

RAPPORTO TECNICO

Report di dettaglio sulla progettazione, preparazione e caratterizzazione analitica e funzionale delle biomolecole progettate e testate per il riconoscimento di ioni Hg^{2+} in ambienti acquosi marini o simili.

Le attività svolte sono:

Attività A1.1 Descrizione dettagliata delle caratteristiche delle biomolecole selezionate

L'attività prevista dal progetto riguarda lo studio e la selezione di biomolecole da applicare a sensori per la rivelazione di Hg^{2+} in ambienti marini o simili (soluzioni acquose).

Descrizione dell'attività

La progettazione di biomolecole per il riconoscimento di Hg^{2+} è stata realizzata a partire dallo studio dello stato dell'arte sugli attuali biosensori disponibili per tale applicazione. La letteratura recente è ricca di molecole di varia natura e complessità che legano selettivamente ioni Hg^{2+} in un ampio spettro di condizioni.

Si riportano di seguito le referenze di lavori che descrivono alcune di tali molecole:

1 – Shunmugam R., Gabriel G. J., Smith C. E., Aamer K. A., and Tew G. N.: A Highly Selective Colorimetric Aqueous Sensor for Mercury, *Chem. Eur. J.*, 14 (2008), 3904 – 3907.

2 - Thirupathi P., Lee H.K.: A new peptidyl fluorescent chemosensors for the selective detection of mercury ions based on tetrapeptide, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 21 (2013), 7964–7970.

Le molecole descritte in questi lavori sono particolarmente interessanti e potenzialmente utilizzabili in applicazioni di rivelazione dello ione metallico, perché mostrano una elevata selettività per ioni Hg^{2+} in ambienti acquosi accoppiata ad una elevata affinità.

Di particolare rilievo sono le molecole riportate nella referenza 2 in quanto posseggono proprietà ottiche facilmente modulabili sulla base del pH, degli equivalenti di ioni Hg^{2+} o di percentuali di solventi organici. Il gruppo fluorescente dansile modula e rende selettivo il riconoscimento dei cationi metallici mediante complessazione con il gruppo sulfonammidico. Il riconoscimento si traduce in variazioni delle proprietà spettroscopiche (fluorescenza ed assorbanza) del dansile. Tali variazioni possono essere sfruttate per la messa a punto di saggi analitici in cui è possibile seguire la risposta dei sensori mediante misure di fluorescenza ed assorbanza.

Inoltre, le molecole fin qui riportate sono facilmente accessibili dal punto di vista sintetico mediante approcci di sintesi in fase solida. Dal punto di vista sintetico e della caratterizzazione analitica, nonché delle proprietà spettroscopiche e potenzialmente della stabilità in soluzioni acquose, la molecola descritta nella referenza 3, Composto **I** (Figura 1), dansyl metionina (Dansyl-L-Met-NH₂), è tra le due quella con le maggiori potenzialità. Infatti è riportato che il composto **I** è in grado di legare selettivamente lo ione mercurio in acqua con un meccanismo “turn-on” (aumento di fluorescenza, vedere Figura 2a) mentre lega altrettanto selettivamente lo stesso ione in solventi organici o misti organico-acquoso (acqua-acetonitrile 1:1) con un meccanismo invertito di “turn-off” (spegnimento della fluorescenza, vedere Figura 2b). L’ipotesi di maggiore stabilità è basata sulla struttura della molecola, sulle ridotte dimensioni e sulla generale elevata stabilità di aminoacidi in soluzioni acquose.

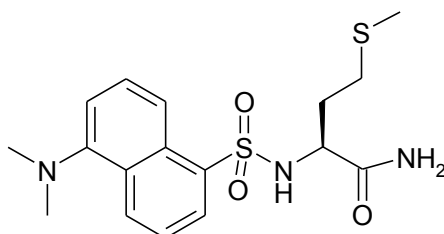


Figura. 1. Composto **I**: Dansyl-L-Met-NH₂.

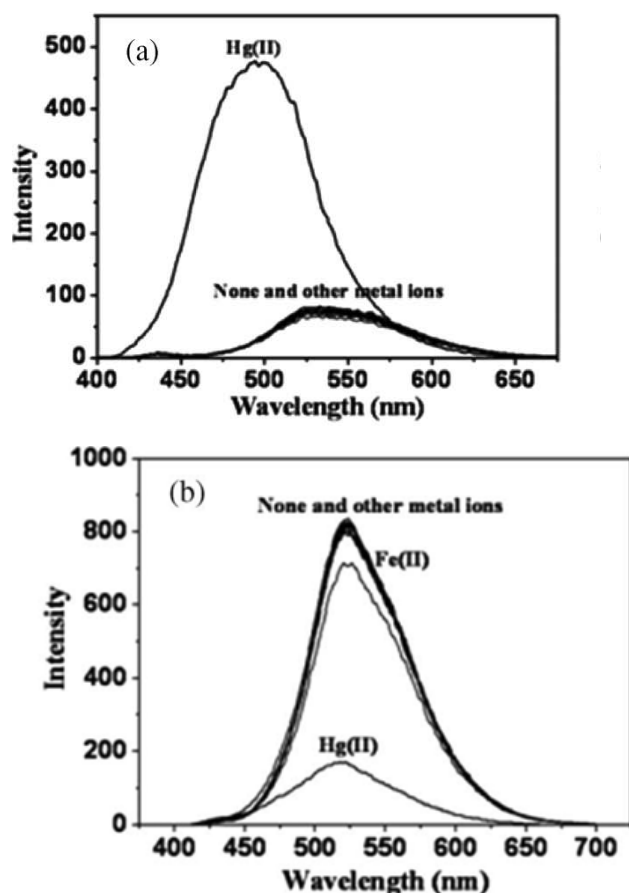


Figura 2a. Spetto di emissione in fluorescenza di I ($\lambda_{ex} = 380$ nm) in tampone 10 mM HEPES pH 7.4, in presenza di ioni Hg^{2+} e di altri metalli, inclusi Hg^{2+} , Ca^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+} , Pb^{2+} , Ag^+ , Mg^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Na^+ , Al^{2+} , K^{2+} .
Figura 2b. Spetto di emissione in fluorescenza di I ($\lambda_{ex} = 380$ nm) in tampone acquoso in (acqua-acetonitrile 1:1) con 50% CH_3CN , in presenza di ioni Hg^{2+} e di altri metalli, inclusi Hg^{2+} , Ca^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+} , Pb^{2+} , Ag^+ , Mg^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Na^+ , Al^{2+} , K^{2+}

La molecola di elezione su cui è stata sviluppata a progettazione di nuovi biosensori è stata quindi il Composto I. Derivati della dansyl metionina (Figura 3) differenti per lunghezza della catena laterale amminoacidica e tipo di sostituenti su *S*-terminale (zolfo terminale) sono stati proposti per valutare gli effetti di tali modifiche sulle proprietà di complessazione di Hg^{2+} , sulla selettività di tale complessazione e sulle rispettive costanti di dissociazioni (K_d).

Nello specifico, i composti II e III sono analoghi della metionina da cui differiscono solo per lo stato di ossidazione dello zolfo in catena laterale. Il legame chimico dello zolfo nella metionina dà luogo a semireazioni di ossido-riduzione dando, nel primo stadio la metionina solfossido (Met(O), costituente il composto II) e, nel secondo stadio, metionina sulfone (Met(O)₂, costituente il composto III). Il composto IV è un derivato della cisteina, un amminoacido contenente zolfo in catena laterale che differisce dalla metionina per la lunghezza della catena laterale (solo una unità di $-CH_2$) e per la presenza del gruppo SH terminale libero. Il composto V è un derivato della omocisteina, un analogo della metionina da cui differisce solo per la presenza del gruppo SH terminale libero e non alchilato. Infine i composti VI e VII sono derivati della cisteina in cui è

presente il gruppo acetamidometil (Acm) come gruppo protettore della funzione tiolica. Ai due composti sono associate le due configurazioni stereochimiche possibili: configurazione D per il composto VI e configurazione L per il composto VII.

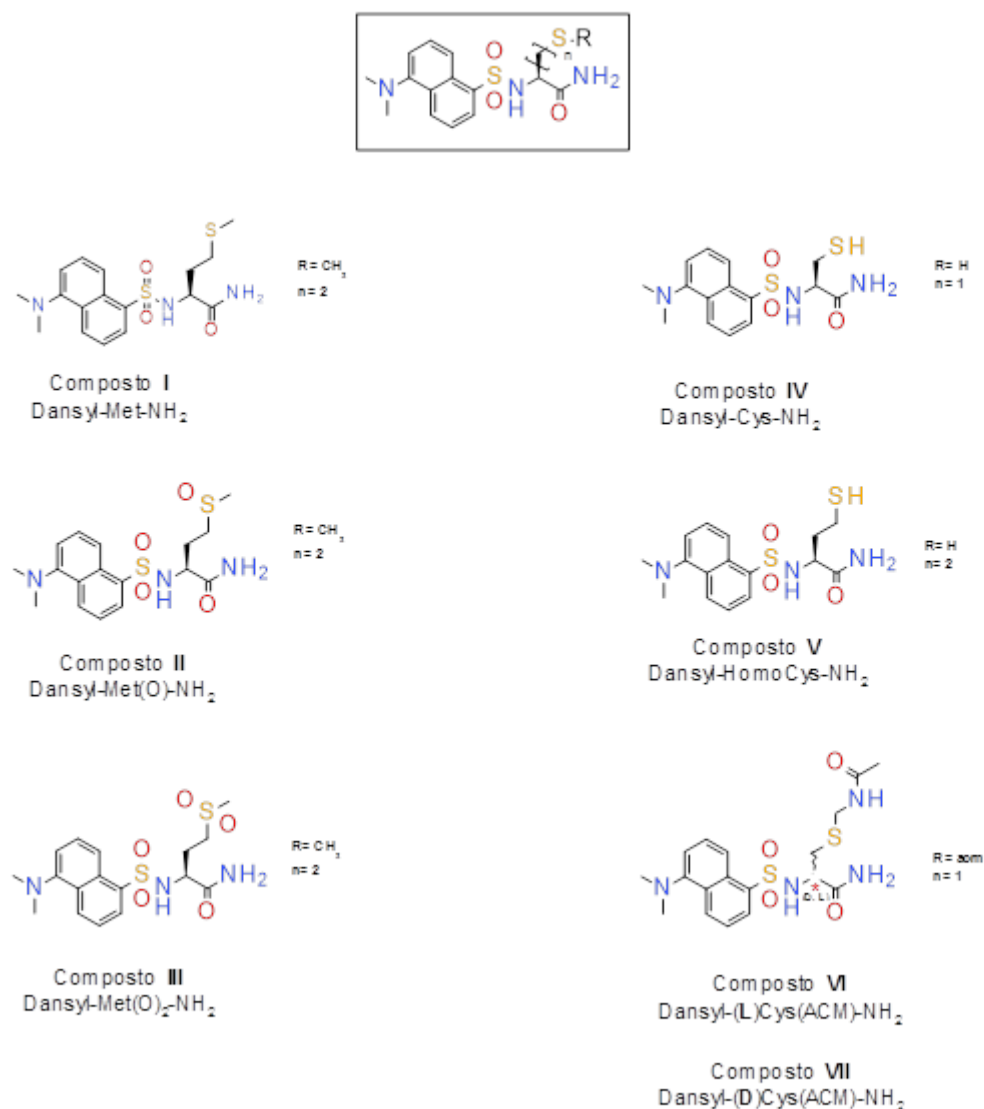


Figura 3. Lista di biomolecole proposte.

A corredo della progettazione delle biomolecole, sono stati anche valutati i possibili approcci tecnologici per l'impiego di tali molecole con sensori in fibra ottica. Le soluzioni tecnologiche individuate sono le seguenti (Figura 4):

a) Operatività diretta in soluzione

Tale approccio richiede la progettazione di un sensore in fibra ottica in grado di sfruttare le proprietà di binding selettivo e specifico delle molecole proposte con Hg²⁺ direttamente in soluzione. Il sensore in fibra ottica deve essere in grado di registrare variazioni negli spettri di

assorbanza e/o emissione in fluorescenza in seguito alla complessazione con il catione metallico direttamente in soluzione (Figura 4).

b) Operatività mediata dalla funzionalizzazione del probe.

L'attuazione di tale modalità operativa necessita di uno step intermedio di immobilizzazione delle molecole proposte sul sensore in fibra ottica. Questo secondo approccio necessita della generazione di gruppi funzionali sulla superficie della fibra su cui ancorare i derivati fluorescenti sensibili allo ione Hg^{2+} (Figura 4)

La seconda soluzione tecnologica prevede l'inserimento nelle biomolecole di opportuni sostituenti che consentono di agganciare il probe alla superficie del sensore senza alterarne in maniera sostanziale le proprietà spettroscopiche. È necessario inoltre nello step di ancoraggio, l'inserimento di spaziatori molecolari (spacer) che permettono una elevata flessibilità del probe in soluzione ed in prossimità della superficie del sensore. Le problematiche di funzionalizzazione del probe fin ad ora esposte, legate all'impossibilità di rigenerare il probe funzionalizzato (probe usa e getta), limitano l'applicabilità di questi sensori in sistemi automatizzati tipo high throughput e richiedono di conseguenza anche costi maggiori.

