

Dottorandi Ciclo XXIV Progetti di Ricerca

Dottorando: **Battigelli Alessia**

Relatore: Prof. Maurizio Prato (DSF)

Co-relatore: Dr. Alberto Bianco (Université de Strasbourg) Dottorato dell'Università Italo-Francese – Progetto VINCI.

Titolo del progetto: Sintesi, caratterizzazione e applicazioni biomediche di nanotubi di carbonio funzionalizzati.

Durante il primo anno di dottorato sono stati sintetizzati nanotubi di carbonio (CNT) parzialmente solubili in ambiente acquoso, presentanti sulla superficie esterna gruppi funzionali recanti porzioni peptidiche, chiamate MTS, “Mitochondria Targeting Sequence Peptide”, in grado di oltrepassare le barriere mitocondriali.

L'obiettivo del secondo anno di dottorato sarà quello di studiare la capacità dei nanotubi recanti le porzioni peptidiche di entrare all'interno di sistemi cellulari e in particolare nei mitocondri.

Inoltre verranno funzionalizzati altri tipi di MWNT, trattati anch'essi con tecniche ossidative, per confrontarne il grado di funzionalizzazione e verranno anch'essi ulteriormente funzionalizzati covalentemente e non covalentemente con sistemi peptidici e anche oligonucleotidici.

I gruppi funzionali così introdotti verranno ulteriormente modificati e i coniugati saranno caratterizzati mediante analisi TEM, SEM, AFM, Raman, UV-Vis-NIR, TGA e DSC.

Dottorando: **Boccalon Mariangela**

Relatore: Prof. Paolo Tecilla (DSCH)

Titolo del progetto: Progettazione e preparazione di nanotubi artificiali a base porfirinica

L'attività di ricerca sarà rivolta alla progettazione, alla sintesi e allo studio dell'attività di ionofori artificiali, di sistemi cioè in grado di promuovere il trasporto di ioni e molecole organiche attraverso una membrana fosfolipidica, generati mediante metal-mediated self-assembly. In particolare ci si propone di investigare ionofori in grado di formare pori termodinamicamente e cineticamente stabili, di dimensioni modulabili, relativamente grandi e in grado di garantire un elevato flusso ionico, in quanto tali sistemi possono trovare importanti applicazioni sia in campo biomedico che nella sensoristica. Nel corso del primo anno sono stati sintetizzati dei quadrati molecolari a base porfirinica che si sono dimostrati però poco adatti agli scopi prefissi in quanto poco solubili nei comuni solventi. Per questa ragione nel corso del secondo anno saranno progettati e sintetizzati dei quadrati molecolari di porfirine opportunamente funzionalizzate in modo da generare sistemi maggiormente solubili. I quadrati molecolari saranno inoltre progettati in modo da poter creare una rete di legami ad idrogeno o altre interazioni deboli, e costituire così un nanoporo. Verranno inoltre selezionati centri metallici con la geometria desiderata, studiate le condizioni di autoassemblamento e verificata la stabilità degli addotti finali in membrane fosfolipidiche. Studi preliminari sull'attività ionoforica verranno condotti utilizzando liposomi come modelli di membrana biologica e effettuando esperimenti di permeazione di ioni Na^+ (con tecnica NMR del ^{23}Na), di ioni H^+ (con tecnica spettrofluorimetrica) e con esperimenti di rilascio di probe fluorescenti (con tecnica spettrofluorimetrica).

Dottorando: **Del Favero Giorgia**

Relatore: Prof. Aurelia Tubaro (DMRN)

Titolo del progetto: Caratterizzazione del rischio da palitossina e composti analoghi quali contaminanti di alimenti di origine marina.

Prosecution in the investigation of the toxicity of PLTX and its analogues on the skeletal muscle cells. Evaluation of the involvement of Voltage Sensitive Channels in the PLTXs mediated

response. Effect of the toxins on the production of cAMP and on the cellular organization and the architecture.

Evaluation of the importance of the stages of differentiation of the muscle cells in the development of toxicity. Toxicological analysis of PLTXs on undifferentiated skeletal muscle cells.

Sub-acute toxicity studies: evaluation of the toxicological effects of the repeated oral administration of PLTXs in mice. Analysis of the haematological alterations, histological damage and target organ toxicity.

Dottorando: **Del Rio Castillo Antonio Esau**

Relatore: Prof. Maurizio Prato (DSF)

Titolo del progetto: Tuning electronic properties of single-walled carbon nanotubes.

In order to obtain a good *carbon nanotubes-field effect transistor* performance it is necessary to have sp_2 carbons, to achieve this I will heat the nanotubes at 1000°C for 1 hour under vacuum, I have to tune up this protocol.

