

POLITECNICO DI TORINO

Collegio di Ingegneria Chimica e dei Materiali

**Corso di Laurea Magistrale
in Ingegneria dei Materiali**

Tesi di Laurea Magistrale

Sviluppo di silici mesoporose per biosensori di interesse farmaceutico



Relatori

Prof. Marco Piumetti

Prof.ssa Valentina Alice Cauda

Candidato

Veronica Li Volsi

Luglio 2023

*Alla mia famiglia,
costante fonte di amore ed incoraggiamento*

Sommario

1. Introduzione	5
1.1 Lattato deidrogenasi	7
1.1.1 Classificazione e struttura	7
1.1.2 Glicolisi e glicolisi aerobica: effetto Warburg	9
1.2 Supporti per l'immobilizzazione enzimatica: il ruolo delle silici mesoporose	11
1.2.1 SBA-15	15
1.2.2 MCF _{0,75}	16
1.2.3 DPS	18
1.3 Tecniche di immobilizzazione enzimatica	19
1.3.1 Immobilizzazione covalente su supporti funzionalizzati	21
1.3.2 Stabilizzazione enzimi	22
1.4 Inibizione enzimatica	23
1.4.1 Inibitori dell'LDH come agenti antitumorali	27
2. Materiali e metodi	29
2.1 Sintesi dei supporti	29
2.1.1 Sintesi dei supporti SBA-15 _{0,25} e MCF _{0,75}	30
2.1.3 Sintesi dei supporti DPS e DPS _{0,75}	31
2.2 Funzionalizzazione dei supporti	32
2.2.1 Etero-funzionalizzazione: generazione di gruppi amminici ed aldeici	32
2.2.2 Quantificazione dei gruppi aldeidici	35
2.3 Caratterizzazione del materiale	36
2.3.1 Spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier	36
2.3.2 Fisisorbimento di azoto a -196°C	39
2.3.3 Diffrazione a raggi X (XRD)	44
2.3.4 Microscopio elettronico a scansione ad alta risoluzione (FESEM)	47
2.4 Immobilizzazione dell'LDH	48
2.4.1 Immobilizzazione su supporto etero-funzionalizzato	49
2.4.2 Saggio di attività dell'enzima immobilizzato	50
2.4.3 Test di pH e temperatura ottimale dell'enzima immobilizzato	51
2.4.4 Test di stabilità termica dell'enzima immobilizzato	52
2.4.5 Prove di riutilizzo	53
2.4.6 Immobilizzazione dell'LDH marcata con fluorescenza	53
2.5 Inibizione dell'LDH	54
2.5.1 Inibizione dell'enzima libero	54

2.5.2 Inibizione dell'enzima immobilizzato	55
3. Discussione dei risultati	56
3.1 Risultati della spettroscopia a infrarossa a trasformata di Fourier (FTIR)	56
3.2 Risultati del fisisorbimento di azoto a -196°C.....	61
3.3 Risultati della diffrazione a raggi X (XRD).....	64
3.4 Analisi al FESEM	66
3.5 Quantificazione dei gruppi aldeidici	67
3.6 Resa di immobilizzazione e attività relativa percentuale	67
3.7 Test di pH e temperatura ottimale dell'enzima immobilizzato	70
3.8 Test di stabilità termica	72
3.9 Prove di riutilizzo	74
3.10 Immagini della microscopia a fluorescenza	75
3.11 Efficienza dell'inibizione enzimatica.....	77
4. Caratteristiche di un biosensore enzimatico	79
5. Conclusioni e prospettive future	82

1. Introduzione

Il cancro rappresenta una delle principali sfide per la salute pubblica in tutto il mondo. Tale malattia costituisce una delle principali fonti di mortalità e rappresenta un ostacolo significativo all'aumento dell'aspettativa di vita a livello globale. Secondo le stime del progetto GLOBOCAN, promosso dall'IARC dell'OMS, nel corso del 2020 si sono riscontrati circa 19,3 milioni di nuovi casi di tumore in tutto il mondo, causando quasi 10 milioni di morti [1]. Questi dati hanno confermato la necessità di continuare ad investire nella ricerca scientifica per lo sviluppo di nuove strategie di prevenzione e terapia del cancro. Il report mostra in maniera dettagliata l'analisi dell'incidenza (numero di nuovi casi) e della mortalità dei casi di tumore in 185 Paesi del mondo, valutati sulla base di diversi fattori come il livello di sviluppo. Da questo studio si può osservare come il cancro sia una patologia più diffusa nei Paesi ricchi e sviluppati, rispetto ai Paesi in via di sviluppo. Tuttavia, i cambiamenti demografici, come l'aumento della popolazione e dell'aspettativa di vita, possono portare a un aumento del numero di casi di cancro anche nei Paesi più poveri [2]. Esistono molteplici ragioni alla base di questa tendenza. In primo luogo, i Paesi a basso reddito spesso hanno limitate risorse per dedicare alla prevenzione e alla diagnosi precoce del cancro. Di conseguenza, i tumori vengono spesso rilevati solo quando sono già in uno stadio avanzato e difficile da trattare, aumentando significativamente il tasso di mortalità. Ciò vale anche per i tipi di cancro che, nei Paesi più sviluppati, sono facilmente prevenibili e curabili [1]. In aggiunta, nei Paesi in via di sviluppo, le risorse mediche di alta qualità e le attrezzature avanzate per la diagnosi e il trattamento del cancro possono essere limitate. Questo limita l'accesso delle persone a cure adeguate. Inoltre, alcuni fattori di rischio per il cancro, come il consumo di tabacco, l'abuso di alcol, l'obesità e l'inquinamento ambientale, possono essere più diffusi in questi Paesi, aumentando il rischio di sviluppare la malattia. Questi fattori contribuiscono all'aumento del tasso di mortalità da cancro nei Paesi in via di sviluppo [3]. Nel 2040 si prevede un aumento del 47% dei nuovi casi di cancro rispetto al 2020 [1].

A dicembre 2022 è stato presentato presso il ministero della Salute il report “I numeri del cancro in Italia 2022”, elaborato dall'Associazione Italiana di Oncologia Medica (AIOM), AIRTUM (Associazione Italiana Registri Tumori), Fondazione AIOM, Osservatorio Nazionale Screening (ONS), PASSI (Progressi delle Aziende Sanitarie per la salute in Italia) [4]. In Italia è stato stimato un aumento di circa 14.000 nuovi casi di tumore in due anni. Questo aumento stimola l'ulteriore sviluppo e l'implementazione di programmi di screening e diagnosi precoce, al fine di individuare tempestivamente i tumori e migliorare le possibilità di guarigione. Inoltre, si rende necessario

promuovere l'adozione di uno stile di vita sano come misura preventiva primaria. Inoltre, è fondamentale concentrarsi sul miglioramento della precisione dei farmaci antitumorali, in modo che possano mirare in modo specifico alle cellule cancerose senza danneggiare le cellule sane e funzionanti. Questi sforzi combinati sono fondamentali per affrontare efficacemente la sfida del cancro e ridurre l'impatto negativo sulla salute delle persone. [4].

Il metabolismo delle cellule tumorali è stato considerato un possibile bersaglio per la terapia del cancro. I tumori mostrano una maggiore attività glicolitica e una ridotta fosforilazione ossidativa [5]. Questo effetto, chiamato "Effetto Warburg", è caratterizzato da un aumento dell'assorbimento di glucosio e della produzione di lattato nelle cellule tumorali, indipendentemente dalle condizioni di ipossia/normossia che circondano le cellule. Da questo aumento del flusso glicolitico vengono prodotti energia ed intermedi glicolitici come l'acido piruvico, la gliceraldeide-3-fosfato e il fosfoenolpiruvato (PEP), che possono essere utilizzati per generare ATP e biosintetizzare aminoacidi, nucleotidi e lipidi necessari alla crescita e alla divisione cellulare [6]. La ricerca si è concentrata sullo sviluppo di nuovi agenti terapeutici che possano potenzialmente sfruttare questo caratteristico profilo metabolico, presente nelle cellule tumorali, agendo come agenti antiglicolitici. Uno degli enzimi chiave della glicolisi è la lattato deidrogenasi (LDH), che catalizza la trasformazione reversibile del piruvato in lattato. In particolare, l'inibizione della lattato deidrogenasi umana rappresenta una strategia promettente per lo sviluppo di farmaci antitumorali. Ad esempio con il cancro al seno, ai polmoni, allo stomaco, al pancreas, alla prostata e all'endometrio, le cellule tumorali sovraesprimono la subunità LDH-A e, pertanto, la sua forma tetrameric hLDH5 può rappresentare un promettente bersaglio terapeutico [7].

Lo scopo di questo lavoro di tesi è lo sviluppo di nuovi materiali per la realizzazione di un prototipo di biosensore a base di hLDH-A che sia in grado di testare l'efficacia di farmaci antitumorali attraverso un processo rapido ed economico. Gli enzimi sono molecole solubili che presentano una certa instabilità, soprattutto a diverse condizioni di temperatura e pH. Per questo motivo la loro immobilizzazione su dei supporti rappresenta uno dei metodi più diffusi per consentire il loro riutilizzo e la modulazione di proprietà catalitiche come specificità, selettività e resistenza all'inibizione [8]. La scelta di materiali adatti come supporti di immobilizzazione dell'enzima può migliorare efficacemente la tolleranza dell'enzima al variare delle condizioni dell'ambiente circostante (pH e temperatura), mantenere nel tempo l'attività catalitica dell'enzima stesso e inoltre consentire il loro uso continuo o riutilizzo nei processi industriali [8]. I supporti per l'immobilizzazione enzimatica sono comunemente suddivisi in due classi principali: organici e inorganici [9]. Il primo gruppo comprende principalmente polisaccaridi come la cellulosa

modificata, il destrano, il chitosano, l'agarasio, ma anche polimeri vinilici e acrilici come la poliacrilammide e l'alcool polivinilico. I supporti inorganici comprendono diversi materiali a base di silice e altri ossidi e le due caratteristiche principali che li contraddistinguono sono la possibilità di ottenere una porosità strettamente controllata e una rigidità che assicura l'invarianza del diametro e del volume dei pori. Inoltre, sono stati studiati grazie alle loro caratteristiche uniche di resistenza termica e meccanica, resistenza microbica e stabilità chimica [9]. In questo studio si è posta una maggiore attenzione sulla silice mesoporosa, che risulta essere un materiale molto vantaggioso per la sua facile sintesi, funzionalizzazione superficiale, struttura dei pori regolabile e ampia superficie specifica. Durante la prima fase di questa ricerca sono state selezionate quattro tipi di silice mesoporosa: l'SBA-15, l'MCF e la DPS, ed è stata eseguita la sintesi di questi supporti e la loro caratterizzazione mentre, nella seconda, si è posta l'attenzione sull'immobilizzazione covalente dell'enzima e sull'inibizione della proteina.

1.1 Lattato deidrogenasi

La lattato deidrogenasi (LDH o latticodeidrogenasi) è un enzima citoplasmatico della via metabolica anaerobica appartenente al gruppo delle deidrogenasi, sottoclasse delle ossidoreduttasi, che catalizza il trasferimento di atomi di idrogeno ed elettroni da un substrato donatore ad un accettore. È un enzima presente nelle cellule di molti organismi, tra cui gli esseri umani e la sua funzione principale è quella di catalizzare la conversione reversibile del lattato in piruvato con la riduzione del NAD^+ in NADH e viceversa [10].

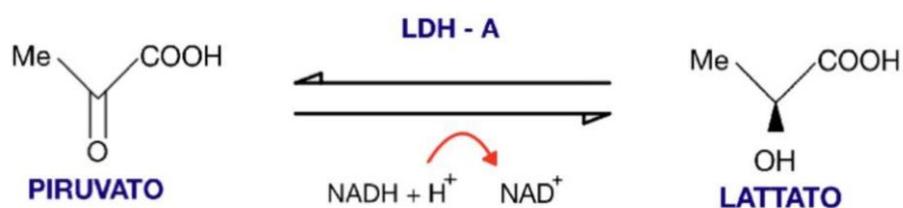


Figura 1.1 Schema di reazione catalizzata dalla lattato deidrogenasi (LDH)

1.1.1 Classificazione e struttura

È un tetramero composto da due diverse subunità, LDHA (o M, *muscle*) e LDHB (o H, *heart*) che, combinandosi fra loro in modo vario, danno origine a cinque diversi isoenzimi denominati LDH1-LDH5. In particolare, si ottengono due isoforme omotetrameriche chiamate hLDH-A4 (o hLDH5)

e h LDH-B4 (o hLDH1) e tre isoforme eterotetrameriche indentificate con le sigle hLDH-A3B1 (o hLDH4), hLDH-A2B2 (o hLDH3) e hLDH-A1B3 (o hLDH2). Un'ulteriore sesta forma isoforma, nota come LDH6 o LDHX, è presente principalmente nei testicoli e nello sperma e svolge un ruolo nella fertilità maschile, perciò rimanente totalmente inattivo nelle femmine [7],[10].

La lattato deidrogenasi si trova in numerosi tessuti, ma è concentrata soprattutto a livello di muscoli scheletrici, fegato, cuore, reni, pancreas e polmoni. L'omotetramero hLDH5 (A4, LDHA) è assemblato solo dalla subunità A e appare prevalentemente nel muscolo scheletrico e nel fegato, mentre hLDH1 (B4, LDHB) formato solo dalla subunità B esiste principalmente nel muscolo cardiaco e in altri tessuti ossigenati dove risulta più efficiente nel catalizzare la reazione inversa di conversione dell'L-lattato in piruvato [7].

Lo studio della struttura cristallina dell'LDH ha fornito importanti informazioni sulla funzione di questo enzima, consentendo lo studio dei meccanismi molecolari della catalisi e la progettazione di farmaci che inibiscono la sua attività. La Figura 1.2 mostra la struttura cristallina dell'hLDH5, composta da quattro subunità che si assemblano per formare un tetramero [11].



Figura 1.2 struttura cristallina dell'hLDH5

Ogni subunità consiste di circa 330 amminoacidi e contiene due siti di legame (o tasche di legame): il sito di legame del substrato lattato e il sito di legame del coenzima NADH O NADH⁺. Il sito di legame del substrato lattato si trova sul dominio C-terminale di ogni subunità. Il lattato si lega al sito attivo dell'LDH, che è costituito da un residuo di istidina e cisteina, dove avviene la catalisi della reazione tra lattato e piruvato. Il sito del coenzima NADH o NADH⁺ si trova sul dominio N-terminale di ogni subunità, dove durante la reazione catalitica il NADH agisce come donatore di elettroni mentre il NADH⁺ come accettore di elettroni. Inoltre, il coenzima è posizionato in modo

che il suo gruppo adenosina sia rivolto verso il sito del lattato, formando una sorta di cerniera molecolare che avvicina il substrato al sito attivo per la catalisi [7].

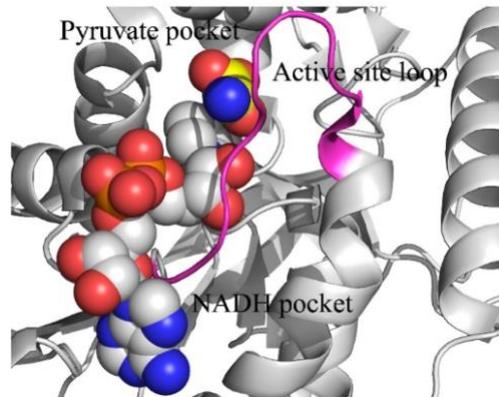


Figura 1.3 Siti di legame del coenzima (NADH) e del substrato (piruvato)

1.1.2 Glicolisi e glicolisi aerobica: effetto Warburg

Il glucosio è un tipo di zucchero a sei atomi di carbonio molto importante per il metabolismo degli esseri viventi. È una molecola di carboidrati che viene utilizzata come fonte di energia primaria per il mantenimento, crescita e proliferazione cellulare di molti organismi. La glicolisi corrisponde alla prima parte del metabolismo del glucosio ed è caratterizzata da un processo biochimico costituito da una sequenza di reazioni catalizzate da molteplici enzimi. Una molecola di glucosio, durante questo processo, viene degradata a due molecole di piruvato, con conseguente generazione di due molecole di ATP e due di NADH (nicotinamide adenina dinucleotide ridotto), un coenzima che viene utilizzato in altre reazioni metaboliche. Come mostrato in Figura 1.4 le molecole di piruvato così ottenute possono seguire diverse vie metaboliche a seconda delle condizioni in cui avviene il processo [12].

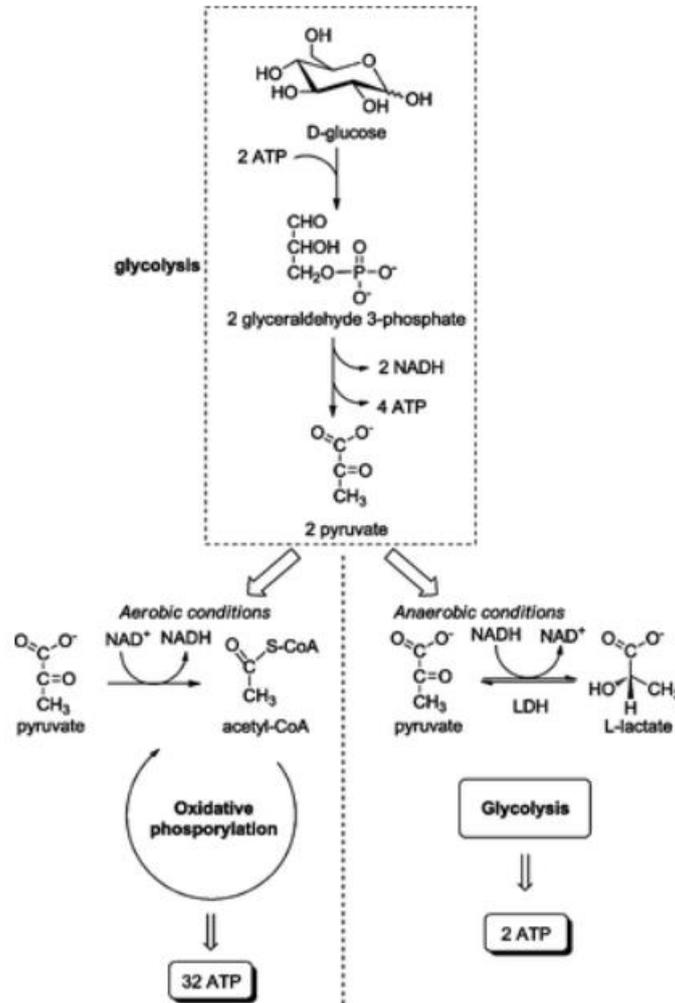


Figura 1.4 Destino del piruvato durante la glicolisi in condizioni aerobiche e anaerobiche: ruolo di LDH [12]

- ❖ In condizioni aerobiche, il piruvato viene ossidato ad acetato (acetil-coenzima A o acetil-CoA) che viene trasportato nel mitocondrio, dove entra nel ciclo di krebs (o ciclo dell'acido citrico) e viene completamente ossidato in CO₂ e H₂O, producendo una grande quantità di ATP attraverso la fosforilazione ossidativa [13], [12].
- ❖ In condizioni anaerobiche, tuttavia, il piruvato non può essere completamente ossidato, poiché manca l'ossigeno necessario per il processo di fosforilazione ossidativa (ipossia). In questo caso, il piruvato viene ridotto in acido lattico dalla lattato deidrogenasi (LDH), un enzima che catalizza la reazione di riduzione del piruvato in acido lattico, utilizzando il NADH prodotto durante la glicolisi come coenzima [13]. L'attività dell'enzima LDH è quindi fondamentale per il funzionamento della glicolisi in condizioni anaerobiche, poiché permette la rigenerazione del NAD⁺ necessario per la prosecuzione del processo. Senza l'azione di tale enzima, la glicolisi si

bloccherebbe a causa dell'accumulo di NADH e della conseguente carenza di NAD^+ per continuare il processo di scomposizione del glucosio.

Quest'ultima via metabolica è chiamata fermentazione lattica e rappresenta una delle principali vie di produzione di energia nelle cellule che non dispongono di una quantità sufficiente di ossigeno per il processo di respirazione cellulare [12]. Questo è il caso, ad esempio, dei muscoli durante l'esercizio intenso, in cui la richiesta di energia supera l'apporto di ossigeno ai tessuti muscolari. Il processo metabolico di conversione del piruvato in L-lattato, noto anche come la via del lattato, avviene anche nelle cellule tumorali, in condizioni di buona ossigenazione. Questo è noto come effetto Warburg, e consiste nel fatto che le cellule tumorali, producendo energia attraverso questa via metabolica alterata, portano ad una maggiore quantità di lattato rispetto alle cellule normali, contribuendo alla loro crescita e alla loro sopravvivenza [14]. La glicolisi nelle cellule tumorali produce una grande quantità di acido lattico, che viene rilasciato nel microambiente circostante. L'accumulo di acido lattico acidifica il microambiente tumorale, creando un ambiente ostile alle cellule normali ma favorevole alla crescita delle cellule tumorali e alla loro diffusione in altre parti del corpo, facilitandone la metastasi. Inoltre, l'effetto Warburg può influire anche sul sistema immunitario. L'accumulo di acido lattico e l'acidificazione del microambiente tumorale possono sopprimere la risposta immunitaria antitumorale, riducendo l'efficacia dei linfociti T e delle altre cellule del sistema immunitario nella distruzione delle cellule tumorali [14], [15]. In generale, l'effetto Warburg rappresenta una strategia metabolica che consente alle cellule tumorali di adattarsi alle condizioni avverse del loro microambiente circostante, promuovendo la loro sopravvivenza e la loro crescita.

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

L'immobilizzazione covalente dell'LDH (lattato deidrogenasi) richiede che il supporto scelto soddisfi alcuni requisiti fondamentali. In primo luogo, il supporto deve essere relativamente poco costoso e non dannoso per l'ambiente, minimizzando l'impatto economico del processo. Inoltre, il supporto deve essere in grado di caricare una quantità significativa di enzima per unità di peso, il che richiede una porosità adeguata ma non troppo grande o troppo piccola, poiché i pori più piccoli escludono semplicemente la proteina mentre quelli troppo grandi provocano una significativa riduzione dell'area superficiale [16]. L'idrofobicità della superficie dovrebbe essere minimizzata per evitare l'adsorbimento e la denaturazione indesiderati, tranne nel caso di enzimi idrofobici noti come le lipasi. Inoltre, la superficie del supporto deve avere funzioni chimiche reattive che permettano la funzionalizzazione e l'attivazione per l'immobilizzazione covalente dell'LDH. Tali funzioni

dovrebbero avere un ostacolo sterico minimo e un'alta densità superficiale. Dopo l'immobilizzazione, il supporto dovrebbe essere completamente inerte nelle condizioni operative dell'enzima, senza interferire con la reazione desiderata. La resistenza microbica è obbligatoria per un enzima commercialmente valido, così come la resistenza termica e meccanica, consentendo all'enzima immobilizzato di essere utilizzato in diverse condizioni operative. Infine, la durabilità chimica dovrebbe essere presa in considerazione, poiché i valori di pH lontani dalla neutralità potrebbero influire significativamente sulla stabilità delle strutture inorganiche [9].

Le silici mesoporose sono supporti molto promettenti per l'immobilizzazione di enzimi. La loro capacità di formare strutture porose di diverse dimensioni, da micropori (<2nm) a mesopori (<50) a macropori (>50nm), offre una vasta gamma di opzioni per ospitare molecole di proteine ed enzimi di diverse dimensioni. Nella silice il tetraedro SiO_4 è governato dall'ibridazione sp_3 del Si, la quale porta ad avere angoli O-Si-O rigidi, mentre gli angoli Si-O-Si, che sono quelli che si formano tra i tetraedri, sono più flessibili. È proprio grazie a questa flessibilità che è possibile avere più forme cristalline come il quarzo, la cristobalite e la tridimite, ovvero diversi modi di assemblare questi tetraedri. Le specie superficiali presenti possono invece influenzare le sue proprietà chimiche, fisiche e reattive e la comprensione di queste specie è di fondamentale importanza per sfruttare le proprietà della silice in diverse applicazioni come l'immobilizzazione di enzimi o altri processi chimici. Le specie presenti in superficie possono essere suddivise in diverse categorie. Una delle principali sono i gruppi silanolicci (Si-OH), che sono atomi di silicio legati ad atomi di ossigeno e ad un gruppo idrossile. Questi gruppi sono influenzati dalla struttura elettronica del silicio e possono agire come siti reattivi. Come si può osservare in Figura 1.5 i gruppi silanolicci possono essere presenti in diverse forme, come silanoli geminali, silanoli vicinali e silanoli isolati [9]. Un'altra categoria importante sono i legami silossanici (Si-O-Si), che si formano attraverso la condensazione dei gruppi silanolicci. Questi legami collegano gli atomi di silicio formando una rete tridimensionale di silice. I legami silossanici conferiscono alla silice una certa stabilità strutturale e resistenza chimica.

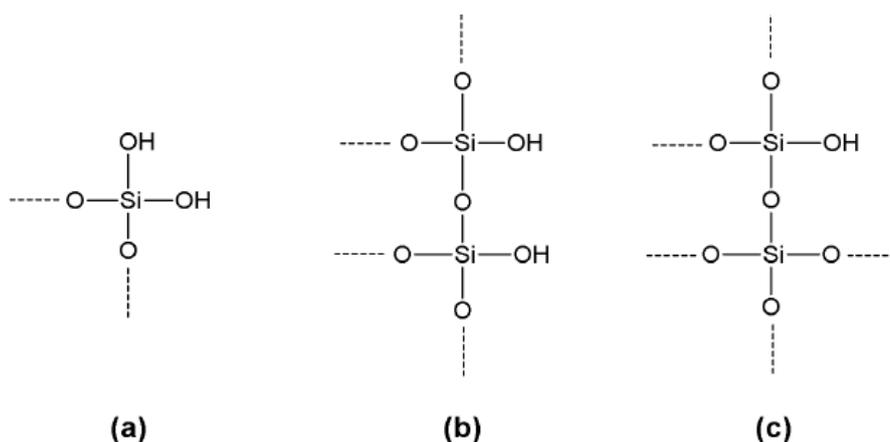


Figura 1.5 Silanoli geminali (a), silanoli vicinali (b), silanoli isolati (c)

I supporti mesoporosi possono essere di due tipi: ordinati, con una struttura regolare e periodica, o disordinati, con una disposizione casuale delle cavità [9]. Tuttavia, finora le strutture ordinate hanno dimostrato di facilitare maggiormente la caratterizzazione fisicochimica e strutturale delle matrici, mentre il loro vantaggio per quanto riguarda l'immobilizzazione degli enzimi all'interno delle porosità stesse, è ancora da valutare in modo conclusivo [17]. In ogni caso, i supporti mesoporosi hanno un'ampia superficie specifica (fino a 600 m²/g) e possono ospitare le molecole di enzimi all'interno dei pori, fornendo una protezione contro eventuali danni fisici e meccanici.

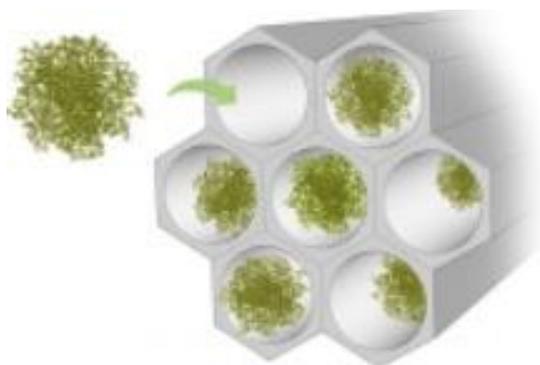


Figura 1.6 Enzima immobilizzato su silice mesoporosa

Le dimensioni dei canali possono essere regolate selezionando diversi tensioattivi, sostanze chimiche ausiliari e condizioni di reazione (temperatura, concentrazione dei reagenti, pH, tempi) [18].

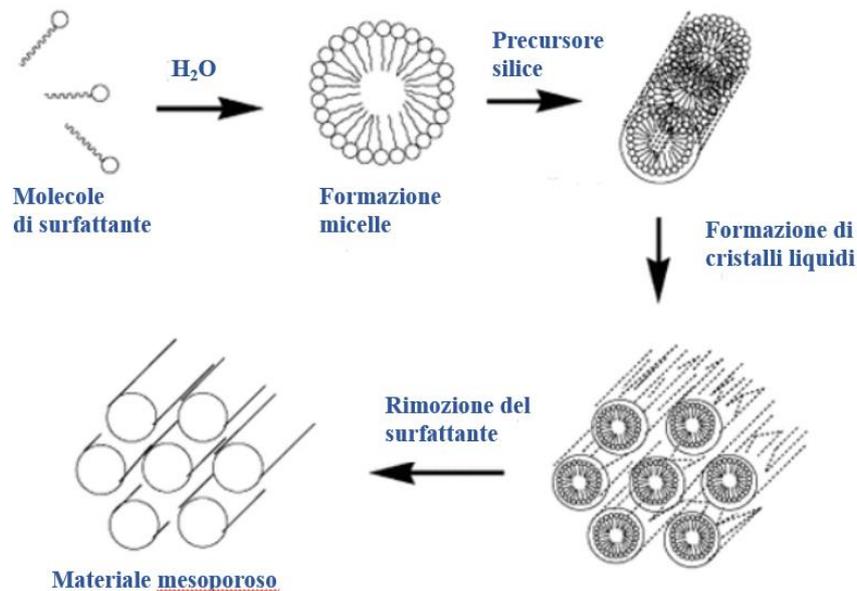


Figura 1.7 Percorso meccanicistico proposto per la formazione di materiali mesoporosi [16]

Il meccanismo di sintesi si basa sulla formazione di cristalli liquidi all'interno della miscela reattiva. I cristalli liquidi si formano quando si combinano solventi polari come l'acqua con tensioattivi che presentano una porzione non polare. Le molecole di tensioattivo si aggregano formando micelle, in cui le code idrofobiche si riuniscono mentre le teste idrofile rimangono protette in ambiente acquoso. La formazione di queste micelle avviene solo al di sopra della concentrazione micellare critica a una specifica temperatura[16]. Le micelle svolgono un ruolo chiave nella formazione della mesostruttura in quanto dirigono la crescita della struttura a causa della condensazione della silice sulla loro superficie. Inoltre, influenzano la dimensione dei pori in base alla lunghezza delle code idrofobiche del tensioattivo e l'ordine della mesostruttura in base all'impacchettamento che creano tra di loro. Tuttavia, anche la concentrazione del tensioattivo ha un'influenza sull'ordine che si crea nella mesostruttura. Esistono diversi tipi di materiali di silice mesoporosa per l'immobilizzazione di enzimi. Nel 1992 sono state sintetizzate le prime silici mesoporose appartenenti alla famiglia M41s e denominati MCM (Mobil Composite of Matter). Preparati con tensioattivi cationici con catene alchiliche che vanno da 8 a 22 atomi di carbonio, i materiali appartenenti a questa famiglia si trovano nella parte inferiore della scala delle dimensioni mesoporose. L'MCM-41 (Mobil Composition of Matter No.41) ha pori disposti in modo esagonale con un diametro compreso tra 1.5 e 10 nm, mentre l'MCM-48 (Mobil Composition of Matter No.48) ha una struttura cubica [19]. L'introduzione di questi materiali ha segnato una svolta significativa nell'ambito dell'ingegneria dei materiali, aprendo la strada allo sviluppo di nuovi supporti

mesoporosi che condividono un meccanismo di formazione simile. Grazie alla varietà di condizioni di sintesi, precursori di silice e tipologie di surfattanti impiegate, sono stati prodotti numerosi altri materiali mesoporosi. Un materiale simile a MCM-41 è l'FSM-16 in cui la silice è derivata dalla kanemite. Un'altra famiglia di silice mesoporosa è preparata con copolimeri a blocchi non ionici ed è conosciuta come materiali SBA (Santa Barbara Amorphous). SBA-15 è un materiale con una struttura esagonale ordinata che presenta ampi pori, mentre SBA-16 ha una struttura cubica simile ad una gabbia. Per controllare l'ordine e le dimensioni della mesostruttura, è possibile utilizzare agenti che espandono le micelle entrando nel core idrofobo (*swelling agent*), come il 1,3,5-trimetilbenzene (TMB), il cicloesano, alcani a catena lunga (come l'esaesano o l'ottodecano), alcoli a catena lunga (come l'ottano o il dodecanolo), tensioattivi anfifilici con parte idrofila e parte idrofoba [20], [21]. Tuttavia, oltre un certo rapporto tra lo *swelling agent* e le molecole di surfattante si verifica una transizione di fase che porta a una trasformazione da pori cilindrici esagonali ordinati a una struttura a schiuma mesoporosa (MCF) [19]. La silice mesoporosa con struttura dendritica (DPS) rappresenta invece un'interessante direzione di ricerca nell'ambito dei materiali mesoporosi. Si tratta di una classe di materiali caratterizzati da una morfologia a ramificazione simile a una struttura dendritica, che li rende promettenti per una serie di applicazioni, tra cui la catalisi, la separazione e l'immobilizzazione di enzimi.

