/blu) (d)

Figura 4.16 Immagini della fluorescenza dell'eMCM-41: campo chiaro (a), canale del blu (b), canale del verde (c), sovrapposizione di più canali (rosso/verde/blu) (d)

Figura 4.17 Immagini della fluorescenza dell'LDH immobilizzato su eMCM-41 in presenza del 5% di PEG: proiezioni di piani ortogonali (a), ricostruzione 3D (b)

Figura 4.18 Spettri di assorbimento dell'enzima libero (a) e di quello immobilizzato con il 5% di PEG su eMCM-41 (b) in presenza e in assenza di farmaco

Figura 4.19 Spettri di assorbimento a concentrazione nota di NADH (a) e rispettiva retta di taratura (b)

Elenco delle tabelle

Tabella 4.1 Assegnamento delle bande degli spettri FTIR dei campioni pretrattati a 300 °C

Tabella 4.2 Proprietà dell'MCM-41 (funzionalizzata e non) derivanti dal fisisorbimento di azoto a -196 °C

Tabella 4.3 Proprietà dei campioni di MCM-41 (funzionalizzati e non) derivanti dalle analisi XRD

Tabella 4.4 Valori ottimali di concentrazione del substrato e cofattore, di temperatura e pH della reazione diretta e inversa catalizzate dalla lattato deidrogenasi

Tabella 4.5 Parametri cinetici della conversione del piruvato in lattato catalizzata dall'LDH nelle condizioni operative ottimali

Tabella 4.6 Quantificazione dei gruppi aldeidici ed amminici generati rispettivamente sui supporti etero e mono-funzionalizzati

Tabella 4.7 Resa di immobilizzazione e attività relativa percentuale dell'LDH immobilizzato sull'eMCM-41 in presenza del 5% di PEG e sull'mMCM-41 pre-attivato con l'1% di glutaraldeide

Tabella 4.8 Risultati dei test di inibizione enzimatica

Riferimenti bibliografici

- [1] H. Sung *et al.*, “Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries,” *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, vol. 71, no. 3, pp. 209–249, May 2021, doi: 10.3322/CAAC.21660.
- [2] “I NUMERI DEL CANCRO IN ITALIA 2021.” Accessed: Apr. 06, 2022. [Online]. Available: https://www.aiom.it/wp-content/uploads/2021/10/2021_NumeriCancro_web.pdf
- [3] S. L. Zhang, Y. He, and K. Y. Tam, “Targeting cancer metabolism to develop human lactate dehydrogenase (hLDH)5 inhibitors,” *Drug Discovery Today*, vol. 23, no. 7. Elsevier Ltd, pp. 1407–1415, Jul. 01, 2018. doi: 10.1016/j.drudis.2018.05.014.
- [4] Y. Zhou *et al.*, “Development of novel human lactate dehydrogenase A inhibitors: High-throughput screening, synthesis, and biological evaluations,” *European Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 177, pp. 105–115, Sep. 2019, doi: 10.1016/j.ejmech.2019.05.033.
- [5] C. Granchi *et al.*, “Discovery of N-hydroxyindole-based inhibitors of human lactate dehydrogenase isoform A (LDH-A) as starvation agents against cancer cells,” *Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 54, no. 6, pp. 1599–1612, Mar. 2011, doi: 10.1021/jm101007q.
- [6] M. Manerba *et al.*, “Galloflavin (CAS 568-80-9): A Novel Inhibitor of Lactate Dehydrogenase,” *ChemMedChem*, vol. 7, no. 2, pp. 311–317, Feb. 2012, doi: 10.1002/cmdc.201100471.
- [7] D. M. Dawson, T. L. Goodfriend, and N. O. Kaplan, “Lactic Dehydrogenases: Functions of the Two Types,” Springer, 1963.
- [8] D. L. Nelson, M. M. Cox, and A. L. Lehninger, “I principi di biochimica di Lehninger,” 5th ed., Zanichelli, Ed. Bologna, 2010, pp. 196–573.
- [9] J. M. Guisan, “New opportunities for immobilization of enzymes,” in *Immobilization of Enzymes and Cells*, Third., J. M. Guisan, Ed. Humana Totowa, NJ, 2013, pp. 1–13. doi: 10.1007/978-1-62703-550-7_1.
- [10] B. Brena, P. González-Pombo, and F. Batista-Viera, “Immobilization of enzymes: A literature survey,” in *Immobilization of Enzymes and Cells*, Third., J. M. Guisan, Ed. Humana Totowa, NJ, 2013, pp. 15–31. doi: 10.1007/978-1-62703-550-7_2.
- [11] K. A. Johnson and R. S. Goody, “The original Michaelis constant: Translation of the 1913 Michaelis-Menten Paper,” *Biochemistry*, vol. 50, no. 39, pp. 8264–8269, Oct. 2011, doi: 10.1021/bi201284u.
- [12] H. Lineweaver, D. E. A N BURK Vol, B. Hans Lineweaver, and D. Burk, “The Determination of Enzyme Dissociation Constants.”
- [13] G. L. Atkins and I. A. Nimmo, “A Comparison of Seven Methods for Fitting the Michaelis-Menten Equation,” 1975.
- [14] P. Tang, J. Xu, C. L. Oliveira, Z. J. Li, and S. Liu, “A mechanistic kinetic description of lactate dehydrogenase elucidating cancer diagnosis and inhibitor evaluation,” *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, vol. 32, no. 1, pp. 564–571, Jan. 2017, doi: 10.1080/14756366.2016.1275606.