L'operatività diretta in soluzione, invece, non prevede step intermedi di funzionalizzazione dei sensori in fibra, il sensore in fibra può essere applicato per misure di differenti spettri di assorbanza e fluorescenza e può essere integrato in sistemi di analisi in parallelo automatizzati. Sulla base di queste valutazioni, la soluzione tecnologica con operatività diretta in soluzione è stata prescelta per i successivi sviluppi del sensore.

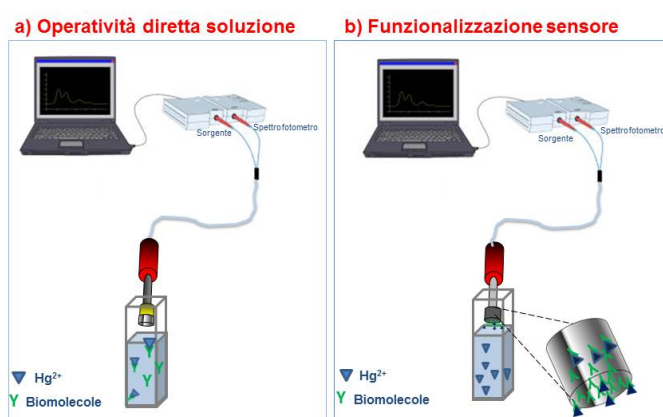


Figura 4: Schema dei due possibile approcci tecnologici: a) operatività diretta in soluzione; b) operatività mediata dalla funzionalizzazione del sensore.

Attività A1.2 Modalità di sintesi e purificazione delle biomolecole selezionate

L'attività prevista dal progetto riguarda la sintesi e la purificazione delle biomolecole selezionate nel corso dell'attività A1.1

Descrizione dell'attività

La metodica sintetica comune a tutti i derivati sintetizzati è stata messa a punto su fase solida, utilizzando una resina polistirenica di tipo Rink-ammide con grado di sostituzione di 0.77 mmol/g.

Il protocollo di sintesi, uguale per tutti i peptidi, è basato su cicli di accoppiamento composti dai seguenti moduli (Figura 5):

1. Deprotezione resina
2. Accoppiamento
3. Labelling con cloruro di dansile
4. Sblocco resina

Il modulo di deprotezione consiste di due trattamenti di 5 minuti con una soluzione al 20% e successivamente al 40% di Piperidina in dimetilformammide (DMF) .

Per il modulo di accoppiamento sono stati utilizzati 4 equivalenti di aminoacidi protetti con 9-fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc-AA), 3.8 equivalenti di 1-[Bis(dimethylamino)methylene]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]pyridinium 3-oxid hexafluorophosphate (HATU) in DMF e 8 equivalenti di sim-collidina rispetto alla scala di sintesi. Il tempo di reazione per accoppiamento è stato di 60 minuti.

Per il modulo di labelling con cloruro di dansile sono stati utilizzati 2 equivalenti di Dansyl-Cl e 2 equivalenti di N,N-Diisopropylethylamine (DIPEA) con tempi di reazione di 12 ore .

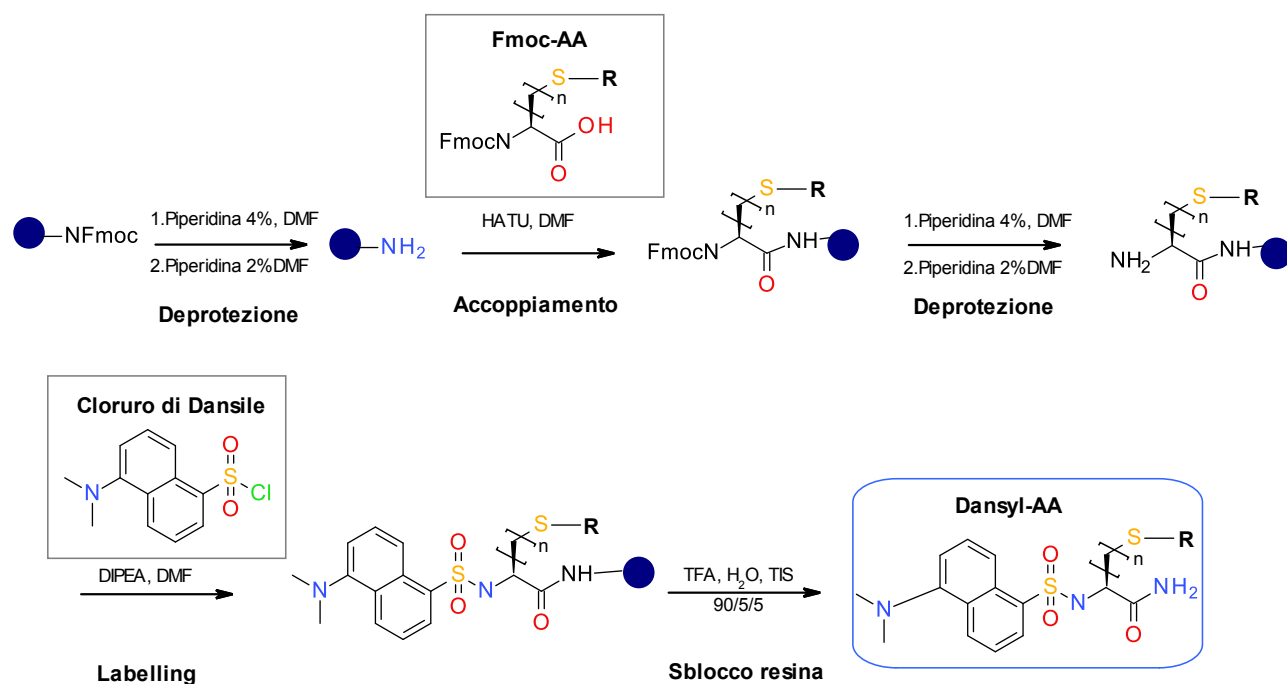


Figura 5: Schema sintetico per la preparazione dei dansyl derivati

Dopo ogni modulo sono stati effettuati quattro lavaggi con DMF per un minuto.

I peptidi sono stati staccati dalla resina, con contemporanea deprotezione delle catene laterali, trattando quest'ultima con una soluzione di acido trifluoroacetico (TFA)/ H₂O/tri-isopropilsilano)



Consiglio Nazionale delle Ricerche
Istituto di Biostrutture e Bioimmagini



Dipartimento di Scienze e Tecnologie Ambientali, Biologiche e
Farmaceutiche della Seconda Università di Napoli (SUN-DISTABIF)

nel rapporto 90/5/5 in volume per 4 h sotto agitazione a temperatura ambiente. La soluzione è stata poi filtrata, lavata con la minima quantità di TFA e liofilizzata.

Tutti i derivati sono stati caratterizzati analiticamente mediante LC-MS, UV, fluorimetria ed NMR. Le analisi LC-MS sono state eseguite con uno spettrometro Ion Trap (HCT-Ultra PTM discovery system, Bruker) accoppiato ad un sistema HPLC Waters Alliance Separation Module/ Detector 2998 PDA) equipaggiato con colonne a fase inversa (colonna Phenomenex OnxY C18). In figura 6 sono riportati gli spettri di massa che hanno confermato l'identità dei composti sintetizzati.

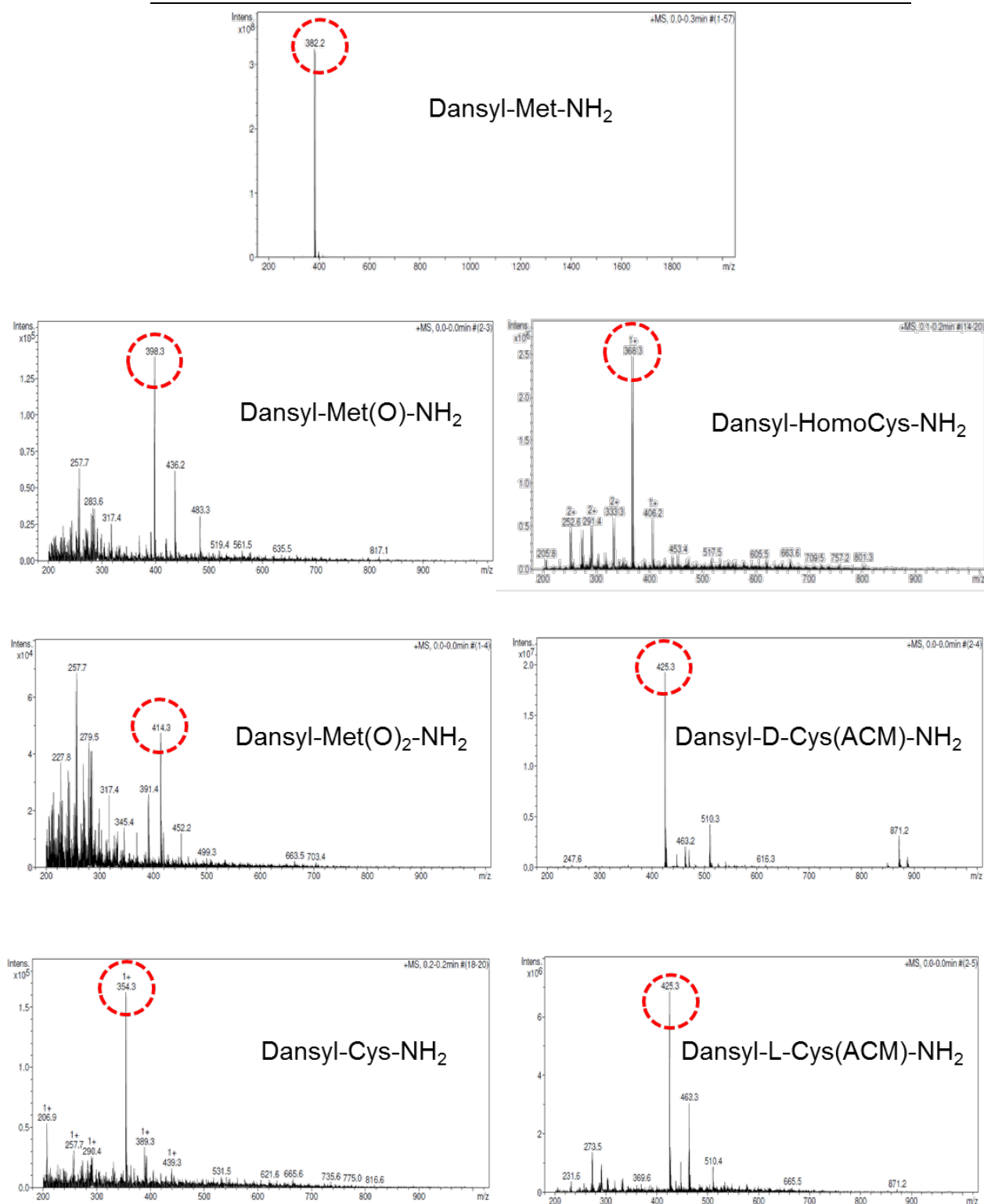


Figura 6: Spettri Esi Mass dei dansyl derivati sintetizzati

La purificazione del composto I è stata effettuata mediante RP-HPLC utilizzando gli eluenti H₂O/0.1% TFA (A) e CH₃CN/0.1% TFA (B) con un gradiente dal 5% al 50% di B in 15 minuti ad

un flusso di 20 ml/min, mentre per gli altri derivati è stato utilizzato un gradiente dal 5 al 70% di B in 15 minuti ad un flusso di 20 ml/min (Figura 7).