1.2.1 SBA-15

La silice mesoporosa SBA-15 presenta una struttura cristallina a base di silice altamente ordinata. La sua struttura è caratterizzata da una rete tridimensionale di pori cilindrici (~5 nm) disposti in modo regolare con una geometria esagonale. I pori risultano essere allineati parallelamente tra loro e sono separati da pareti di silice sottili. La regolarità e l'ordine della struttura cristallina sono ottenuti attraverso un processo di auto-assemblaggio controllato dei precursori di silice in presenza di un agente strutturante (tensioattivo) durante la sintesi che agisce come un modello attorno al quale si formano le pareti di silice e i pori della SBA-15 [22] [23].

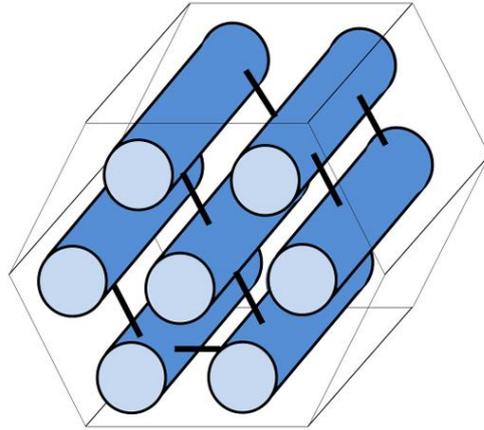


Figura 1.8 Struttura SBA-15 [22]

Tipicamente, il diametro dei pori di SBA-15 varia da circa 5 a 30 nm, ma può essere controllato per adattarsi alle specifiche esigenze dell'applicazione. Le proprietà che lo rendono un materiale promettente per l'immobilizzazione di enzimi, la catalisi eterogenea, l'adsorbimento selettivo e altre applicazioni tecnologiche, includono:

- Grande area superficiale: SBA-15 presenta un'ampia area superficiale, offrendo una maggiore superficie di contatto per le reazioni chimiche e l'adsorbimento di molecole.
- Pori altamente ordinati: Questa regolarità nella disposizione dei pori conferisce alla SBA-15 una maggiore stabilità strutturale e facilita il trasporto delle molecole all'interno dei pori
- Dimensione dei pori controllabile: La dimensione dei pori può essere regolata modificando il rapporto tra il tensioattivo ed il precursore di silice durante la sintesi.
- Stabilità chimica: Può resistere a condizioni reattive e aggressive, come alte temperature e pH estremi.
- Possibilità di funzionalizzazione: La superficie della SBA-15 può essere funzionalizzata tramite legami covalenti con gruppi chimici specifici. Questa funzionalizzazione consente di modificare le proprietà di superficie e di introdurre selettività nelle reazioni chimiche o nell'adsorbimento di molecole.

1.2.2 MCF_{0,75}

La silice MCF_{0,75} (Mesocellular Foam) è una forma particolare di silice mesoporosa caratterizzata da una struttura tridimensionale "spugnosa". Questa struttura viene ottenuta partendo dalla procedura adottata per l'SBA-15 e introducendo uno *swelling agent*, come ad esempio l'1,3,5-trimetilbenzenexilene (TMB), in combinazione con un tensioattivo con un rapporto specifico di

0,75. L'aggiunta del swelling agent favorisce l'espansione delle celle e la formazione di una struttura porosa a schiuma, mentre il tensioattivo aiuta a stabilizzare la struttura e a controllarne le dimensioni dei pori. La sua struttura è costituita da una rete tridimensionale di celle sferiche di dimensioni uniformi (20-40 nm), che sono interconnesse da finestre regolari (~10 nm) [24].

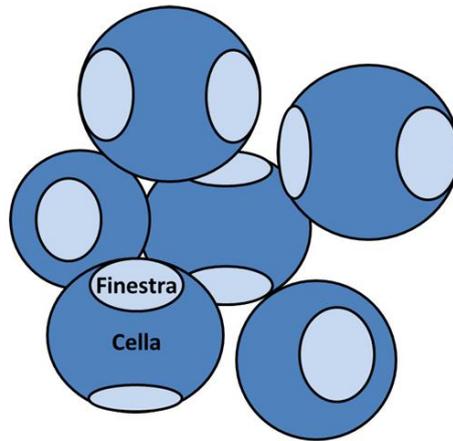


Figura 1.9 Struttura MCF [22]

Questa particolare architettura porosa conferisce alla silice MCF alcune caratteristiche distintive:

- Dimensioni delle celle regolare: Le celle sferiche sono altamente regolari e di dimensioni uniformi. Questo permette un controllo preciso sulla dimensione dei pori, consentendo l'ottimizzazione delle proprietà e delle prestazioni del materiale per applicazioni specifiche.
- Ampia gamma di dimensioni delle celle: La silice MCF può essere preparata con una vasta gamma di dimensioni delle celle, tipicamente nell'intervallo da 10 a 100nm. Questa flessibilità dimensionale offre una maggiore versatilità nella progettazione di materiali adatti a diverse applicazioni.
- Elevata area superficiale (500-1000 m²/g): Grazie alla struttura porosa altamente sviluppata, presenta un'ampia area superficiale disponibile per l'interazione con altre molecole, facilitando l'adsorbimento di sostanze chimiche, la catalisi e altre reazioni che avvengono sulla superficie del materiale.
- Stabilità termica e meccanica: La silice MCF mostra una buona stabilità termica e meccanica. Può resistere a temperature elevate senza subire collassi strutturali o perdita di proprietà.
- Possibilità di funzionalizzazione: La sua superficie può essere funzionalizzata introducendo gruppi chimici specifici sui siti reattivi della superficie. Questa funzionalizzazione consente di modulare le proprietà chimiche del materiale e di migliorarne l'interazione con diverse molecole o sostanze.

1.2.3 DPS

A livello molecolare, la silice dendritica è costituita da catene di silice (Si-O) che si connettono tra di loro formando una rete tridimensionale. Le catene ramificate si estendono dal nucleo centrale e si biforcano ripetutamente, creando una struttura ramificata ad albero. È una silice caratterizzata da una distribuzione dei pori ampia, con dimensioni variabili all'interno della struttura, la cui struttura può essere controllata attraverso i parametri di sintesi, come la concentrazione del precursore di sintesi, il tipo di tensioattivo utilizzato e lo *swelling agent*. Questi parametri influenzano la velocità di crescita dei rami, il numero di ramificazioni e la dimensione dei pori (da 2,8 a 13 nm) all'interno della struttura [25].

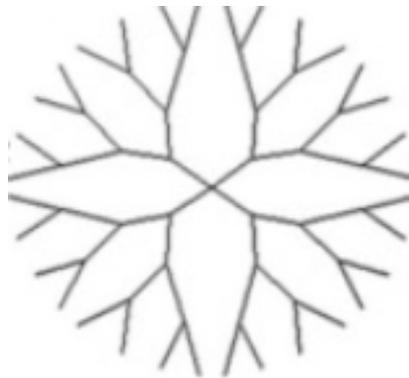


Figura 1.10 Struttura DPS

Le proprietà della silice mesoporosa con struttura dendritica includono:

- Elevata area superficiale (500-1000 m²/g): Grazie alla sua struttura porosa presenta un'ampia area superficiale disponibile per interazioni chimiche.
- Elevata capacità di carico: La sua struttura porosa consente di ospitare e trattenere molecole all'interno dei pori.
- Buona stabilità termica e chimica: Mostra una notevole resistenza sia alle variazioni di temperatura che alle sostanze chimiche, rendendolo adatto a diverse applicazioni nel campo della catalisi.
- Controllo delle dimensioni dei pori: La struttura dendritica offre la possibilità di controllare le dimensioni dei pori, consentendo l'ottimizzazione delle proprietà e delle prestazioni del materiale per diverse applicazioni.

- Versatilità: Può essere funzionalizzata con diverse molecole o gruppi funzionali, consentendo la modifica delle sue proprietà e l'adattamento alle esigenze specifiche dell'applicazione

1.3 Tecniche di immobilizzazione enzimatica

L'immobilizzazione enzimatica riveste un ruolo fondamentale quando si desidera utilizzare un enzima su larga scala industriale. L'utilizzo degli enzimi può presentare alcune sfide legate alla loro sensibilità, bassa stabilità, condizioni di processo e alla tendenza ad essere inibiti da elevate concentrazioni di componenti di reazione. Molti enzimi sono intrinsecamente instabili e la loro applicazione industriale è spesso ostacolata dalla mancanza di stabilità operativa a lungo termine e dalle difficoltà tecniche nel recupero e riutilizzo degli enzimi. Per rendere più vantaggioso l'utilizzo degli enzimi nei processi biotecnologici, sono state sviluppate diverse strategie per ridurre i costi, e l'immobilizzazione enzimatica è una di queste. Il concetto di "enzima immobilizzato" si riferisce all'ancoraggio fisico dell'enzima in una specifica regione dello spazio, preservando la sua attività catalitica e consentendo il suo utilizzo ripetuto e continuo. Inoltre, l'immobilizzazione facilita la manipolazione del biocatalizzatore e il controllo del processo di reazione. Inoltre, migliora la stabilità dell'enzima sia durante lo stoccaggio che durante l'operatività, offrendo vantaggi significativi nell'impiego industriale degli enzimi [26]. L'immobilizzazione degli enzimi sfrutta la diversità dei gruppi funzionali presenti negli aminoacidi delle proteine. Questi gruppi funzionali possono essere coinvolti in vari tipi di legami e interazioni per legare gli enzimi al supporto in modo stabile, consentendo loro di mantenere la loro attività catalitica durante il processo di immobilizzazione e successivamente durante l'utilizzo ripetuto. La Figura 1.10 mostra la classificazione delle diverse tecniche di immobilizzazione enzimatica.

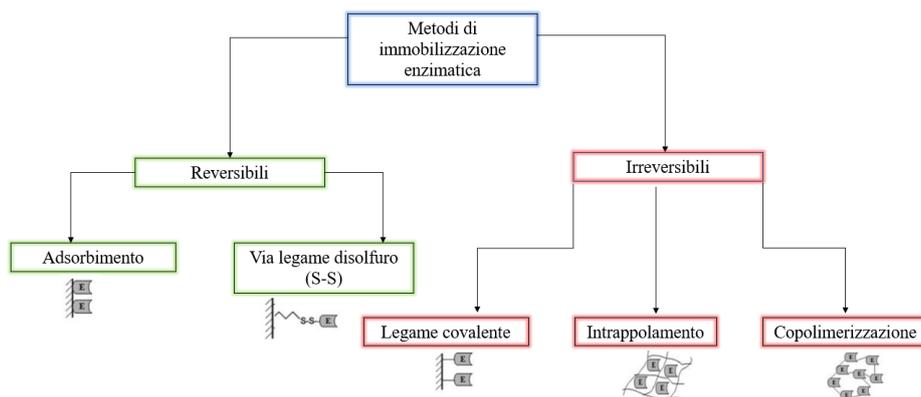


Figura 1.11 Classificazione dei metodi di immobilizzazione enzimatica [18]

Esistono due ampie categorie per classificare gli approcci utilizzati per l'immobilizzazione degli enzimi: metodi irreversibili e metodi reversibili. I legami che si vengono a formare possono variare nella loro forza e stabilità, influenzando la capacità di invertire il processo. Tuttavia, è difficile ottenere simultaneamente stabilità e reversibilità. Di solito, l'approccio tradizionale si è concentrato sulla creazione di legami molto forti, sacrificando la reversibilità. Un'altra modalità di classificazione riguarda la suddivisione dei metodi di immobilizzazione in base al tipo di reazione chimica utilizzata per formare il legame. Ogni metodo presenta vantaggi e svantaggi. La scelta della tecnica più adatta dipende dalle caratteristiche biochimiche e cinetiche dell'enzima, nonché dalle proprietà chimiche e meccaniche del supporto impiegato. Di conseguenza, l'interazione tra l'enzima e il supporto conferisce all'enzima immobilizzato proprietà biochimiche e fisico-chimiche specifiche che determinano la sua applicazione in processi specifici. Il concetto di immobilizzazione irreversibile implica che una volta che il biocatalizzatore è legato al supporto, non può essere separato senza compromettere né l'attività biologica dell'enzima né il supporto stesso, mentre nel meccanismo reversibile l'enzima può essere separato dal supporto. Esistono due categorie principali di metodi irreversibili per l'immobilizzazione degli enzimi: quelli basati sulla formazione di un legame covalente tra l'enzima e il supporto e quelli che agiscono limitando il trasferimento di massa [27]. Tra quest'ultimi si trova l'incapsulamento del biocatalizzatore all'interno di una matrice polimerica o una membrana dove, a differenza dei metodi di accoppiamento covalente, l'enzima non interagisce chimicamente con il supporto, evitando così la denaturazione dell'enzima. Per quanto riguarda la reticolazione, questo approccio non richiede l'uso di un supporto ma la formazione di legami intermolecolari tra molecole di enzima avviene mediante l'utilizzo di reagenti polifunzionali come la glutaraldeide o di aggregati enzimatici (CLEA) [26]. Tuttavia, la tecnica che prevede la formazione di legami covalenti è ampiamente adottata. Un vantaggio di questi metodi

risiede nella stabilità dei legami formati tra l'enzima e la matrice, il che impedisce il rilascio dell'enzima nella soluzione durante l'utilizzo. I metodi reversibili di immobilizzazione enzimatica offrono vantaggi come la rigenerazione del supporto e la possibilità di riutilizzare gli enzimi. Tuttavia, è necessario trovare un equilibrio tra la stabilità del legame enzima-supporto e l'attività enzimatica per garantire prestazioni ottimali. Quando si parla di metodi reversibili il metodo più semplice ed economico è l'adsorbimento fisico, basato sulle interazioni fisiche tra l'enzima e il supporto. Queste interazioni possono includere legami idrogeno, forze di Van Der Waals o interazioni idrofobiche. L'enzima viene semplicemente adsorbito sulla superficie del supporto senza formare legami chimici stabili. Le condizioni ambientali come pH, forza ionica o polarità del solvente, possono essere modificate per indurre la forza dell'interazione e consentire il rilascio dell'enzima dal supporto. Ciononostante, anche se si tratta di una tecnica semplice da eseguire, può essere influenzato da interazioni deboli e può causare perdite di enzima dalla matrice. Un'ulteriore tecnica di immobilizzazione reversibile si basa sulla formazione di legami covalenti tra gruppi tiolici dell'enzima e gruppi disolfuro sul supporto. Questo legame può essere rotto utilizzando un agente riducente come il ditioteitolo (DDT) sotto condizioni particolari. Questo metodo offre un'alta resa di attività enzimatica, ma richiede un supporto che presenti gruppi disolfuro specifici e una buona specificità di reazione dei gruppi tiolici [26], [27].

1.3.1 Immobilizzazione covalente su supporti funzionalizzati

Il legame covalente è uno dei metodi più utilizzati per l'immobilizzazione enzimatica irreversibile. Questo metodo si basa sulla formazione di legami chimici covalenti tra l'enzima e il supporto, che sono forti e stabili. Il gruppo funzionale che prende parte al legame dell'enzima di solito coinvolge il legame attraverso le catene laterali della lisina (gruppo ϵ -amminico), della cisteina (gruppo tiolico) e degli acidi aspartico e glutammico (gruppo carbossilico, imidazolo e gruppi fenolici che non sono essenziali per l'attività catalitica dell'enzima) [26]. L'immobilizzazione covalente presenta diversi vantaggi. Innanzitutto, i legami covalenti formano una connessione solida tra l'enzima e la matrice, che impedisce il rilascio dell'enzima stesso nella soluzione durante l'uso. Ciò consente di riutilizzare l'enzima per diversi cicli reattivi e facilita la sua separazione dalla miscela di reazione. Inoltre, può migliorare la stabilità dell'enzima, proteggendolo da fattori ambientali sfavorevoli come il pH estremo o la temperatura elevata. Per eseguire questo tipo di immobilizzazione è necessario che il supporto presenti gruppi funzionali reattivi che possano reagire con i gruppi funzionali dell'enzima. I gruppi funzionali comunemente utilizzati per la reazione di accoppiamento includono ammine primarie (gruppo aminico), tioli (gruppo sulfidrilico) e gruppi carbossilici. Gli amminoacidi

specifici presenti nell'enzima che contengono questi gruppi funzionali possono essere sfruttati per la formazione di legami covalenti, ma è importante considerare che durante il processo di immobilizzazione è necessario evitare il coinvolgimento degli amminoacidi essenziali per l'attività catalitica dell'enzima, al fine di preservarne l'attività [27]. Questa selezione dei siti di legame appropriati rappresenta una sfida in alcuni casi, poiché gli amminoacidi coinvolti potrebbero essere critici per l'attività catalitica dell'enzima. Esistono diverse strategie e reagenti chimici disponibili per l'immobilizzazione covalente degli enzimi. Alcuni esempi includono l'utilizzo di reattivi come glutaraldeide, aldeidi attivate, NHS-esteri, epossidi, isocianati e silani. Questi gruppi reattivi vengono spesso funzionalizzati sul supporto per creare gruppi reattivi che possono legarsi agli amminoacidi specifici dell'enzima.

1.3.2 Stabilizzazione enzimi

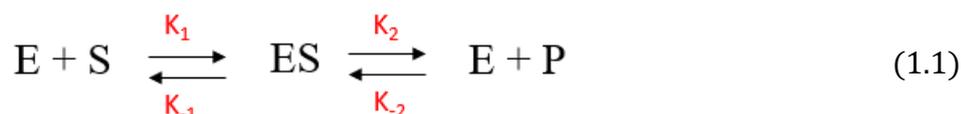
La stabilizzazione degli enzimi è un processo fondamentale per preservarne l'attività e la struttura in diverse condizioni ambientali. Due composti ampiamente studiati per la loro capacità di stabilizzare gli enzimi sono il polietilenglicole (PEG) e il trealosio. Il PEG è una molecola polimerica costituita da unità di etilene glicole ripetute e si ritiene che agisca in due modi principali. In primo luogo, il PEG può sopprimere l'aggregazione degli enzimi grazie a interazioni più forti tra il PEG e le proteine. L'idrofobicità del PEG e delle proteine può favorire l'interazione tra le due molecole, prevenendo l'aggregazione enzimatica. In secondo luogo, il PEG può stabilizzare le strutture secondarie dell'enzima, impedendo la loro denaturazione. Le simulazioni di dinamica molecolare hanno mostrato che il PEG può prevenire l'instabilità delle strutture dell'enzima a temperature elevate. Inoltre, aumentandone la concentrazione l'effetto stabilizzante diventa più evidente [28], [29]. Il trealosio è un osmolita naturale presente in molti organismi, come batteri, funghi e piante. È noto per la sua capacità di stabilizzare le proteine in diverse condizioni. In soluzione, il trealosio aumenta la tensione superficiale del mezzo circostante, causando una maggiore idratazione preferenziale della proteina. Nonostante siano ancora oggetto di studio approfondito, si ipotizza che il trealosio possa formare strutture vicino alle superfici delle proteine, creando numerosi legami idrogeno con uno strato di acqua. Questi complessi trealosio-acqua più rigidi rallentano la dinamica delle proteine e favoriscono la loro stabilità. Altri studi indicano che il trealosio tende a legarsi direttamente alla superficie della proteina, scenario in cui le molecole di trealosio sostituiscono l'acqua superficiale e attraverso tale interazione la proteina viene stabilizzata [30]. Tuttavia, è importante sottolineare che l'efficacia di queste sostanze stabilizzanti può variare a seconda dell'enzima specifico, del supporto utilizzato e delle condizioni sperimentali. Pertanto, è

necessario un approccio caso per caso per determinare le condizioni ottimali per la stabilizzazione degli enzimi utilizzando PEG, trealosio o altri agenti stabilizzanti.

1.4 Inibizione enzimatica

Grazie alla loro straordinaria capacità catalitica, gli enzimi hanno la capacità di accelerare in modo significativo la velocità di un processo, agendo come catalizzatori. L'analisi della velocità di reazione di un processo enzimatico e delle sue modificazioni in risposta a vari parametri sperimentali è conosciuta come cinetica enzimatica.

Un enzima catalizza una reazione quando si lega al suo substrato formando un complesso enzima-substrato. Indipendentemente dalle dimensioni del substrato, il legame tra i gruppi del substrato su cui l'enzima agisce avviene in una regione specifica chiamata sito attivo. Si tratta di una piccola porzione della superficie dell'enzima che si presenta come una fessura o una tasca. La funzione catalitica avviene in questo sito perché i vari gruppi chimici, importanti per il legame del substrato, sono disposti in modo tale da conferire specificità e abilità catalitica all'enzima [31]. La reazione enzimatica coinvolge la formazione di un complesso enzima-substrato (ES) a partire dal legame dell'enzima con il substrato (S), seguito dalla conversione di ES in prodotto (P) e il rilascio dell'enzima:



Questo processo avviene grazie alle costanti di velocità (k_1 , k_{-1} , k_2 , k_{-2}) che rappresentano le diverse fasi della reazione. Gli enzimi accelerano notevolmente la velocità di reazione riducendo l'energia di attivazione necessaria. Inoltre, agiscono come catalizzatori senza subire modifiche permanenti o consumarsi, consentendo a poche molecole enzimatiche di convertire un gran numero di molecole di substrato in prodotto. La loro influenza si limita alla velocità a cui si raggiunge l'equilibrio tra reagenti e prodotti in una singola reazione. Normalmente, aumentando la temperatura, la velocità delle reazioni chimiche aumenta grazie all'aumento dell'energia cinetica delle molecole. Le reazioni catalizzate dagli enzimi possono accelerare ulteriormente la velocità grazie alla loro struttura specifica che riduce la barriera di attivazione. Tuttavia, gli enzimi possono denaturarsi a temperature elevate. Esiste una temperatura ottimale per le reazioni enzimatiche, che di solito è vicina alla temperatura normale dell'organismo. Nell'uomo, la maggior parte degli enzimi ha una temperatura

ottimale intorno o leggermente superiore a 36°C. L'attività degli enzimi dipende anche dal pH a causa dei residui di aminoacidi ionizzabili presenti nell'enzima. La maggior parte degli enzimi mostra un'attività ottimale a un pH specifico, che di solito corrisponde al pH del fluido in cui agiscono. I cambiamenti di pH influenzano la catalisi e la stabilità del complesso enzima-substrato. Come le altre reazioni chimiche, le interazioni enzima-substrato seguono la legge dell'azione di massa. Di conseguenza, le reazioni dipendono dalle concentrazioni di enzima e substrato e nelle condizioni usuali la velocità di reazione è direttamente proporzionale alla concentrazione dell'enzima, poiché le molecole di substrato sono presenti in eccesso rispetto alla concentrazione dell'enzima. Per una data concentrazione di enzima, la velocità di reazione aumenta inizialmente con l'aumento della concentrazione di substrato. Alla fine, si raggiunge una velocità limite e l'ulteriore aggiunta di substrato ha essenzialmente nessun effetto sulla velocità di reazione (v). La forma di un grafico di velocità di reazione (v) in funzione della concentrazione di substrato $[S]$ è un'iperbole rettangolare ed è caratteristica di tutti gli enzimi non allosterici. Queste dipendenze dalle concentrazioni di enzima e substrato hanno portato a un'equazione algebrica semplice che descrive la maggior parte delle reazioni catalizzate dagli enzimi [31]. Tale modello fu sviluppato da Leonor Michaelis e Maud Menten ed è un modello matematico che descrive le reazioni catalizzate dagli enzimi. È basato sull'idea che l'enzima si lega al substrato formando un complesso enzima-substrato (ES) che poi si converte nel prodotto. L'equazione del modello di Michaelis-Menten è data da:

$$v = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]} = \frac{K_c[E]_t[S]}{K_m + [S]} \quad (1.2)$$

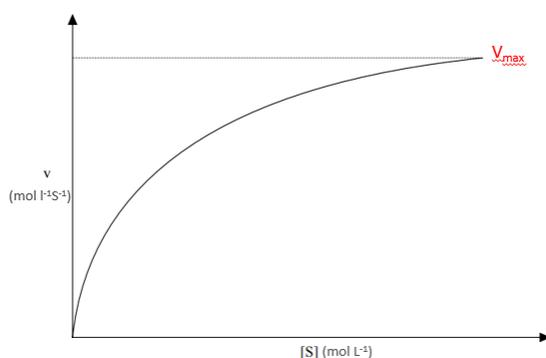


Figura 1.12 Rappresentazione grafica dell'equazione di Michaelis-Menten

Dove v rappresenta la velocità della reazione, $[S]$ è la concentrazione di substrato, V_{\max} è la velocità massima della reazione (quando tutto l'enzima è legato al substrato), e K_m è la costante di Michaelis-Menten, che rappresenta la concentrazione di substrato alla quale la velocità di reazione è la metà di V_{\max} . Il comportamento cinetico di questa equazione può essere visualizzato manipolando algebricamente l'equazione di Michaelis-Menten. Una delle trasformazioni più comuni è rappresentata dall'equazione di Lineweaver-Burk (equazione 1.3), che consiste nella linearizzazione dell'equazione di Michaelis-Menten [31]. Questo tipo di plot viene ottenuto prendendo l'inverso di entrambi i lati dell'equazione (1.2). Graficando $1/v$ in funzione di $1/[S]$, si ottiene una retta con un'intercetta sull'asse delle ordinate corrispondente a $1/V_{\max}$ e un'inclinazione della retta che è uguale a (K_m/V_{\max}) . Questo plot lineare semplifica l'analisi cinetica dei dati sperimentali e permette di determinare facilmente i valori di V_{\max} e K_m tramite l'intercetta e l'inclinazione della retta, rispettivamente [31].

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{\max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}} \quad (1.3)$$

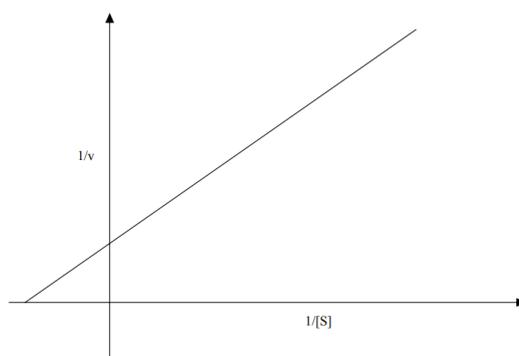


Figura 1.12 Diagramma di Lineweaver-Burk

Tale metodo, tuttavia è noto per la sua sensibilità agli errori sperimentali a causa del processo di linearizzazione che può accentuare anche piccoli errori nella misurazione della velocità di reazione.

Per fortuna, ci sono altri approcci di linearizzazione che sono meno suscettibili agli errori sperimentali come ad esempio il modello di Hanes-Woolf [31]:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}} \quad (1.3)$$

L'inibizione enzimatica rappresenta un processo in cui un inibitore interagisce con un enzima e riduce o blocca la sua attività catalitica. Tale fenomeno può influenzare diversi aspetti della cinetica enzimatica, come la velocità di reazione, la cinetica di legame del substrato e la conformazione dell'enzima. A seconda della natura e della stabilità dell'interazione tra l'inibitore e l'enzima, l'inibizione enzimatica può essere classificata come reversibile o irreversibile. Nell'inibizione reversibile, l'inibitore si lega all'enzima in modo non covalente, formando un complesso enzima-inibitore. Tale legame è relativamente fragile e può essere scisso, consentendo all'enzima di riprendere la sua attività catalitica e, allo stesso tempo, permettendo all'inibitore di essere rilasciato dall'enzima. Nell'inibizione irreversibile, l'inibitore forma un legame covalente stabile con l'enzima, inattivandolo in modo permanente [31][32]. Questo legame covalente può essere formato attraverso reazioni chimiche specifiche tra l'inibitore e l'enzima, come la formazione di un ponte disolfuro o l'aggiunta di un gruppo chimico reattivo. La scelta tra inibizione reversibile o irreversibile dipende dalla specificità dell'inibitore e dagli obiettivi dell'uso terapeutico o sperimentale. La prima offre la possibilità di controllare e regolare l'attività enzimatica, mentre la seconda può essere utilizzata per inattivare selettivamente l'enzima in modo permanente [32]. L'inibizione reversibile può essere suddivisa ulteriormente in competitiva, non competitiva e mista. La tipologia di inibizione più comune è quella competitiva in cui l'inibitore si lega al sito attivo dell'enzima competendo direttamente con il substrato. Questo significa che l'inibitore e il substrato non possono legarsi all'enzima contemporaneamente. Di conseguenza, l'inibitore riduce l'affinità dell'enzima per il substrato, aumentando il valore di K_m , che rappresenta la concentrazione di substrato necessaria per raggiungere la metà della velocità massima. La presenza dell'inibitore non influisce sulla velocità massima della reazione (V_{max}), ma richiede una maggiore concentrazione di substrato per raggiungere la stessa velocità. Nell'inibizione non competitiva invece, l'inibitore si lega a un sito diverso rispetto al sito attivo dell'enzima. Poiché l'inibitore non competitivo non influisce sul legame enzima-substrato, l'inibizione non competitiva non influisce direttamente sul legame tra l'enzima e il substrato, e di conseguenza il valore di K_m rimane invariato. Tuttavia, l'inibitore interferisce con il processo di catalisi enzimatica, riducendo il valore di V_{max} . Questo accade perché

l'inibitore crea un ostacolo o una interferenza che impedisce all'enzima di svolgere la sua funzione catalitica in modo efficiente, limitando così la velocità massima raggiungibile dalla reazione [31], [32]. La Figura 2.5 illustra come i parametri cinetici variano a seconda del tipo di inibizione.

