

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SALERNO

DIPARTIMENTO DI CHIMICA E BIOLOGIA  
“ADOLFO ZAMBELLI”  
DOTTORATO DI RICERCA IN CHIMICA

XIV CICLO (Nuova serie)

***FLUORESCENCE-BASED SENSORS FOR THE DETECTION OF BIOLOGICALLY  
AND ENVIRONMENTALLY RELEVANT MOLECULES***

***Silvia Mirra***

TUTOR

*Prof. Claudio Pellecchia*

CO-TUTORS

*Dott.<sup>ssa</sup> Mina Mazzeo  
Prof. Gerard Canters*

COORDINATORE

*Prof. Gaetano Guerra*

2013-2016

## Abstract

Il solfuro di idrogeno ( $H_2S$ ) è da tempo noto come una molecola tossica per i sistemi biologici. Studi più recenti hanno dimostrato che i mammiferi possono produrre  $H_2S$  in maniera controllata, suggerendo che sia in realtà importante nel mantenerne la normale fisiologia. Di recente, sono stati fatti diversi sforzi per poter migliorare le tecniche di rilevamento del solfuro di idrogeno. Infatti, monitorare la distribuzione di questa molecola nei sistemi biologici complessi, apporterebbe un aiuto nel comprenderne i meccanismi di azione. Esistono tre approcci principali in letteratura a seconda del meccanismo con cui si verifica l'evento di riconoscimento. 1) Riduzione da azide ad ammina, 2) addizione nucleofila e 3) precipitazione dello ione rame. L'idea alla base di questa tesi di dottorato si basa su un approccio diverso: un approccio di tipo coordinativo. In questo modo si può, in linea di principio, essere in grado di rimuovere il solfuro di idrogeno dal centro metallico del sensore e garantire un processo di legame reversibile dell' $H_2S$ . Questo potrebbe risultare vantaggioso per applicazioni di rilevamento pratiche che consentirebbero quindi la riutilizzabilità del sensore.

Sapendo che la vitamina B12 è coinvolta nel trasporto dell' $H_2S$ , è stato deciso di utilizzare i modelli di questa vitamina: le cobalossime. Questi complessi sono solubili in acqua e di facile sintesi. Entrambe queste condizioni sono altamente desiderabili per la progettazione di un sensore. Studi  $^1H$ -NMR e UV-Vis hanno suggerito che la coordinazione dell' $H_2S$  al cobalto avviene attraverso lo spostamento del frammento di piridina. I complessi hanno anche dimostrato di essere selettivi nei confronti dell' $H_2S$  rispetto a tioli naturalmente presenti in ambito fisiologico, come la cisteina ed il glutatione, e di una serie di anioni inorganici.

È ben noto che l' $H_2S$  possa legarsi alle emoproteine, inducendo risposte diverse che a sua volta modulano la sua citotossica ed attività citoprotettiva. Per realizzare un sensore per il solfuro di idrogeno mi sono concentrata sulla progettazione di un semplice rame porfirina (rame(II) protoporfirina IX), che potrebbe funzionare con un approccio di tipo coordinativo. La sonda può rilevare anioni  $HS^-$  in acqua in maniera efficace e selettivamente rispetto ad altri anioni, dei tioli, e ossidanti comuni come  $H_2O_2$ . Esperimenti  $^1H$  NMR e ESI-MS dimostrano chiaramente che l'aumento di fluorescenza in presenza di  $H_2S$  è attribuito al legame dell'analita bersaglio al centro di rame. Sfruttando l'esperienza precedente sui complessi di rame come sensori per l' $H_2S$ , ho deciso di concentrare la mia attenzione sull'Azurina, una rame proteina espressa in maniera molto semplice e molto stabile in natura. L'azurina wild type ha mostrato una buona risposta di fluorescenza, ma non ha mostrato selettività ed il sistema non si è dimostrato reversibile. I migliori risultati sono stati ottenuti con la cobalto azurina. Questo sistema, anche se attraverso un meccanismo di turn-off, ha mostrato una buona risposta di fluorescenza in presenza di KSH, con una dipendenza lineare dell'intensità di fluorescenza rispetto la concentrazione di KSH, un limite di rilevazione nell'intervallo del micromolare ed una buona selettività.

Negli ultimi anni sono stati riportati alcuni sensori fluorescenti per l' $H_2S$  che utilizzano il metodo della precipitazione dello ione rame sotto forma di solfuro utilizzando complessi fluorescenti basati sulla struttura del cyclam. Nonostante mostri una buona sensibilità ed una selettività eccellente, questi sensori funzionano come semplici chemodosimetri e non sono riutilizzabili, poiché il processo di riconoscimento non è reversibile. Per ottenere un approccio di tipo coordinativo, ho progettato un sensore fluorescente basato sulla struttura del cyclam. Questo sensore ha mostrato un aumento di fluorescenza di 4,5 volte in presenza di 10 equivalenti di KSH in metanolo, oltre ad un'elevata selettività.