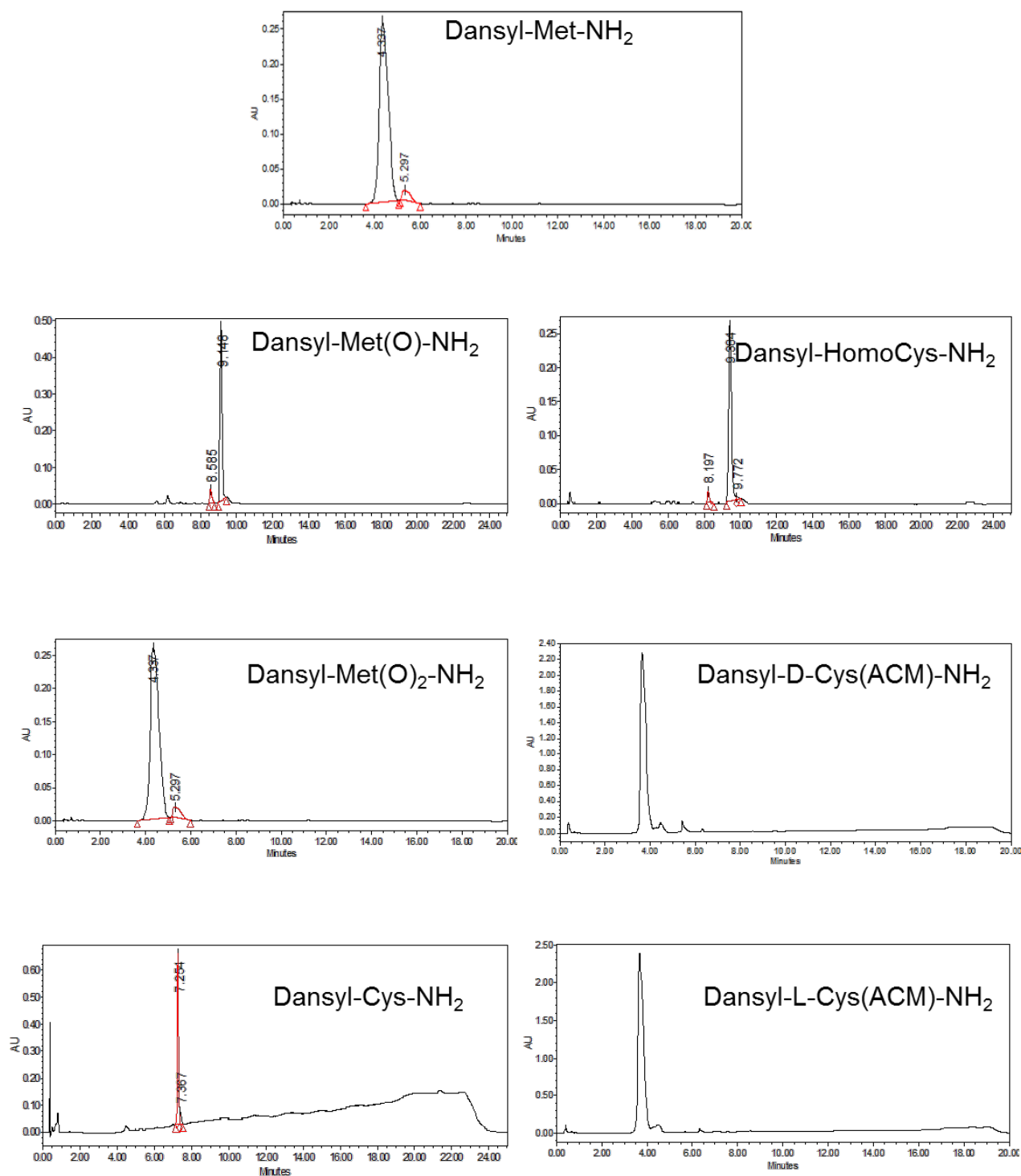


Figura 7: Cromatogrammi delle analisi HPLC dei dansyl derivati sintetizzati

La purezza dei derivati sintetizzati risulta essere $\geq 93\%$.

Le rese globali delle reazioni sono risultate essere $\geq 80\%$ per i composti I e II e $\geq 73\%$ per i restanti composti.

Attività A1.3 Metodiche per la caratterizzazione analitica di biomolecole con riferimento allo stato dell'arte nel campo ed alla letteratura scientifica recente per il riconoscimento di ioni Hg^{2+}

L'attività prevista dal progetto riguarda la caratterizzazione delle proprietà spettroscopiche (assorbimento UV e fluorescenza) delle molecole sintetizzate nell'attività A2.1. Per verificare la capacità di complessazione tali molecole con lo ione mercurio e/o con i vari metalli interferenti sono state condotte analisi UV e di fluorescenza.

Descrizione dell'attività

Analisi UV e di fluorescenza sono state effettuate per verificare le proprietà spettroscopiche sia delle molecole isolate sia dei complessi con i vari metalli. Gli spettri UV e di fluorescenza sono stati registrati con uno spettrofluorimetro EnSpire (Perkin Elmer) in piastre 96-multiwell OptiPlate. Le titolazioni all'UV sono state eseguite acquisendo spettri di assorbimento nel range 200 nm – 500 nm e monitorando le variazioni spettrali in seguito all'aggiunta di ioni mercurio. Le titolazioni in fluorescenza sono state eseguite acquisendo spettri di fluorescenza nel range 400 nm – 700 nm in seguito ad eccitazione a 380 nm. Gli spettri di emissione di fluorescenza e di assorbimento UV-visibile sono stati registrati su soluzioni di dansyl derivati con concentrazione pari a 30 μM . Le misure sono state effettuate mantenendo costante in ogni campione la concentrazione di dansyl-derivato, in modo tale da poter trascurare in fase di elaborazione dati l'effetto di diluizione.

La caratterizzazione mediante UV e fluorescenza del binding agli ioni metallici è stata eseguita inizialmente in tamponi acquosi (HEPES 10 mM pH 7.4).

Gli spettri di emissione in fluorescenza del composto I per concentrazioni crescenti di Hg^{2+} (intervallo di concentrazioni 0.6 - 120 μM) sono riportati in Figura 8a. L'intensità e la posizione del picco di emissione del dansile sono funzione della concentrazione di Hg^{2+} . È stato osservato che per basse concentrazioni di Hg^{2+} (inferiori a 20 μM) si ha una diminuzione dell' emissione di fluorescenza (o quenching) e successivamente per concentrazioni crescenti una 'accensione' della intensità di emissione a 500 nm ed un blue-shift di 50 nm della massima intensità di emissione (550-500 nm). Tale risultato suggerisce la formazione di complessi di stechiometrica differente e dipendente dalle concentrazioni relative del composto I e dello ione mercurio. La stechiometria dei complessi è responsabile della risposta in fluorescenza dei sensori in esame; l'effetto sulle proprietà spettroscopiche dei diversi tipi di complessi è imputabile alla loro influenza sul trasferimento di carica interna tra il gruppo dimetilamino e/o il gruppo sulfamidico presenti nel fluoroforo.

Andamento analogo agli spettri di emissione in fluorescenza si registra per gli spettri di assorbimento: anche in questo caso l'intensità e la posizione dei picchi di assorbimento del dansile sono funzione della concentrazione di Hg^{2+} durante la titolazione (Figura 8b).

Per testare la selettività del binding del composto I verso Hg^{2+} , sono stati registrati gli spettri di emissione in fluorescenza del composto I (a $30 \mu M$) in presenza di cationi metallici potenzialmente interferenti quali Ca^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+} , Pb^{2+} , Fe^{2+} , Pd^{2+} , Cu^{2+} , Na^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} (soluzioni preparate a partire dai cloruri, concentrazione di cationi pari a $120 \mu M$). È stata testata dapprima la risposta del composto I in miscela con i singoli cationi metallici interferenti, ed in parallelo è stata anche valutata la risposta del composto I in presenza di miscele Hg^{2+} / metallo interferente. In Figura 8c, sono riportate le intensità di emissioni in fluorescenza del composto I in presenza di metalli interferenti e miscele metalli / Hg^{2+} . Considerando l'emissione in fluorescenza a 500 nm , è stato osservato che in assenza di mercurio e per alte concentrazioni di interferenti ($120 \mu M$), non si ha una accensione della fluorescenza del composto I (Figura 8c, istogramma a barre rosse). In presenza di mercurio ($120 \mu M$), invece si ha un'accensione della fluorescenza a 500 nm pur essendo in presenza degli interferenti presi in esame (Figura 8c, istogramma a barre grigie). È necessario sottolineare che per metalli quali Pd^{2+} , Fe^{2+} , Cd^{2+} , l'intensità di emissione di fluorescenza registrata nelle miscele binarie ioni / Hg^{2+} risulta essere più bassa di quella attesa. È possibile che, in presenza di tali metalli, si instaurino complessi deboli in grado di alterare la risposta del sistema. Ulteriori prove di selettività per concentrazioni di mercurio ed interferenti più basse (caso reale) sono state successivamente approfondite.

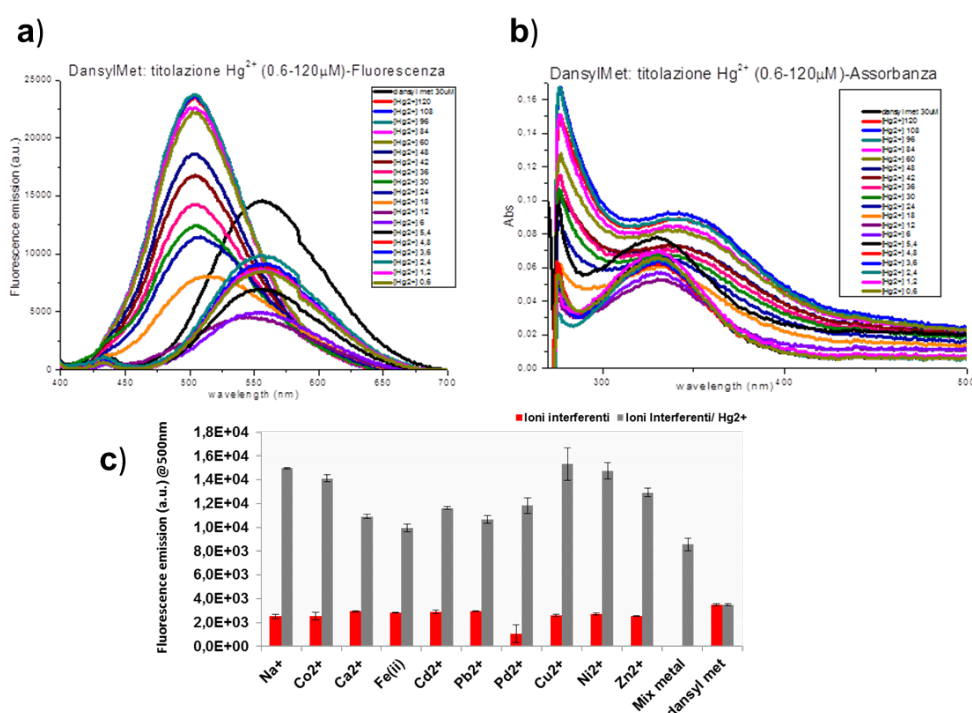


Figura 8: a) Spettri di emissione in fluorescenza e b) spettri di assorbimento del Composto I in presenza di concentrazioni crescenti di mercurio. c) Emissione in fluorescenza del Composto I in presenza di ioni interferenti e miscele di ioni interferenti/ Hg^{2+} 1:1 registrata a 500 nm .

In Figura 9 sono riportati gli spettri di emissione in fluorescenza per i derivati II-VII in funzione di concentrazioni crescenti di mercurio.



Nel caso del composto II (dansyl-Met (O), Figura 9a), del composto III (dansyl-Met(O)₂, Figura 9b), del composto IV (dansyl-Cys, Figura 9c) e del composto V (dansyl-HomoCys, Figura 9d) si ha uno spegnimento dell'emissione della fluorescenza per concentrazioni crescenti di mercurio. Tale andamento è stato giustificato ipotizzando in questi casi la formazione di complessi con stechiometria diversa da quella responsabile dell'accensione della fluorescenza (come registrato per la dansyl metionina). Caso particolare risulta essere il composto IV (dansyl-Cys, Figura 9c), in cui l'andamento degli spettri di emissione in fluorescenza (aumento di emissione) nell'intervallo 6-30 μM sembra essere associato alla formazione di complessi con stechiometria diversa da quella responsabile dello spegnimento della fluorescenza. Nel caso dei composti VI (dansyl-(D)CysAcm, Figura 9e) e VII (dansyl-(L)CysAcm, Figura 9f), l'andamento degli spettri di emissione in fluorescenza è analogo a quello registrato nel caso della dansyl-Met.