- [15] A. Pietro Pasti, V. Rossi, G. di Stefano, M. Brigotti, and A. Hochkoepler, "Human lactate dehydrogenase A undergoes allosteric transitions under pH conditions inducing the dissociation of the tetrameric enzyme," *Bioscience Reports*, vol. 42, no. 1, Jan. 2022, doi: 10.1042/BSR20212654.
- [16] L. F. Giraldo, B. L. López, L. Pérez, S. Urrego, L. Sierra, and M. Mesa, "Mesoporous silica applications," *Macromolecular Symposia*, vol. 258, pp. 129–141, 2007, doi: 10.1002/masy.200751215.
- [17] N. Carlsson, H. Gustafsson, C. Thörn, L. Olsson, K. Holmberg, and B. Åkerman, "Enzymes immobilized in mesoporous silica: A physical-chemical perspective," *Advances in Colloid and Interface Science*, vol. 205, pp. 339–360, Mar. 2014. doi: 10.1016/j.cis.2013.08.010.
- [18] R. B. Silverman and M. W. Holladay, "Enzyme Inhibition and Inactivation," in *The Organic Chemistry of Drug Design and Drug Action*, Elsevier, 2014, pp. 207–274. doi: 10.1016/b978-0-12-382030-3.00005-2.
- [19] H. P. Erickson, "Size and shape of protein molecules at the nanometer level determined by sedimentation, gel filtration, and electron microscopy," *Biological Procedures Online*, vol. 11, no. 1, pp. 32–51, 2009. doi: 10.1007/s12575-009-9008-x.
- [20] K. M. Levan and E. Goldbergt, "Properties of human testis-specific lactate dehydrogenase expressed from Escherichia coli," 1991.
- [21] V. Ambrogi and L. Perioli, "Rilascio prolungato di farmaci: utilizzo di MCM-41," *Notiziario chimico farmaceutico*, vol. Novembre, pp. 86–90, 2008.
- [22] G. Pietricola, C. Ottone, D. Fino, and T. Tommasi, "Enzymatic reduction of CO₂ to formic acid using FDH immobilized on natural zeolite," *Journal of CO₂ Utilization*, vol. 42, Dec. 2020, doi: 10.1016/j.jcou.2020.101343.
- [23] P. Vejayakumaran, I. A. Rahman, C. S. Sipaut, J. Ismail, and C. K. Chee, "Structural and thermal characterizations of silica nanoparticles grafted with pendant maleimide and epoxide groups," *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 328, no. 1, pp. 81–91, Dec. 2008, doi: 10.1016/j.jcis.2008.08.054.
- [24] C. Bernal, L. Sierra, and M. Mesa, "Improvement of thermal stability of β -galactosidase from *Bacillus circulans* by multipoint covalent immobilization in hierarchical macromesoporous silica," in *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, Dec. 2012, vol. 84, pp. 166–172. doi: 10.1016/j.molcatb.2012.05.023.
- [25] J. M. Guis~in, "Aldehyde-agarose gels as activated supports for immobilization-stabilization of enzymes," 1988.
- [26] M. Piumetti and N. Russo, "Notes on Catalysis for Environment and Energy," CLUT, Ed. Torino, 2017, pp. 1–40.
- [27] K. S. W. Sing, "REPORTING PHYSISORPTION DATA FOR GAS/SOLID SYSTEMS with Special Reference to the Determination of Surface Area and Porosity," 1985.
- [28] G. Pietricola *et al.*, "Synthesis and characterization of ordered mesoporous silicas for the immobilization of formate dehydrogenase (FDH)," *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 177, pp. 261–270, Apr. 2021, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2021.02.114.
- [29] S. A. Khan, S. B. Khan, L. U. Khan, A. Farooq, K. Akhtar, and A. M. Asiri, "Fourier transform infrared spectroscopy: Fundamentals and application in functional groups and