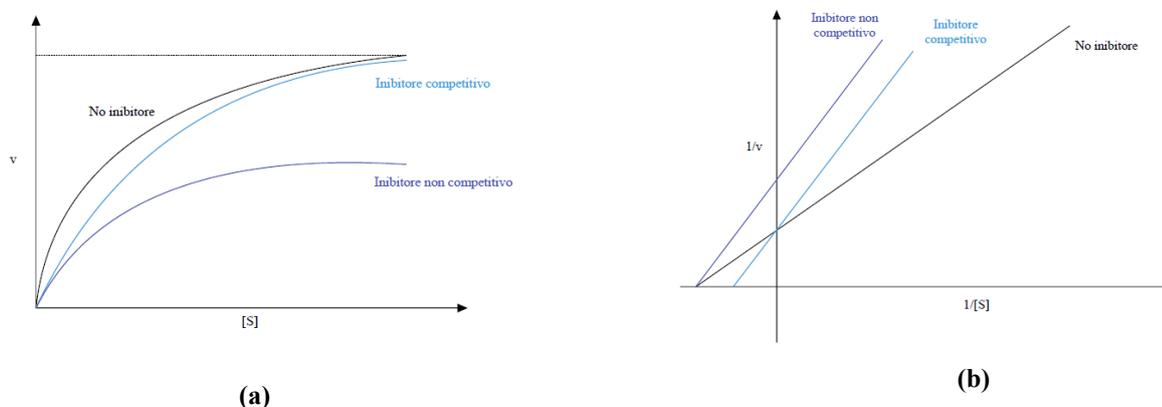


Figura 1.13 L'effetto di un inibitore competitivo (azzurro) e non competitivo (viola) sui parametri cinetici dell'equazione di Michaelis-Menten (a) e sulla linearizzazione di Lineweaver-Burk (b)

1.4.1 Inibitori dell'LDH come agenti antitumorali

Gli inibitori dell'hLDH-A sono stati suddivisi in diverse categorie in base al loro meccanismo d'azione. Una classe di inibitori sono quelli competitivi del substrato (piruvato), che competono con il substrato per il legame al sito attivo dell'enzima. Questi inibitori si legano al sito attivo dell'LDH e impediscono al piruvato di interagire con l'enzima, riducendo la sua attività catalitica. Un esempio di inibitore appartenente a questa classe è l'Ossammato, che presenta però un'azione antiglicolitica poco selettiva verso l'isoforma umana hLDH-5. Inoltre, l'ossammato ha una bassa permeabilità attraverso la membrana cellulare, il che richiede l'uso di concentrazioni elevate per ottenere un'efficace inibizione dell'enzima[33]. Un'altra classe di inibitori sono quelli competitivi del cofattore (NADH), che competono con il cofattore per il legame all'enzima. Il NADH è coinvolto nel processo di ossidoriduzione catalizzato dall'LDH, quindi un inibitore competitivo del NADH interferisce con l'interazione tra l'enzima e il cofattore, compromettendo la sua attività catalitica e tra questi trovano posto i composti a base di chinolina 3-sulfonamidi ed il composto polifenolico Gossypol, che possiede però una tossicità aspecifica sui tessuti biologici per la presenza di due gruppi aldeidici che possono legare qualsiasi ammino gruppo presente nelle molecole biologiche. Nonostante i risultati del gossypol non siano stati molto promettenti, sono stati sviluppati diversi composti simili con l'obiettivo di ridurre o eliminare gli effetti collaterali mantenendo l'attività biologica. Esistono anche inibitori competitivi duali che agiscono sia come inibitore del substrato che del cofattore. Questi inibitori competono simultaneamente con il piruvato e il NADH per il

legame all'LDH, interferendo con entrambe le interazioni necessarie per la catalisi. Ad esempio, hanno mostrato un potente effetto inibitorio con buona selettività contro hLDH-A rispetto a hLDH-B i derivati dell'N-idrosiindolo (NHI) [12]. Infine, un altro potenziale inibitore non competitivo che si lega agli enzimi liberi senza competizione di substrato e cofattore è la Galloflavina che ha mostrato una buona attività inibitoria dell'LDH e una buona permeabilità cellulare [33]

2. Materiali e metodi

Come descritto nella sezione 1.2, al fine di selezionare dei materiali con una porosità adeguata e individuare la metodologia di sintesi appropriata, è stata inizialmente valutata la dimensione dell'enzima coinvolto. Nello specifico, si è trattato dell'LDH-A umano ricombinante, prodotto mediante espressione in *Escherichia Coli* e successivamente acquisito in forma di soluzione acquosa da Merck. Tutte le proteine hanno approssimativamente una densità di circa $1,37 \text{ g/cm}^3$ ed un volume specifico parziale, reciproco della densità, di $0,73 \text{ cm}^3/\text{g}$. È possibile calcolare il volume occupato da una proteina di massa M come segue [34]:

$$V_{Prot} = \frac{v_2}{N_A} \times M \quad (2.1)$$

Se si assume che la proteina abbia la forma più semplice, una sfera, è possibile calcolare il raggio nel seguente modo [34]:

$$R_{min} = \left(\frac{3}{4\pi} \times V \right)^{\frac{1}{3}} = 0,066 \times M^{\frac{1}{3}} \quad (2.2)$$

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

Secondo i dati presenti in letteratura, si stima che la subunità A di questo enzima abbia un peso approssimativo di 35 kDa, portando così il peso totale medio del tetramero a circa 140 kDa e ottenendo un raggio minimo pari a 3,43 nm.

2.1 Sintesi dei supporti

Per questo lavoro di tesi si è effettuata la sintesi di quattro supporti silicei mesoporosi: SBA-15_{0,25}, MCF_{0,75}, DPS e DPS_{0,75}. I pedici indicano il rapporto specifico tra lo swelling agent ed il tensioattivo, utilizzati nella sintesi dei materiali. Nel contesto dei materiali mesoporosi, l'agente

rigonfiante è spesso utilizzato per generare la struttura porosa desiderata, mentre il tensioattivo svolge il ruolo di stabilizzatore per controllare la formazione e la dimensione dei pori. Il rapporto tra questi due componenti è fondamentale per ottenere le caratteristiche desiderate del materiale finale, come la dimensione dei pori, l'area superficiale e la stabilità strutturale [19]. Si riporta di seguito la procedura adottata per la sintesi dei materiali precedentemente citati.

2.1.1 Sintesi dei supporti SBA-15_{0,25} e MCF_{0,75}

I supporti SBA-15_{0,25} ed MCF_{0,75} vengono sintetizzati sfruttando una procedura bottom-up basata sulla chimica sol-gel che coinvolge l'idrolisi e la condensazione di composti organosilici in condizioni acquose. Per la sintesi dell'SBA-15_{0,25} si preparano sotto cappa chimica, in un pallone, 160 ml di soluzione di HCl 1,6M. Per ottenere tale soluzione, si miscelano 31,53 ml di HCl 37% con 128,47 ml di H₂O deionizzata e purificata (Milli-Q). Successivamente, si aggiungono 4 g di Pluronic 123 (templante) alla soluzione acida e si mantiene in agitazione a 40°C per 1h in modo da rendere omogenea la soluzione. Dopo l'ora di miscelazione, viene introdotto l'agente rigonfiante tramite una pipetta, aggiungendo goccia a goccia 0,7859 ml di mesitilene (1,3,5-trimetilbenzene, C₉H₁₂) alla miscela precedente e la soluzione si mantiene nuovamente in agitazione a 40°C per 1h. Nella sintesi dell'SBA-15, presente in letteratura, quest'ultimo passaggio non è menzionato. Tuttavia, nel contesto di questa ricerca, l'obiettivo del rapporto massico Mesitilene/Pluronic di 0,25 è di aumentare le dimensioni dei pori del supporto. Successivamente si aggiungono alla soluzione 8,5 g di TEOS (tetraetossisilano, SiC₈H₂₀O₄) goccia a goccia e si lascia in agitazione a 40 °C per 24h. Il TEOS agisce come precursore nel processo di sintesi. Grazie alla sua natura idrofoba, si inserisce all'interno delle micelle di Pluronic 123 e inizia la polimerizzazione. Questo processo permette alle micelle di acquisire la forma desiderata e contribuisce alla formazione del materiale. Dopo le 24h di miscelazione, la soluzione viene trasferita in un'autoclave e sottoposta a un trattamento termico a 100°C per 24h. Il trattamento termico della soluzione porta ad un incremento delle dimensioni dei pori del supporto, consentendo una maggiore porosità a un'ampia superficie specifica. Terminato il trattamento termico la soluzione raffreddata viene centrifugata e lavata con Milli-Q. Dopo il lavaggio, si lascia il materiale ad essiccare a 60°C per una notte in modo da rimuovere l'umidità residua. Infine, il materiale viene sottoposto a un processo di calcinazione a 550 °C per 5h, con un aumento di temperatura di 0,75 °C/min (45°C/h). Con questo step in temperatura vengono liberati i pori dell'SBA-15 dal tensioattivo e dall'acqua residua [22]. La procedura di sintesi seguita per l'MCF_{0,75} è identica a quella utilizzata in precedenza, ad eccezione

di una modifica apportata al rapporto massico Mesitilene/Pluronic, che per poter ottenere la struttura tridimensionale “spugnosa” tipica dell’MCF, viene aumentato a 0,75.

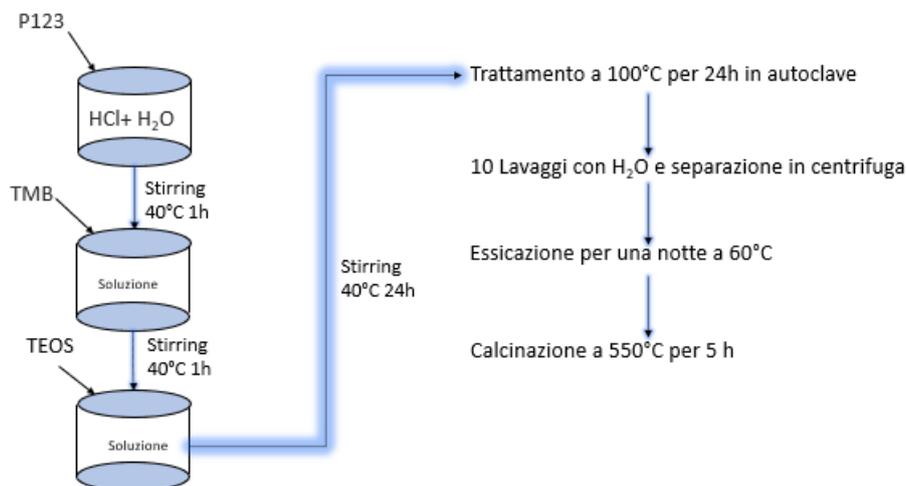


Figura 2.1 Schema di sintesi SBA-15_{0,20} e MCF_{0,75}

2.1.3 Sintesi dei supporti DPS e DPS_{0,75}

Una serie di particelle DPS sferiche è stata sintetizzata tramite un processo combinato di autoassemblaggio dinamico e calcinazione, utilizzando come fonte di silice del TEOS (come le precedenti sintesi), CTAB come tensioattivo e l’urea come catalizzatore di base in modo da modificare la velocità della reazione chimica senza però essere presente nella composizione del prodotto finale. Inizialmente, si prepara una soluzione di Urea e CTAB, miscelando 1,2g di urea, 5,6 g di CTAB e 60 ml di acqua Milli-Q. Successivamente, si prepara una soluzione di butanolo e cicloesano, mescolando 3 ml di butanolo e 60 ml di cicloesano. Durante il processo di sintesi, il cicloesano viene utilizzato insieme al butanolo per creare un’ambiente a fase organica in cui si forma una micellarità inversa. Queste micelle inverse fungono da template per la creazione delle strutture dendritiche durante la polimerizzazione del TEOS. Quando il cicloesano viene rimosso dalla struttura tramite evaporazione o mediante trattamento termico contribuisce all’aumento delle dimensioni dei pori all’interno del materiale siliceo dendritico finale [21]. Goccia a goccia, si aggiungono 8 ml di TEOS alla soluzione di butanolo e cicloesano e infine la soluzione di urea e CTAB viene aggiunta alla soluzione di TEOS, butanolo e cicloesano. La miscela viene quindi sottoposta ad agitazione a temperatura ambiente per 30 minuti, trasferita in un’autoclave e sottoposta a trattamento termico a 130°C per 5h. La sospensione viene poi filtrata per rimuovere eventualità

impurità, lavata con etanolo e acqua e successivamente separata utilizzando una centrifuga, ripetendo questo processo per 10 volte. Dopo il lavaggio, il materiale viene essiccato per una notte a 60°C per rimuovere l'umidità residua. Infine, si sottopone il materiale a un processo di calcinazione a 550°C per 5h con un aumento di temperatura di 0,75°C/min (45°C/h), al fine di ottenere il prodotto finale desiderato [35]. La procedura di sintesi seguita per le DPS_{0,75} è identica a quella utilizzata in precedenza, ad eccezione di una modifica apportata al volume della soluzione di butanolo e cicloesano, ottenuta miscelando 0,2715 ml di butanolo e 5,43 ml di cicloesano.



Figura 2.2 Schema di sintesi DPS e DPS_{0,75}

2.2 Funzionalizzazione dei supporti

La funzionalizzazione dei supporti silicei è un processo che consente di modificare la superficie del materiale al fine di facilitare la successiva adesione e stabilizzazione dell'LDH, permettendo così un legame stabile tra il supporto e l'enzima. La funzionalizzazione può avvenire attraverso diverse metodologie, come la silanizzazione, in cui molecole organiche contenenti gruppi funzionali reattivi vengono legate covalentemente alla superficie del supporto siliceo. SBA-15_{0,20}, MCF_{0,75}, DPS e DPS_{0,75} sono stati sottoposti a trattamenti di silanizzazione utilizzando reagenti come l'APTES (3-aminopropiltrirossilano) e il GPTMS (3-glicidilpropiltrimetossilano), al fine di creare sulla superficie del supporto gruppi amminici e gruppi aldeidici che possano interagire con i residui amminoacidi dell'enzima.

2.2.1 Etero-funzionalizzazione: generazione di gruppi amminici ed aldeici

L'Etero-funzionalizzazione dei supporti in silice per generare gruppi amminici ed aldeici può essere realizzata utilizzando una combinazione di reagenti come APTES (3-aminopropiltrirossilano) e GPTMS (3-glicidilpropiltrimetossilano). Il processo di generazione dei

gruppi aldeidici implica l'esecuzione di tre reazioni consecutive. La prima reazione è finalizzata alla formazione dei gruppi epossidici, seguita dalla trasformazione di tali gruppi in dioli mediante la seconda reazione. Infine, la terza reazione comporta l'ossidazione dei dioli a gruppi aldeidici alifatici, comunemente noti come gruppi gliossilici [36], [37].

Inizialmente si pesa il supporto in silice nella quantità desiderata, solitamente compresa tra 0,6667g e 2g, e si lascia da parte in attesa di essere trattato. Nel frattempo, si preparano in un pallone una soluzione di etanolo contenente APTES e GPTMS [38]. La proporzione tipica è di 30 ml di etanolo per grammo di supporto, con il 5% in volume di APTES e GPTMS. Gli organosilani vengono aggiunti goccia a goccia alla soluzione di etanolo per garantire una distribuzione uniforme. Successivamente, il supporto in silice viene aggiunto alla soluzione contenente gli organosilani e si mantiene la miscela in agitazione per un periodo di 5h a temperatura ambiente. Durante questo tempo, gli agenti silanizzanti reagiscono con la superficie del supporto, legando i gruppi amminici e gli epossidici ai siti disponibili. Dopo il tempo di reazione, il supporto funzionalizzato viene separato dal liquido residuo in centrifuga e lavato con etanolo per rimuovere eventuali impurità o reagenti residui, con un rapporto di circa 1:1 tra etanolo e la soluzione. Infine, il supporto funzionalizzato viene lavato abbondantemente con acqua deionizzata per rimuovere ulteriori residui.

Il supporto precedentemente funzionalizzato con gruppi amminici ed epossidici viene sottoposto alla generazione di dioli. Per questa fase si prepara, in un pallone, una soluzione di acido solforico (H_2SO_4) 0,1 M. In particolare, per ogni 20 ml di soluzione, si aggiungono 0,11 ml di acido solforico concentrato (96,5%) a 20 ml di Milli-Q. Successivamente, il supporto viene aggiunto alla soluzione di acido solforico diluito e miscelato in modo uniforme per 2h ad una temperatura di 85 °C, collegando il pallone posto in un bagno d'olio ad una colonna di raffreddamento. L'acido solforico è in grado di aprire la struttura ad anello presente sulla superficie del supporto e di idrolizzare i gruppi epossidici, portando alla formazione di dioli. Questo meccanismo reattivo è rappresentato nel dettaglio nella Figura 2.4. Dopo il tempo di reazione, la miscela viene lasciata raffreddare e successivamente separata dai residui liquidi mediante centrifuga. Dopodiché, il supporto viene lavato abbondantemente con Milli-Q per rimuovere eventuali tracce di acido solforico residuo.

Come ultimo step si procede con la generazione dei gruppi gliossilici mediante l'utilizzo di una soluzione di $NaIO_4$ con una concentrazione di 0,1 M. Quest'ultima viene preparata miscelando in un becher una quantità specifica di periodato di sodio con acqua Milli-Q. La proporzione tipica è di 30 ml di soluzione per grammo di supporto. Una volta preparata la soluzione di $NaIO_4$, si aggiunge il supporto ottenuto nelle fasi precedenti e si lascia in agitazione per 2h a temperatura ambiente.

Durante questo tempo avviene la reazione di ossidazione dove i dioli precedentemente formati sulla superficie del supporto vengono convertiti in gruppi aldeidici alifatici, noti come gruppi gliossilici. Successivamente, il supporto viene lavato in centrifuga per rimuovere eventuali residui della soluzione di ossidante e viene quindi messo ad essiccare in stufa.

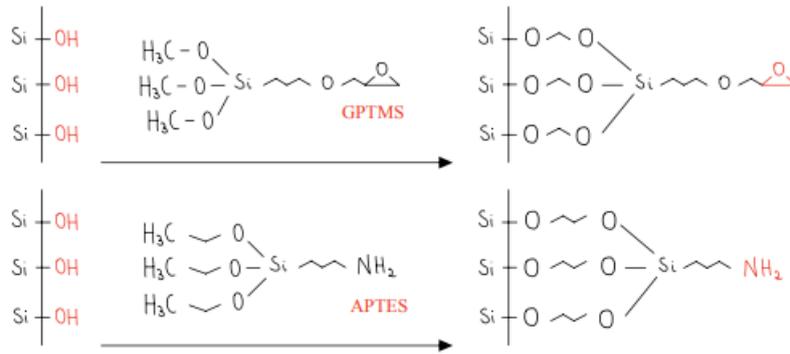


Figura 2.3 Generazione dei gruppi epossidici ed amminici

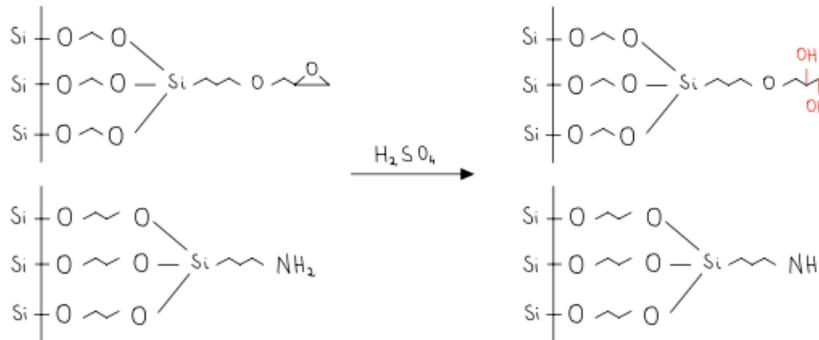


Figura 2.4 Generazione dei dioli

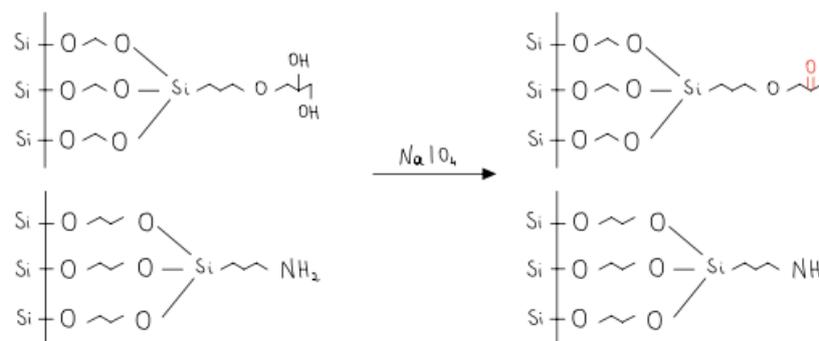


Figura 2.5 Generazione dei gruppi aldeidici alifatici (gliossilici)

2.2.2 Quantificazione dei gruppi aldeidici

Per quantificare i gruppi aldeidici, dopo la funzionalizzazione con i gruppi gliossilici, si segue una procedura dettagliata. Innanzitutto, viene preparata una soluzione di ioduro di potassio (KI) al 10% miscelando una quantità specifica di KI con acqua Milli-Q e una soluzione satura di bicarbonato di sodio (NaHCO_3) miscelando bicarbonato di sodio con acqua Milli-Q. I campioni contenenti gli ioni IO_4^- , che sono stati prelevati all'inizio e alla fine della reazione di ossidazione dei dioli a gruppi aldeidici, vengono diluiti in rapporto 1:50 aggiungendo una piccola quantità di campione a una quantità di acqua Milli-Q. Questa diluizione permette di ottenere una concentrazione adeguata per l'analisi successiva. I campioni da analizzare si preparano aggiungendo 0,1 ml del campione diluito al passaggio precedente, ad una soluzione contenente 0,5 ml della soluzione di ioduro di potassio al 10% e 0,5 ml della soluzione satura di bicarbonato di sodio. Per eseguire l'analisi, si imposta lo spettrofotometro UV-vis sulla modalità "Fixed wavelenght" a 420nm, che è la lunghezza d'onda specifica per la misurazione del composto formato dall'interazione tra il periodato di sodio e lo ioduro di potassio. Dunque, misurando l'assorbanza della soluzione prima e dopo la reazione di ossidazione epossidica, è possibile determinare la quantità dei gruppi generati sul supporto in silice utilizzando la seguente equazione:

$$\frac{\text{mol}_{\text{ald}}}{g_{\text{sup}}} = \frac{V_{\text{IO}_4^-} [\text{IO}_4^-]_{\text{in}} \left(1 - \frac{\text{Abs}_{\text{fin}}}{\text{Abs}_{\text{in}}}\right)}{g_{\text{sup}}} = \frac{V_{\text{soluzione}} \text{ml} \times 0,1 \frac{\text{mmol}}{\text{ml}} \times \left(1 - \frac{\text{Abs}_{\text{fin}}}{\text{Abs}_{\text{in}}}\right)}{\text{massa supporto g}} \quad (2.3)$$

mol_{ald} → Quantità di gruppi aldeidici formati sulla superficie del supporto

g_{sup} → Massa del supporto

$V_{\text{IO}_4^-}$ → Volume della soluzione iniziale di periodato di sodio

$[\text{IO}_4^-]_{\text{in}}$ → 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

2.3 Caratterizzazione del materiale

La caratterizzazione dei supporti in silice mesoporosa è un processo essenziale per comprendere le loro proprietà strutturali e chimiche. Esistono diverse tecniche di analisi che vengono utilizzate per ottenere informazioni dettagliate su questi materiali. In questo lavoro di tesi sono state utilizzate le seguenti tecniche: spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier (FTIR), fisisorbimento di azoto a 77K, diffrazione a raggi X (XRD), microscopio elettronico a scansione ad alta risoluzione (FESEM). L'utilizzo combinato di queste tecniche di analisi consente di ottenere una caratterizzazione completa dei supporti SBA-15_{0,20}, MCF_{0,75}, DPS e DPS_{0,75}, fornendo informazioni sulla loro struttura cristallina, composizione chimica, morfologia e proprietà di assorbimento.

2.3.1 Spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier

La spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier (FTIR) è una tecnica di analisi che si basa sull'interazione tra una radiazione elettromagnetica e il campione in esame. La radiazione utilizzata nell'IR appartiene alla regione dello spettro elettromagnetico degli infrarossi, che si estende tra la regione visibile e quella delle microonde. Questa radiazione viene suddivisa in tre regioni: l'IR vicino, l'IR medio e l'IR lontano, ognuna delle quali fornisce informazioni specifiche [39]. Tuttavia, per le analisi spettroscopiche IR, è tipicamente la regione dell'IR medio quella di maggiore interesse, caratterizzata da numeri d'onda compresi tra 400 e 4000 cm⁻¹, grazie alla quale si possono analizzare le vibrazioni dei legami chimici presenti nelle molecole [40]. La spettroscopia IR, conosciuta anche come spettroscopia vibrazionale, si concentra sullo studio delle vibrazioni molecolari generate dall'assorbimento di energia. Quando il campione viene irradiato con la radiazione infrarossa, l'energia viene assorbita e provoca una transizione nell'energia vibrazionale, passando da uno stato fondamentale a uno stato eccitato. Una vibrazione viene considerata IR-attiva solo quando si verifica una variazione del momento di dipolo che non sia pari a zero. Ovvero, se all'interno della molecola la vibrazione genera una distribuzione di carica non simmetrica, questa verrà rilevata dalla spettroscopia IR e quindi sarà evidente nello spettro di assorbimento registrato [39]. I modi di vibrazione possono essere classificati in base al tipo di movimento che coinvolgono in vibrazioni di stretching (stiramento) e di bending (piegamento). Le vibrazioni di stretching sono un fenomeno comune che si verifica quando gli atomi all'interno di una molecola si muovono ritmicamente lungo l'asse di legame, causando un cambiamento nella distanza tra di loro e fornendo informazioni sulle forze dei legami chimici. Queste vibrazioni possono essere distinte in due categorie principali: vibrazioni simmetriche e vibrazioni asimmetriche. Le vibrazioni simmetriche coinvolgono il movimento simultaneo di atomi o gruppi di atomi in direzioni opposte rispetto al piano di simmetria

della molecola. Le vibrazioni asimmetriche, d'altra parte, coinvolgono il movimento di atomi o gruppi di atomi in direzioni diverse rispetto al piano di simmetria della molecola. Oltre alle vibrazioni di stretching, esistono anche le vibrazioni di bending, che coinvolgono una variazione nell'angolo di legame tra gli atomi. Queste vibrazioni possono essere ulteriormente classificate in base alla loro posizione rispetto al piano di simmetria della molecola. Le vibrazioni di wagging e twisting si verificano quando il movimento è al di fuori del piano, mentre le vibrazioni di scissoring e rocking si verificano quando il movimento avviene sul piano [40].

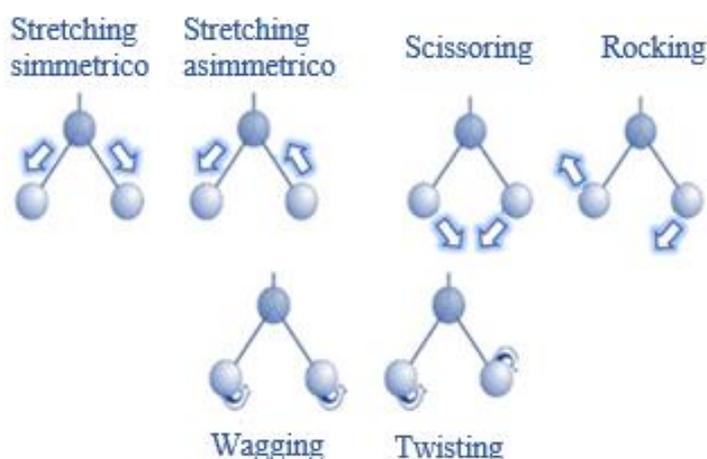


Figura 2.6 Vibrazioni di stretching e di bending del legame

Le vibrazioni di stretching, essendo caratterizzate da un movimento più energetico, generalmente richiedono un'energia più elevata rispetto alle vibrazioni di bending. Ciò significa che le vibrazioni di stretching si verificano a frequenze più elevate nello spettro infrarosso rispetto alle vibrazioni di bending, che si verificano a frequenze più basse.

Lo spettro di assorbimento si manifesta come una serie di picchi che rappresentano l'assorbimento energetico da parte di specifici legami, gruppi funzionali o anche delle vibrazioni complessive del campione. Da questo punto di vista, lo spettro di assorbimento può essere suddiviso in due regioni distinte. La prima regione, che si osserva a numeri d'onda $4000-1400\text{ cm}^{-1}$, è nota come la regione dei gruppi funzionali. In questa zona, vengono rappresentati i picchi di assorbimento caratteristici dei principali gruppi funzionali presenti nel campione. Ogni gruppo funzionale è associato a una banda di assorbimento specifica che consente di identificarlo attraverso il confronto con spettri di assorbimento presenti in database e cataloghi informatizzati. La seconda regione dello spettro di assorbimento, che si osserva a numeri d'onda $1400-600\text{ cm}^{-1}$, è nota come la regione dell'impronta digitale. Questa regione è caratteristica per ciascun campione analizzato e fornisce informazioni sulle

vibrazioni molecolari nel loro insieme, senza considerarle individualmente. Viene analizzata la quantità di energia che viene trasmessa o assorbita dal campione. Per quanto riguarda la strumentazione si vuole lavorare in un ambiente controllato, ponendo attenzione sia al gas presente all'interno della camera di analisi che alla superficie del campione effettuando dei trattamenti termici che permettono di ottenere una superficie pulita da certi inquinanti adsorbiti dall'ambiente. I materiali che vengono sottoposti a questo tipo di analisi devono essere trasparenti alla radiazione IR, ovvero non devono assorbire la radiazione, in modo che tale radiazione possa essere trasmessa al detector e si possa registrare uno spettro. Oltre ad essere sufficientemente trasparenti, i materiali devono possedere una sufficiente superficie specifica [40].