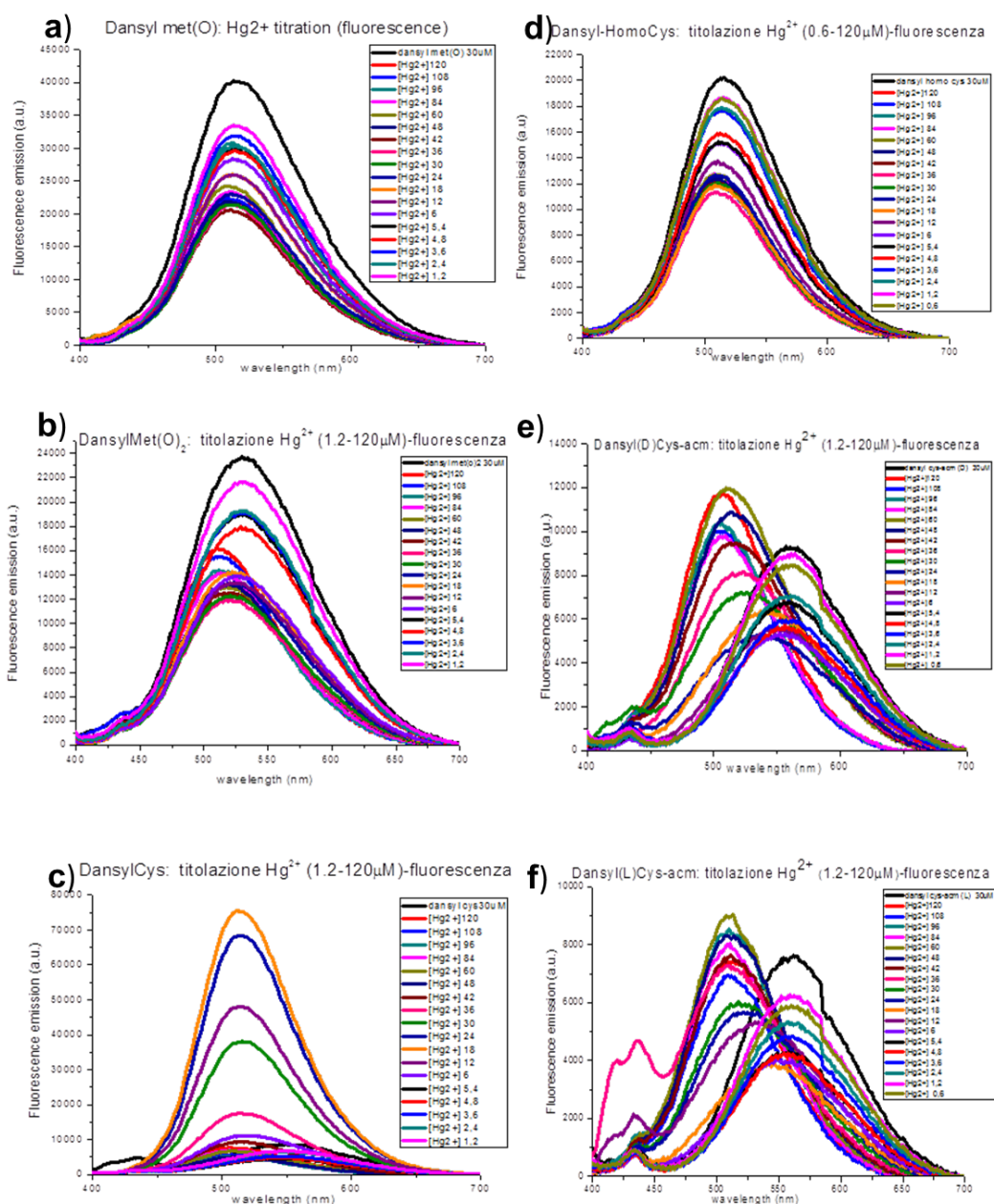


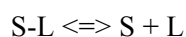
Figura 9.: Curve di titolazione in fluorescenza per concentrazioni crescenti di mercurio per i derivati: **a)** composto II (dansyl-Met(O)), **b)** composto III (dansyl-Met(O)₂), **c)** composto IV (dansyl-(L)Cys), **d)** composto V (dansyl-HomoCys), **e)** composto VI (dansyl-(L)CysAcm) e **f)** composto VII (dansyl-(D)CysAcm).

E' possibile distinguere anche per questi derivati una diversa stechiometria di complessazione: associata, per basse concentrazioni di mercurio, allo spegnimento della fluorescenza e per più alte concentrazioni di mercurio all'accensione della fluorescenza.

Analogamente sono stati acquisiti gli spettri di assorbanza per i vari derivati nei quali è stato possibile osservare lo shift dei massimi di assorbimento in funzione delle concentrazioni crescenti di Hg²⁺ durante la titolazione .

Sulla base degli spettri di emissione in fluorescenza dei derivati è stato possibile anche determinare le costanti di dissociazione dansyl derivati –mercurio.

In generale per la determinazione delle costanti di dissociazione, l'interazione reversibile tra un generico substrato (S) e legante (L) viene trattata come un qualsiasi equilibrio chimico e descritta mediante la legge di azione di massa:



$$K_d = [S] [L] / [S-L] \quad [1]$$

valgono le seguenti definizioni:

$$[Stot] = [S] + [S-L] \quad [2]$$

$$[Ltot] = [L] + [S-L] \quad [3]$$

L'equazione [1] può essere riscritta nella forma:

$$[S-L] / [S] = [L] / K_d \quad [4]$$

Combinando le equazioni [2] e [4] si ricava:

$$Y = [S-L] / [Stot] = [L] / K_d + [L] \quad [5]$$

Se [SL] è direttamente proporzionale al cambiamento di “un segnale” rilevabile (fluorescenza), la rappresentazione grafica dell'equazione [5] è un'iperbole equilatera che ha [L] per ascissa e la variazione di segnale rivelato (Y) per ordinata. Curve non iperboliche possono essere osservate ed indicano che lo schema di reazione è più complesso di quello descritto dall'equazione [1].

Quando $[S-L] / [Stot] = 0,5$ si ha $[L] = K_d$; questo comporta che la costante di dissociazione corrisponde alla concentrazione di legante libero necessaria per ottenere la semisaturazione del substrato (un valore spesso indicato come $[L]_{50}$ o L_{50}). Valori molto bassi di costanti di dissociazione corrispondono ad elevate affinità substrato/ligando.

Sulla base di queste considerazioni e, tenendo conto delle differenti stechiometrie dei complessi durante le titolazioni in presenza di concentrazioni crescenti di mercurio, i dati delle variazioni di emissioni in fluorescenza in funzione delle concentrazioni di mercurio sono stati elaborati con opportuni fitting e sono stati così determinati i valori delle costanti di dissociazione per i derivati sintetizzati (Tabella 1):

BIOMOLECOLE	$K_{d(1)}$ (μM)	$K_{d(2)}$ (μM)	Note
Composto I -Dansyl Met	17	45	2 differenti stechiometrie di complessazione
Composto II- Dansyl Met (O)	2	-	
Composto III- Dansyl Met (O) ₂	-	-	
Composto IV- Dansyl Cys	30		
Composto V- Dansyl Homocys	5		
Composto VI- Dansyl Cys (L)-acm	10	36	2 differenti stechiometrie di complessazione
Composto VII- Dansyl Cys (D)-acm	30		

Tabella 1. Lista delle costanti di dissociazione determinate per i composti sintetizzati

Nel caso dei composti I e VI, è stato possibile determinare le due costanti di dissociazione relativi ai due complessi con diverse stechiometria. Considerando che valori bassi delle costanti di dissociazione corrispondono ad affinità maggiori tra il mercurio e il dansyl derivato, i derivati I, II, V, VI risultano essere quelli più affini al mercurio. Inoltre, poiché lo scopo ultimo dell'attività di ricerca è la determinazione quantitativa di ioni mercurio in campioni marini in cui la concentrazione di tale catione è al di sotto di una ppm, sui derivati a più alta affinità sono state effettuate nuove prove di titolazione per valutarne la risposta in intervalli di concentrazione di Hg^{2+} al di sotto di $0.6 \mu\text{M}$ (0.12 ppm).

In particolare, per i composti I e VI sono stati registrati ulteriori spettri di emissione di fluorescenza e di assorbimento UV-visibile su soluzioni di dansyl derivati con concentrazione pari a $30 \mu\text{M}$ ed utilizzando concentrazioni crescenti di Hg^{2+} nel range $0.1\text{-}1.2 \mu\text{M}$.

In figura 10 sono riportati gli spettri di emissione in fluorescenza per il composto I. Una prima analisi evidenzia che per concentrazioni di Hg^{2+} nel range $0.1\text{-}0.6 \mu\text{M}$ e $0.6\text{-}1.2 \mu\text{M}$ (Figura 10.b, 10.c) non è possibile delineare un andamento dell'emissione di fluorescenza in funzione di concentrazioni di Hg^{2+} al di sotto di $0.6 \mu\text{M}$.

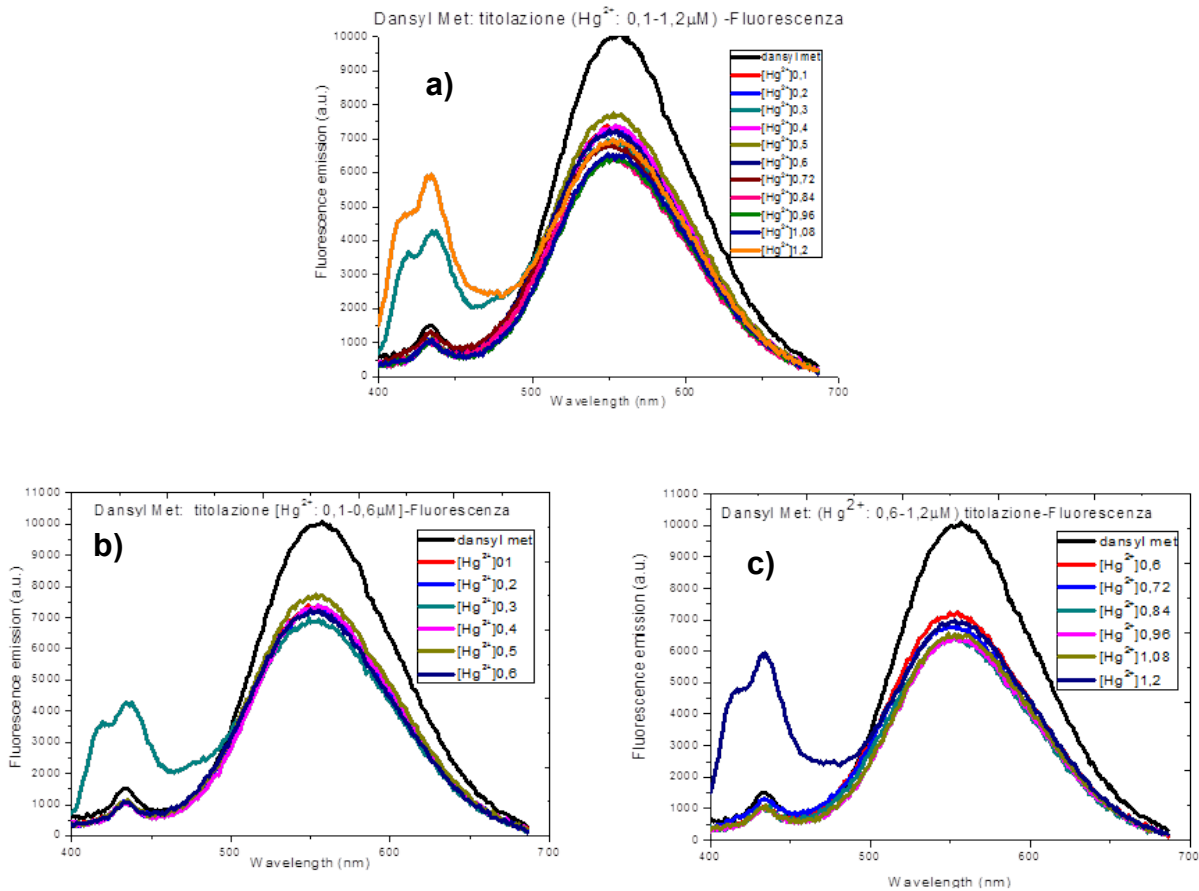


Figura 10: Spettri di emissione in fluorescenza del Composto I in presenza di concentrazioni crescenti di Hg^{2+} nel range: **a)** 0.1-1.2 mM; **b)** 0.1-0.6 μM ; **c)** 0.6-1.2 μM .

Inoltre, per piccole variazioni di concentrazioni (Figura 11) le differenze degli spettri di emissione per concentrazioni di Hg^{2+} pari a 0.1 e 0.6 μM sono minime ed i relativi spettri sovrapponibili considerando le barre di errore ad essi associati. Le condizioni di acquisizione delle misure in fluorescenza fin qui adottate non hanno permesso di discriminare variazioni di concentrazione al di sotto di 0.6 μM .

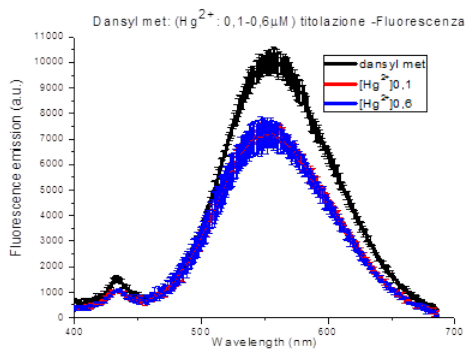


Figura 11: Spettri di emissione in fluorescenza del Composto I in presenza di concentrazioni di Hg^{2+} 0.1 μM e 0.6 μM con relative barre di errore.

Analogamente è stato effettuato anche uno studio degli spettri di assorbanza del composto I per concentrazioni di Hg^{2+} nel range 0.1-1.2 μM (Figura 12).