- nanomaterials characterization,” in *Handbook of Materials Characterization*, Springer International Publishing, 2018, pp. 317–344. doi: 10.1007/978-3-319-92955-2_9.
- [30] M. M. Bradford, “A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding,” 1976.
- [31] A. A. Khan, K. S. Allemailem, F. A. Alhumaydhi, S. J. T. Gowder, and A. H. Rahmani, “The Biochemical and Clinical Perspectives of Lactate Dehydrogenase: An Enzyme of Active Metabolism,” *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders - Drug Targets*, vol. 20, no. 6, pp. 855–868, Dec. 2019, doi: 10.2174/1871530320666191230141110.
- [32] G. Pietricola, C. Ottone, D. Fino, and T. Tommasi, “Enzymatic reduction of CO₂ to formic acid using FDH immobilized on natural zeolite,” *Journal of CO₂ Utilization*, vol. 42, Dec. 2020, doi: 10.1016/j.jcou.2020.101343.
- [33] D. Alosi, M. Bisgaard, S. Hemmingsen, L. Krogh, H. Mikkelsen, and M. Binderup, “Management of Gene Variants of Unknown Significance: Analysis Method and Risk Assessment of the VHL Mutation p.P81S (c.241C>T),” *Current Genomics*, vol. 18, no. 1, pp. 93–103, Dec. 2016, doi: 10.2174/1389202917666160805153221.
- [34] F. López-Gallego, G. Fernandez-Lorente, J. Rocha-Martin, J. M. Bolivar, C. Mateo, and J. M. Guisan, “Stabilization of enzymes by multipoint covalent immobilization on supports activated with glyoxyl groups,” in *Immobilization of Enzymes and Cells*, Third., J. M. Guisan, Ed. Humana Totowa, NJ, 2013, pp. 59–71. doi: 10.1007/978-1-62703-550-7_5.
- [35] E. Camelin, O. Romero, M. Piumetti, C. Ottone, A. Illanes, and D. Fino, “Mechanisms of interaction among enzymes and supports,” *Nanomaterials for Biocatalysis*, pp. 105–148, Jan. 2022, doi: 10.1016/B978-0-12-824436-4.00022-8.
- [36] E. Jackson, F. López-Gallego, J. M. Guisan, and L. Betancor, “Enhanced stability of L-lactate dehydrogenase through immobilization engineering,” *Process Biochemistry*, vol. 51, no. 9, pp. 1248–1255, Sep. 2016, doi: 10.1016/j.procbio.2016.06.001.
- [37] F. López-Gallego, J. M. Guisán, and L. Betancor, “Glutaraldehyde-mediated protein immobilization,” in *Immobilization of Enzymes and Cells*, Third., J. M. Guisan, Ed. Humana Totowa, NJ, 2013, pp. 33–41. doi: 10.1007/978-1-62703-550-7_3.
- [38] G. Pietricola, C. Ottone, D. Fino, and T. Tommasi, “Enzymatic reduction of CO₂ to formic acid using FDH immobilized on natural zeolite,” *Journal of CO₂ Utilization*, vol. 42, Dec. 2020, doi: 10.1016/j.jcou.2020.101343.
- [39] Yusdy, S. R. Patel, M. G. S. Yap, and D. I. C. Wang, “Immobilization of l-lactate dehydrogenase on magnetic nanoclusters for chiral synthesis of pharmaceutical compounds,” *Biochemical Engineering Journal*, vol. 48, no. 1, pp. 13–21, Dec. 2009, doi: 10.1016/j.bej.2009.07.017.
- [40] “Fluorescent Labels.” <https://www.atto-tec.com/ATTO-488.html?language=en> (accessed May 24, 2022).
- [41] Q. Cai, Z. S. Luo, W. Q. Pang, Y. W. Fan, X. H. Chen, and F. Z. Cui, “Dilute solution routes to various controllable morphologies of MCM-41 silica with a basic medium,” *Chemistry of Materials*, vol. 13, no. 2, pp. 258–263, 2001, doi: 10.1021/cm990661z.
- [42] M. Kruk, M. Jaroniec, Y. Sakamoto, O. Terasaki, R. Ryoo, and C. H. Ko, “Determination of Pore Size and Pore Wall Structure of MCM-41 by Using Nitrogen Adsorption,