Nel contesto di questa analisi, le silici mesoporose in esame in forma di polvere vengono trasformate in sottili pastiglie auto-supportate. Successivamente, le suddette pastiglie vengono posizionate all'interno di un supporto porta-campione, realizzato con lamine d'oro, appositamente forato per ospitare il campione. Infine, il campione viene collocato all'interno della cella di uno spettrofotometro Equinox 55 Bruker. Una prima analisi consiste nel registrare lo spettro dei campioni pretratti a diverse temperature, funzionalizzati e non, in modo da ottenere informazioni sulla superficie e sui gruppi funzionali esposti che danno un assorbimento nell'IR. Una successiva analisi effettuata sfrutta invece una molecola sonda per studiare la superficie ancora più nel dettaglio. In questa ricerca, è stato effettuato un approfondito studio sull'acidità dei campioni di silici mesoporose mediante il monitoraggio dell'adsorbimento di CO a una temperatura di 77K. Con l'analisi degli spettri FTIR della CO adsorbita sulla superficie delle silici mesoporose, è possibile osservare variazioni nell'assorbimento spettrale, risultanti dalla formazione di complessi tra la CO e i siti acidi presenti sul materiale [40]. Queste variazioni forniscono informazioni significative riguardo alla presenza, all'intensità e alla natura dei siti acidi sulla superficie della silice mesoporosa. Considerando l'interazione relativamente debole tra la CO e il materiale, l'adsorbimento si studia accuratamente a basse temperature. Durante i test, vengono dosate quantità crescenti di CO sui campioni precedentemente degassati a 423K. Inoltre, l'utilizzo di azoto liquido consente un dosaggio simultaneo di monossido di carbonio e un controllo preciso della temperatura all'interno della cella. Alla conclusione di ciascun esperimento, si esegue una fase di evacuazione per valutare la reversibilità dell'interazione [41].

2.3.2 Fisisorbimento di azoto a -196°C

Il fisisorbimento di azoto su silici mesoporose è un processo di adsorbimento in cui le molecole di azoto (N_2) vengono fisicamente assorbite sulla superficie dei pori delle silici mesoporose a una temperatura molto bassa, di solito intorno ai -196°C . Durante l'adsorbimento, le molecole di azoto a causa delle loro dimensioni relativamente piccole e della loro inerzia chimica, possono penetrare all'interno dei pori delle silici mesoporose e interagire con la superficie interna del materiale formando uno strato di azoto adsorbito sulla superficie. In base alla natura dell'interazione tra le molecole adsorbite e la superficie del materiale, l'adsorbimento può essere classificato in chemisorbimento e fisisorbimento [40]. Il chemisorbimento è un processo di adsorbimento in cui le molecole adsorbite formano legami chimici con la superficie del materiale. Gli atomi o le molecole adsorbite reagiscono con i siti attivi presenti sulla superficie, formando legami chimici stabili. Questo tipo di adsorbimento è spesso caratterizzato da forti interazioni elettrostatiche, scambio di elettroni e/o legami covalenti tra le molecole adsorbite e la superficie del materiale. D'altra parte, il fisisorbimento è un processo di adsorbimento in cui le molecole adsorbite interagiscono con la superficie del materiale principalmente attraverso forze di van der Waals, che includono forze di attrazione di tipo dipolo-dipolo, forze di dispersione e forze di repulsione. Queste interazioni sono di natura fisica e non coinvolgono la formazione di legami chimici significativi. Durante il fisisorbimento, le molecole adsorbite sono generalmente debolmente legate alla superficie e possono essere facilmente desorbite o rilasciate senza rompere legami chimici. Inoltre, è un fenomeno che si osserva a temperature relativamente basse, ed è caratterizzato da una bassa energia di adsorbimento, generalmente inferiore a 30 kJ/mol . Sfruttando il processo di fisisorbimento di azoto a una temperatura di -196°C , è possibile effettuare una valutazione della superficie specifica, del volume e del diametro medio dei pori di un materiale. Questa analisi viene condotta mediante la costruzione di curve chiamate isoterme di adsorbimento, che rappresentano il volume di gas adsorbito in funzione del rapporto tra la pressione dell'adsorbato e la pressione di saturazione. Le isoterme di adsorbimento sono suddivise in sei tipologie secondo la classificazione stabilita dalla IUPAC. Tale classificazione consente di ottenere informazioni dettagliate sul comportamento di adsorbimento del materiale e di caratterizzarne le proprietà porose in maniera accurata [40].

- ❖ L'isoterma di tipo I (isoterma di Langmuir) è tipica dei materiali microporosi (dimensione dei pori $< 2\text{nm}$) e mostra un aumento lineare della quantità di adsorbato all'aumentare della pressione. Si ha una concavità verso il basso e una pendenza della curva che man mano che aumenta la pressione diminuisce tanto da diventare pari a zero. Questo comportamento è tipico di una buona affinità dell'adsorbato con la superficie, per cui la quantità adsorbita

diminuisce al diminuire della concentrazione dei siti liberi, fino ad arrivare alla saturazione ovvero al ricoprimento totale del primo strato (in corrispondenza del plateau) [42].

- ❖ L'isoterma di tipo II è tipica di materiali non porosi ma presenta un'affinità intermedia tra l'isoterma di tipo I e l'isoterma di tipo III. Quest'ultima invece, risulta essere l'opposto dell'isoterma di Langmuir. In questo caso l'affinità dell'adsorbato con la superficie è bassa, quindi a basse pressioni l'aumento di quantità adsorbita è minore di quello che si osserva ad alte pressioni, considerando la stessa variazione di pressione. Se l'affinità adsorbato-superficie è molto bassa, le molecole adsorbite nel primo strato diventano dei siti di adsorbimento per le molecole che si adsorbono negli strati successivi, addirittura più forti della superficie pulita. Man mano che diminuisce la concentrazione dei siti liberi di adsorbere più adsorbato a parità di aumento di pressione [42].
- ❖ Le isoterme IV e V sono tipiche di materiali mesoporosi con dimensione dei pori nell'intervallo 2-50 nm. L'isoterma di tipo IV mostra un rapido adsorbimento iniziale, seguito da un graduale incremento nell'adsorbimento. Questo suggerisce che vi siano forti interazioni tra l'adsorbato e il materiale adsorbente, permettendo un adsorbimento progressivo a pressioni più elevate. Questo tipo di isoterma è tipico di materiali mesoporosi con una buona capacità di adsorbimento. D'altra parte, l'isoterma di tipo V è caratterizzata da una rapida saturazione a basse pressioni. Questo indica una debole interazione tra l'adsorbato e l'adsorbente, che porta a una bassa capacità di adsorbimento. Questo tipo di isoterma è comune nei materiali mesoporosi con una struttura meno sviluppata o pori di dimensioni più piccole. Entrambe, tuttavia, mostrano un fenomeno noto come isteresi, che si manifesta come una differenza nei percorsi di adsorbimento e desorbimento a causa dei fenomeni di condensazione capillare. Questi fenomeni si verificano quando, durante la fase di adsorbimento, la pressione di vapore è inferiore alla pressione di saturazione e il gas inizia a condensare all'interno dei pori del materiale. Durante la fase di adsorbimento, le molecole di adsorbato si accumulano progressivamente nei pori del materiale fino a raggiungere la saturazione. Tuttavia, durante la fase di desorbimento, le molecole di adsorbato possono rimanere intrappolate all'interno dei pori a causa delle forze di attrazione tra le molecole e l'adsorbente. Questo causa un ritardo nel rilascio dell'adsorbato e una differenza di pressione necessaria per avviare il desorbimento completo [42] [43].

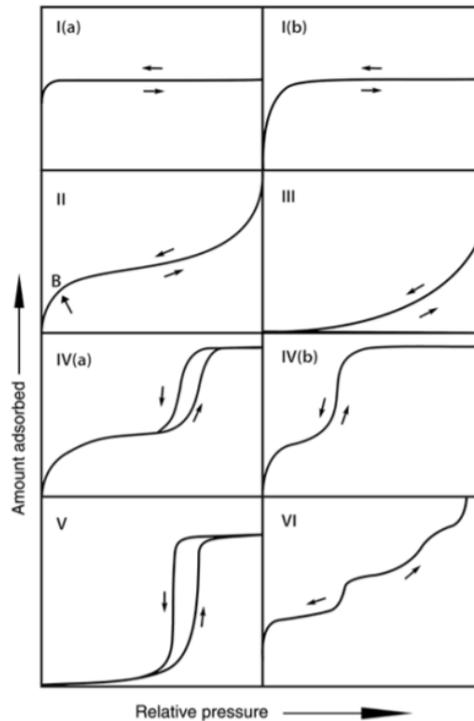


Figura 2.7 Classificazione IUPAC delle isoterme di adsorbimento [40]

Esiste una correlazione tra la forma del ciclo di isteresi e le caratteristiche strutturali del materiale, come la distribuzione delle dimensioni dei pori, la geometria dei pori e la connettività. La classificazione delle isteresi è stata definita dall'IUPAC, basandosi su una precedente classificazione proposta da de Boer. Nella Figura 2.5, viene presentata la classificazione IUPAC delle isteresi. Secondo questa classificazione, il tipo H_1 è associato spesso a materiali porosi con canali porosi di forma cilindrica ben definiti o aggregati di sfere approssimativamente uniformi. Il tipo H_2 è attribuito a materiali disordinati in cui la distribuzione delle dimensioni e delle forme dei pori non è ben definita, ed è spesso indicativo di restrizioni nel collo di bottiglia. L'isteresi di tipo H_3 è associata a pori in posizione interstiziale e aggregati di particelle disposti in foglietti e questa configurazione può creare una serie di fessure e canali che influenzano l'adsorbimento e il rilascio dell'adsorbato durante il processo. La tipologia di isteresi IV è caratterizzata dalla presenza di pori a fessura stretta nel materiale poroso. Durante l'adsorbimento, la curva mostra un rapido incremento dell'adsorbimento fino a raggiungere un plateau. Durante la fase di desorbimento, la curva di desorbimento può presentare una pendenza significativa, indicando una maggiore difficoltà nel rilascio dell'adsorbato dai pori a fessura stretta. Questo fenomeno è spesso attribuito alla condensazione capillare, in cui l'adsorbato si accumula nelle fessure più strette del materiale poroso [40] [43].

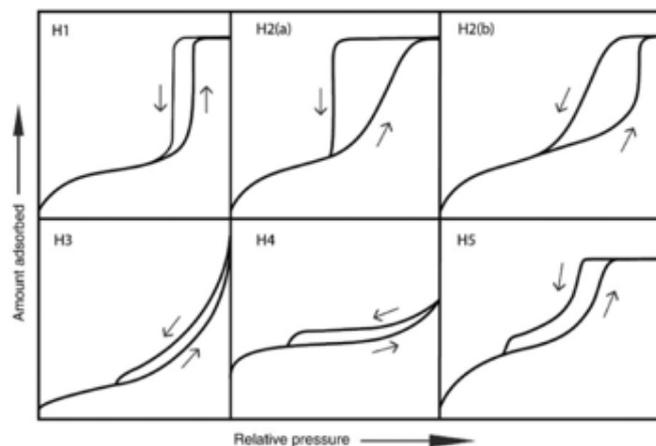


Figura 2.8 Classificazione dei capi di isteresi[40]

Prima di effettuare l'analisi, si effettua un pretrattamento di due ore a 200°C, alle burette contenenti i campioni funzionalizzati e non, sfruttando un flusso di azoto. Questa procedura ha lo scopo di eliminare le molecole di acqua e altri contaminanti atmosferici che potrebbero essere presenti sulla superficie del materiale. Successivamente, viene eseguito un ciclo di adsorbimento e desorbimento utilizzando un apparecchio chiamato Micrometrics TriStar II, alla temperatura di liquefazione dell'azoto (-196°C). L'area superficiale dei campioni viene determinata utilizzando il software dell'apparecchiatura, mediante l'equazione (2.4) BET (Brunauer-Emmett-Teller). Questa equazione fornisce una stima dell'area superficiale del materiale in base ai dati ottenuti durante il ciclo di adsorbimento e desorbimento. L'equazione è espressa come:

$$\frac{P}{v \times (p^0 - p)} = \frac{c-1}{v_m \times c} \left(\frac{p}{p^0} \right) + \frac{1}{v_m \times c} \quad (2.4)$$

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 il calcolo della costante BET si utilizza la seguente equazione [40]:

$$c = \exp\left(\frac{E_1 - E_L}{RT}\right) \quad (2.5)$$

$E_1 \rightarrow$ Calore di adsorbimento del primo strato

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

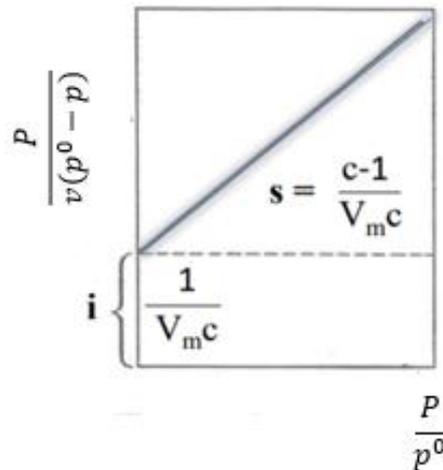


Figura 2.9 Rappresentazione grafica Equazione BET [40]

Mettendo a sistema l'intercetta (i) e la pendenza (s) della retta rappresentata in figura 2.6 si ricava v_m . Conoscendo il volume occupato dalle moli che costituiscono il monolayer, si passa attraverso il numero di Avogadro, e si calcola il numero di molecole che formano il monolayer. Considerando che ogni molecola adsorbita occupa una certa area sulla superficie, e conoscendo l'area occupata da una singola molecola tramite appositi calcoli, possiamo ottenere l'area del monolayer, ovvero l'area superficiale. Dividendo l'area superficiale per la massa dell'adsorbente, otteniamo l'area superficiale specifica. In questo modo è possibile quantificare la quantità di superficie disponibile per l'adsorbimento di molecole sul materiale [40].

$$S = N_m \times A \quad (2.6)$$

$S \rightarrow$ Area superficiale

$N_m \rightarrow$ Numero di molecole al monolayer

$A \rightarrow$ Area occupata dalla molecola

$$S_{BET} = \frac{S}{m(g)} \quad (2.7)$$

S_{BET} → Area superficiale specifica BET

m → massa dell'adsorbente

2.3.3 Diffrazione a raggi X (XRD)

La diffrazione a raggi X (XRD) è una tecnica utilizzata per studiare la struttura cristallina dei materiali. Quando i raggi X interagiscono con un materiale cristallino, vengono diffratti in diverse direzioni a causa dell'interferenza costruttiva e distruttiva delle onde di raggi X che interagiscono con gli atomi del reticolo cristallino. Questo fenomeno produce un diagramma di diffrazione la cui interpretazione può fornire informazioni dettagliate sulla dimensione dei microcristalli, presenza di difetti cristallini e valutazione delle fasi presenti. Il principio di base coinvolto nel fenomeno della diffrazione è l'interazione di un fascio di elettroni ad alta energia con un solido cristallino, che porta alla generazione di raggi X con lunghezze d'onda comparabili alle distanze atomiche nel cristallo. In particolare, quando un fascio di elettroni accelerato attraverso un alto voltaggio colpisce una lamina di rame, si verifica un fenomeno in cui gli elettroni vengono espulsi dagli atomi di rame e gli elettroni rimanenti si riorganizzano da uno stato più esterno a un più interno, rilasciando dell'energia sotto forma di raggi X. Questi raggi X vengono quindi filtrati per produrre una radiazione monocromatica e direzionati verso il solido da analizzare con un certo angolo di incidenza[44]. Quando i raggi X incidenti interagiscono con la struttura cristallina del campione, vengono diffratti in accordo con l'equazione di Bragg (2.8). Questa equazione descrive la relazione tra l'angolo di diffrazione, la lunghezza d'onda dei raggi X e la distanza reticolare nel cristallo ed è applicabile solo quando si verifica un'interferenza costruttiva, ovvero quando la differenza di percorso ottico causata dalla diffrazione è un multiplo intero della lunghezza d'onda dei raggi X. Misurando l'angolo di diffrazione e conoscendo la lunghezza d'onda dei raggi X utilizzati, è possibile determinare le distanze atomiche nel cristallo e ottenere informazioni sulla sua struttura cristallina [45].

$$n \times \lambda = 2 \times d \times \sin\theta \quad (2.8)$$

$n \rightarrow$ Ordine di diffrazione ($n=1,2,\dots,d$)

$\lambda \rightarrow$ Lunghezza d'onda del raggio incidente

$d \rightarrow$ Distanza tra i piani cristallini adiacenti

$\theta \rightarrow$ Angolo di diffrazione

quando la differenza di percorso ottico tra i raggi X diffratti da due piani cristallini consecutivi è un multiplo intero della lunghezza d'onda, si avrà un'intensità di diffrazione massima. Questo corrisponde a picchi di diffrazione ben definiti nel diagramma di diffrazione. Tuttavia, se la differenza di percorso ottico non è un multiplo intero della lunghezza d'onda, si verificherà un'interferenza distruttiva, e l'intensità di diffrazione sarà ridotta o annullata. In questo caso, non si osserveranno picchi di diffrazione distinti.

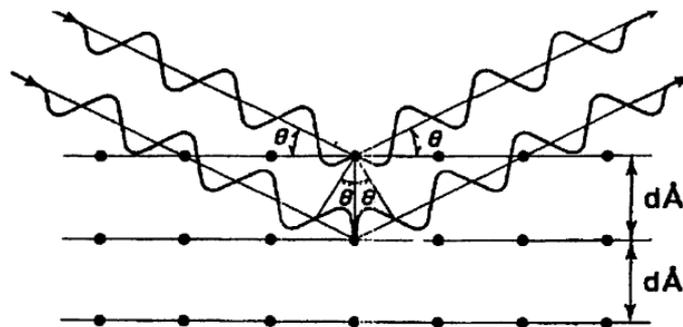


Figura 2.10 Rappresentazione schematica della legge di Bragg

I raggi X emessi con un determinato angolo di incidenza θ hanno una lunghezza d'onda simile alla distanza tra i piani cristallini nel materiale mentre l'intensità del segnale di diffrazione varia al variare dell'angolo di incidenza (θ) e mostra picchi correlati alla disposizione e alla distanza dei piani atomici. In genere, per materiali con una struttura cristallina ordinata, vengono utilizzati angoli di diffrazione (2θ) compresi tra 20° e 80° . Tuttavia, per materiali mesoporosi con pori ordinati periodicamente, si utilizzano valori bassi di 2θ ($2\theta < 3^\circ$) [22]. Per condurre le analisi desiderate, è stato utilizzato un diffrattometro Empyrean 3.0. La radiazione utilizzata per i campioni SBA-15_{0,75} ed MCF_{0,75} era Cu $K\alpha$, con valori di 2θ inferiori a 3° (2θ compreso tra $0,2^\circ$ e 5°). Per acquisire i dati di diffrazione, è stato utilizzato uno step angolare di 0,013. Per i campioni DPS e DPS_{0,75}, invece, è stata utilizzata una radiazione Cu $K\alpha$ con un angolo di diffrazione 2θ compreso tra 10° e 50° .

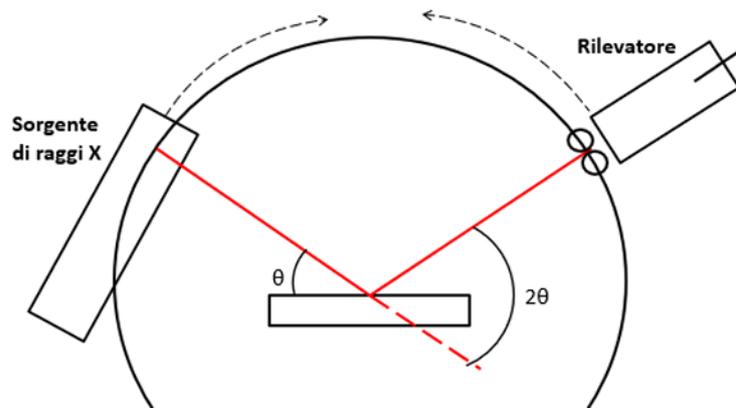


Figura 2.11 Schema di funzionamento diffrattometro

Per le strutture regolari come l'SBA-15 è possibile valutare alcuni parametri di cella [22]:

$$d_0 = \frac{\lambda}{2 \times \sin \theta} \quad (2.9)$$

$$a_0 = \frac{2 \times d_0}{\sqrt{3}} \quad (2.10)$$

$$\delta = a_0 - d_{p,BJH} \quad (2.11)$$

$d_0 \rightarrow$ Distanza inter-reticolare

$\lambda \rightarrow$ Sorgente $K\alpha_1$ (1,540598 Å)

$\theta \rightarrow$ Angolo di diffrazione in corrispondenza del picco

$a_0 \rightarrow$ Parametro di cella

$\delta \rightarrow$ Spessore della parete

$d_{p,BJH} \rightarrow$ Diametro dei pori valutato con il metodo BJH

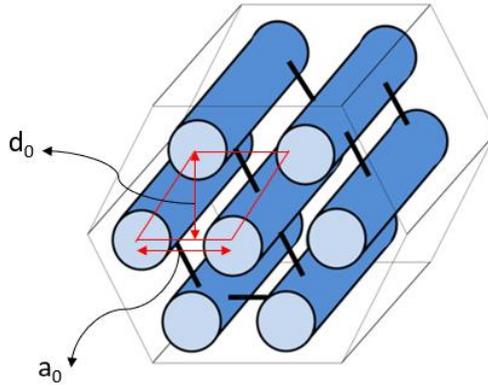


Figura 2.12 Schema dei parametri di cella (100) SBA-15

2.3.4 Microscopio elettronico a scansione ad alta risoluzione (FESEM)

La microscopia elettronica a scansione ad alta risoluzione (FESEM, Field-Emission Scanning Electron Microscopy) è una tecnica avanzata di imaging che sfrutta un fascio di elettroni focalizzato per ottenere immagini ad alta risoluzione della superficie di un campione. Questa tipologia di analisi è stata effettuata sui campioni scelti e sintetizzati in questo lavoro di tesi, in modo da ottenere informazioni più dettagliate sulla morfologia dei supporti. Il FESEM si differenzia dalla microscopia ottica convenzionale in quanto utilizza un fascio di elettroni anziché la luce per generare l'immagine. Questo consente di superare il limite di risoluzione ottica, consentendo l'osservazione di dettagli molto più piccoli. [46]. Il funzionamento di un FESEM si basa su una serie di colonne con lenti elettromagnetiche e delle aperture. Un fascio di elettroni è focalizzato dalle lenti elettromagnetiche e dalle aperture della colonna per formare un punto molto piccolo e nitido. Gli elettroni primari, generati dalla sorgente di emissione di campo, vengono deflessi e bombardano il campione. Per rendere i campioni conduttivi e consentire la diffusione degli elettroni emessi su di essi, generalmente si applica uno strato di platino con uno spessore inferiore a 5 nm. Da ogni punto del campione, vengono generati ed emessi elettroni secondari, che sono il risultato di un numero molto elevato di urti e cessioni di energia, con un angolo di emissione ed una velocità che dipendono dalla struttura superficiale dell'oggetto [47]. L'angolo e la velocità di questi elettroni secondari, rilevati da un rivelatore, forniscono informazioni sulla morfologia del campione. Uno dei vantaggi principali del FESEM è la sua capacità di fornire immagini ad alta risoluzione con ingrandimenti molto elevati. Questo permette di esaminare la struttura superficiale del campione fino ai dettagli a scala nanometrica. Inoltre, il FESEM offre una profonda profondità di campo, consentendo di mantenere la chiarezza dell'immagine anche su campioni con una superficie irregolare o tridimensionale.

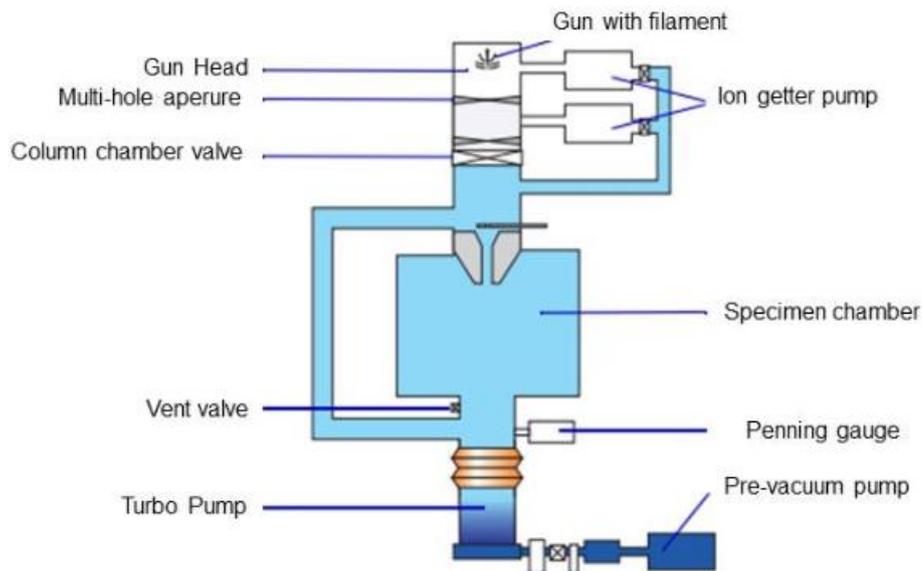


Figura 2.13 Rappresentazione schematica FESEM [47]

Oltre all'imaging a risoluzione superficiale, il FESEM può essere utilizzato per eseguire diverse analisi e caratterizzazioni. Ad esempio, con l'ausilio di rivelatori appropriati, è possibile eseguire analisi spettrali come lo spettro di energia dispersiva (EDS) o la spettroscopia di perdita di energia degli elettroni (EELS) per determinare la composizione chimica del campione o identificare specifici elementi.

2.4 Immobilizzazione dell'LDH

In questa sezione, viene fornita una descrizione della tecnica di immobilizzazione covalente multipunto utilizzata sui supporti che sono stati sintetizzati in precedenza e funzionalizzati con APTES e GPTMS. Sono state eseguite due diverse immobilizzazioni per ogni supporto, una utilizzando il PEG (polietilenglicole) come agente stabilizzante dell'enzima e l'altra utilizzando il trealosio. I risultati ottenuti sono stati differenti per ciascun supporto. Il processo di immobilizzazione enzimatica viene eseguito in due fasi distinte. Nella prima fase, viene utilizzata una soluzione basica di tampone bicarbonato che permette all'enzima di interagire con il supporto con la quale forma un legame di Schiff. Nella seconda fase, utilizzando il boroidruro di sodio (NaBH_4), il legame di Schiff viene ridotto e trasformato in un legame covalente stabile [48]. Al termine delle immobilizzazioni effettuate, conoscendo la concentrazione dell'enzima in soluzione all'inizio e al termine dell'immobilizzazione, è possibile determinare la resa di immobilizzazione percentuale e, di conseguenza, la quantità di enzima che si è legata al supporto [36]

$$IY = \frac{C_{enz,in} - C_{enz,fin}}{C_{enz,in}} \times 100 \quad (2.12)$$

$IY \rightarrow$ Resa di immobilizzazione enzimatica percentuale

$C_{enz,in} \rightarrow$ Concentrazione dell'enzima in soluzione all'inizio dell'immobilizzazione

$C_{enz,fin} \rightarrow$ Concentrazione dell'enzima in soluzione al termine dell'immobilizzazione

2.4.1 Immobilizzazione su supporto etero-funzionalizzato

Si riportano in seguito i passaggi relativi all'immobilizzazione su un supporto con gruppi funzionali amminici e aldeidici, riformulando in parte il metodo descritto da Pietricola *et al.* [22][36] per l'immobilizzazione dell'FDH. Nella prima fase si è preparato in un becher la soluzione di carbonato buffer 25 mM pH 9 e PEG 50ppm. Una volta disciolto lo stabilizzante nel buffer, viene aggiunto l'enzima e dopo pochi minuti si preleva un campione di LDH libero in modo da monitorare l'evoluzione dell'attività durante il tempo di immobilizzazione. Successivamente vengono aggiunti 200 mg di supporto etero-funzionalizzato in modo da ottenere una carica enzimatica di 1 mg_{enz}/g_{sup}. La reazione si svolge con una delicata agitazione a una temperatura compresa tra 4°C e 10 °C. Dopo i primi 15 minuti di reazione, si preleva il primo campione e, successivamente, uno ogni 15 minuti. L'attività enzimatica viene valutata come assorbanza, in Time Course su 60s a 340nm, sulle sospensioni prelevate. Per il test vengono preparate in delle cuvette delle soluzioni contenenti 2,7 ml di buffer fosfato 0,1 M e pH 7,5, 100 µL di soluzione di piruvato a 49 mM, 100 µL di soluzione di NADH a 7 Mm e 100 µL del campione prelevato ad intervalli di 15 minuti. Dopo aver centrifugato il campione a 1000 rpm per 2 minuti, in modo da separare il surnatante dal supporto, si effettua lo stesso test sulla soluzione ottenuta seguendo i passaggi precedenti ma aggiungendo 100 µL di surnatante al posto della sospensione. La reazione prosegue fino a quando l'attività enzimatica in soluzione (nel surnatante) si avvicina a zero o fino a quando si ottengono due misurazioni successive uguale. Al termine di questa prima fase, in cui i gruppi amminici generati sulla superficie del supporto favoriscono l'adsorbimento fisico dell'enzima, creando legami deboli che da soli non sarebbero sufficienti per legare l'enzima al supporto per un lungo periodo di tempo [49], si aggiunge alla soluzione il buffer carbonato pH 9 25 mM in modo da avere 20 ml di soluzione finale a cui aggiungere 2 mg di boroidruo di sodio NaBH₄. Si lascia reagire per circa 15 minuti con una delicata agitazione ed una temperatura compresa tra 4°C e 10°C in modo che le basi di Schiff vengano ridotte in un singolo legame covalente stabile. Al termine di questa ultima reazione, il supporto viene filtrato, lavato con buffer fosfato pH 7,5 25 Mm e acqua Milli-Q in abbondanza e conservato in un essiccatore in frigo

[36]. Lo stesso procedimento è stato eseguito utilizzando il trealosio come stabilizzante, con una concentrazione di 300 mM.