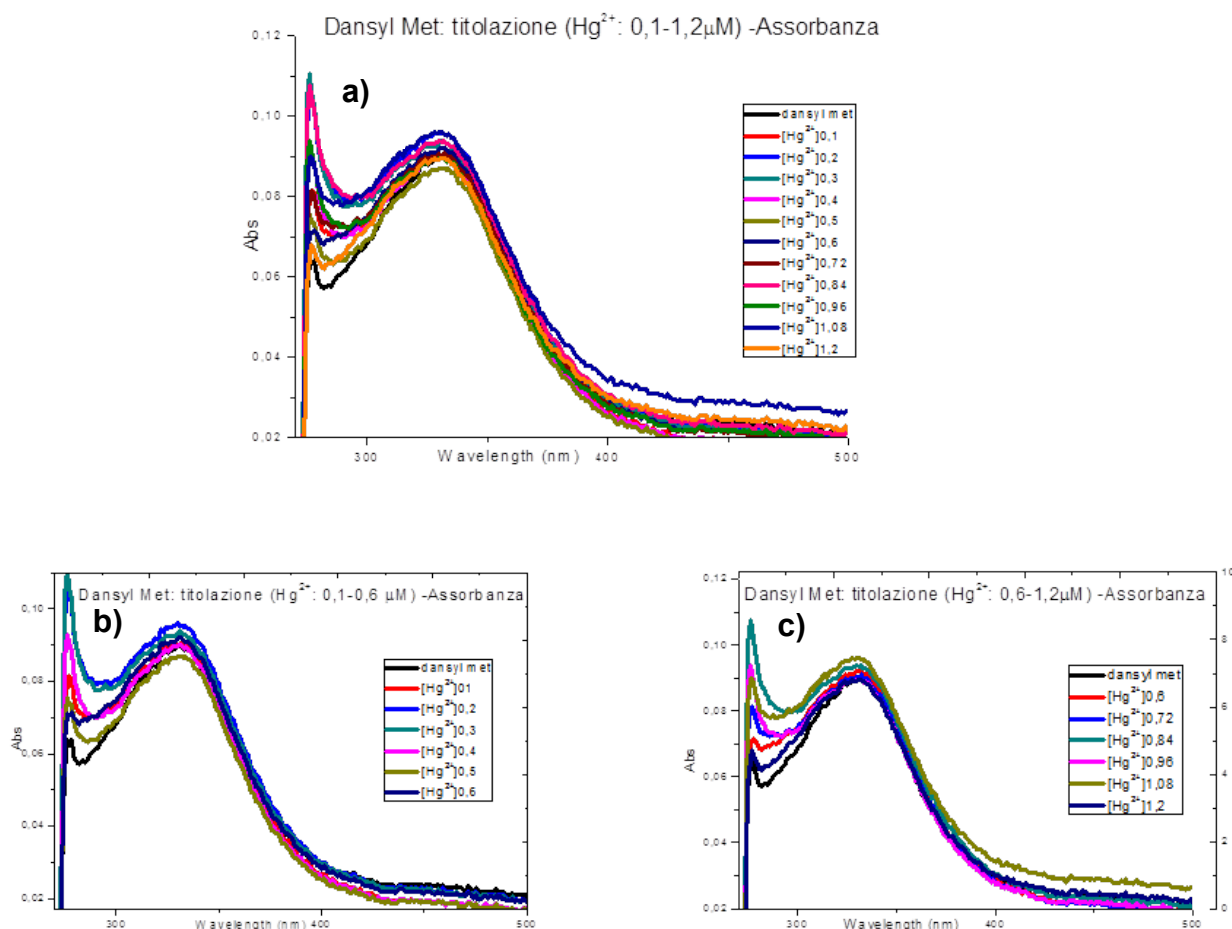


Figura 12: Spettri di assorbimento del Composto I in presenza di concentrazioni crescenti di Hg^{2+} nel range: **a)** 0.1-1.2 μM ; **b)** 0.1-0.6 μM ; **c)** 0.6-1.2 μM .

Una prima analisi evidenzia che anche in assorbanza per concentrazioni di Hg^{2+} nel range 0.1-0.6 μM e 0.6-1.2 μM (Figura 12.b, 12.c) non è possibile delineare un andamento degli spettri di assorbimento in funzione delle concentrazioni di Hg^{2+} al di sotto di 0.6 μM .

Inoltre, per piccole variazioni di concentrazioni (Figura 13) le differenze degli spettri di assorbimento sono minime e gli spettri per concentrazioni di Hg^{2+} pari a 0.1 e 0.6 μM sono sovrapponibili considerando le barre di errore ad essi associati. Le condizioni di acquisizione delle misure in assorbanza fin qui adottate non hanno permesso di discriminare variazioni di concentrazione al di sotto di 0.6 μM .

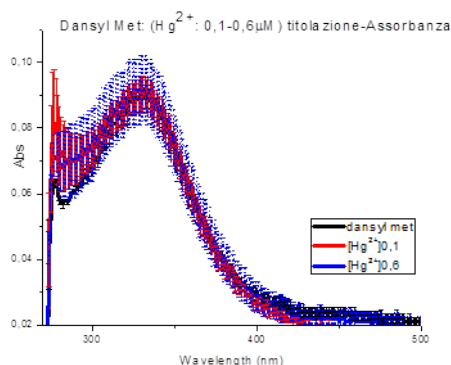


Figura 13: Spettri assorbimento del Composto I in presenza di concentrazioni di Hg^{2+} 0.1 μM e 0.6 μM con relative barre di errore.

Uno studio per concentrazioni di Hg^{2+} al di sotto di 0.6 μM è stato anche effettuato per il composto VI. In Figura 14 sono riportati gli spettri di emissione in fluorescenza per il composto VI. Una prima analisi evidenzia che per concentrazioni di Hg^{2+} nel range 0.1-0.6 μM e 0.6-1.2 μM (Figura 14.b, 14.c) non è possibile tracciare un andamento dell'emissione di fluorescenza in funzione delle concentrazioni di Hg^{2+} al di sotto di 0.6 μM .

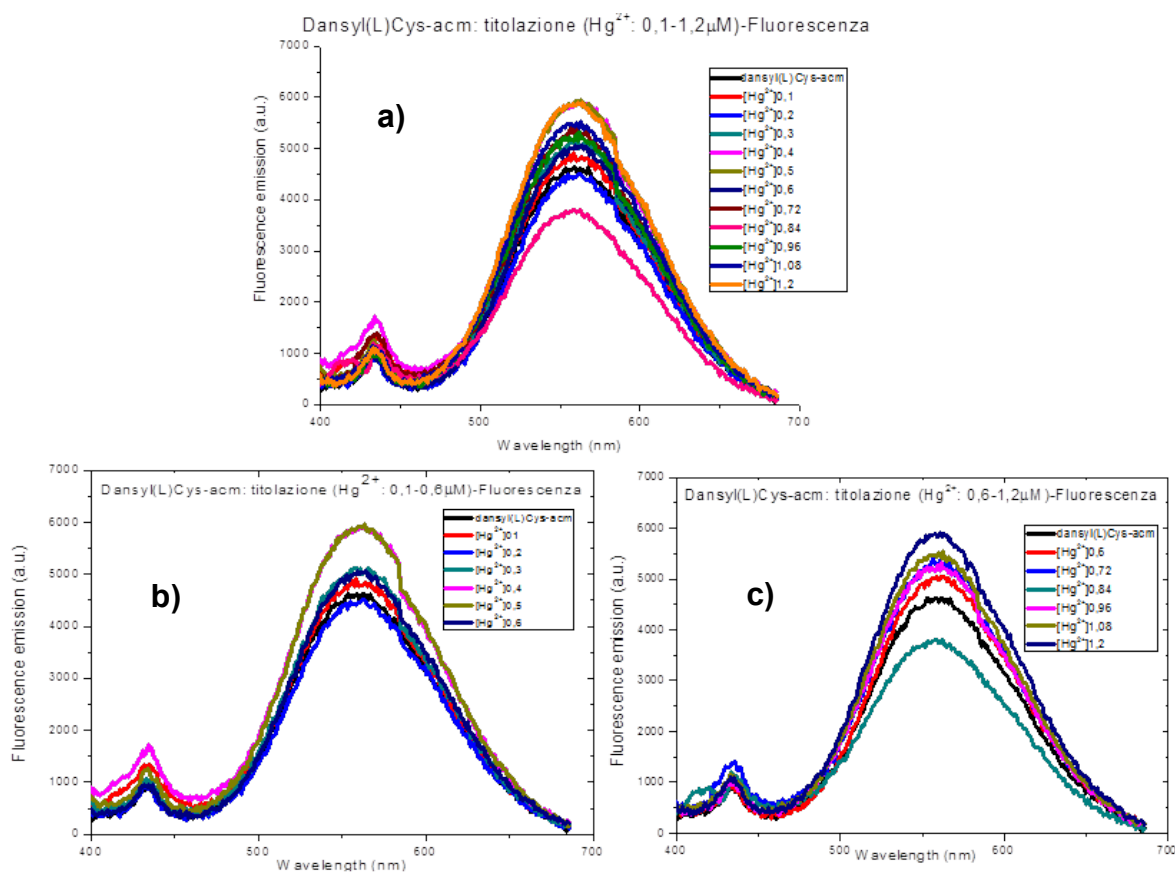


Figura 14: Spettri di emissione in fluorescenza del Composto VI in presenza di concentrazioni crescenti di Hg^{2+} nel range: a) 0.1-1.2 μM ; b) 0.1-0.6 μM ; c) 0.6-1.2 μM

Inoltre, per piccole variazioni di concentrazioni (Figura 15) le differenze degli spettri di assorbimento sono minime e per concentrazioni di Hg^{2+} pari a 0.1 e 0.6 μM gli spettri sovrapponibili considerando le barre di errore ad essi associati.

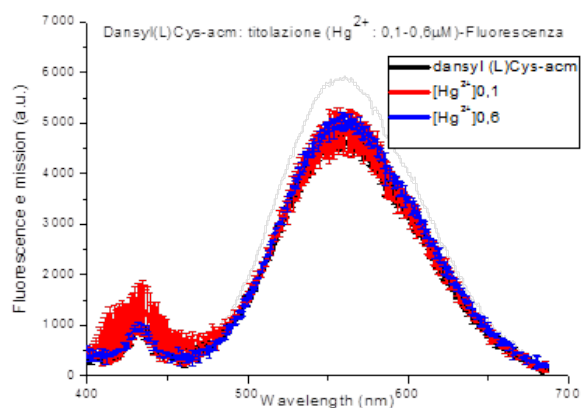


Figura 15: Spettri assorbimento del Composto VI in presenza di concentrazioni di Hg^{2+} 0.1 μM e 0.6 μM con relative barre di errore.

Analogamente, è stato effettuato anche uno studio degli spettri di assorbanza per il composto VI per concentrazioni di Hg^{2+} nel range 0.1-1.2 μM (Figura 16)

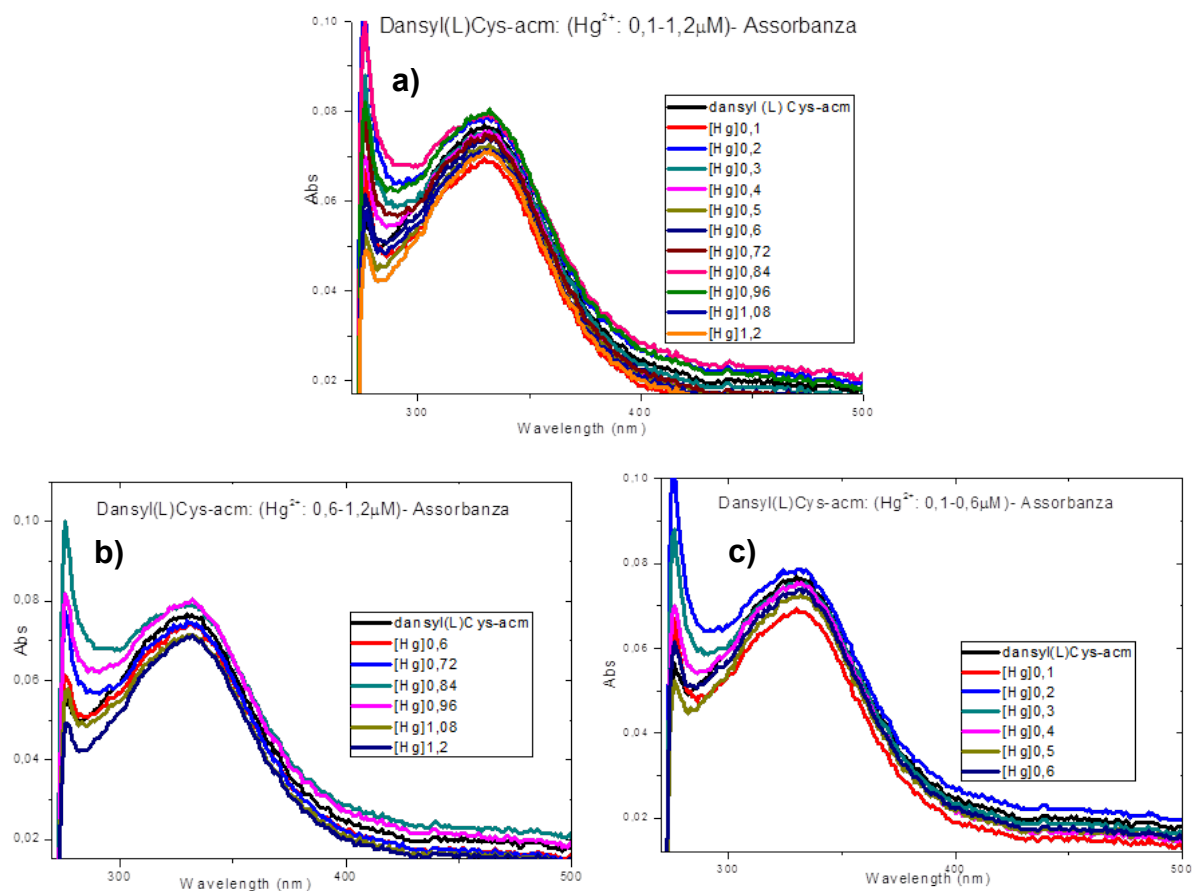


Figura 16: Spettri di assorbanza del Composto VI in presenza di concentrazioni crescenti di Hg^{2+} nel range: **a)** 0.1-1.2 μM ; **b)** 0.1-0.6 μM ; **c)** 0.6-1.2 μM .