In parallel to this, it is also possible to tune the work made in the separation of semiconductor nanotubes with organic molecules.

Once finished this, I can characterize by Raman spectroscopy all my samples, included the methods used to separate semiconductor and metallic nanotubes by acid treatments, the spectrometer will have three different wave lengths so I can have a relatively good knowledge of what kind of nanotubes are being destroyed or separated.

The most important task for the next year is to have a good *field effect transistor* behavior, and to obtain this it is necessary to improve the silica coating down the SWNTs concentration along with the fine control of surfactant and TEOS concentrations. Also, it is imperative to find some group that can be interested in helping me with the electronic characterization. It is necessary to disperse the nanotubes over a silicon surface via spin coating, and once a good dispersion is achieved it is necessary to deposit gold or palladium stripes over the ends of a coated SWNT in order to proceed with electronic characterization of the "pre-FET".

Dottorando: **De Zordi Nicola**

Relatore: Prof. Mariarosa Moneghini (DSF)

Titolo del progetto: Studi di veicolazione di farmaci per il rilascio modificato ad uso orale.

Nell'ambito degli studi preformulativi per l'allestimento di forme farmaceutiche solide orali, il progetto di ricerca del secondo anno di dottorato del dott. De Zordi riguarderà la preparazione di sistemi a matrice per la veicolazione di principi attivi allo scopo di modificarne la velocità e/o il sito di rilascio, così come definito dalla vigente Farmacopea italiana. Le tecnologie preparativa che verranno anzitutto utilizzate saranno quelle dell'irraggiamento alle microonde e dei fluidi supercritici. All'opportuna selezione degli eccipienti e all'allestimento dei sistemi farmaco-carrier, seguirà la caratterizzazione chimico-fisica degli stessi per osservare l'influenza della tecnologia preparativa adottata sullo stato solido dei principi attivi, nonché l'indagine dissolutiva per valutare il raggiungimento dell'obiettivo del lavoro e cioè il rilascio nei tempi e modalità desiderati. Si cercherà inoltre di costruire dei modelli matematici in grado di interpretare i dati raccolti. Il lavoro sarà svolto presso il laboratorio di tecnologia farmaceutica del Dipartimento di Scienze Farmaceutiche e il laboratorio di alte pressioni del Dipartimento di Ingegneria Chimica.

Dottorando: **Fattor Diana**

Relatore: Prof. Lucia Gardossi (DSF)

Titolo del progetto: Razionalizzazione di stabilità e attività di proteine e biocatalizzatori.

Il programma di ricerca vuole proseguire con la combinazione di modelling molecolare ed approcci sperimentali con lo scopo di identificare dei descrittori molecolari degli enzimi e trovare le correlazioni tra la stabilità enzimatica e le condizioni operative. In particolare sarà preso in considerazione l'effetto denaturante dei solventi.

La ricerca si focalizzerà sulla stabilità di diverse preparazioni enzimatiche (immobilizzati covalenti e per adsorbimento) a varie concentrazioni di metanolo. Dapprima lo studio sarà condotto su trigliceridi puri per poi proseguire in oli non edibili di diversa provenienza. A tal proposito verranno applicate tecniche di estrazione di sostanze oleose da materie prime di varia natura.

Le stesse lipasi verranno testate anche in reazioni di transesterificazione applicabili in campo alimentare. Durante questa parte dello studio sarà necessario mettere appunto sistemi di analisi delle materie prime e dei prodotti di reazione.

Programma del secondo anno:

1. Valutazione sperimentale e modelling molecolare della stabilità di lipasi in forma nativa in soluzioni acquose a diversa concentrazione in alcol.
2. Valutazione sperimentale e modelling molecolare della stabilità di lipasi immobilizzate nei sistemi di reazione presi in considerazione.
3. Ottimizzazione dei processi di trans esterificazione in trigliceridi puri e in oli non edibili.
4. Applicazioni di lipasi immobilizzate per la catalisi di reazioni di transesterificazione di interesse alimentare.

Dottorando: **Gombac Valentina**

Relatore: Prof. Paolo Fornasiero (DSCH)

Titolo del progetto: Processi sostenibili di seconda generazione per la produzione di idrogeno da fonti rinnovabili.

L'attività di ricerca prevede lo studio dell'attività di catalizzatori a base di semiconduttori e metalli quali Cu, Pd e Pt per il reforming foto-catalitico di componenti di biomasse e derivati.

Saranno studiate metodologie alternative per la deposizione ottimale della fase metallica sui supporti preformati che permettano di controllare le dimensioni delle particelle metalliche. Quali supporti verranno utilizzati semiconduttori con opportuno band gap e posizione delle soglie delle bande di conduzione e valenza, quali ad esempio TiO_2 drogata con B e N.