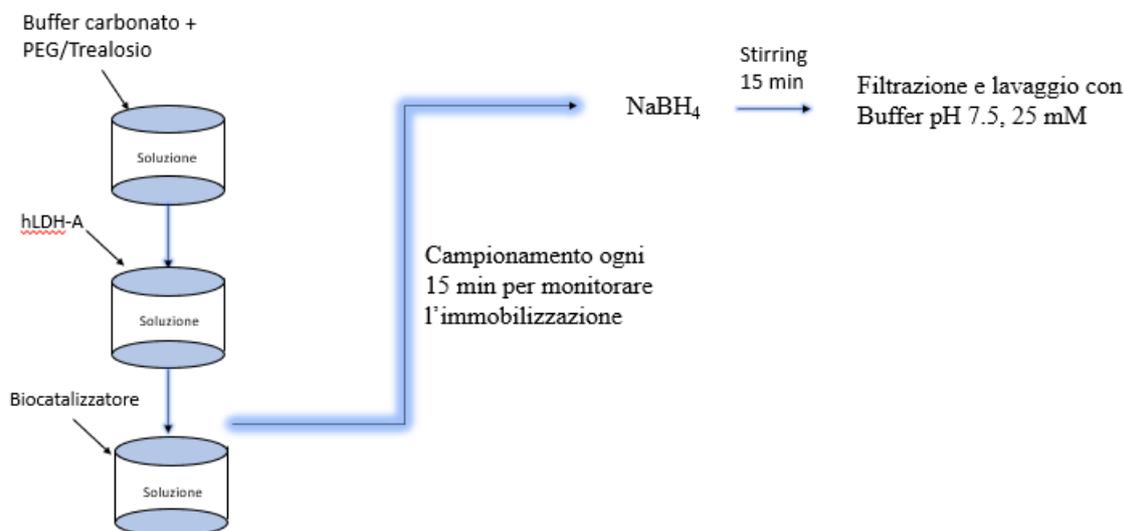


Figura 2.14 Schema seguito per l'immobilizzazione dell'hLDH-A

2.4.2 Saggio di attività dell'enzima immobilizzato

Per misurare l'attività enzimatica dell'hLDH-A, sia nella sua forma libera che immobilizzata, si utilizza lo stesso spettrofotometro adoperato in precedenza, ad una lunghezza d'onda di 340 nm. L'enzima LDH catalizza la reazione di conversione del cofattore NADH in NAD⁺ insieme alla conversione di piruvato in lattato. Durante questa reazione, il NADH assorbe a 340nm. Dunque, per effettuare la misurazione dell'attività enzimatica, si monitora la diminuzione di assorbanza dovuta alla formazione di NAD⁺ [50]. Il test consiste nell'aggiungere 1 ml di buffer fosfato pH 7,5 0.1 M a 20 mg di biocatalizzatore pesato. La soluzione viene quindi miscelata utilizzando un vortex e ne vengono prelevati 100 µL che vengono testati in una cuvette contenente 2,7 ml di buffer pH 7,5, 100 µL di una soluzione di NADH a 7 mM e 100 µL di una soluzione di piruvato a 49mM. Durante l'analisi tutto viene mantenuto alla temperatura fisiologica di circa 36°C, in agitazione. L'attività enzimatica è espressa in Unità Internazionali (UI) e rappresenta la quantità di enzima richiesta per catalizzare la trasformazione di 1 µMole di substrato per grammo di biocatalizzatore al minuto, in specifiche condizioni di temperatura, pH e concentrazione di substrato. I valori di attività vengono registrati in Time Course su 60s per tre campioni in modo da definire meglio l'errore che influisce sulle misurazioni. L'equazione utilizzata è la seguente:

$$A_{ie} = \frac{\Delta Abs}{\Delta t} \times \frac{1}{\varepsilon} \times \frac{V}{m_{sup}} \quad (2.13)$$

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 mM⁻¹*cm⁻¹*1 cm)

V → Volume della soluzione di reazione

m_{sup} → Massa del supporto

Tuttavia, si calcola un parametro supplementare con l'obiettivo di confrontare in modo universale tutti i tipi di immobilizzazioni in termini di attività rispetto alla LDH libera. L'attività di quest'ultima è calcolata seguendo la procedura menzionata precedentemente ma sostituendo ai 100 µL di sospensione con il biocatalizzatore la soluzione con l'enzima libero. Secondo l'equazione (2.14), l'attività enzimatica relativa percentuale (Retained Activity) può essere definita come segue [22]:

$$R_{act} = \frac{A_{IE}}{q \times A_{FE}} \times 100 \quad (2.14)$$

R_{act} → Attività enzimatica relativa percentuale

A_{IE} → Attività dell'enzima immobilizzato

q → Carica enzimatica sul supporto

A_{FE} → Attività dell'enzima libero

2.4.3 Test di pH e temperatura ottimale dell'enzima immobilizzato

Il test di pH e temperatura ottimale dell'enzima immobilizzato viene effettuato sul campione che mostra la maggiore attività enzimatica percentuale tra i quattro campioni sottoposti all'immobilizzazione utilizzando trealosio e PEG come stabilizzanti. L'obiettivo del test è di determinare le condizioni di lavoro ottimali per l'enzima immobilizzato in termini di pH e temperatura. Durante l'analisi, l'attività dell'enzima immobilizzato viene valutata alle diverse temperature di 25°C, 45°C e 65°C e a pH compresi tra 5 e 11 in modo da coprire un'ampia gamma

di condizioni operative. La procedura del test è simile a quella utilizzata per il calcolo dell'attività dell'enzima immobilizzato. Inizialmente, sono stati miscelati 2,7 mL del buffer specifico per la prova di temperatura e pH desiderati, come preparato in precedenza, con 100 µL di una soluzione di piruvato a 49 mM, 100 µL di una soluzione di NADH a 7 mM e 100 µL della sospensione contenente l'enzima immobilizzato. Vengono preparate, anche in questo caso, tre cuvette per ogni combinazione di temperatura e pH, ovvero vengono effettuate tre prove consecutive per ogni specifica combinazione di temperatura e pH. Questo approccio triplicato garantisce la riproducibilità e la precisione dei risultati.

2.4.4 Test di stabilità termica dell'enzima immobilizzato

Per caratterizzare al meglio le prestazioni del campione che mostra la maggiore attività enzimatica percentuale, si effettua un test per valutare la stabilità termica dell'enzima immobilizzato. In questo test, un cristallizzatore con acqua viene portato alla temperatura di 45°C e il biocatalizzatore, all'interno di un tubo Eppendorf, viene immerso nell'acqua per un periodo di 72 ore. La prima misurazione viene effettuata al tempo 0, quando la temperatura non ha ancora alcun effetto sull'enzima, e successivamente vengono eseguite misure dopo intervalli di 2, 4, 7, 18, 24, 48, 66 e 72 ore dal tempo 0. Anche in questo caso, l'assorbanza si registra a una lunghezza d'onda di 340 nm per 60s. Per ogni cuvette, si miscelano 2,7 mL di buffer pH 7,5 con 100 µL di una soluzione di piruvato a 49 mM e 100 µL di una soluzione di NADH a 7 mM. La diminuzione dell'attività dell'enzima viene valutata in base alla percentuale di attività residua rispetto a quella misurata all'inizio dell'esperimento. Per descrivere questo fenomeno di disattivazione enzimatica, è stato utilizzato un modello cinetico di tipo del primo ordine [36].

$$A = A_0[(1 - \alpha) \times e^{-k_D * t} + \alpha] \quad (2.15)$$

A → Attività in un qualsiasi momento t

A₀ → Attività iniziale

α → Valore asintotico a cui tende l'attività per un tempo infinito

K_d → Costante di disattivazione

t → tempo

2.4.5 Prove di riutilizzo

Per valutare le prestazioni del biocatalizzatore migliore viene condotto un test di riutilizzo. Inizialmente, viene preparata in un becher una soluzione contenente buffer fosfato 0,1 M a pH 7,5, NADH a 7 mM, piruvato a 49mM e il biocatalizzatore. Successivamente, ogni 10 minuti, vengono prelevati 600 μ L della soluzione che viene lasciata a reagire per 60 minuti in leggera agitazione. Dopo aver centrifugato, a 10000 rpm per 4 minuti, viene monitorata la diminuzione dell'assorbanza del NADH, correlata alla formazione di NAD^+ , presente nel surnatante del campione prelevato. Alla fine del test il biocatalizzatore viene recuperato e lasciato ad essiccare, in modo da poter effettuare la stessa analisi una seconda volta. Per poter valutare nel tempo la concentrazione di NADH presente nel becher, è stata precedentemente costruita una retta di taratura misurando l'assorbanza di diverse soluzioni costituite da 2,7 mL di buffer a pH 7,5 e 100 μ L di NADH a diverse concentrazioni.

2.4.6 Immobilizzazione dell'LDH marcata con fluorescenza

Per eseguire questo tipo di analisi la lattato deidrogenasi è stata colorata secondo le istruzioni fornite nel kit di marcatura ATTO 550, acquistato su Merck. Il marcatore fluorescente appartiene alla famiglia delle rodamine e le sue caratteristiche sono il forte assorbimento, l'elevata resa quantica della fluorescenza e l'elevata stabilità termica e fotochimica. Il colorante è moderatamente idrofilo e la sua fluorescenza viene eccitata in modo più efficiente nell'intervallo 540-565 nm. Al fine di preservare le prestazioni del colorante, sia la procedura di colorazione che quella di immobilizzazione dell'enzima vengono eseguite al buio. Per il labeling il colorante, solubile nel dimetilsolfossido (DMSO), viene aggiunto ad una soluzione contenente l'enzima, con una concentrazione di 0,8 mg/mL, e buffer bicarbonato di sodio a pH 9,5. Il tutto viene posto in leggera agitazione per due ore. Successivamente, l'enzima marcato con fluorescenza viene purificato utilizzando una colonna di filtrazione su gel e successivamente immobilizzato sul supporto migliore.

2.5 Inibizione dell'LDH

Al fine di valutare l'efficacia del biocatalizzatore nei confronti dei farmaci inibitori dell'LDH, viene condotto un test di inibizione utilizzando il farmaco NHI-2. Il NHI-2 fa parte dei composti a base di NHI, noti per essere inibitori reversibili e competitivi nei confronti del piruvato e dell'NADH, come descritto nella sezione 1.4.1. Per ottenere una valutazione completa dell'inibizione, il test viene eseguito sia sull'LDH libero che sull'enzima immobilizzato.

2.5.1 Inibizione dell'enzima libero

Nella prima fase, vengono valutate le percentuali di inibizione sull'enzima libero utilizzando l'NHI-2. A questo scopo, vengono analizzate diverse concentrazioni dell'inibitore al fine di identificare quella più efficace sull'enzima: 30 μM , 20 μM , 10 μM e 5 μM . A tal scopo, vengono preparate cuvette contenenti 2,7 mL di buffer fosfato a pH 7,5, 100 μL di soluzione di NADH a 7 mM, 100 μL di soluzione di piruvato a 49 mM e 100 μL di soluzione di buffer fosfato contenente l'enzima libero con una concentrazione di 0,01 mg/mL. Prima di procedere con il test dell'inibitore, viene valutata l'attività dell'enzima in presenza di dimetilsolfossido (DMSO) per determinare se questo ha un effetto di inibizione sull'enzima libero. Ciò è importante poiché la soluzione contenente l'NHI-2 viene preparata sciogliendo il farmaco nel dimetilsolfossido o nell'etanolo, in quanto è solubile in questi solventi. Le cuvette per l'analisi vengono preparate come descritto in precedenza, con l'aggiunta di 20 μL di DMSO. Successivamente, viene valutata l'attività dell'enzima in presenza del farmaco nelle diverse concentrazioni menzionate in precedenza, aggiungendo alle cuvette preparate come descritto in precedenza, 20 μL del farmaco disciolto in DMSO. Per calcolare la percentuale di inibizione enzimatica dell'LDH libero in soluzione si utilizza la seguente equazione:

$$I\% = \frac{A_{LDH \text{ libero}} - A_{LDH \text{ libero, NHI-2}}}{A_{LDH \text{ libero}}} \times 100 \quad (2.16)$$

I \rightarrow Inibizione relativa percentuale

$A_{LDH \text{ libero}}$ \rightarrow Attività LDH libero in assenza di NHI-2

$A_{LDH \text{ libero, NHI-2}}$ \rightarrow Attività LDH in presenza di NHI-2

Le attività $A_{LDH \text{ libero}}$ e $A_{LDH \text{ libero, NHI-2}}$ vengono calcolate con l'equazione descritta nella sezione 2.4.2:

$$A_{LDH\text{libero}/\text{con NHI-2}} = \frac{\Delta Abs}{\Delta t} \times \frac{1}{\epsilon} \times \frac{V}{m_{pro}} \quad (2.17)$$

$A_{LDH\text{libero}/\text{con NHI-2}}$ → Attività dell'enzima libero senza NHI-2 e con NHI-2

$\frac{\Delta Abs}{\Delta t}$ → Variazione assorbanza in 60s

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

V → Volume della soluzione di reazione espressa in mL

m_{pro} → Massa dell'enzima in soluzione espressa in mg

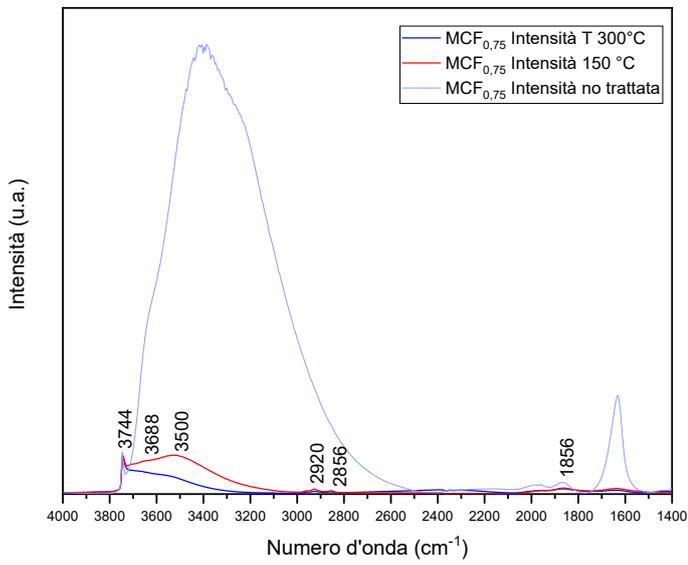
2.5.2 Inibizione dell'enzima immobilizzato

Il medesimo procedimento viene eseguito per l'inibizione dell'enzima immobilizzato. Vengono pesati 20 mg di biocatalizzatore e miscelati con 1 mL di buffer a pH 7,5. Vengono testati nelle cuvette 100 µL di questa sospensione con 2,7 mL di buffer fosfato a pH 7,5, 100 µL di soluzione di NADH a 7 mM, 100 µL di soluzione di piruvato a 49 mM con l'aggiunta di 20 µL di NHI-2 alle diverse concentrazioni utilizzate per l'enzima libero. Dopo aver effettuato i test, si utilizza l'equazione (2.16) per calcolare l'inibizione percentuale relativa, mentre le attività vengono calcolate utilizzando l'equazione (2.17), andando a sostituire alla massa dell'enzima in soluzione la massa del biocatalizzatore.

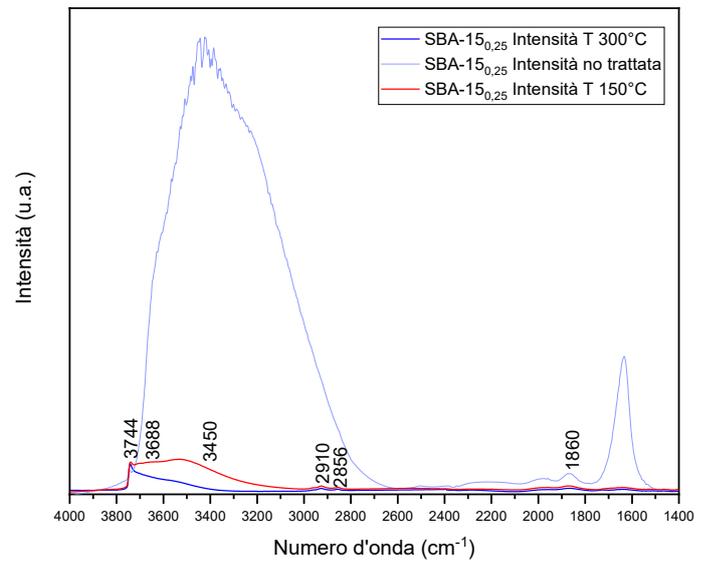
3. Discussione dei risultati

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

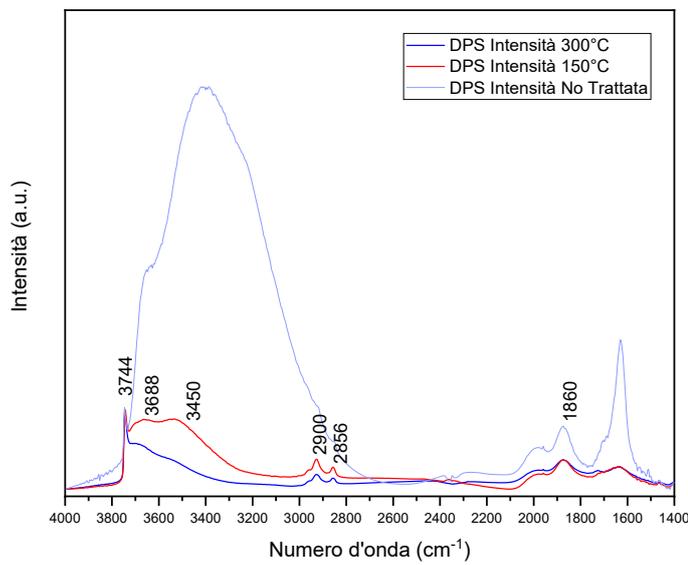
Nella Figura 3.1 e 3.2 sono riportati gli spettri ottenuti mediante analisi FTIR su quattro campioni sintetizzati. L'analisi è stata condotta su campioni funzionalizzati e non funzionalizzati, sia non pretrattati che pretrattati alle temperature di 150 °C e 300 °C. I pretrattamenti vengono effettuati per rimuovere l'acqua e le impurità presenti al fine di evidenziare i picchi nell'intervallo di 4000-1300 cm^{-1} . Tutti e quattro i campioni non funzionalizzati, pretrattati a 150 °C mostrano il picco a 3744 cm^{-1} caratteristico dei silanoli isolati, mentre i picchi compresi nell'intervallo 3668-3377 cm^{-1} sono relativi allo stretching degli OH di Si-OH coinvolti nei fenomeni di adsorbimento. Dopo il pretrattamento a 300°C le ultime due bande diminuiscono di intensità a causa della progressiva deidrossilazione superficiale ed il picco a 3744 cm^{-1} diventa prominente [51]. Inoltre, negli spettri dei campioni non funzionalizzati, sono presenti dei picchi più o meno intensi, nell'intervallo 2900-2856 cm^{-1} , dovuti alla presenza di catene carboniose derivanti dalla presenza del templante, utilizzato nella sintesi, non totalmente rimosso durante la calcinazione. Nella Figura 3.2, i campioni funzionalizzati presentano un diverso spettro rispetto ai campioni non funzionalizzati. Non si osserva più il picco caratteristico del silanolo isolato a 3744 cm^{-1} , ma quello relativo al bending del legame -NH e allo stretching del legame C=O, mentre i picchi relativi allo stretching del -CH (2900-2856 cm^{-1}), presenti anche sui campioni non funzionalizzati, diventano più intensi a seguito dell'utilizzo durante la fase di funzionalizzazione degli organosilani APTES e GPTMS. Questi picchi indicano l'avvenuta eterofunzionalizzazione, i cui dettagli sono riassunti nella tabella 3.1.



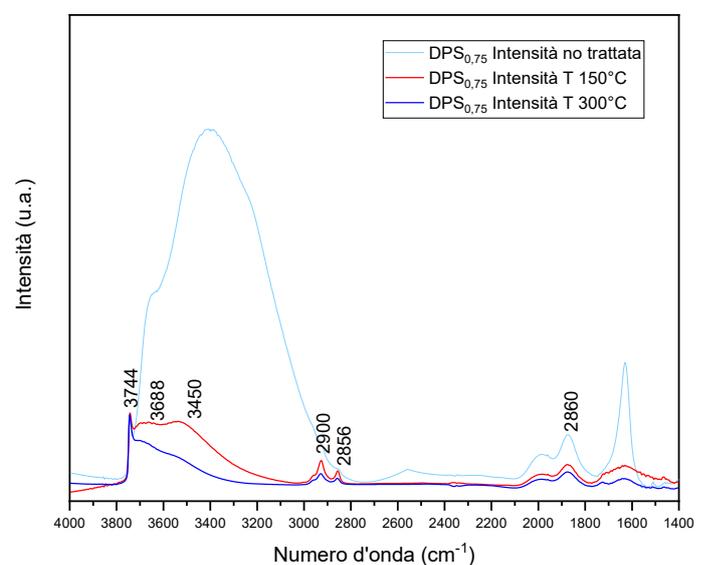
(a)



(b)

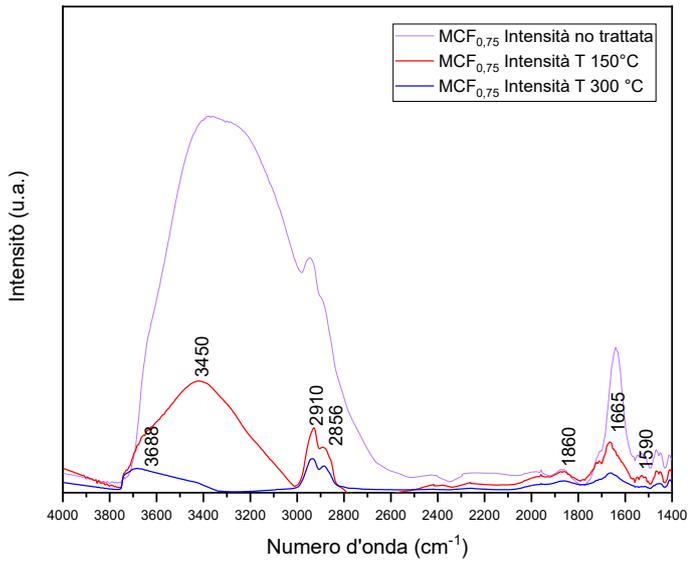


(c)

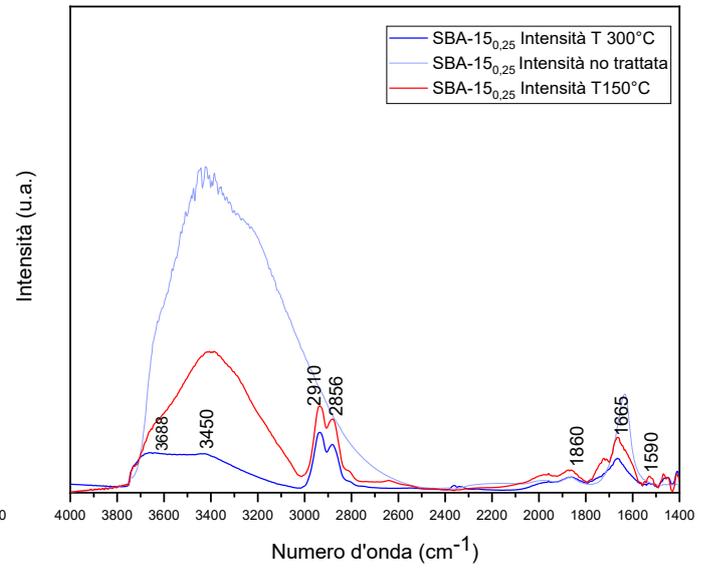


(d)

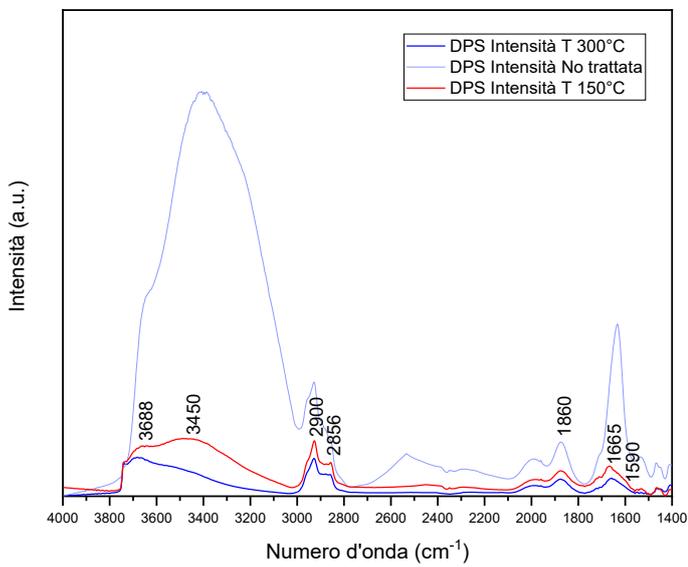
Figura 3.1 Spettri FTIR dei campioni non funzionalizzati (a) MCF_{0.75} (b) SBA-15_{0.25} (c) DPS (d) DPS_{0.75}



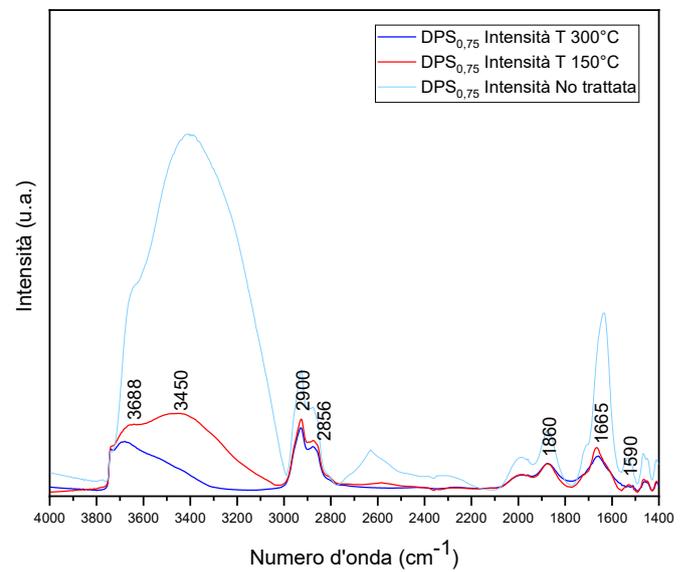
(a)



(b)



(c)



(d)

Figura 3.2 Spettri FTIR dei campioni funzionalizzati (a) MCF_{0.75} (b) SBA-15_{0.25} (c) DPS (d) DPS_{0.75}

Numero d'onda (cm ⁻¹)	Assegnazione banda
3744	Si-OH isolati
3688, 3422 e 3377	Stretching -OH di Si-OH coinvolti nei fenomeni di adsorbimento/ stretching gruppi funzionali
3000-2800	Stretching -CH di APTES e GPTMS
2934-2869	Stretching CH in -CH ₂ - e -CH ₃ -
1665	Bending -NH e Stretching C=O
1500-1650	Bending -NH
820-750	Stretching O-Si-O
1860	Vibration Si-O-Si

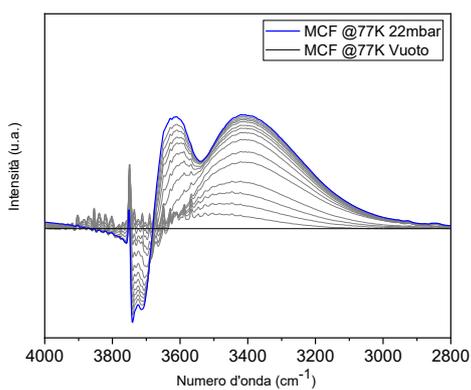
Tabella 3.1 Assegnazione delle bande degli spettri FTIR dei campioni

Per valutare meglio la natura degli ossidrili superficiali, si studia l'adsorbimento di CO alla temperatura dell'azoto liquido. Il monossido di carbonio (CO) è ampiamente utilizzato come molecola sonda per rilevare la presenza e la natura dei siti acidi di Lewis e dei siti di Bronsted. La figura 3.3 mostra gli spettri ottenuti per tutti e quattro i campioni pretrattati in vuoto a 150°C. Questi spettri sono ottenuti sottraendo dagli spettri, ricavati a pressioni di CO via via crescenti, lo spettro ottenuto inizialmente in vuoto a 77K. Vengono considerati due intervalli: quello del modo di stretching del gruppo idrossilico $\nu(\text{OH})$ (intervallo 400-2800 cm⁻¹) e quello del modo di stretching del CO $\nu(\text{CO})$ (intervallo 2250-2050 cm⁻¹). Le bande negative e positive corrispondono rispettivamente alle specie che scompaiono e si formano dall'interazione con il CO [51]. Dopo il dosaggio di CO sui campioni, si osservano due bande negative, nella regione di stretching dell'OH (4000-2800 cm⁻¹), a circa 3744 e 3715 cm⁻¹ (picchi caratteristici di silanoli isolati e terminali) dei silanoli che interagiscono con le molecole di CO. Quando quest'ultimi interagiscono con la CO, mediante legame a idrogeno, si verifica uno spostamento verso numeri d'onda inferiori con formazione di una nuova banda di assorbimento IR. Questo spostamento $\Delta\nu$ è una misura dell'acidità degli idrossili, maggiore è questo spostamento più gli ossidrili sono acidi. Nel caso presente, gli spostamenti $\Delta\nu$ misurati, per ogni campione ad una pressione maggiore di CO, relativi ai silanoli isolati ($\nu=3744$ cm⁻¹) e terminali ($\nu=3715$) cm⁻¹, sono gli stessi di quelli normalmente osservati sulla superficie di silici amorfe [51]. Nella tabella 3.3, si evidenzia come i valori di spostamento $\Delta\nu$ dell'MCF_{0,75} risultino superiori rispetto agli altri campioni, indicando una maggiore acidità rispetto agli altri supporti. La banda a 2156 cm⁻¹ è dovuta allo stretching delle molecole di CO che interagiscono tramite il legame a idrogeno con i silanoli, mentre il picco a 2138 cm⁻¹ è dovuto alla

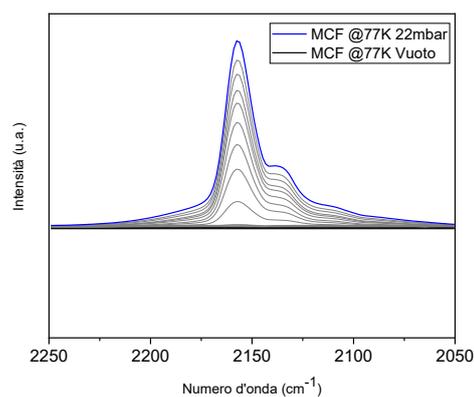
CO fisisorbita [52]. L'interazione della CO con gli ossidrilici è reversibile, le molecole di CO vengono desorbite a pressioni via via decrescenti recuperando lo spettro IR iniziale.