Analizzando gli spettri si osserva che anche in assorbanza per concentrazioni di Hg^{2+} nel range 0.1-0.6 mM e 0.6-1.2 mM (Figura 16.b, 16.c) non è possibile delineare un andamento degli spettri di assorbimento in funzione delle concentrazioni di Hg^{2+} al di sotto di 0.6 mM.

Inoltre, per piccole variazioni di concentrazioni (Figura 17) le differenze degli spettri di assorbimento sono minime e gli spettri per le concentrazioni Hg^{2+} 0.1 e 0.6 μM sono sovrapponibili considerando le barre di errore ad essi associati. Le condizioni di acquisizione delle misure in fluorescenza fin qui adottate non hanno permesso di discriminare variazioni di concentrazione al di sotto di 0.6 μM .

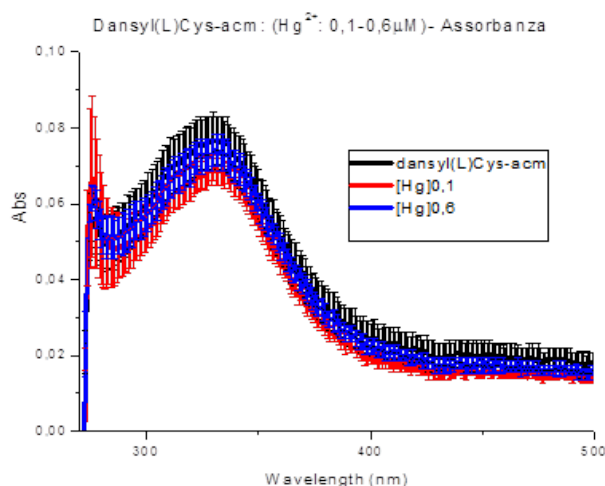


Figura 17: Spettri assorbimento del Composto VI in presenza di concentrazioni di Hg^{2+} 0.1 μM e 0.6 μM con relative barre di errore.

Per migliorare il limite di rilevabilità di Hg^{2+} e poter incrementare ulteriormente la sensibilità della risposta in fluorescenza a basse concentrazioni di Hg^{2+} , è stata valutata una fase successiva di ottimizzazione delle condizioni strumentali di acquisizione. Quindi si è cercato di ottimizzare nuovamente le condizioni del saggio e l'effetto dell'utilizzo di volumi piccoli su piastre da 384 pozzetti sulla sensibilità della risposta in fluorescenza dei composti I, II, V, VI.

Gli spettri di fluorescenza sono stati registrati con uno spettrofluorimetro EnSpire (Perkin Elmer) in piastre 384-multiwell Proxy Plate su soluzioni di dansyl derivati con concentrazione pari a 30 μM , operando su un volume di 30mL. Le misure sono state effettuate mantenendo costante in ogni campione la concentrazione di dansyl-derivato, in modo tale da poter trascurare in fase di elaborazione dati l'effetto di diluizione.

In Figura 18a, sono riportati gli spettri di emissione in fluorescenza registrati con il protocollo ottimizzato nel range di concentrazioni di Hg^{2+} 0.1-0.6 μM per il composto I. In figura 18.b sono stati comparati gli spettri di emissione con le relative deviazioni standard per le concentrazioni di Hg^{2+} 0.1 e 0.6 μM e del composto I. Pur avendo ottimizzato i nuovi parametri di acquisizione ed incrementato l'intensità di segnale acquisito a parità di concentrazione (rispetto alle precedenti condizioni di acquisizione), dalla comparazione degli spettri per basse concentrazioni, non è possibile individuare una sensibilità inferiore a 0.6 μM .

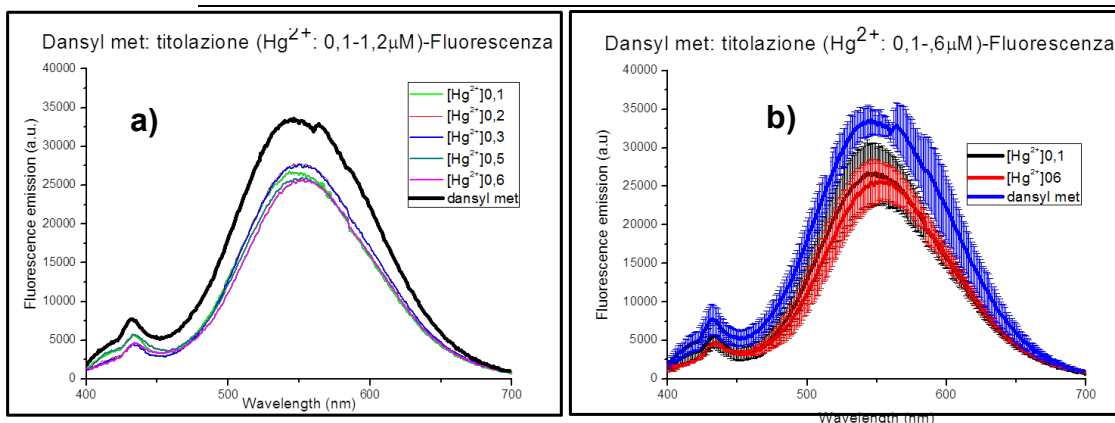


Figura 18: a) Spettri di emissione di fluorescenza del Composto I in presenza di concentrazioni crescenti di Hg^{2+} nel range: 0.1-0.6 μ M; b) Spettri di emissione di fluorescenza per concentrazioni di Hg^{2+} 0.1 μ M e 0.6 mM con relative barre di errore.

In Figura 19a, sono riportati gli spettri di emissione in fluorescenza registrati con il protocollo ottimizzato per il range di concentrazioni di Hg^{2+} 0.1-0.6 μ M per il composto II. In Figura 19.b sono stati comparati gli spettri di emissione con le relative deviazioni standard per le concentrazioni Hg^{2+} 0.1 e 0.6 μ M e del composto II. Pur avendo ottimizzato i nuovi parametri di acquisizione ed incrementato l'intensità di segnale acquisito, dalla comparazione degli spettri per basse concentrazioni, non è possibile individuare una sensibilità inferiore a 0.6 μ M.

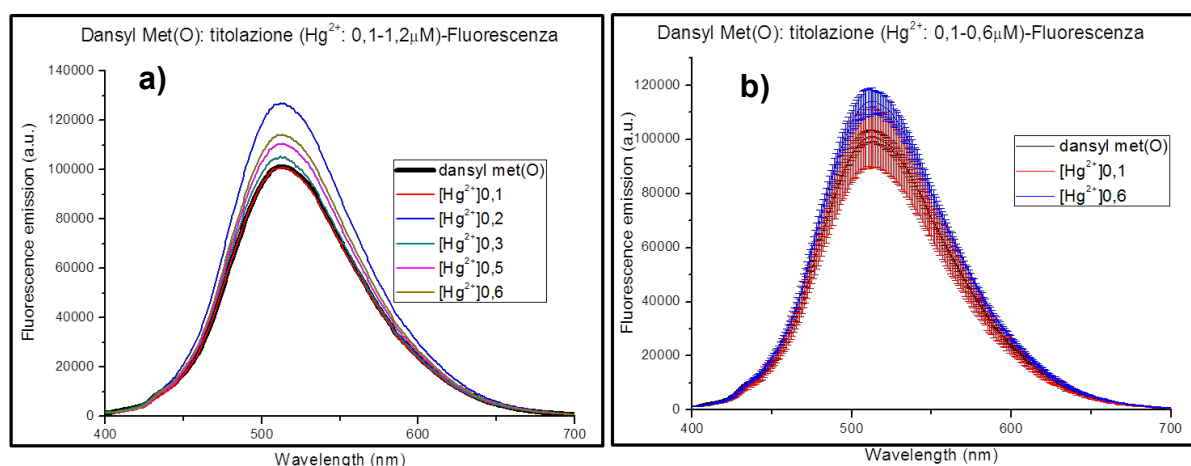


Figura 19: a) Spettri di emissione di fluorescenza del Composto II in presenza di concentrazioni crescenti di Hg^{2+} nel range: 0.1-0.6 mM; b) Spettri di emissione di fluorescenza per concentrazioni di Hg^{2+} 0.1 mM e 0.6 mM con relative barre di errore.

Studi analoghi con il nuovo protocollo ottimizzato sono stati condotti anche sul composto IV. In Figura 20a sono riportati gli spettri di emissione in fluorescenza registrati con il protocollo ottimizzato per il range di concentrazioni di Hg^{2+} 0.1-0.6 μ M per il composto IV. In Figura 20b sono stati comparati gli spettri di emissioni con le relative deviazioni standard per le concentrazioni Hg^{2+} 0.1 e 0.6 μ M e del composto IV. Pur avendo ottimizzato i nuovi parametri di acquisizione ed

incrementato l'intensità di segnale acquisito a parità di concentrazione, dalla comparazione degli spettri per basse concentrazioni, non è possibile individuare una sensibilità inferiore a 0.6 μM .

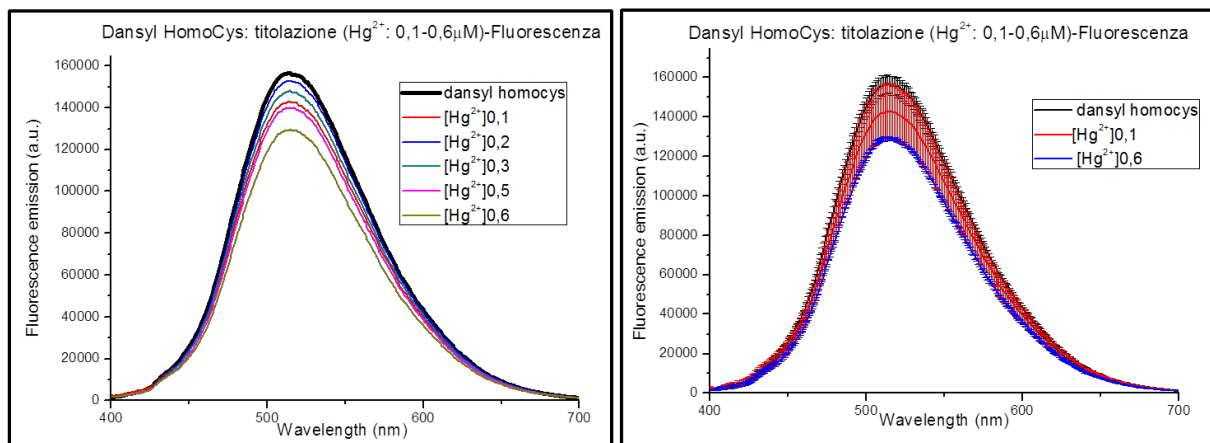


Figura 20: a) Spettri di emissione di fluorescenza del Composto IV in presenza di concentrazioni crescenti di Hg^{2+} nel range: 0.1-0.6 μM ; b) Spettri di emissione di fluorescenza per concentrazioni di Hg^{2+} 0.1 μM e 0.6 μM con relative barre di errore.