- Transmission Electron Microscopy, and X-ray Diffraction,” *Journal of Physical Chemistry B*, vol. 104, no. 2, pp. 292–301, Jan. 2000, doi: 10.1021/jp992718a.
- [43] P. Ngene *et al.*, “The influence of silica surface groups on the Li-ion conductivity of LiBH₄/SiO₂ nanocomposites,” *Physical Chemistry Chemical Physics*, vol. 21, no. 40, pp. 22456–22466, 2019, doi: 10.1039/c9cp04235k.
- [44] G. Gatti *et al.*, “The influence of particle size of amino-functionalized MCM-41 silicas on CO₂ adsorption,” *Physical Chemistry Chemical Physics*, vol. 19, no. 43, pp. 29449–29460, 2017, doi: 10.1039/c7cp05177h.
- [45] M. Lazghab, K. Saleh, and P. Guigon, “Functionalisation of porous silica powders in a fluidised-bed reactor with glycidoxypopyltrimethoxysilane (GPTMS) and aminopropyltriethoxysilane (APTES),” *Chemical Engineering Research and Design*, vol. 88, no. 5–6, pp. 686–692, May 2010, doi: 10.1016/j.cherd.2009.11.005.
- [46] S. R. Karnati, D. Oldham, E. H. Fini, and L. Zhang, “Surface functionalization of silica nanoparticles to enhance aging resistance of asphalt binder,” *Construction and Building Materials*, vol. 211, pp. 1065–1072, Jun. 2019, doi: 10.1016/j.conbuildmat.2019.03.257.
- [47] D. Gorski, E. Klemm, P. Fink, and H.-H. Horhold, “Investigation of Quantitative SiOH Determination by the Silane Treatment of Disperse Silica,” *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 186. 1988.
- [48] Y. Gao, S. Liu, Q. Wang, and G. Wang, “Preparation of melamine–formaldehyde resin grafted by (3-aminopropyl) triethoxysilane for high-performance hydrophobic materials,” *Journal of Applied Polymer Science*, vol. 137, no. 19, May 2020, doi: 10.1002/app.48664.
- [49] A. Karuppaiah *et al.*, “Building and behavior of a pH-stimuli responsive chitosan nanoparticles loaded with folic acid conjugated gemcitabine silver colloids in MDA-MB-453 metastatic breast cancer cell line and pharmacokinetics in rats,” *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 165, Oct. 2021, doi: 10.1016/j.ejps.2021.105938.
- [50] M. v. Lombardo, M. Videla, A. Calvo, F. G. Requejo, and G. J. A. A. Soler-Illia, “Aminopropyl-modified mesoporous silica SBA-15 as recovery agents of Cu(II)-sulfate solutions: Adsorption efficiency, functional stability and reusability aspects,” *Journal of Hazardous Materials*, vol. 223–224, pp. 53–62, Jul. 2012, doi: 10.1016/j.jhazmat.2012.04.049.
- [51] I. Migneault, C. Dartiguenave, M. J. Bertrand, and K. C. Waldron, “Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking,” *Biotechniques*, vol. 37, pp. 790–802, 2004, doi: <https://doi.org/10.2144/04375RV01>.
- [52] D. Alagöz, A. Toprak, N. E. Varan, D. Yildirim, and S. S. Tükel, “Effective immobilization of lactate dehydrogenase onto mesoporous silica,” *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 2021, doi: 10.1002/bab.2304.
- [53] P. Xue, F. Xu, and L. Xu, “Epoxy-functionalized mesostructured cellular foams as effective support for covalent immobilization of penicillin G acylase,” *Applied Surface Science*, vol. 255, no. 5 PART 1. Elsevier, pp. 1625–1630, Dec. 30, 2008. doi: 10.1016/j.apsusc.2008.06.162.