	$\Delta\nu$ (Silanoli isolati)	$\Delta\nu$ (Silanoli terminali)
MCF_{0,75}	127	304
SBA-15_{0,25}	113	278
DPS	107	248
DPS_{0,75}	116	243

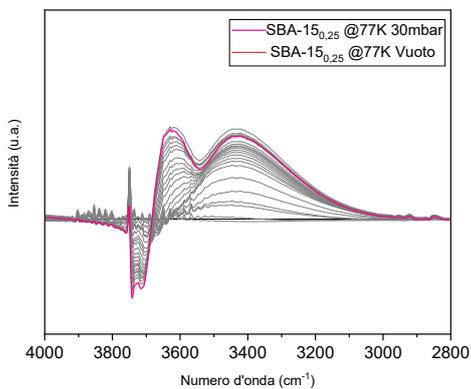
Tabella 3.3 Risultati relativi agli shift $\Delta\nu$ misurati per ogni campione



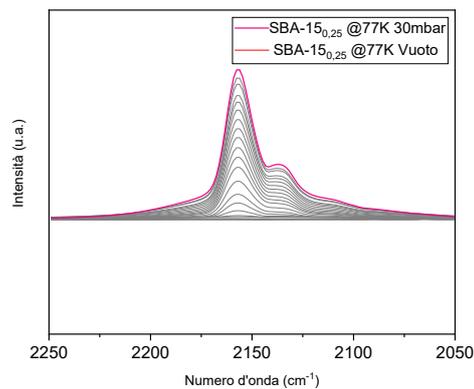
(a)



(b)



(c)



(d)

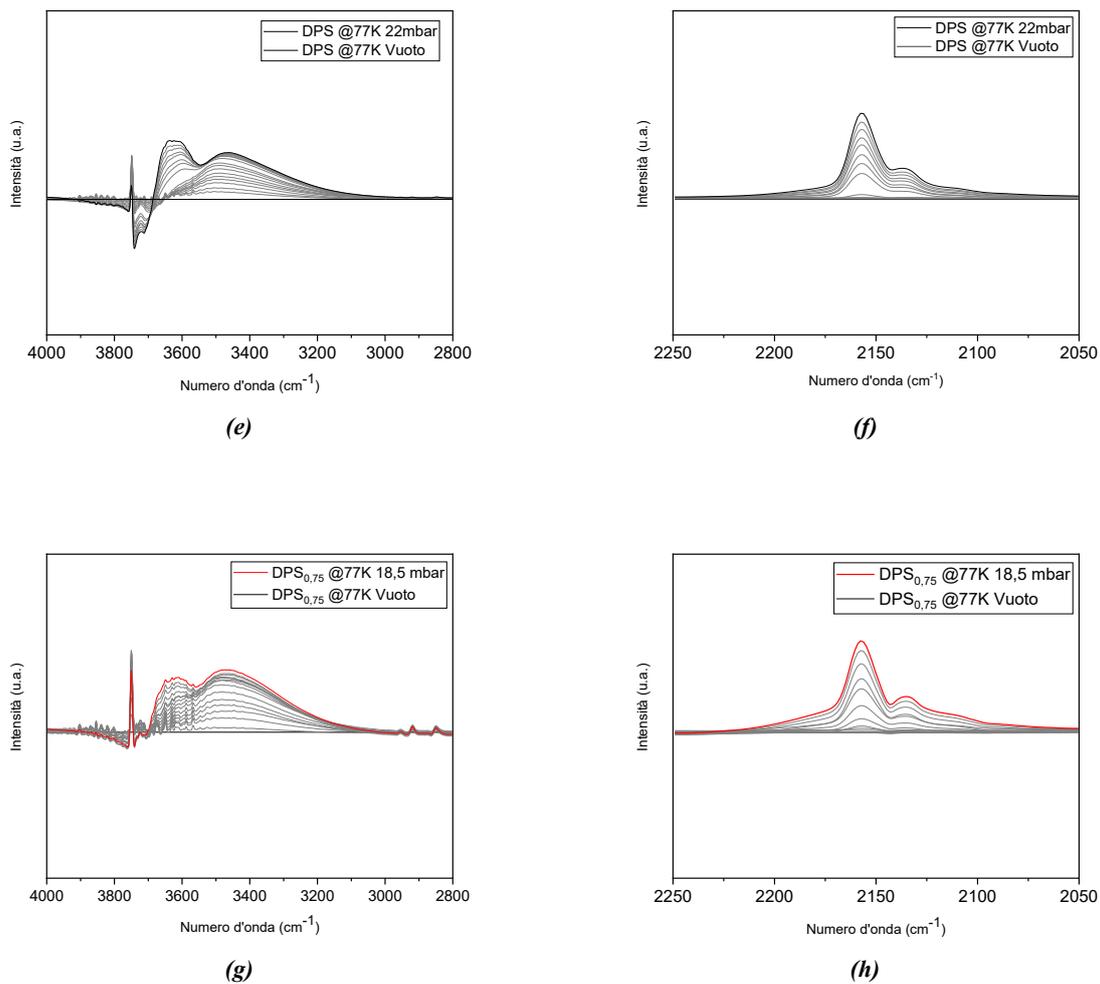


Figura 3.3 Spettri FTIR con invii di CO dei campioni nei due intervalli considerati (a) (b) MCF_{0,75} (c) (d) SBA-15_{0,25} (e) (f) DPS (g) (h) DPS_{0,75}

3.2 Risultati del fisisorbimento di azoto a -196°C

Nella Tabella 3.2 sono riportati i risultati dell'analisi BET per i quattro campioni, sia quelli eterofunzionalizzati che quelli non funzionalizzati. I dati riguardanti l'area superficiale specifica (S_{BET}) sono calcolati utilizzando l'Equazione (2.7) del modello BET (Brunauer-Emmett-Teller), mentre il volume cumulativo dei pori (V_p) e il diametro medio dei pori (d_p) sono valutati mediante il metodo BJH (Barrett-Joyner-Halenda). Per tutti i campioni si osserva una diminuzione di S_{BET} e V_p dovuto al processo di eterofunzionalizzazione che ha un certo effetto sulla morfologia iniziale della struttura. Nella figura 3.4 si può osservare come questa diminuzione del volume, riguardante porosità maggiori, sia più marcata nell'MCF_{0,75} rispetto all'SBA-15_{0,25}. Si può ipotizzare che questo effetto

derivi dal processo di funzionalizzazione, dove gli organosilani vanno ad occludere parte del volume delle porosità maggiori.

Il processo di funzionalizzazione in genere porta anche ad una diminuzione del diametro medio dei pori, tuttavia, per il campione SBA-15_{0,25} il valor medio del diametro si sposta su un valore leggermente più alto, probabilmente perché il processo di funzionalizzazione va ad occludere delle porosità più piccole.

	S_{BET} (m²/g)	V_p (cm³/g)	D_p(nm)
MCF_{0,75}	734,2	1,9	10,4
MCF_{0,75} Eterofunzionalizzata	371	0,9	9,8
SBA-15_{0,25}	716,27	1,5	8,3
SBA-15_{0,25} Eterofunzionalizzata	371,7	0,9	9,8
DPS	297,7	0,4	5,4
DPS Eterofunzionalizzata	160,8	0,2	4,8
DPS_{0,75}	193,1	0,5	11,3
DPS_{0,75} Eterofunzionalizzata	143,1	0,4	11,3

Tabella 3.4 Risultati derivanti dal fisisorbimento di azoto a -196 °C

Nella figura 3.4 è possibile osservare come per i campioni MCF_{0,75} ed SBA-15_{0,25} la distribuzione delle dimensioni dei pori risulta stretta e concentrata attorno al valore di d_p riportato nella tabella 3.2, mentre per i campioni DPS e DPS_{0,75} sono presenti più picchi ed una distribuzione delle dimensioni dei pori più ampia. Questo deriva dal fatto che i campioni DPS, a differenza di MCF_{0,75} ed SBA-15_{0,25} che presentano una struttura con delle porosità pressoché della stessa dimensione, mostrano una struttura gerarchica con ramificazioni a diverse scale di dimensione [21].

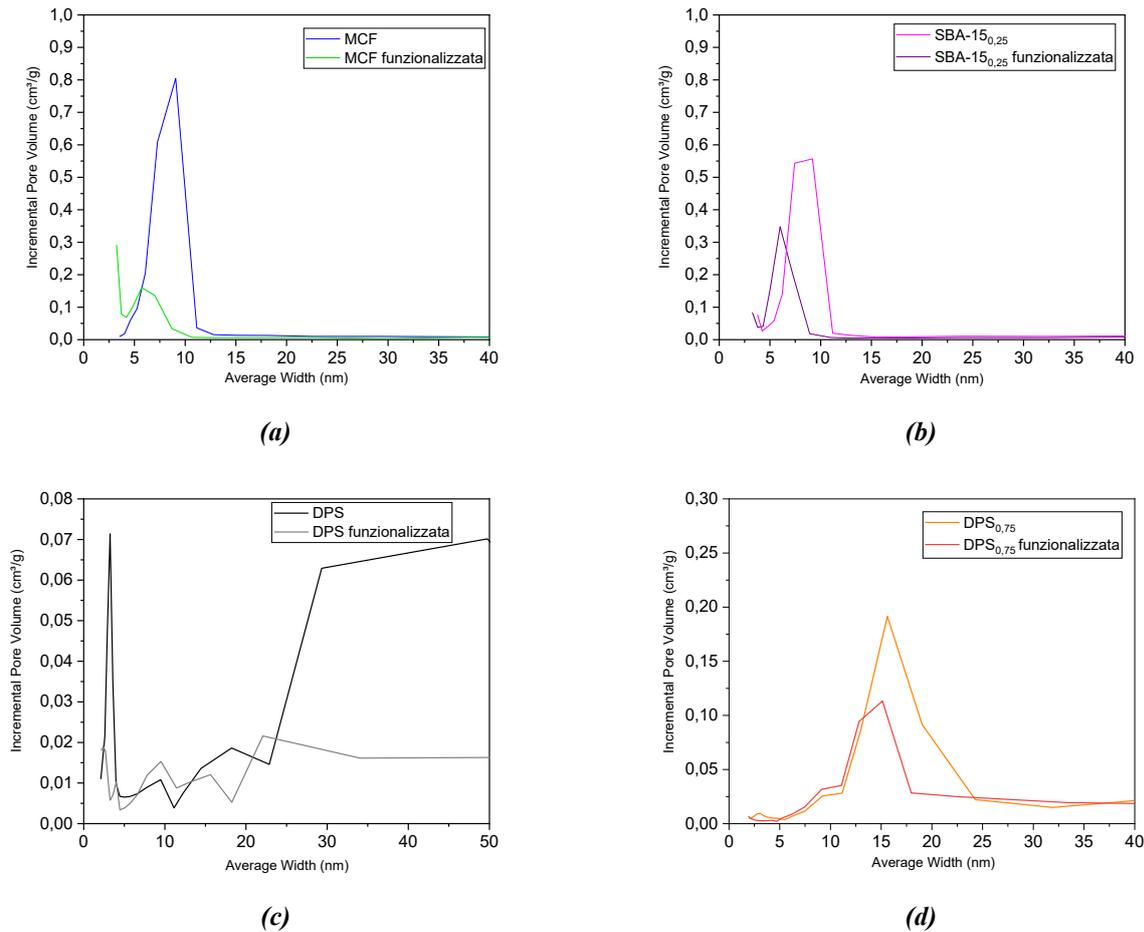


Figura 3.4 Distribuzione della dimensione dei pori per (a) MCF_{0,75} (b) SBA-15_{0,25} (c) DPS e (d) DPS_{0,75}

Nella figura 3.5 sono presentate le isoterme di adsorbimento e desorbimento che nel loro insieme presentano profili di tipo IV che sono caratteristici dei materiali mesoporosi [40], [42]. SBA-15_{0,25} ed MCF_{0,75} presentano un ciclo di isteresi di tipo H₁, tipico di questi materiali. Si può osservare come le curve dell'MCF_{0,75} siano leggermente spostate su pressioni più elevate, indicando così la presenza di pori più grandi rispetto all'SBA-15_{0,25}. I supporti con una struttura dendritica presentano invece un ciclo di isteresi di tipo H₃ suggerendo l'esistenza di mesopori a fessura di varie dimensioni [35].

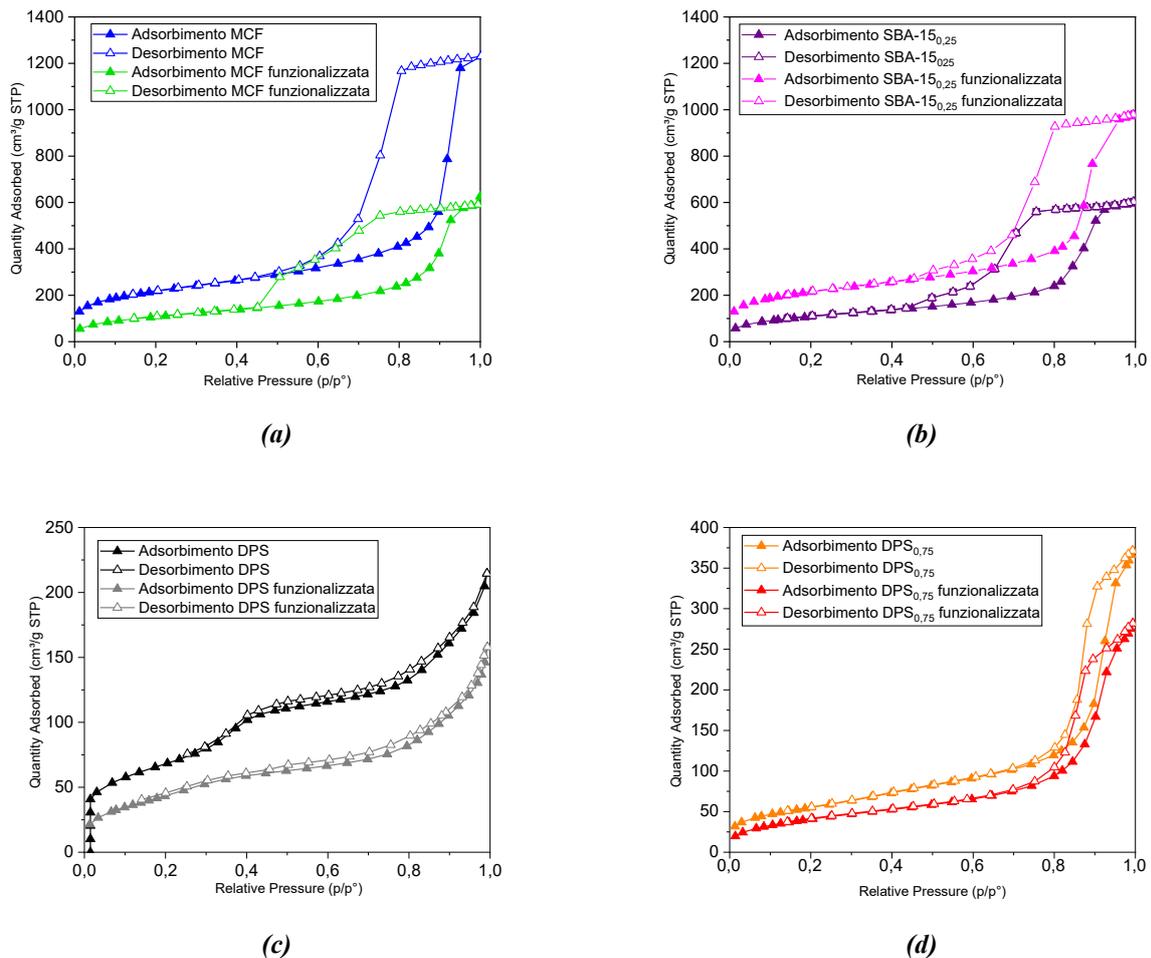


Figura 3.5 Curve di adsorbimento e desorbimento per (a) MCF_{0,75} (b) SBA-15_{0,25} (c) DPS e (d) DPS_{0,75}

3.3 Risultati della diffrazione a raggi X (XRD)

Nella figura 3.6 vengono illustrati gli spettri XRD a bassi angoli di SBA-15_{0,25} ed MCF_{0,75}, mentre nella figura 3.7 gli spettri ad alti angoli delle silici dendritiche DPS e DPS_{0,75}. Lo spettro ottenuto per l'SBA-15_{0,25} non è quello caratteristico di questa silice sintetizzata in assenza dell'agente rigonfiante. Quest'ultimo mostra, infatti dei picchi di diffrazione (1 0 0), (1 1 0) e (2 0 0) attribuiti alla tipica simmetria del gruppo spaziale esagonale p6mm [22]. Il supporto SBA-15_{0,25}, sintetizzato in questo lavoro di tesi, presenta una percentuale di Mesitilene/Pluronic di 0,25 che consente di incrementare le dimensioni dei pori del supporto. Con questo specifico rapporto, compreso tra 0,2 e 0,3, si formano silici a fase mista sotto forma di SBA-15 ed MCF [24]. La struttura tipica è evidente nello spettro del campione di sintesi, in cui non sono presenti i picchi distintivi dell'SBA-15, così come nello spettro dell'MCF_{0,75}. Poiché entrambi i campioni non presentano una struttura d'ordine a

lungo raggio non è possibile andare a valutare i parametri di cella con le equazioni (2.9), (2.10) e (2.11). Gli spettri di diffrazione ottenuti per i campioni DPS e $DPS_{0,75}$ mostrano invece un picco intorno a 22° , tipico di questo materiale, come osservato in letteratura [35].

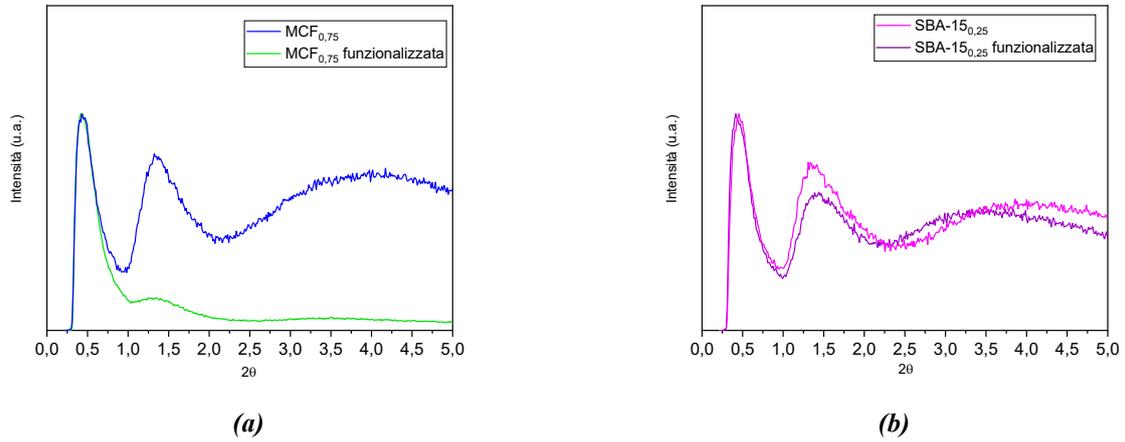


Figura 3.6 Spettri XRD a bassi angoli di (a) $MCF_{0,75}$ e (b) $SBA-15_{0,25}$

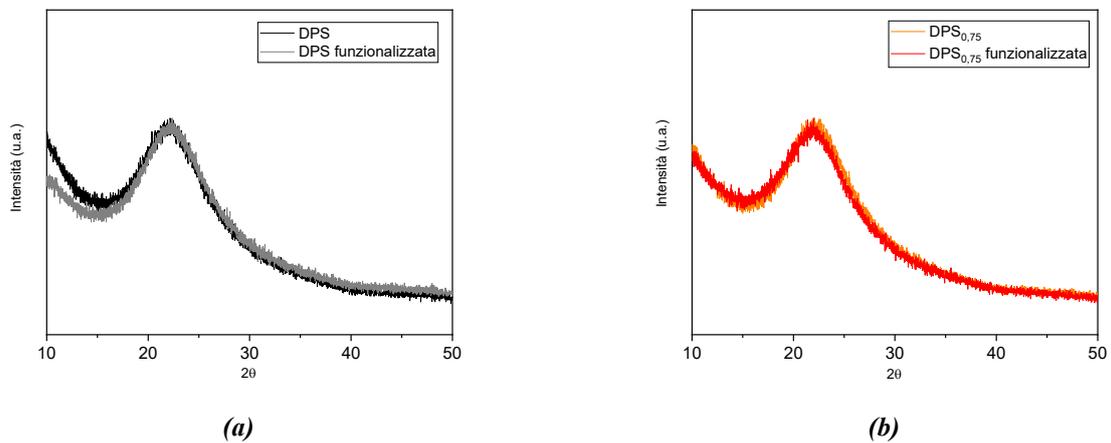


Figura 3.7 Spettri XRD ad alti angoli di (a) DPS e (b) $DPS_{0,75}$

3.4 Analisi al FESEM

Vengono presentate di seguito le immagini FE-SEM dei supporti silicei mesoporosi MCF_{0,75}, DPS e DPS_{0,75}, in modo da comprenderne al meglio la morfologia.

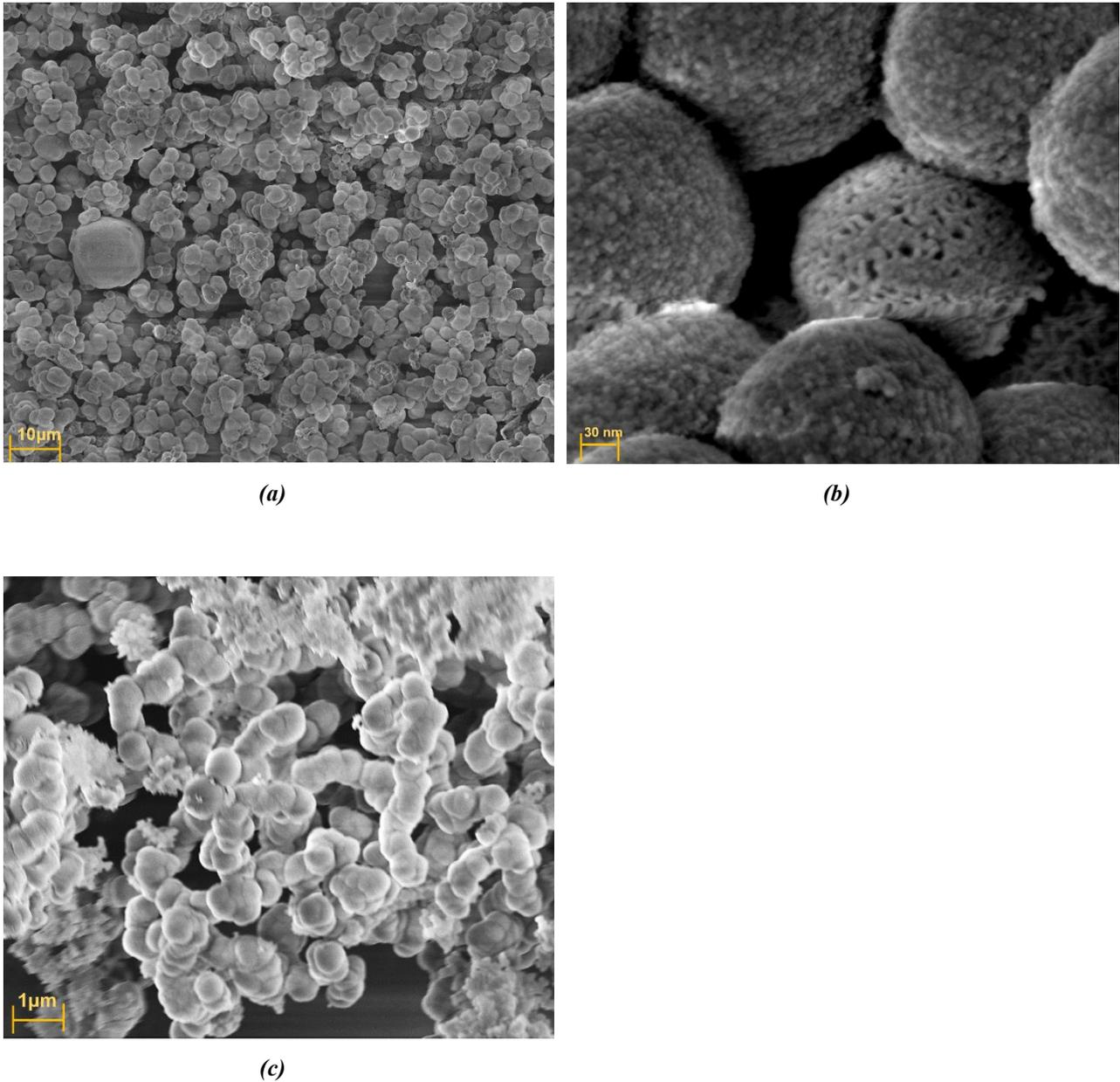


Figura 3.8 Immagini FE-SEM di (a) MCF_{0,75}, (b) DPS, (c) DPS_{0,75}

Per quanto riguarda il supporto MCF_{0,75}, la figura 3.8 (a) evidenzia chiaramente la presenza di una struttura “spugnosa” disordinata costituita da sfere connesse tra di loro attraverso i pori. L’immagine al FE-SEM della silice dendritica (b) mostra una morfologia tridimensionale caratterizzata da una struttura ramificata e con la presenza di porosità di diverse dimensioni. Non si possono fare delle

particolari considerazioni invece sull'immagine (c) della silice dendritica modificata. L'immagine presenta una scarsa nitidezza, probabilmente a causa della presenza di cariche elettrostatiche che hanno interferito con la rivelazione del segnale. È possibile che l'assenza di un trattamento preventivo di metallizzazione abbia contribuito alla formazione e all'accumulo di cariche elettrostatiche sulla superficie, compromettendo la chiarezza e la definizione dell'immagine.

3.5 Quantificazione dei gruppi aldeidici

Per tutti i campioni funzionalizzati vengono calcolate, utilizzando l'equazione (2.3), le moli dei gruppi gliossilici formati per grammo di supporto. Nella tabella 3.6 si riportano anche i valori delle densità superficiali ottenute dividendo le moli dei gruppi gliossilici per l'area specifica superficiale (S_{BET}) del supporto funzionalizzato. Si può notare come i valori più elevati si osservano per l'MCF_{0,75} e la DPS non modificata, per quanto riguarda le silici dendritiche. Si può osservare come il numero di gruppi gliossilici è proporzionale alla S_{BET} , ovvero più grande è l'area superficiale del supporto maggiore è il numero di gruppi gliossilici sulla superficie. Tuttavia, in questo lavoro di tesi non è stato eseguito uno studio approfondito su come il tipo di struttura della silice e le sue caratteristiche chimico-fisiche possano influenzare il processo di funzionalizzazione. Delle prime ipotesi sul perché le silici dendritiche mostrano dei valori più elevati, possono riguardare la diversa morfologia e la presenza di una struttura più difettiva, rispetto alle silici MCF_{0,75} ed SBA-15_{0,25}, che potrebbe conferire dei maggiori punti di attacco per i gruppi funzionali.

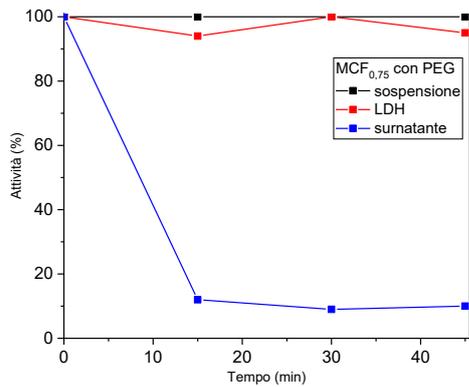
	MCF _{0,75}	SBA-15 _{0,25}	DPS	DPS _{0,75}
Gruppi aldeidici (μmol /g)	691	464	1190	1085
Densità superficiale (μmol/m²)	1,86	1,25	7,58	7,40

Tabella 3.5 Quantificazione dei gruppi aldeidici

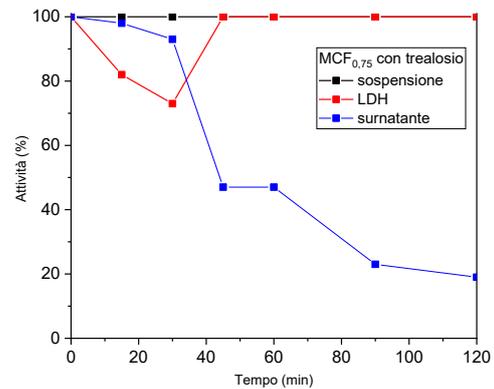
3.6 Resa di immobilizzazione e attività relativa percentuale

Nella figura 3.9 si riportano gli andamenti, per le due immobilizzazioni con PEG e trealosio effettuate su ogni campione, dell'attività residua della sospensione con il biocatalizzatore, dell'enzima libero e del surnatante della sospensione ottenute dopo centrifugazione. Si può osservare che per tutti e quattro i campioni, sebbene i tempi di reazione relativi all'immobilizzazione siano differenti, questi ricadono in un intervallo che va da 35-180 minuti. Durante il processo di immobilizzazione, si nota che i valori

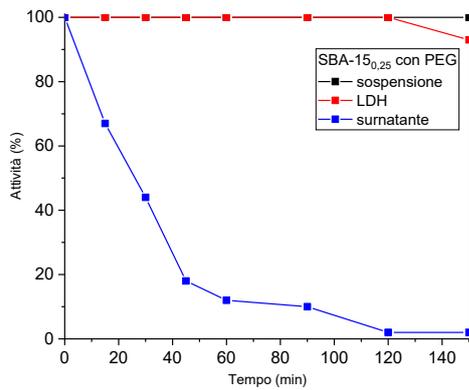
dell'attività dell'enzima libero e in sospensione rimangono quasi costanti intorno al 100%, mentre in tutti i campioni si osserva una diminuzione dell'attività nel surnatante, confermando l'avvenuta immobilizzazione dell'enzima sul supporto.