Infine, sono state verificate le risposte in fluorescenza con il nuovo protocollo per l'ultimo derivato selezionato, il composto VI. In Figura 21a, sono riportati gli spettri di emissione in fluorescenza del composto VI registrati con il protocollo ottimizzato per il range di concentrazioni di Hg^{2+} 0.1-0.6 μM . In Figura 21b sono stati comparati gli spettri di emissioni con le relative deviazioni standard per le concentrazioni Hg^{2+} 0.1 e 0.6 μM e del Composto VI. Pur avendo ottimizzato i nuovi parametri di acquisizione ed incrementato l'intensità di segnale acquisito a parità di concentrazione, dalla comparazione degli spettri per basse concentrazioni, non è possibile individuare una sensibilità inferiore a 0.6 μM .

In conclusione, per migliorare la sensibilità del nostro saggio di riconoscimento di Hg^{2+} , si è proceduto con l'ottimizzazione delle condizioni di acquisizione (reader, piastra da 384 multiwell, volume 30 μL), ma pur avendo ottenuto una segnale in fluorescenza più intenso (a parità di concentrazione di dansyl derivato rispetto alle condizioni precedenti), non è stato possibile abbassare la sensibilità al di sotto di una concentrazione pari 0.6 μM .

Future acquisizioni con i probe in fluorescenza ed assorbanza su fibra potranno favorire l'ottenimento di sensibilità inferiori ai 0.12 ppm.

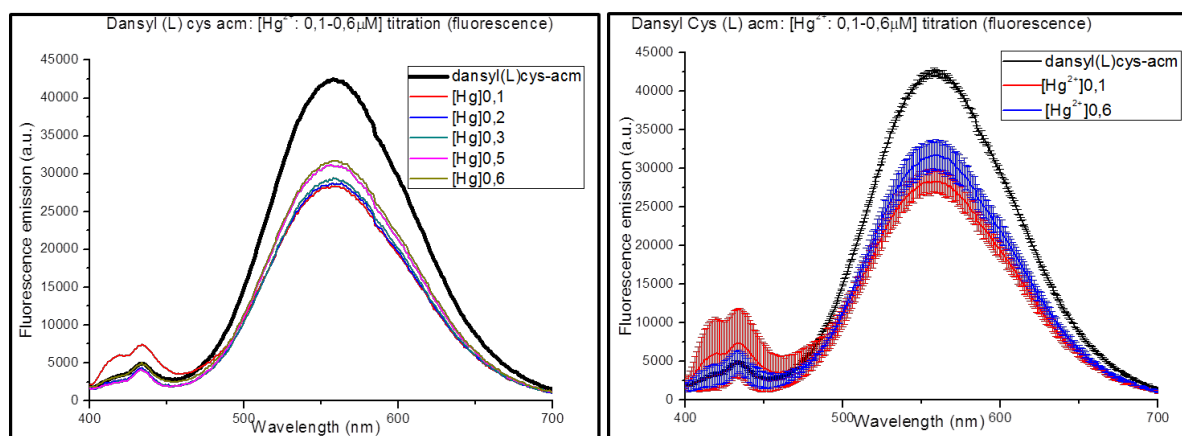


Figura 20: a) Spettri di emissione di fluorescenza del Composto VI in presenza di concentrazioni crescenti di Hg^{2+} nel range: 0.1-0.6 μM ; b) Spettri di emissione di fluorescenza per concentrazioni di Hg^{2+} 0.1 μM e 0.6 μM con relative barre di errore.

Dopo il completamento degli studi sulla sensibilità dei dansyl derivati in saggi di riconoscimento di Hg^{2+} , è stato effettuato uno studio approfondito sulla selettività del riconoscimento di tale catione in presenza di cationi interferenti quali Ca^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+} , Pb^{2+} , Fe^{2+} , Pd^{2+} , Cu^{2+} , Na^+ , Ni^{2+} , Zn^{2+} (soluzioni preparate a partire dai cloruri) e successivamente in acqua di mare sintetica.

Per valutare l'interferenza di altri cationi metallici sono stati effettuati differenti saggi di binding, utilizzando le seguenti condizioni sperimentali: i) concentrazione di dansyl-derivato pari a 30 μM ; ii) concentrazioni limite di cationi interferenti 0.6 μM e 120 μM . L'effetto di tale cationi sulla fluorescenza del dansyl derivato è stato valutato in presenza ed assenza di Hg^{2+} . In particolare tali studi si sono concentrati sui derivati dansyl-Met (Composto I) e dansyl(L)Cys-Acm (composto VI), gli unici derivati a cui è associato uno shift della posizione del picco di emissione del dansile in seguito a complessazione con Hg^{2+} .

[1] Selettività Dansyl Met

- **[0.6 μM] metalli interferenti + dansyl derivato [30 μM]**

È stato valutato l'effetto sull'intensità di emissione di fluorescenza del composto I in presenza di concentrazioni di cationi interferenti pari a 0.6 μM . Lo scopo di tali misure è di valutare l'effetto dei cationi interferenti sulla fluorescenza del Composto I in assenza di Hg^{2+} ed in condizioni in cui la dansyl metionina è presente in largo eccesso (stechiometria 50:1) rispetto alla concentrazione dei cationi metallici (Figura 21).

Dansyl met: selettività-Fluorescenza

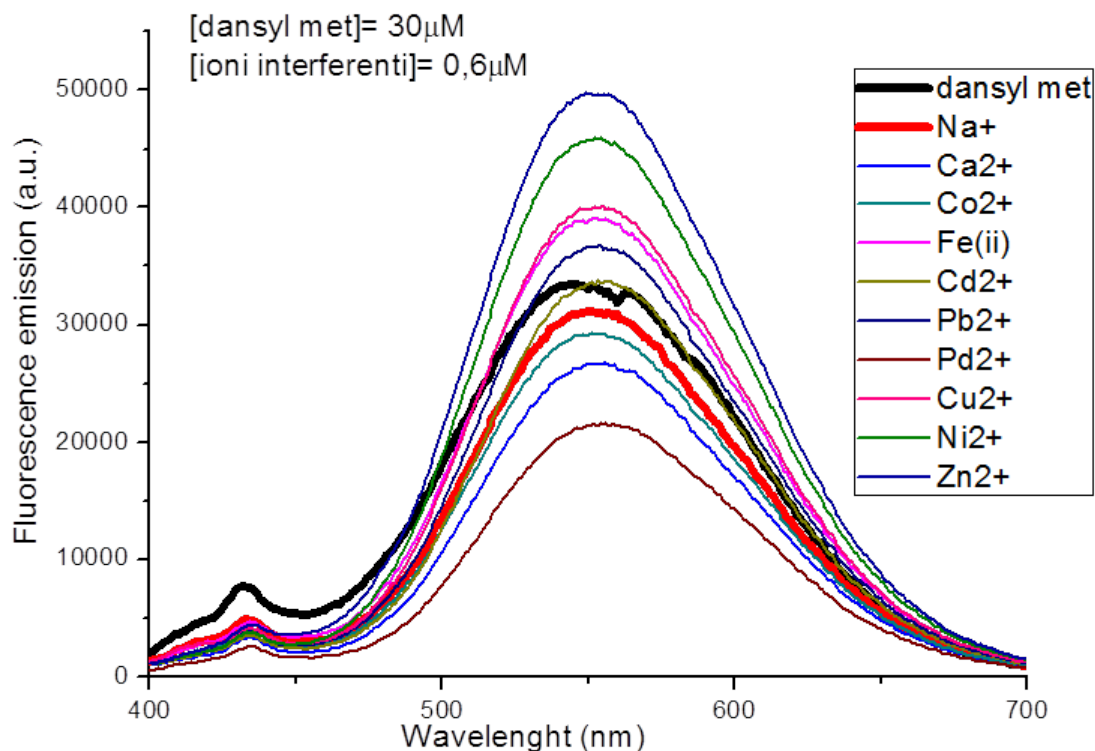


Figura 21: Spettri di emissione in fluorescenza del Composto I in presenza di ioni interferenti Ca^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+} , Pb^{2+} , Fe^{2+} , Pd^{2+} , Cu^{2+} , Na^{+} , Ni^{2+} , Zn^{2+}

Per alcuni cationi, (Cu^{2+} , Pb^{2+} , Fe^{2+} , Ca^{2+}) seppur presenti in bassa concentrazione (0.6 μ M), si ha un incremento della fluorescenza della dansyl met di riferimento (curva nera). Tale incremento, o più in generale le variazioni di emissione in fluorescenza in presenza dei vari cationi sono attribuibili alla formazione di complessi o di interazioni di carica tra il composto I ed i cationi interferenti. Inoltre, particolare attenzione è da rivolgere catione Na^{+} , uno dei cationi presente in acqua di mare in concentrazioni elevate (0.6 M). Per basse concentrazioni, tale catione sembra non avere un effetto limitante sull'emissione in fluorescenza del composto I (curva nera per riferimento, curva rossa per Na^{+})

- **[0.6 μ M] metalli interferenti + dansyl derivato [30 μ M] + Hg^{2+} [0.6 μ M]**

È stata valutata la risposta sull'intensità di emissione di fluorescenza del composto I in presenza di uguali concentrazioni (0.6 μ M) di cationi interferenti e di Hg^{2+} . Lo scopo di tali misure è di valutare l'effetto dei cationi interferenti sulla risposta in fluorescenza del composto I in presenza di Hg^{2+} ed in condizioni in cui la dansyl-Met è presente in largo eccesso (stechiometria 50:1) rispetto alla concentrazione dei cationi metallici (Figura 22).

Dansyl met: selettività-Fluorescenza

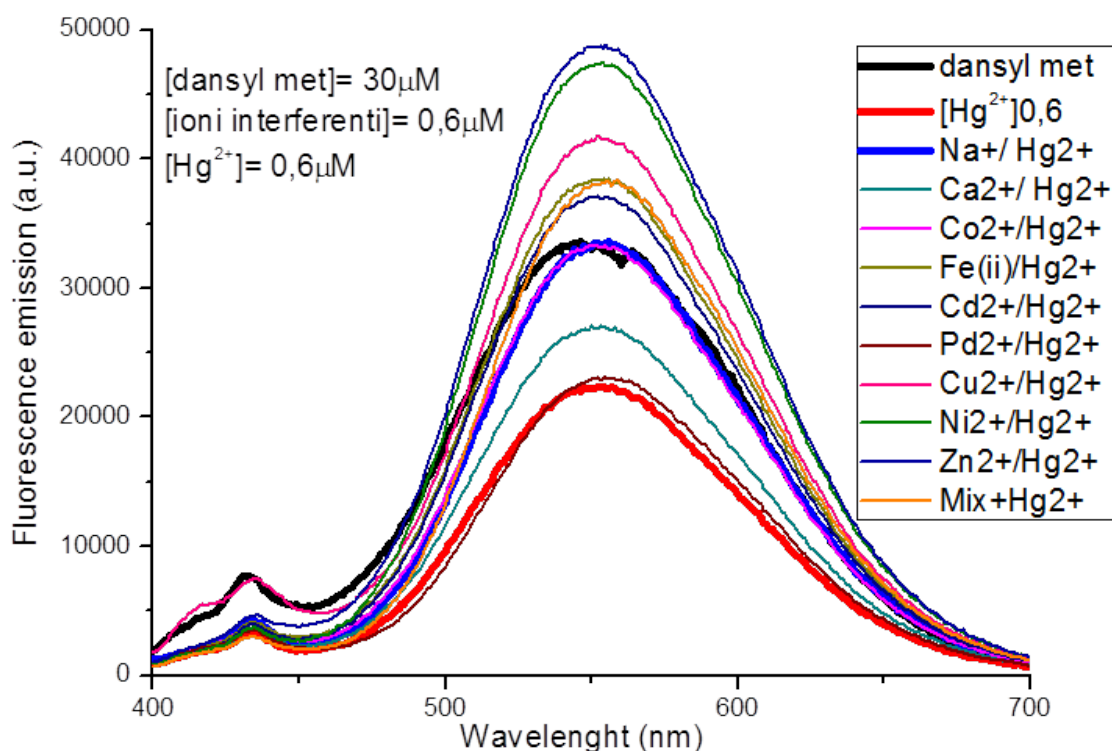


Figura 22: Spettri di emissione in fluorescenza del Composto I in presenza di Hg^{2+} e di ioni interferenti Ca^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+} , Pb^{2+} , Fe^{2+} , Pd^{2+} , Cu^{2+} , Na^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+}

Molti cationi bivalenti seppur presenti in bassa concentrazione ($0.6 \mu M$) interferiscono con la risposta del dansyl-Met in presenza di Hg^{2+} $0.6 \mu M$ (curva rossa). In particolare, anche il catione Na^+ (curva blu) risulta influenzare la risposta del composto I in presenza di Hg^{2+} , inibendo l'atteso spegnimento della fluorescenza del dansile in seguito alla complessazione con il mercurio.