- [54] M. Yuan, M. J. Kummer, R. D. Milton, T. Quah, and S. D. Minter, "Efficient NADH Regeneration by a Redox Polymer-Immobilized Enzymatic System," *ACS Catalysis*, pp. 5486–5495, 2019, doi: 10.1021/acscatal.9b00513.

Ringraziamenti

Quest'ultima pagina rappresenta, per me, non solo la fine del lavoro di tesi ma anche il raggiungimento di un importante traguardo e la conclusione di lungo percorso di crescita. Mi reputo una persona molto diversa e migliore rispetto alla ragazza che a diciotto anni ha deciso di allontanarsi dal suo piccolo paese per intraprendere il percorso di studi scelto.

Grazie mamma, grazie papà, senza di voi tutto questo non sarebbe stato possibile. Anche nei momenti più difficili mi avete sempre supportata, insegnandomi ad affrontare le difficoltà senza mai arrendermi. Sappiate che il vostro amore mi ha sempre incoraggiata. Grazie alle mie nonne, a mio fratello Vito, a mia cugina Martina e a tutta la mia famiglia. L'affetto che mi donate ogni giorno riempie il mio cuore di gioia e mi dimostra che i chilometri che ci separano non riusciranno mai a dividerci per davvero.

Grazie a tutti i miei amici, a chi c'è da sempre e a chi è arrivato da poco. Avete sempre alleggerito le giornate più pesanti e riempito quelle più leggere. Grazie a Torino, la splendida città che mi ha accolta diventando presto una seconda casa e che mi ha regalato alcune delle persone più importanti della mia vita.

Infine, ringrazio il professore Marco Piumetti per avermi dato la possibilità di concludere questo percorso universitario con un progetto affascinante e stimolante e la dottoressa Clarissa Cocuzza che, giorno dopo giorno, mi ha affiancata ed aiutata nell'attività sperimentale. La loro professionalità, pazienza e disponibilità sono per me un modello da seguire.