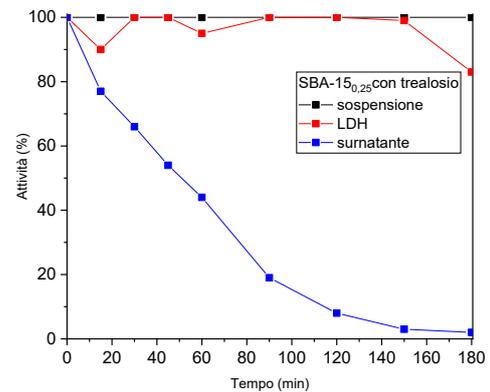
(a)



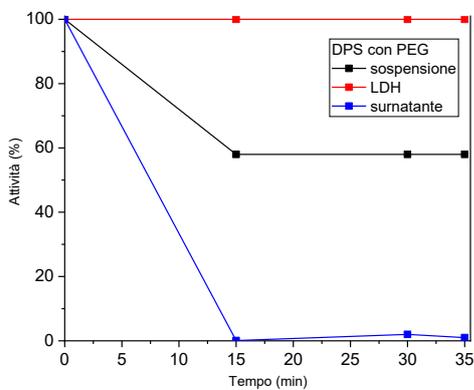
(b)



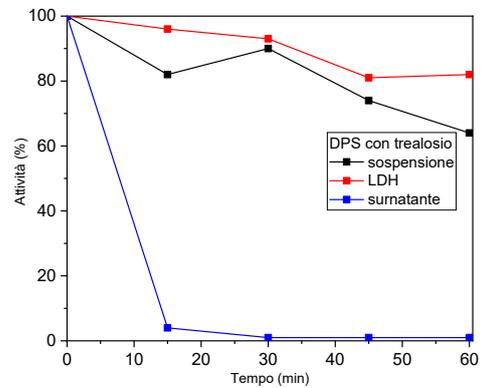
(c)



(d)



(e)



(f)

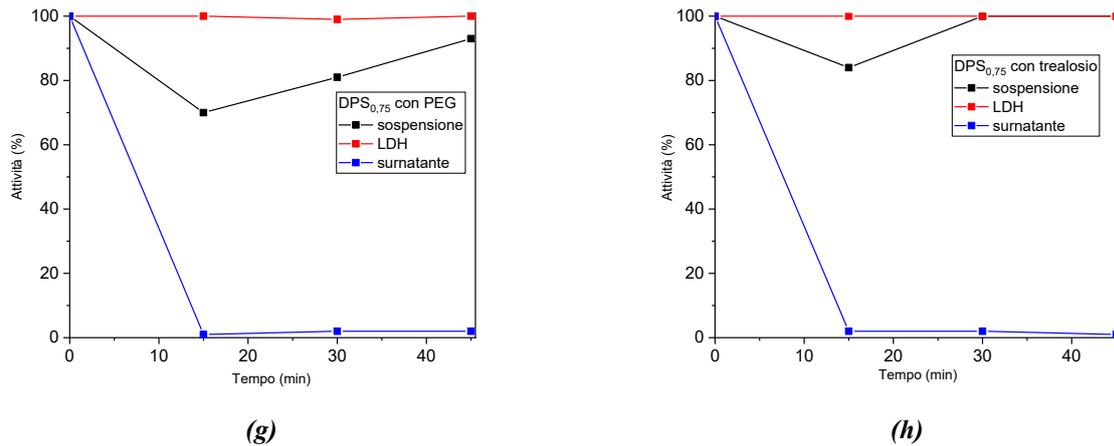


Figura 3.9 Andamenti dell'attività residua di sospensione, LDH e surnatante per (a) MCF_{0,75}-PEG, (b) MCF_{0,75}-TREA, (c) SBA-15_{0,25}-PEG, (d) SBA-15_{0,25}-TREA, (e) DPS-PEG, (f) DPS-TREA, (g) DPS_{0,75}-PEG (h) DPS_{0,75}-TREA

Dalla tabella 3.6 sono riportati per ogni supporto i valori del tempo di immobilizzazione, della resa di immobilizzazione IY , dell'attività relativa percentuale R_{act} , dell'attività dell'enzima immobilizzato A_{ie} con il relativo errore e del diametro medio delle porosità presenti d_p . Per tutti i campioni è possibile osservare una R_{act} e un A_{ie} maggiore nelle immobilizzazioni effettuate con trealosio, ad eccezione della DPS_{0,75} che invece mostra dei valori leggermente superiori con l'utilizzo del PEG. Questo dimostra come il trealosio riesca a stabilizzare e a preservare al meglio l'attività dell'enzima durante l'immobilizzazione grazie alle sue caratteristiche descritte nella sezione (1.3.2). I valori più alti di R_{act} e A_{ie} sono osservati per il supporto SBA-15_{0,25}. Nonostante il campione MCF presenti un diametro medio delle porosità simile al campione SBA-15_{0,25}, si potrebbe supporre che entrambi i campioni mostrino valori simili di attività relativa percentuale e attività dell'enzima immobilizzato. Tuttavia, questo non sembra verificarsi, probabilmente a causa delle differenze strutturali tra i due supporti. Il supporto SBA-15_{0,25}, infatti, presenta una struttura mista caratterizzata da pori cilindrici tipici della struttura SBA-15, le cui pareti risultano deformate a causa della presenza dell'agente rigonfiante. D'altra parte, l'MCF presenta una struttura tridimensionale "spugnosa" con una rete di celle sferiche di dimensioni uniformi, che come discusso nella sezione 3.2, a seguito della funzionalizzazione risultano avere un volume minore rispetto a quello osservato per l'SBA-15_{0,25}, (Figura 3.4). Questo effetto potrebbe influire sulla distribuzione e sull'accessibilità dell'enzima immobilizzato, portando a valori diversi di attività del supporto MCF_{0,75}.

In generale, è possibile osservare come le attività relative di tutti i biocatalizzatori siano inferiori al 35%, indicando una perdita di attività dopo l'immobilizzazione dell'enzima. Questo fenomeno può

essere attribuito alla denaturazione dell'enzima durante il processo di immobilizzazione. La sua struttura tridimensionale potrebbe essere alterata a seguito dei legami covalenti che si formano tra il supporto e l'enzima, portando ad una diminuzione della sua attività e ad una modifica dei siti attivi dell'enzima. Anche il boroidruro di sodio se utilizzato in quantità elevate, durante l'immobilizzazione per ridurre i legami di Schiff, può avere un impatto negativo e portare alla sua denaturazione. Un altro fattore potrebbe essere rappresentato dalla limitazione dei cambiamenti strutturali dell'enzima a causa dell'immobilizzazione all'interno dei pori, che può comportare un irrigidimento della proteina e una diminuzione dell'attività. Per quanto riguarda le silici dendritiche, si osserva che la DPS non modificata presenta valori più elevati di R_{act} e A_{ie} . Questo potrebbe essere dovuto alle porosità più grandi della $DPS_{0,75}$, le quali potrebbero causare il fenomeno di leaching dell'enzima dal supporto.

	t (min)	IY (%)	R_{act} (%)	$A_{ie}(U/g_{sup})$	d_p (nm)
MCF-PEG	45	89,24	1,85	$7,08 \pm 0,08$	9,8
MCF-TREA	120	81,07	2,05	$7,85 \pm 2,47$	9,8
SBA-15_{0,25}-PEG	150	97,97	2,64	$10,11 \pm 6,03$	9,8
SBA-15_{0,25}-TREA	180	98,43	8,52	$32,68 \pm 3,11$	9,8
DPS-PEG	35	99,05	1,47	$5,64 \pm 1,12$	4,8
DPS-TREA	60	98,76	6,77	$25,96 \pm 7,04$	4,8
DPS_{0,75}-PEG	45	97,97	3,94	$15,13 \pm 1,76$	11,3
DPS_{0,75}-TREA	45	98,56	1,68	$6,42 \pm 1,02$	11,3

Tabella 3.6 Valori del tempo di immobilizzazione t , della resa di immobilizzazione IY , dell'attività relativa percentuale R_{act} e dell'attività dell'enzima immobilizzato A_{ie} per tutti i campioni immobilizzati con PEG e trealosio

3.7 Test di pH e temperatura ottimale dell'enzima immobilizzato

Come discusso nella sezione precedente l'LDH immobilizzato su SBA-15_{0,25} e sulla silice dendritica DPS non modificata, presentano le migliori attività percentuale dunque, per tale motivo, entrambi i campioni sono stati sottoposti al test di pH e temperatura ottimale per l'enzima immobilizzato. Nella figura 3.10 (a) si può osservare come la temperatura ed il pH ottimale per l'enzima libero siano rispettivamente di 40°C e 7,5. Nella figura 3.11 (b) l'analisi per l'enzima immobilizzato sul supporto DPS mostra come il picco di attività (98% circa) si sia spostato ad una temperatura più bassa di 25°C ed un pH 8, leggermente più basico. L'SBA-15_{0,25} mostra la stessa attività percentuale della DPS a

25°C e pH 8, ma il picco maggiore si osserva ad una temperatura più alta di 65 °C ed un pH più acido di 5. È plausibile ipotizzare che i valori di temperatura e pH sopra menzionati favoriscano modifiche nella conformazione dell'enzima, le quali potrebbero contribuire a migliorarne la sua attività rispettivamente sui due supporti di immobilizzazione. Il pH influenza l'enzima durante la fase di immobilizzazione sul supporto di silice e durante il processo stesso di biocatalisi. In particolare, variazioni di pH dell'ambiente di reazione possono alterare la distribuzione delle cariche superficiali non solo sul supporto, ma anche sul sito attivo e sulla superficie dell'enzima, influenzando la loro interazione elettrostatica e la conformazione stessa dell'enzima [8]. La temperatura influenza profondamente non solo l'attività enzimatica, ma anche la stabilità dell'enzima. A differenza del pH la temperatura può avere effetti contrastanti sull'attività e sulla stabilità dell'enzima. Infatti, un aumento della temperatura può accelerare la velocità delle reazioni chimiche catalizzate dall'enzima, ma allo stesso tempo aumenta anche il tasso di inattivazione dell'enzima. Questo spiega perché in entrambi i supporti a 60°C siano presenti dei picchi di attività e come l'immobilizzazione su questi due supporti abbia avuto un effetto stabilizzante.

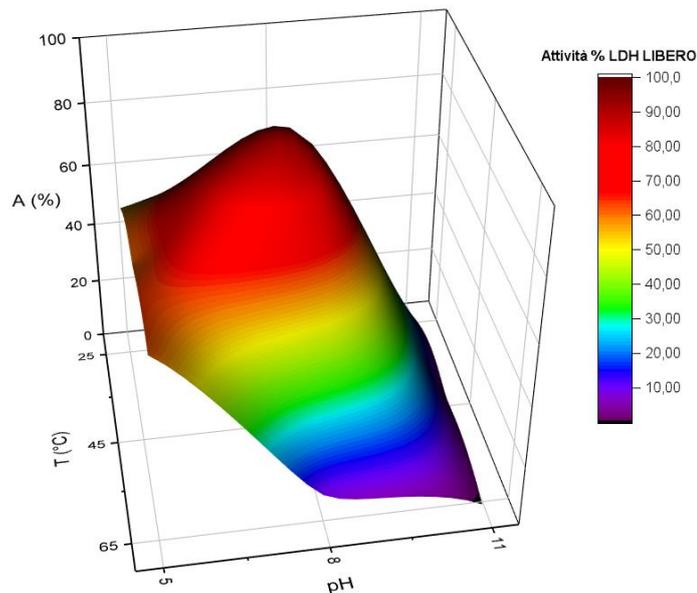


Figura 3.10 Temperatura e pH ottimale per l'enzima libero

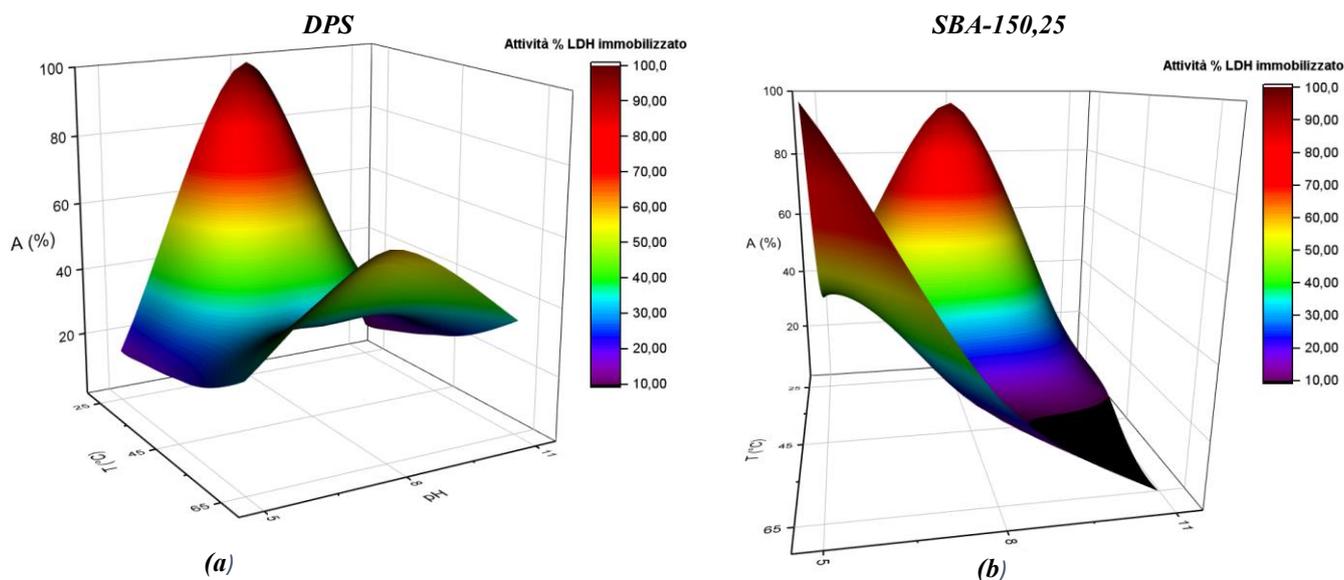


Figura 3.11 Temperatura e pH ottimale per l'enzima immobilizzato (a) DPS e (b) SBA-15_{0,25}

3.8 Test di stabilità termica

Le figure 3.12 e 3.13 mostrano l'andamento della stabilità termica rispettivamente dell'enzima libero e dell'enzima immobilizzato sulla DPS (a) e sull'SBA-15_{0,25} (b).

Dopo aver campionato e monitorato l'attività dell'enzima nelle 72 ore, si è calcolata una linea di tendenza con i corrispondenti intervalli di confidenza e previsione, attraverso l'equazione (2.15), in modo da evidenziare la tendenza dell'andamento della stabilità ottenuta. Rispetto all'attività dell'enzima libero, che dopo le 72 ore rimane circa del 60%, le attività per i due biocatalizzatori, dopo 7 ore a 45°C raggiungono valori di circa il 12 % rispetto a quella iniziale, e seguendo l'evoluzione della linea di tendenza rimangono pressoché invariate fino al raggiungimento delle 72 ore. A seguito del test di stabilità termica, la ridotta attività dell'enzima immobilizzato rispetto all'enzima libero può essere spiegata considerando le peculiarità dell'immobilizzazione stessa. Durante il processo di immobilizzazione, l'enzima potrebbe subire stress e alterazioni conformazionali che potrebbero influenzare la sua stabilità [53]. Anche la presenza del supporto stesso può limitare la mobilità dell'enzima e l'accesso ai substrati, compromettendo la sua attività catalitica. Di conseguenza, l'immobilizzazione riduce l'attività catalitica ma in qualche modo mantiene una certa stabilità residua seppur minima, mentre l'enzima libero potrebbe manifestare una maggiore resistenza a mantenere una maggiore attività poiché non è vincolato alle restrizioni imposte dalla fase di immobilizzazione

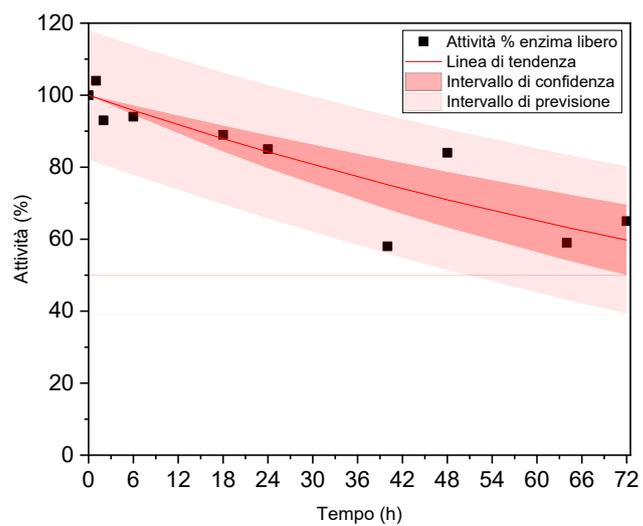
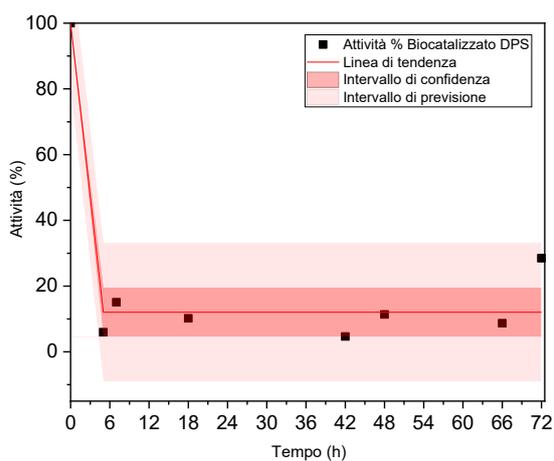
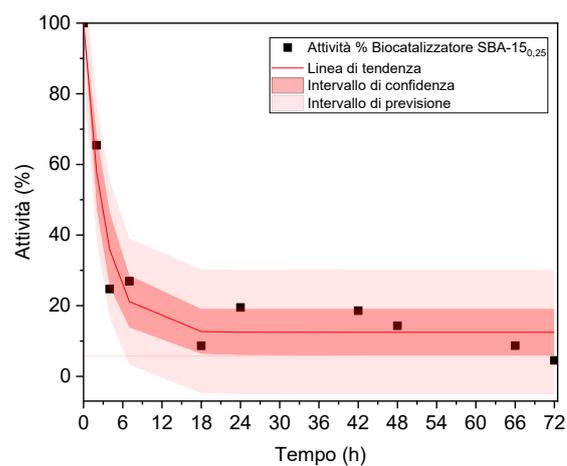


Figura 3.12 Stabilità termica dell'enzima libero



(a)



(b)

Figura 3.13 Stabilità termica dell'enzima immobilizzato su (a) DPS e (b) SBA-15_{0,25}

3.9 Prove di riutilizzo

Per verificare che il biocatalizzatore migliore sia effettivamente riutilizzabile, si è effettuato un secondo test, come descritto nella sezione 2.4.5, monitorando la diminuzione di assorbanza del NADH dovuta alla formazione di NAD^+ . Nella figura 3.14 (a) si riporta la retta di taratura costruita per valutare la concentrazione di NADH nel becher di reazione. L'andamento della concentrazione di NADH, nel becher di reazione, è mostrato in figura 3.14 (b) sia per il test 1 che per il test 2. Si può osservare come nel primo test si abbia una notevole riduzione della concentrazione di NADH nei primi 5 minuti della reazione, mentre per il secondo test si ha una riduzione sino a 30 minuti dall'inizio della reazione. In tutti e due i test l'enzima, immobilizzato sul supporto SBA-15_{0,25}, catalizza la conversione del NADH in NAD^+ , tuttavia nel secondo test si ha già una minore conversione della concentrazione di NADH in soluzione, pari al 76% rispetto al test 1.

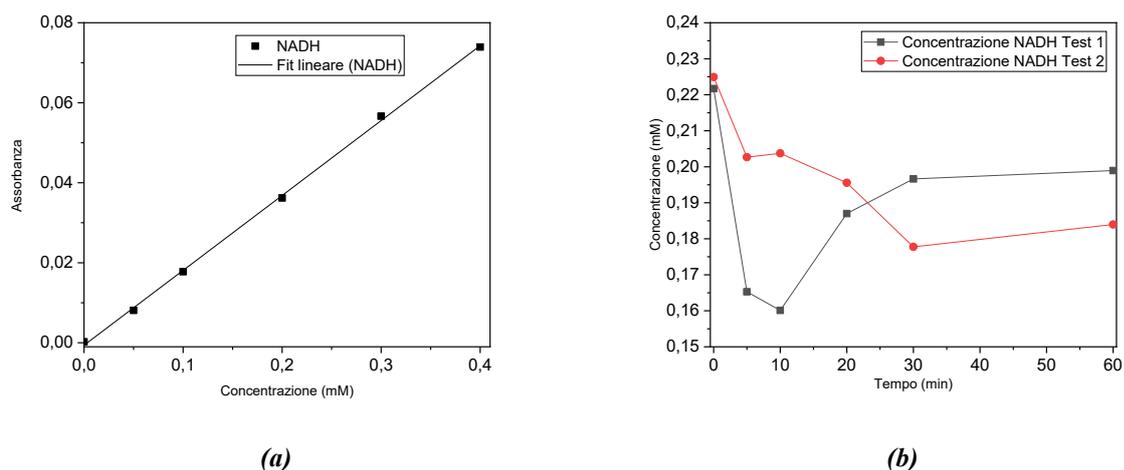
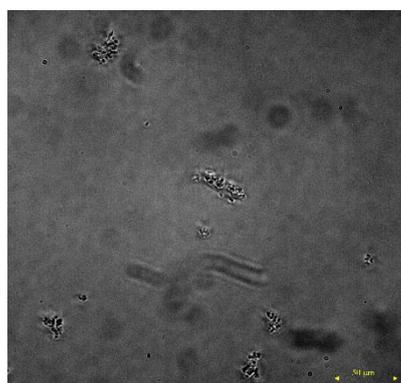


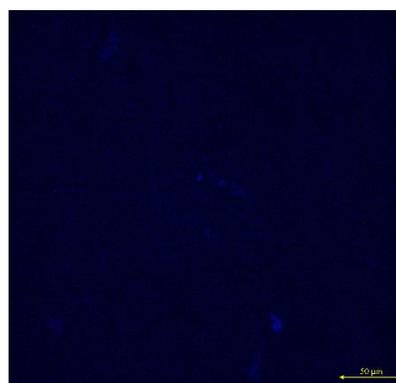
Figura 3.14 (a) retta di taratura utilizzata per il calcolo della concentrazione di NADH nel becher di reazione, (b) concentrazione di NADH nel tempo

3.10 Immagini della microscopia a fluorescenza

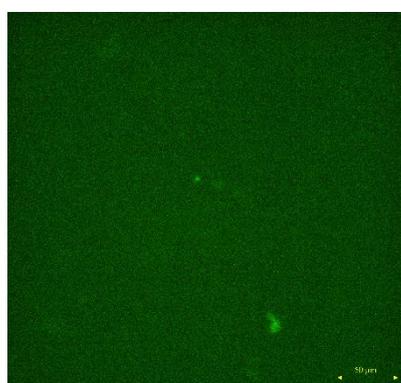
Per analizzare e visualizzare l'enzima immobilizzato sul supporto migliore, sono state acquisite immagini utilizzando un microscopio a fluorescenza dopo l'immobilizzazione dell'LDH colorato sul supporto SBA-15_{0,25}. L'analisi è stata condotta sia sul biocatalizzatore che sul supporto eterofunzionalizzato, al fine di verificare che quest'ultimo non emetta fluorescenza nello stesso canale dell'enzima colorato. Per la colorazione è stato scelto un kit che emette nel canale del rosso. Nella figura 3.15 si possono osservare le immagini rilevate, per il supporto funzionalizzato, rispettivamente nel campo chiaro, nel canale blu, verde, rosso e infine con una sovrapposizione di più canali (rosso/verde/blu). In particolare, nella figura (a) è evidente la presenza di piccoli agglomerati di particelle di silice. Dall'immagine (b) e (c) si può notare come il supporto abbia una sua fluorescenza rispettivamente nel canale del blu e del verde, mentre l'immagine (d) può confermare come il supporto non emette fluorescenza nel rosso. Per quanto riguarda l'analisi dell'LDH immobilizzato sull'SBA-15_{0,25}, nella figura 3.16 (d) è possibile distinguere l'enzima dal supporto per la sua fluorescenza nel canale del rosso. Inoltre, si può notare come l'enzima sia presente in corrispondenza della posizione delle particelle di silice evidenti nel campo chiaro (figura a).



(a)



(b)



(c)

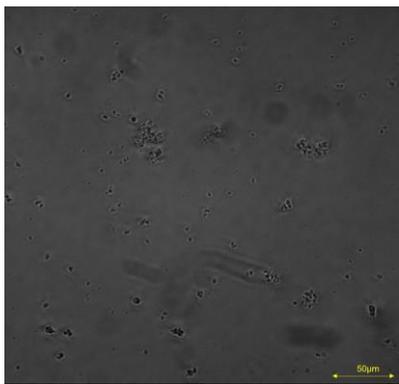


(d)

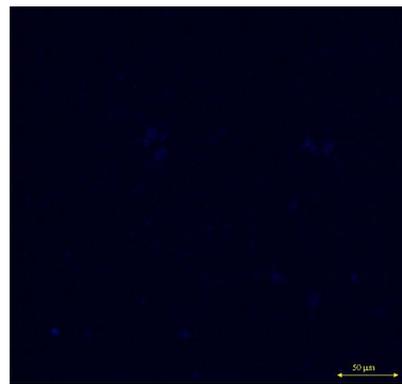


(e)

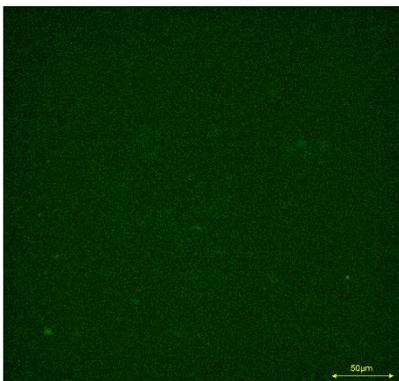
Figura 3.15 Immagini della fluorescenza del supporto SBA-15_{0,25} eterofunzionalizzato: (a) campo chiaro, (b) canale del blu, (c) canale del verde, (d) canale del rosso, (e) sovrapposizione di più canali



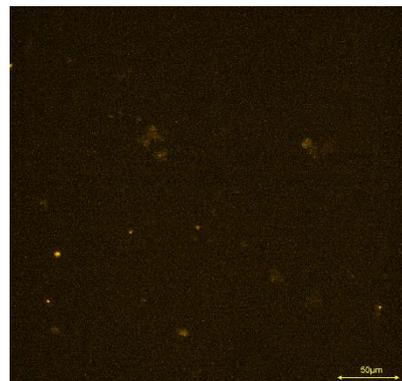
(a)



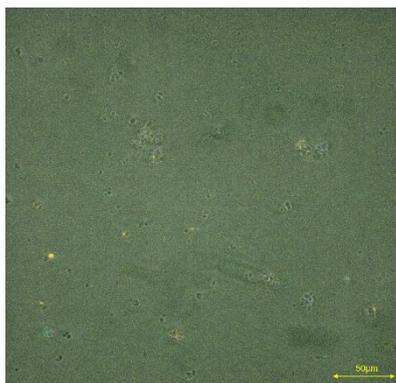
(b)



(c)



(d)



(e)

Figura 3.16 Immagini della fluorescenza dell'LDH immobilizzato su SBA-15_{0,25}: (a) campo chiaro, (b) canale del blu, (c) canale del verde, (d) canale del rosso, (e) sovrapposizione di più canali

3.11 Efficienza dell'inibizione enzimatica

Prima di condurre il test di inibizione sul biocatalizzatore migliore, si è effettuata una prova sull'enzima libero utilizzando diverse concentrazioni del farmaco NHI-2, come discusso nella sezione 2.5.1. Nella figura 3.17 (a) sono riportati i valori di attività misurati dopo l'interazione dell'enzima con il farmaco. L'attività rilevata nella soluzione dell'enzima con DMSO esclude un possibile effetto di inibizione del DMSO sull'enzima libero. È evidente che la conversione del piruvato in lattato, catalizzata dall'enzima, è inibita già al 50% con una concentrazione di farmaco pari a 5 μM e del 67% con una concentrazione di 10 μM , dimostrando così l'efficacia del farmaco anticancro. Come mostrato nella figura 3.17 (b), anche il test condotto sul biocatalizzatore SBA-15_{0,25} conferma un'efficace inibizione dell'enzima immobilizzato, pari all'88%, utilizzando una concentrazione di farmaco di 10 μM . Si può presumere che l'inibizione dell'enzima immobilizzato sia più efficace rispetto a quella riscontrata nell'enzima libero, poiché la concentrazione di enzima nel biocatalizzatore è inferiore rispetto alla concentrazione di enzima libero presente nella cuvetta di analisi.