I catalizzatori ottenuti saranno caratterizzati mediante tecniche di fisi- e chemiadsorbimento, XRD, TPR, TEM e attività foto catalitica per la produzione di idrogeno da soluzioni acquose di molecole modello (carboidrati C5 e C6).

Dottorando: **Knapic Lorena**

Relatore: Prof. Cynthia Ebert (DSF)

Titolo del progetto: Computational methods for rational screening and engineering of enzyme properties.

La ricerca sarà focalizzata alle applicazioni delle conoscenze fin qui acquisite in modo da integrare i modelli predittivi 3D-QSAR con i dati sperimentali che verranno prodotti e resi disponibili dagli altri partners del progetto europeo. I modelli computazionali fin qui prodotti verranno validati dai risultati sperimentali degli altri partners. I protocolli computazionali verranno corretti per migliorarne la predittività e verranno utilizzati per la progettazione dei mutanti di seconda generazione.

Si procederà inoltre ad un'integrazione dei diversi approcci computazionali in grado di testare e vagliare gli enzimi mutati e i nuovi substrati in modo da accelerare la pianificazione di reazioni multi enzimatiche e a cascata.

Verranno inoltre analizzate e selezionate le varie strategie per lo sviluppo di nuovi approcci e metodi computazionali per una modifica strutturale razionale di alcuni enzimi target (tra cui lipasi, esterasi, liasi ed enteropeptidasi) e si procederà verso l'integrazione dei vari approcci quantomeccanici, di meccanica molecolare e di statistica multivariata per la creazione di metodi computazionali ibridi.

Dottorando: **Marangoni Tomas**

Relatore: Prof. Maurizio Prato (DSF)

Co-relatore: Dr. Davide Bonifazi (DSF e Faculté universitaire Notre Dame de la Paix, FUNDP, Namur, Belgio).

Titolo del progetto: Design and synthesis of self-assembling molecular building block for the preparation of nanostructured surface.

For what it concerns the synthesis of the molecular building block designed for the formation of mono and bidimensional arrays on surface, the work of the next year will focus on the complete characterization of the behavior of the molecules on surface. To better understand the geometrical properties and the structural features of the macrostructure produced from the self assembly process on surface AFM and STM techniques will be used. Moreover the different type of assembly will be study also from the point of view of their ability to form host-guest complex with molecules of different properties in order to obtain a nanometrical control on the disposition of secondary and more appealing molecule on surface.

For the synthesis of the “molecular wire” the work will be mainly focus on the synthetical problem that were notice during this year. The two coupling reaction that was not successfully carried out, will be exhaustively studied employing other type of coupling conditions. After the synthesis of the complete module their ability to self assembly on surface will be studied using AFM microscopy in order to characterize the geometrical properties of the supramolecolar assemblies formed. Moreover, always with the help of the AFM technique the ability of the system to perform electron transfer phenomena will be tested.

Dottorando: **Montellano Lopez Alejandro**

Relatore: Prof. Maurizio Prato (DSF)

Co-relatore: Dr.ssa Tatiana Da Ros (DSF)

Titolo del progetto: Synthesis and applications of new fullerene derivatives.

Fullerenes functionalization is a tool that allows us to obtain molecules with some characteristics ready to be used in many applications, mainly biological. The possibility to encapsulate molecules, their dimension in the nanoscale and redox potential make fullerenes interesting molecules in the biomedical field. The necessity of solubilize in aqueous media requires the synthesis of fullerene derivatives bearing polar groups attached to the fullerene sphere, as well as groups that can be positively charged. The functionalization of fullerenes by cycloaddition of azomethine ylides is a well-known strategy in order to obtain or modify the C₆₀ properties.

The combined effects of MW irradiation and ionic liquids on the cycloaddition affords advantages on the preparation of fullerene derivatives; leading to shorter reaction times and more efficient heating. The control of stereoselectivity in the poly-cycloaddition should be possible, affording new reaction conditions to build up novel derivatives.

In this way new fullerene derivatives containing 1G-PAMAM, and 2G-PAMAM dendrons will be synthesized not only for biological applications, either to study how the presence of a bulky group can affect the stereoselectivity on the cycloaddition reaction.

Dottorando: **Pelin Marco**

Relatore: Prof. Aurelia Tubaro (DMRN)

Co-relatore: Dr.ssa Chiara Florio (DMRN)

Titolo del progetto: Toxicological effects of palytoxin and other compounds after cutaneous exposure.

The aim of this research is to clarify the entity of the skin distress induced by Palytoxin (PLTX), characterizing its effects on HaCaT cell line, in order to estimate *in vitro* its toxicity after cutaneous exposure. HaCaT cells are spontaneously immortalized human keratinocytes that present similar morphological and functional properties of normal keratinocytes, and were thus chosen as a predictive model for assessing human skin keratinocytes distress.