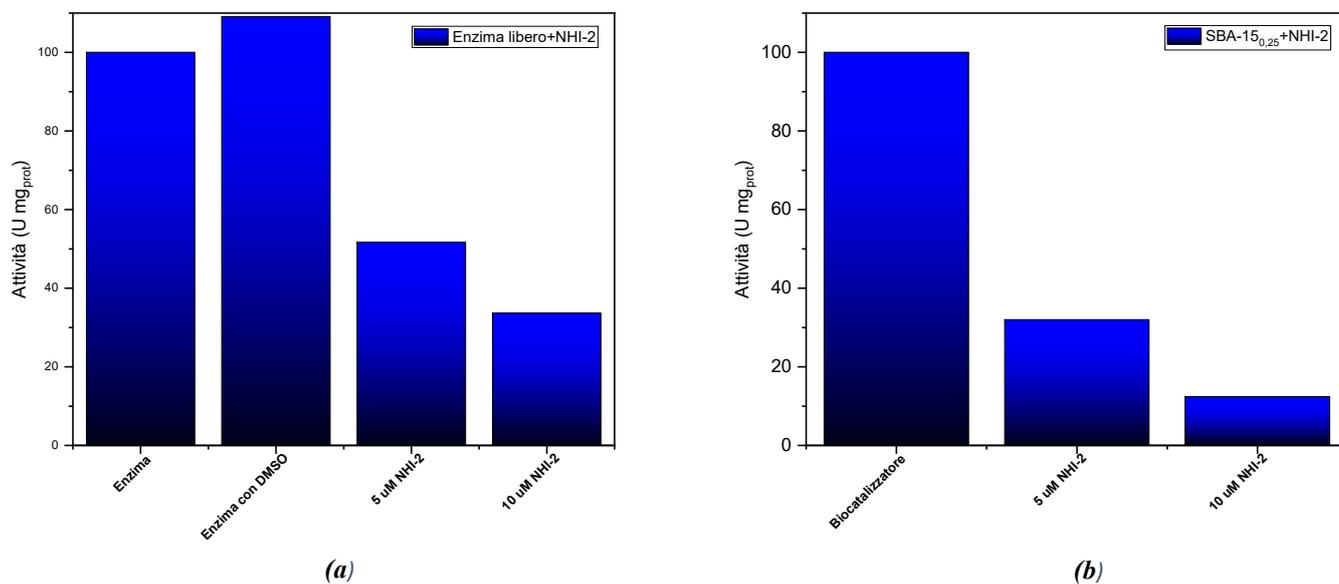


Figura 3.17 Inibizione sull'LDH libero (a) e immobilizzato (b)

	Inibizione % (5 μM NHI-2)	Inibizione % (10 μM NHI-2)
Enzima libero	48	66
Biocatalizzatore SBA-15_{0,25}	12	88

Tabella 3.7 Percentuali di inibizione con le diverse concentrazioni di NHI-2 su enzima libero e biocatalizzatore

4. Caratteristiche di un biosensore enzimatico

Lo scopo finale di questo lavoro di tesi è la realizzazione di un prototipo di biosensore a base di hLDH-A che sia in grado di testare l'efficacia di farmaci antitumorali. I biosensori sono dispositivi analitici che comprendono un insieme integrato di strumenti per convertire una risposta biologica o una concentrazione di analita in informazioni specifiche (parzialmente) quantitative [54]. Un biosensore tipico è composto da tre componenti principali:

- (i) Biorecettori che riconoscono in modo specifico un analita e lo catturano;
- (ii) Una matrice di interfaccia che fornisce un'area funzionale in cui avvengono le reazioni;
- (iii) Un elemento trasduttore fisico-chimico che converte l'evento generato in un segnale quantificabile, principalmente di natura elettronica.

Il funzionamento del biosensore è relativamente semplice: il materiale biologico immobilizzato sulla superficie del sensore partecipa a uno o più processi che provocano una variazione di un parametro chimico o fisico, il quale viene poi rilevato dal trasduttore e convertito in un segnale elettrico [55]. Per questa applicazione i biosensori elettrochimici presentano numerosi vantaggi, tra cui la loro semplicità, il basso costo, i tempi di misurazione ridotti, l'utilizzo di piccoli volumi di analita e reagenti, nonché un'alta selettività e sensibilità. Nei biosensori elettrochimici, sulla base delle modalità di trasduzione del segnale, quest'ultimo può essere individuato in uno dei seguenti modi [54]:

- ❖ Nei biosensori amperometrici viene analizzato la variazione di corrente causata dai processi di riduzione e ossidazione elettrochimica.
- ❖ Nei biosensori potenziometrici viene monitorato l'accumulo di potenziale o di carica.

Le misurazioni elettrochimiche si basano sull'interazione spontanea tra l'energia elettrica e una reazione chimica di ossido-riduzione, che produce o consuma ioni o elettroni. Questa interazione influisce sulla corrente elettrica, sul potenziale elettrico e su altre proprietà elettriche della soluzione. Tali reazioni si verificano all'interfaccia tra un elettrodo metallico o semiconduttore e un elettrolita. La rivelazione è possibile solo quando le reazioni avvengono in stretto contatto con la superficie dell'elettrodo. Di conseguenza, gli elettrodi hanno un impatto significativo sulle prestazioni dei biosensori elettrochimici [56]. Nella scelta di un elettrodo adeguato, è necessario considerare diversi fattori, come il materiale, le dimensioni e la possibilità di apportare modifiche superficiali. Come mostrato nella figura X, la maggior parte delle celle elettrochimiche è composta da tre elettrodi.

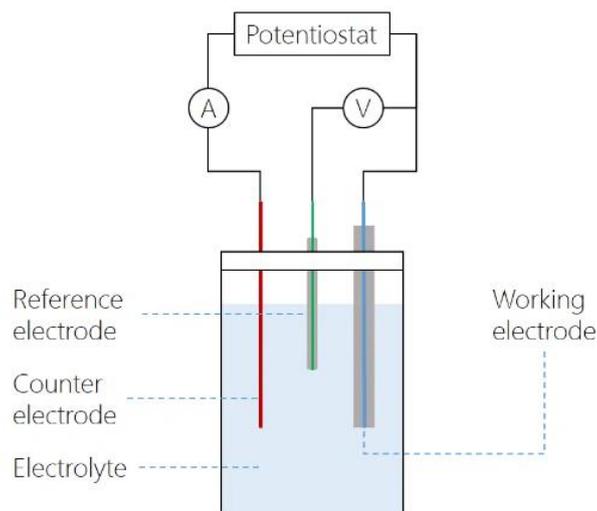


Figura 3.18 Biosensore elettrochimico con tre elettrodi

Un elettrodo di riferimento (RE) è un componente essenziale di un sistema elettrochimico. Di solito è realizzato in Ag/AgCl e si trova a una certa distanza dal punto in cui avviene la reazione. Il suo scopo è fornire un potenziale noto e stabile che permette la normalizzazione delle misurazioni. Un controelettrodo (ausiliario) (CE) è responsabile della fornitura della corrente necessaria nell'elettrodo di lavoro. L'elettrodo di lavoro (WE), noto anche come elettrodo di rilevamento o redox, è il componente chiave nella reazione biochimica e svolge il ruolo di trasduttore. CE e WE devono essere conduttivi e chimicamente stabili. A seconda dell'analita e della natura della reazione, i materiali comunemente utilizzati per l'elettrodo di lavoro includono oro, argento, platino, silicio, carbonio e grafene [54].

Un prototipo di biosensore amperometrico potrebbe essere come quello mostrato in figura X in cui il supporto eterofunzionalizzato con l'enzima immobilizzato è inserito tra due membrane in policarbonato che aiuta a trattenere l'enzima e a proteggerlo da potenziali interferenze esterne, consentendo la diffusione degli analiti e dei reagenti attraverso di essa. Il processo di rilevamento consiste nel misurare la concentrazione di lattato nella soluzione a seguito di una reazione redox che coinvolge il cofattore NADH/NAD⁺. Come discusso nella sezione 1.1, l'LDH catalizza la conversione del piruvato in lattato e del NADH in NAD⁺. Il NAD⁺ funge da mediatore per spostare gli elettroni tra l'enzima e il trasduttore. Nell'ambiente reattivo, si verificano diverse reazioni redox tra l'enzima e la superficie dell'elettrodo, con la partecipazione dell'ossigeno. Queste reazioni generano una differenza di potenziale, che è proporzionale alla quantità di lattato presente nella soluzione. La trasduzione amperometrica in questo caso si basa sull'ossidazione del NADH e la corrente di ossidazione è direttamente proporzionale alla concentrazione di lattato nella soluzione. il

rilevamento da parte del trasduttore e la conversione in un segnale elettrico avviene nella cella di analisi dove sono presenti gli elettrodi di lavoro e di riferimento [57] [58].

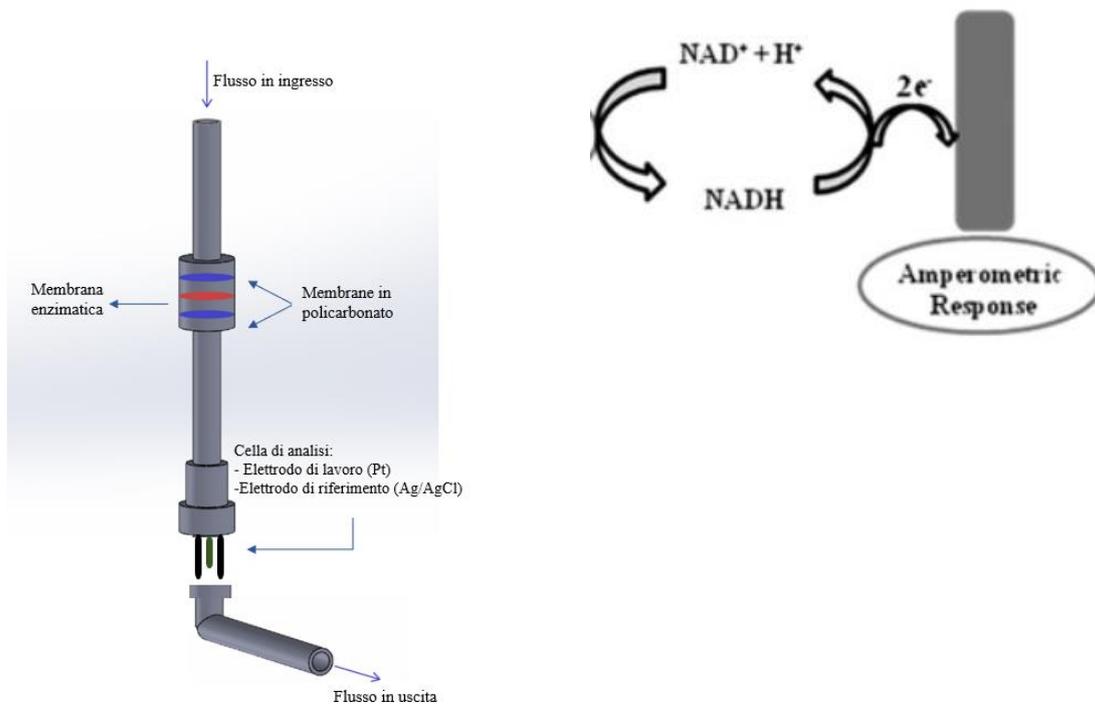


Figura 3.19 Schema di un biosensore enzimatico

Una strategia comune per migliorare le prestazioni del sensore è la modifica chimica della superficie dell'elettrodo di lavoro. Attualmente, sono in corso approfondite ricerche per identificare materiali adeguati al fine di aumentare ulteriormente la sensibilità e la selettività dei sensori elettrochimici, come ad esempio lo studio condotto da *Romero et al* [57] che ha individuato il Nafion (fluoropolimero solfonato) come possibile rivestimento permanente selettivo dell'elettrodo di lavoro il Pt.

5. Conclusioni e prospettive future

Lo scopo di questa tesi è lo sviluppo di silici mesoporose come supporti per l'immobilizzazione della lattato deidrogenasi (hLDH-A). Questo lavoro rappresenta una parte importante di un progetto più grande che vede la realizzazione di un prototipo di biosensore, a base di hLDH-A che sia in grado di testare l'efficacia di farmaci antitumorali attraverso un processo rapido ed economico. L'immobilizzazione degli enzimi nelle applicazioni biocatalitiche rappresenta una strategia ampiamente adottata per migliorare la stabilità, l'efficienza e un facile recupero degli enzimi. tra i vari supporti disponibili, le silici mesoporose sono diventate una scelta comune grazie ai loro vantaggi come la loro facile sintesi, funzionalizzazione superficiale, struttura dei pori regolabile e ampia superficie specifica. Sono stati scelti per l'immobilizzazione della lattato deidrogenasi l'SBA-15_{0,25}, l'MCF_{0,75} e le silici con struttura dendritica DPS e DPS_{0,75}, di cui sono stati modificati alcuni parametri in fasi di sintesi e che hanno portato a delle morfologie differenti. Questi supporti sono stati etero-funzionalizzati con gruppi amminici ed aldeidici e per verificare la presenza effettiva di questi gruppi reattivi sono state condotte delle analisi FTIR. Con lo stesso strumento è stato effettuato un approfondito studio sull'acidità dei campioni mediante il monitoraggio dell'adsorbimento di CO a una temperatura di 77K. Da questa analisi è emerso che il supporto MCF_{0,75} risultata leggermente più acido rispetto agli altri campioni. Inoltre, per esaminare le proprietà fisiche e le loro variazioni a seguito del processo di funzionalizzazione si sono eseguite analisi di fisisorbimento di azoto a 77K e analisi XRD. In particolare, sui campioni funzionalizzati si è osservata una riduzione dell'area superficiale specifica, del volume cumulativo e in generale del diametro medio dei pori ad eccezione del campione SBA-15_{0,25} per il quale il processo di funzionalizzazione è andato ad occludere le porosità minore spostando la media su dei valori leggermente più alti. Per quanto riguarda l'immobilizzazione dell'enzima, per ogni supporto sono state effettuate due immobilizzazioni, una utilizzando il PEG (polietilenglicole) come agente stabilizzante dell'enzima e l'altra utilizzando il trealosio. Per tutti i campioni si è ottenuta una buona resa di immobilizzazione, e dei valori di attività relativa percentuale (R_{act}) e attività dell'enzima immobilizzato (A_{ie}) maggiori nelle immobilizzazioni effettuate con trealosio, ad eccezione della DPS_{0,75} che invece ha mostrato dei valori leggermente superiori con l'utilizzo del PEG. I valori più alti di R_{act} e A_{ie} si sono ottenuti con il supporto SBA-15_{0,25}, grazie alla sua struttura mista caratterizzata da pori cilindrici tipici della struttura SBA-15, le cui pareti risultano deformate a causa della presenza dell'agente rigonfiante. Anche la silice dendritica DPS, non modificata, ha presentato dei buoni valori di R_{act} e A_{ie} . L'attività dell'enzima immobilizzato su questi due supporti è stata confrontata con l'attività dell'enzima libero in funzione del pH e della temperatura. Per entrambi i supporti l'aumento dell'attività per pH leggermente più basici per la DPS (pH 8) e più acidi per l'SBA-15_{0,25} (pH 5) può confermare l'effetto stabilizzante

dell'immobilizzazione. Non è possibile fare una considerazione simile dopo l'analisi di stabilità termica, in quanto l'andamento dell'attività dell'enzima libero è esponenziale mentre quella dell'enzima immobilizzato è esponenziale asintotica. Infine, è stato effettuato un test di riutilizzabilità del biocatalizzatore SBA-15_{0,25}, ed un test di inibizione enzimatica con il farmaco NHI-2 ottenendo una percentuale di inibizione dell'attività dell'enzima immobilizzato dell'88%. Questo studio ha confermato l'efficacia delle silici mesoporose come supporto per l'immobilizzazione enzimatica. Tuttavia, uno step successivo a questo lavoro di tesi potrebbe essere volto all'ottimizzazione dei valori di attività dell'enzima immobilizzato sui diversi supporti in silice mesoporosa. La stabilità conformazionale delle strutture enzimatiche può essere facilmente influenzata dall'immobilizzazione come conseguenza delle interazioni con la superficie del supporto, portando a un'attività enzimatica aumentata o ridotta. Dunque, una comprensione dettagliata delle proprietà conformazionali e dei siti attivi dell'enzima, attraverso ad esempio delle simulazioni di dinamica molecolare, è fondamentale nella progettazione di un supporto mesoporoso efficace [19]. Si potrebbe approfondire come il processo di immobilizzazione sia influenzato dall'acidità del supporto e come quest'ultimo possa avere anche un effetto sul processo di funzionalizzazione. Inoltre, per essere utile nella biocatalisi, l'enzima immobilizzato deve poter essere riutilizzato più volte, dunque è necessario condurre un'analisi approfondita per determinare il numero ottimale di cicli di riutilizzo che il biocatalizzatore immobilizzato può affrontare prima di perdere le sue prestazioni. Poiché le silici dendritiche hanno attirato una notevole attenzione, grazie alla loro struttura tridimensionale con ampi canali e superfici interne altamente accessibili rispetto alla silice mesoporosa convenzionale, è necessario ottimizzare gli attuali metodi di sintesi e sviluppare approcci più semplici, più efficaci e più economici per ottenere la preparazione su larga scala di particelle di silice dendritica di alta qualità. Inoltre, sono necessarie molte più indagini per confermare i vantaggi strutturali e le buone prestazioni che derivano dall'immobilizzazione enzimatica su questo tipo di supporto [25].

BIBLIOGRAFIA

- [1] H. Sung *et al.*, “Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries,” *CA Cancer J Clin*, vol. 71, no. 3, pp. 209–249, May 2021, doi: 10.3322/caac.21660.
- [2] C. F. Karmann, S. Sborea, and G. Tinini, “Scuola di Formazione del Volontariato in Oncologia MANUALE DEL VOLONTARIATO IN ONCOLOGIA Il Modello formativo della Lega Italiana per la Lotta contro i Tumori Sezione Provinciale di Milano II Edizione A cura di.”
- [3] A. Jemal, F. Bray, M. M. Center, J. Ferlay, E. Ward, and D. Forman, “Global cancer statistics,” *CA Cancer J Clin*, vol. 61, no. 2, pp. 69–90, Mar. 2011, doi: 10.3322/caac.20107.
- [4] “Associazione Italiana di Oncologia Medica.” [Online]. Available: www.medinews.it
- [5] R. Diaz-Ruiz, M. Rigoulet, and A. Devin, “The Warburg and Crabtree effects: On the origin of cancer cell energy metabolism and of yeast glucose repression,” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, vol. 1807, no. 6, pp. 568–576, Jun. 2011, doi: 10.1016/j.bbabi.2010.08.010.
- [6] C. Li, G. Zhang, L. Zhao, Z. Ma, and H. Chen, “Metabolic reprogramming in cancer cells: Glycolysis, glutaminolysis, and Bcl-2 proteins as novel therapeutic targets for cancer,” *World Journal of Surgical Oncology*, vol. 14, no. 1. BioMed Central Ltd., Jan. 20, 2016. doi: 10.1186/s12957-016-0769-9.
- [7] S.-L. Zhang, Y. He, and K. Y. Tam, “Targeting cancer metabolism to develop human lactate dehydrogenase (h LDH)5 inhibitors,” *Drug Discov Today*, vol. 23, no. 7, pp. 1407–1415, Jul. 2018, doi: 10.1016/j.drudis.2018.05.014.
- [8] D. Alagöz, A. Toprak, N. E. Varan, D. Yildirim, and S. S. Tükel, “Effective immobilization of lactate dehydrogenase onto mesoporous silica,” *Biotechnol Appl Biochem*, vol. 69, no. 6, pp. 2550–2560, Dec. 2022, doi: 10.1002/bab.2304.
- [9] P. Zucca and E. Sanjust, “Inorganic materials as supports for covalent enzyme immobilization: Methods and mechanisms,” *Molecules*, vol. 19, no. 9. MDPI AG, pp. 14139–14194, Sep. 09, 2014. doi: 10.3390/molecules190914139.
- [10] Aisha Farhana; Sarah L. Lappin., “Biochemistry, Lactate Dehydrogenase,” *StatPearls Publishing*, 2023.
- [11] “Protein data bank (PDB) ‘Visualizzazione delle caratteristiche delle proteine 3D.’”
- [12] C. Granchi *et al.*, “Discovery of *N*-Hydroxyindole-Based Inhibitors of Human Lactate Dehydrogenase Isoform A (LDH-A) as Starvation Agents against Cancer Cells,” *J Med Chem*, vol. 54, no. 6, pp. 1599–1612, Mar. 2011, doi: 10.1021/jm101007q.
- [13] M. M. C. and A. L. L.] D. L. Nelson, *I principi di biochimica di Lehninger*, 5th ed. 2010.
- [14] M. V. Liberti and J. W. Locasale, “The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells?,” *Trends in Biochemical Sciences*, vol. 41, no. 3. Elsevier Ltd, pp. 211–218, Mar. 01, 2016. doi: 10.1016/j.tibs.2015.12.001.
- [15] X. Zhong *et al.*, “Warburg effect in colorectal cancer: the emerging roles in tumor microenvironment and therapeutic implications,” *Journal of Hematology and Oncology*, vol. 15, no. 1. BioMed Central Ltd, Dec. 01, 2022. doi: 10.1186/s13045-022-01358-5.
- [16] S. Hudson, J. Cooney, and E. Magner, “Proteins in mesoporous silicates,” *Angewandte Chemie - International Edition*, vol. 47, no. 45. pp. 8582–8594, Oct. 27, 2008. doi: 10.1002/anie.200705238.

- [17] M. Hartmann, "Ordered mesoporous materials for bioadsorption and biocatalysis," *Chemistry of Materials*, vol. 17, no. 18, pp. 4577–4593, Sep. 06, 2005. doi: 10.1021/cm0485658.
- [18] U. (Ulrich) Schubert, Nicola. Hüsing, and R. M. Laine, *Materials syntheses: a practical guide*. Springer, 2008.
- [19] 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.
- [20] M. Kruk, "Access to ultralarge-pore ordered mesoporous materials through selection of surfactant/swelling-agent micellar templates," *Acc Chem Res*, vol. 45, no. 10, pp. 1678–1687, Oct. 2012, doi: 10.1021/ar200343s.
- [21] D. Shen *et al.*, "Biphase stratification approach to three-dimensional dendritic biodegradable mesoporous silica nanospheres," *Nano Lett*, vol. 14, no. 2, pp. 923–932, Feb. 2014, doi: 10.1021/nl404316v.
- [22] G. Pietricola *et al.*, "Synthesis and characterization of ordered mesoporous silicas for the immobilization of formate dehydrogenase (FDH)," *Int J Biol Macromol*, vol. 177, pp. 261–270, Apr. 2021, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2021.02.114.
- [23] M. Kruk, M. Jaroniec, C. H. Ko, and R. Ryoo, "Characterization of the porous structure of SBA-15," *Chemistry of Materials*, vol. 12, no. 7, pp. 1961–1968, 2000, doi: 10.1021/cm000164e.
- [24] L. Hermida, J. Agustian, A. Z. Abdullah, and A. R. Mohamed, "Review of large-pore mesostructured cellular foam (MCF) silica and its applications," *Open Chem*, vol. 17, no. 1, pp. 1000–1016, Jan. 2019, doi: 10.1515/chem-2019-0107.
- [25] X. Du and S. Zhang Qiao, "Dendritic silica particles with center-radial pore channels: Promising platforms for catalysis and biomedical applications," *Small*, vol. 11, no. 4. Wiley-VCH Verlag, pp. 392–413, 2015. doi: 10.1002/sml.201401201.
- [26] N. R. Mohamad, N. H. C. Marzuki, N. A. Buang, F. Huyop, and R. A. Wahab, "An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes," *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, vol. 29, no. 2. Diagnosis Press Limited., pp. 205–220, 2015. doi: 10.1080/13102818.2015.1008192.
- [27] J. M. Guisan Editor, "Immobilization of Enzymes and Cells." [Online]. Available: <http://www.springer.com/series/7651>
- [28] X. Wang, J. Bowman, S. Tu, D. Nykypanchuk, O. Kuksenok, and S. Minko, "Polyethylene Glycol Crowder's Effect on Enzyme Aggregation, Thermal Stability, and Residual Catalytic Activity," *Langmuir*, vol. 37, no. 28, pp. 8474–8485, Jul. 2021, doi: 10.1021/acs.langmuir.1c00872.
- [29] L. Betancor *et al.*, "Different mechanisms of protein immobilization on glutaraldehyde activated supports: Effect of support activation and immobilization conditions," *Enzyme Microb Technol*, vol. 39, no. 4, pp. 877–882, Aug. 2006, doi: 10.1016/j.enzmictec.2006.01.014.
- [30] C. Olsson, H. Jansson, and J. Swenson, "The Role of Trehalose for the Stabilization of Proteins," *Journal of Physical Chemistry B*, vol. 120, no. 20, pp. 4723–4731, May 2016, doi: 10.1021/acs.jpcc.6b02517.
- [31] N. V. Bhagavan and C.-E. Ha, "Enzymes and Enzyme Regulation," in *Essentials of Medical Biochemistry*, Elsevier, 2015, pp. 63–84. doi: 10.1016/b978-0-12-416687-5.00006-3.
- [32] R. Copeland, "REVERSIBLE MODES OF INHIBITOR INTERACTIONS WITH ENZYMES," 2013.

- [33] D. Sharma, M. Singh, and R. Rani, "Role of LDH in tumor glycolysis: Regulation of LDHA by small molecules for cancer therapeutics," *Seminars in Cancer Biology*, vol. 87. Academic Press, pp. 184–195, Dec. 01, 2022. doi: 10.1016/j.semcancer.2022.11.007.
- [34] 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.
- [35] H. Chen, H. Liu, R. Wang, X. Jiang, and M. Zhu, "Size-controllable synthesis of dendritic porous silica as reinforcing fillers for dental composites," *Dental Materials*, vol. 37, no. 6, pp. 961–971, Jun. 2021, doi: 10.1016/j.dental.2021.02.015.
- [36] 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.
- [37] C. Bernal, L. Sierra, and M. Mesa, "Improvement of thermal stability of β -galactosidase from *Bacillus circulans* by multipoint covalent immobilization in hierarchical macro-mesoporous silica," in *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, Dec. 2012, pp. 166–172. doi: 10.1016/j.molcatb.2012.05.023.
- [38] 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," *J Colloid Interface Sci*, vol. 328, no. 1, pp. 81–91, Dec. 2008, doi: 10.1016/j.jcis.2008.08.054.
- [39] 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.
- [40] "cfr. Onida B., slide del corso di chimica delle superfici, Politecnico di Torino, 2021."
- [41] T. R. Sahoo *et al.*, "Pure and Fe-doped CeO₂ nanoparticles obtained by microwave assisted combustion synthesis: Physico-chemical properties ruling their catalytic activity towards CO oxidation and soot combustion," *Appl Catal B*, vol. 211, pp. 31–45, 2017, doi: 10.1016/j.apcatb.2017.04.032.
- [42] M. D. Donohue and G. L. Aranovich, "Classification of Gibbs adsorption isotherms," 1998.
- [43] Z. A. Allothman, "A review: Fundamental aspects of silicate mesoporous materials," *Materials*, vol. 5, no. 12. pp. 2874–2902, 2012. doi: 10.3390/ma5122874.
- [44] A. A. Bunaciu, E. Gabriela Udriștioiu, and H. Y. Aboul-Enein, "X-Ray Diffraction: Instrumentation and Applications," *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, vol. 45, no. 4. Taylor and Francis Ltd., pp. 289–299, Oct. 02, 2015. doi: 10.1080/10408347.2014.949616.
- [45] T. Z. Forbes, "X-ray Diffraction," 2016, pp. 1–4. doi: 10.1007/978-3-319-39193-9_25-1.
- [46] "Information on the FESEM (Field-emission Scanning Electron Microscope) Radboud University Nijmegen." [Online]. Available: www.vcbio.science.ru.nl/fesem
- [47] "cfr. Pavese M., slide del corso di Scienza E Tecnologia Dei Materiali Funzionali, Politecnico di Torino, 2021."
- [48] C. Bernal, P. Urrutia, A. Illanes, and L. Wilson, "Hierarchical meso-macroporous silica grafted with glyoxyl groups: Opportunities for covalent immobilization of enzymes," *N Biotechnol*, vol. 30, no. 5, pp. 500–506, Jun. 2013, doi: 10.1016/j.nbt.2013.01.011.
- [49] 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,” *Methods in Molecular Biology*, vol. 1051, pp. 59–71, 2013, doi: 10.1007/978-1-62703-550-7_5.

- [50] G. A. Petkova, K. Záruba, and V. Král, “Synthesis of silica particles and their application as supports for alcohol dehydrogenases and cofactor immobilizations: Conformational changes that lead to switch in enzyme stereoselectivity,” *Biochim Biophys Acta Proteins Proteom*, vol. 1824, no. 6, pp. 792–801, 2012, doi: 10.1016/j.bbapap.2012.03.010.
- [51] M. Piumetti *et al.*, “Novel vanadium-containing mesocellular foams (V-MCF) obtained by direct synthesis,” *Microporous and Mesoporous Materials*, vol. 142, no. 1, pp. 45–54, Jun. 2011, doi: 10.1016/j.micromeso.2010.11.010.
- [52] B. Bonelli *et al.*, “Study of the surface acidity of TiO₂/SiO₂ catalysts by means of FTIR measurements of CO and NH₃ adsorption,” *J Catal*, vol. 246, no. 2, pp. 293–300, Mar. 2007, doi: 10.1016/j.jcat.2006.12.015.
- [53] Y. Masuda, S. ichi Kugimiya, and K. Kato, “Improvement of thermal-stability of enzyme immobilized onto mesoporous zirconia,” *Journal of Asian Ceramic Societies*, vol. 2, no. 1, pp. 11–19, 2014, doi: 10.1016/j.jascer.2013.12.003.
- [54] S. Damiati and B. Schuster, “Electrochemical biosensors based on S-layer proteins,” *Sensors (Switzerland)*, vol. 20, no. 6, Mar. 2020, doi: 10.3390/s20061721.
- [55] C. Cremisini, R. Pilloton, L. Segre Enea Dipartimento Ambiente, and E. Dipartimento Innovazione, “Biosensors: an ever expanding research field.”
- [56] K. Wang *et al.*, “Direct electrochemistry and electrocatalysis of glucose oxidase immobilized on glassy carbon electrode modified by Nafion and ordered mesoporous silica-SBA-15,” *J Mol Catal B Enzym*, vol. 58, no. 1–4, pp. 194–198, Jun. 2009, doi: 10.1016/j.molcatb.2008.12.022.
- [57] M. R. Romero, F. Ahumada, F. Garay, and A. M. Baruzzi, “Amperometric biosensor for direct blood lactate detection,” *Anal Chem*, vol. 82, no. 13, pp. 5568–5572, Jul. 2010, doi: 10.1021/ac1004426.
- [58] S. Tvorynska, J. Barek, and B. Josypcuk, “High-performance amperometric biosensor for flow injection analysis consisting of a replaceable lactate oxidase-based mini-reactor and a silver amalgam screen-printed electrode,” *Electrochim Acta*, vol. 445, Mar. 2023, doi: 10.1016/j.electacta.2023.142033.

Ringraziamenti

Alla fine di questo percorso vorrei innanzitutto ringraziare il Professore Marco Piumetti per avermi dato la possibilità di mettere in gioco le mie competenze e di realizzare questo significativo progetto. La sua disponibilità nel dedicare tempo ed energia al mio lavoro è stata per me fondamentale. Un ringraziamento speciale va anche alla Dott.ssa Clarissa Cocuzza, per il suo prezioso contributo e la sua disponibilità nell'aiutarmi nella conduzione degli esperimenti e nell'analisi dei dati ottenuti. La sua esperienza e la sua passione per la ricerca sono state fonte di ispirazione e hanno arricchito il mio percorso accademico. Vi ringrazio per avermi sostenuta durante tutto il percorso, per la comprensione e per il tempo dedicatomi.