During the first year of the research, we evaluated the PLTX toxic effects investigating cell viability (MTT assay) and cell death (SRB assay). We defined the Ouabain – sensitivity and the

concentration - and time - dependency of the effects evaluating the EC₅₀ values of the PLTX toxic activity. Furthermore, we demonstrated the irreversibility of the damage and the reduced cell vitality occurring after short time of exposure to low PLTX concentrations. Measuring the release of Lactate Dehydrogenase and the Propidium Iodide uptake by the cells, we then correlated this damage to a necrotic cell death. In the end, we investigated ROS production occurring after PLTX exposure and we found out that PLTX induced an increase of superoxide anion levels in a concentration-dependent manner after 1 hour of contact with the toxin.

During the second year, the research will focus on the following two aspects. For first, we want to clarify PLTX activity on oxidative stress evaluating if ROS production occurs also in a time dependent manner. Moreover, a set of experiments in presence of selective inhibitors of the enzymatic complexes producers of ROS will help to identify the main mechanism of PLTX – induced ROS production. In concomitance, we want to discriminate in a better way the occurrence of a necrotic or apoptotic damage after PLTX contact. With this aim, we will evaluate the induction of apoptosis measuring caspases activation (an enzymatic family activated during the apoptotic process), and DAPI fluorescence (a fluorescent marker of apoptotic nuclei). Depending on the results obtained, the aspect will be broadened by flow - cytofluorimetric analysis on cell cycle.

Furthermore, we want to investigate on inflammation induction by PLTX on HaCaT cells. It is known that PLTX is referred to be a non – TPA tumour promoter and a skin irritant, acting on MAP Kinases pathway. We thus want to evaluate if PLTX is able to induce an increase of pro-inflammatory cytokines. With this aim we will measure both the increase of cytokines DNA expressions with RT-PCR and the release of the same cytokines by the cells with ELISA quantification test.

Dottorando: Spagnul Cinzia

Relatore: Dr.ssa Teresa Gianferrara (DSF)

Titolo del progetto: Synthesis and evaluation of new ruthenium-porphyrin conjugates for biomedical applications.

Le porfirine sintetiche idrosolubili e le metallo-porfirine rivestono notevole interesse sia per le loro potenziali applicazioni in campo biologico come la terapia fotodinamica, l'attività antivirale e antibatterica sia per il legame specifico con il DNA e il conseguente taglio indotto per via chimica o per via fotochimica; inoltre sono oggetto di studio come potenziali inibitori dei canali del potassio, come inibitori delle telomerasi e dell'acetilcolinesterasi.

In letteratura sono già stati riportati molti esempi di porfirine idrosolubili ottenute sia per introduzione di gruppi ionici o ionizzabili sia per coniugazione con frammenti idrofili. Una strategia alternativa sviluppata dal nostro gruppo di ricerca prevede la sintesi di porfirine che portino coordinati in posizione periferica complessi di rutenio idrosolubili.

Durante il primo anno di dottorato sono stati sintetizzati 8 nuovi coniugati rutenio-porfirinici idrosolubili e 4 diversi substrati porfirinici; dagli studi preliminari *in vitro* di cito- e fotocitotossicità è emerso che tutti presentano una attività antiproliferativa superiore a quella dei soli complessi e che questa viene incrementata di un ordine di grandezza in seguito ad irraggiamento con luce rossa.

Per il prossimo anno il progetto consiste nella sintesi di nuovi derivati rutenio-porfirine con i quali proseguire gli studi di correlazione struttura-attività variando sia la natura del composto periferico sia quella del nucleo porfirinico. Modificazioni successive sugli stessi riguardano l'inserimento di metalli nel core porfirinico (per studiare la variazione della potenza fotodinamica), l'introduzione di controioni di diversa natura (per valutare la variazione della solubilità in acqua).

Poiché un fattore critico sembra essere la distribuzione sistemica del fotosensibilizzatore, un altro approccio promettente è la coniugazione con un elemento tumor-specific per potenziare ulteriormente la selettività e la localizzazione a livello del tessuto tumorale. In letteratura sono già stati riportati alcuni esempi di coniugati con ormoni, zuccheri, epidermal growth factors e oligonucleotidi.

Il progetto prevede la sintesi di nuovi derivati idrosolubili dove siano contemporaneamente presenti in posizione periferica una o più sequenze target (ad es. acido folico, sequenze peptidiche CPP o NLS) e frammenti di rutenio idrosolubili. Sugli stessi saranno eseguiti studi di cito- e fotocitotossicità.