- **[120 μM] metalli interferenti + dansyl derivato [30 μM]**

È stato valutato l'effetto sull'intensità di emissione di fluorescenza del composto I in presenza di concentrazioni di cationi interferenti pari a $120 \mu M$. Lo scopo di tali misure è di valutare l'effetto dei cationi interferenti sulla sola fluorescenza del composto I in assenza di Hg^{2+} ed in condizioni in cui la dansyl-Met è presente in difetto (stechiometria 1:4) rispetto alla concentrazione dei cationi metallici (Figura 23).

Dansyl met: selettività-Fluorescenza

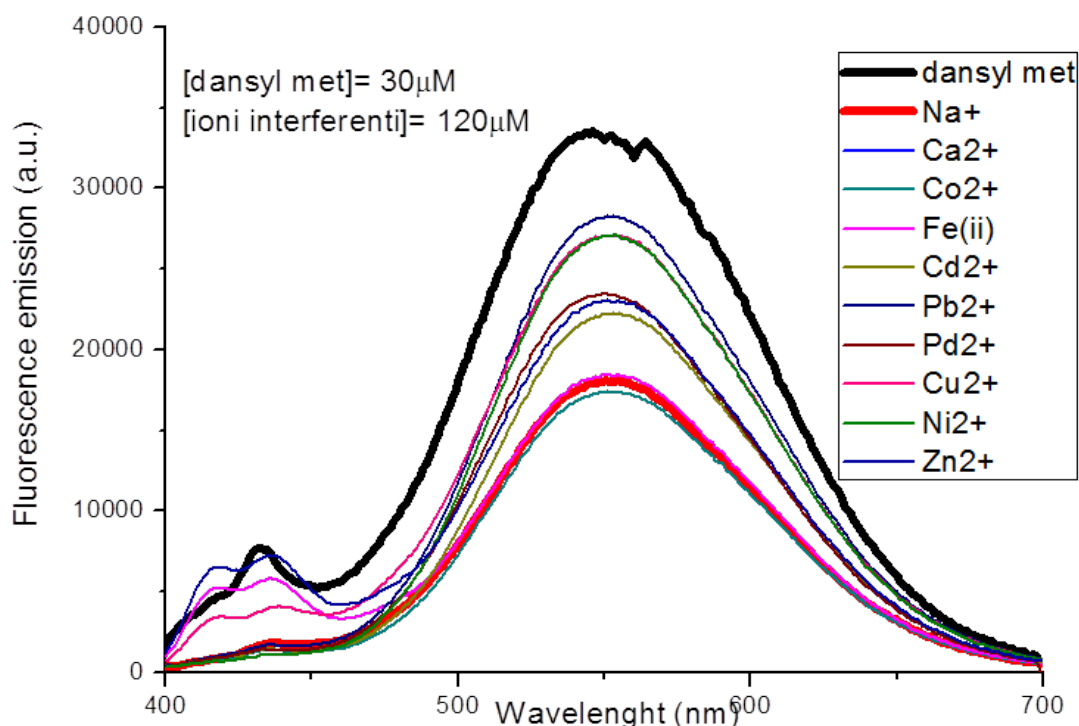


Figura 23: Spettri di emissione in fluorescenza del Composto I in presenza di ioni interferenti Ca²⁺, Cd²⁺, Co²⁺, Pb²⁺, Fe²⁺, Pd²⁺, Cu²⁺, Na⁺, Ni²⁺, Zn²⁺

Tutti i cationi inibiscono l'emissione in fluorescenza della dansyl-Met di riferimento (curva nera). Tale effetto di quenching della fluorescenza, in presenza dei vari cationi è ancora una volta attribuibile alla formazione di complessi o di interazioni di carica non specifici tra il composto I ed i cationi. Inoltre, particolare attenzione è da rivolgere catione Na⁺ che dà luogo ad uno spegnimento dell'emissione di fluorescenza di circa il 50% rispetto alla fluorescenza di riferimento del composto I (curva nera per composto I, curva rossa per Na⁺).

- **[120 μ M] metalli interferenti + dansyl derivato [30 μ M] + Hg²⁺ [120 μ M]**

È stata valutata la risposta sull'intensità di emissione di fluorescenza del composto I in presenza di uguali concentrazioni (120 μ M) di cationi interferenti e di Hg²⁺. Lo scopo di tali misure è di valutare l'effetto dei cationi interferenti sulla risposta in fluorescenza del composto I in presenza di Hg²⁺ ed in condizioni in cui la dansyl metionina è stechiometricamente in difetto (1:8) rispetto alla concentrazione dei cationi metallici (Figura 24).

Dansyl met: selettività-Fluorescenza

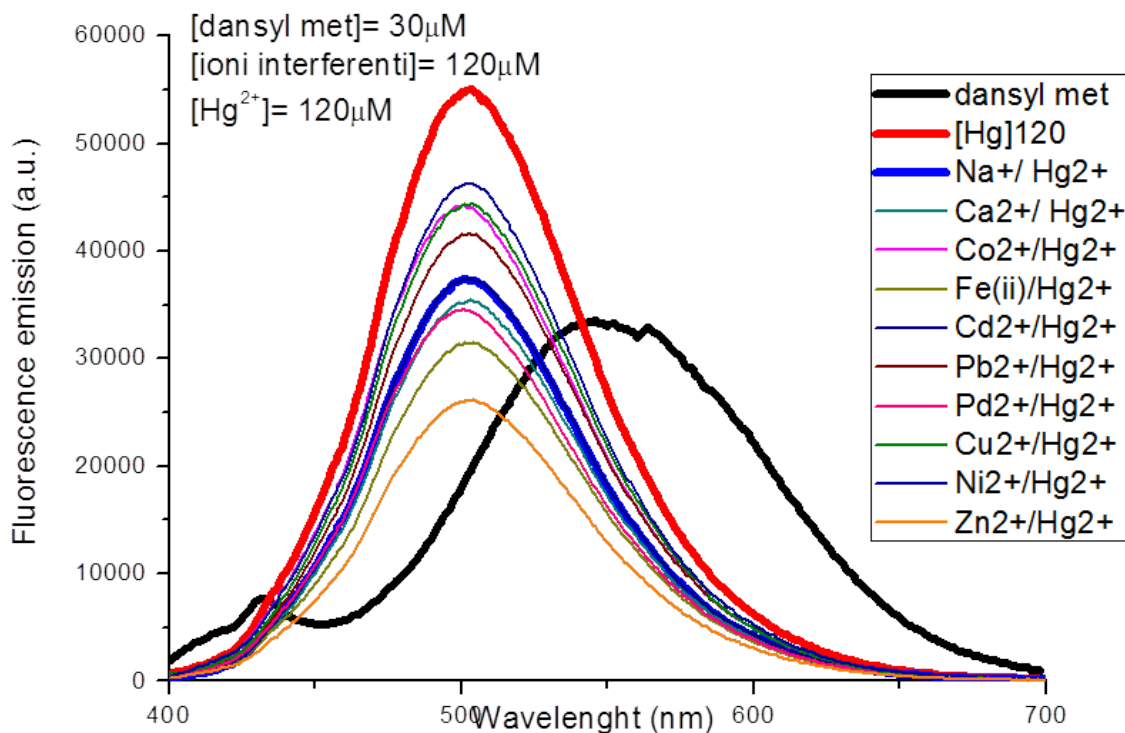


Figura 24: Spettri di emissione in fluorescenza del Composto I in presenza di Hg²⁺ e di ioni interferenti Ca²⁺, Cd²⁺, Co²⁺, Pb²⁺, Fe²⁺, Pd²⁺, Cu²⁺, Na²⁺, Ni²⁺, Zn²⁺

Tutti i cationi interferiscono con la risposta in fluorescenza del Composto I in presenza di una concentrazione di Hg²⁺ pari a 120 μ M (curva rossa). È ancora possibile osservare uno shift della posizione del picco di emissione della fluorescenza in presenza di Hg²⁺, ma la presenza dei cationi dà luogo un parziale spegnimento della fluorescenza.

[2] Selettività Dansyl(L)Cys-Acm

- **[0.6 μ M] metalli interferenti + dansyl derivato [30 μ M]**

È stato valutato l'effetto sull'intensità di emissione di fluorescenza del composto VI in presenza di concentrazioni di cationi interferenti pari a 0.6 μ M. Lo scopo di tali misure è di valutare l'effetto dei cationi interferenti sulla fluorescenza del composto VI in assenza di Hg²⁺ ed in condizioni in cui il composto VI è presente in largo eccesso (stechiometria 50:1) rispetto alla concentrazione dei cationi metallici (Figura 25).

Dansyl(L)Cys-acm: selettività-Fluorescenza

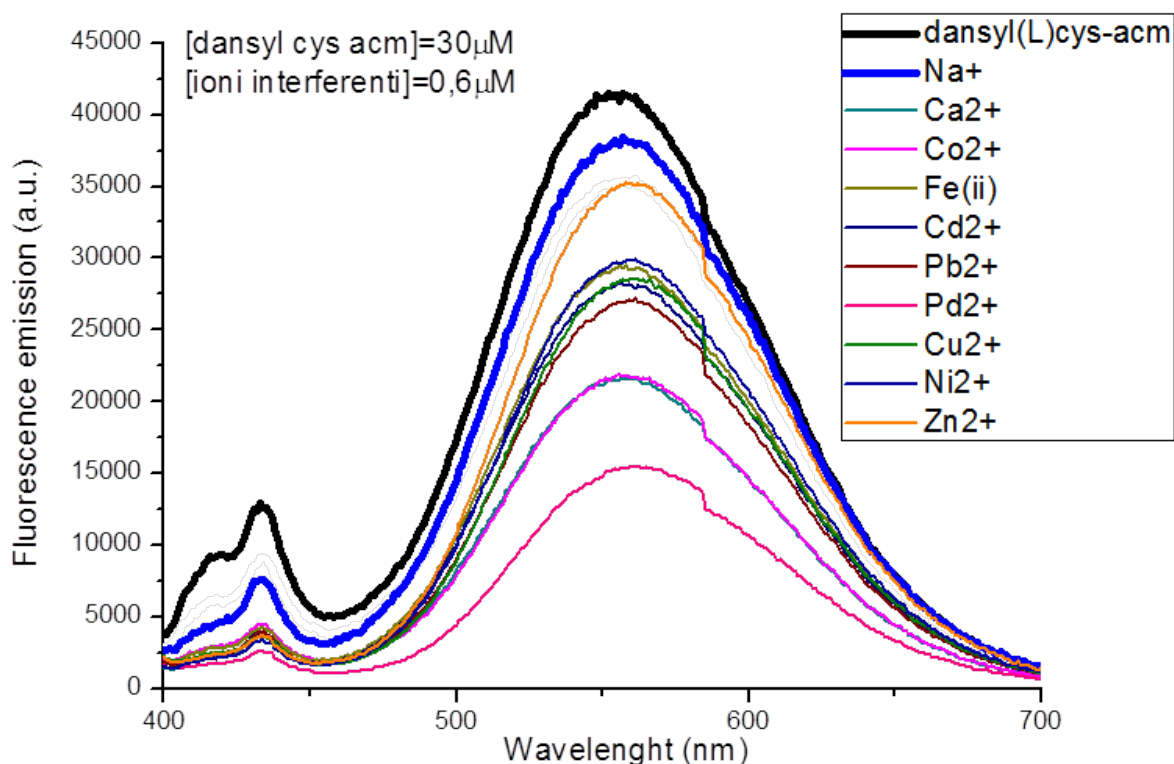


Figura 25: Spettri di emissione in fluorescenza del Composto VI in presenza di ioni interferenti Ca²⁺, Cd²⁺, Co²⁺, Pb²⁺, Fe²⁺, Pd²⁺, Cu²⁺, Na⁺, Ni²⁺, Zn²⁺

Tutti i cationi, seppur in bassa concentrazione (0.6 μ M), danno luogo ad uno spegnimento dell'emissione del composto VI di riferimento (curva nera). Tale effetto è da attribuire alla formazione di complessi o di interazioni di carica non specifici tra il composto VI ed i cationi interferenti. In particolare, la presenza di Na⁺ alla concentrazione in esame sembra non avere un effetto limitante sull'emissione in fluorescenza del composto VI (curva nera per riferimento, curva blu per Na⁺).

- **[0.6 μ M] metalli interferenti + dansyl derivato [30 μ M] + Hg²⁺ [0.6 μ M]**

È stata valutata la risposta sull'intensità di emissione di fluorescenza del composto VI in presenza di uguali concentrazioni (0.6 mM) di cationi interferenti e di Hg²⁺. Lo scopo di tali misure è di valutare l'effetto dei cationi interferenti sulla risposta in fluorescenza del composto VI in presenza di Hg²⁺ ed in condizioni in cui il composto VI è presente in largo eccesso (stechiometria 50:1) rispetto ai cationi metallici (Figura 26).

Dansyl(L)Cys-acm: selettività-Fluorescenza

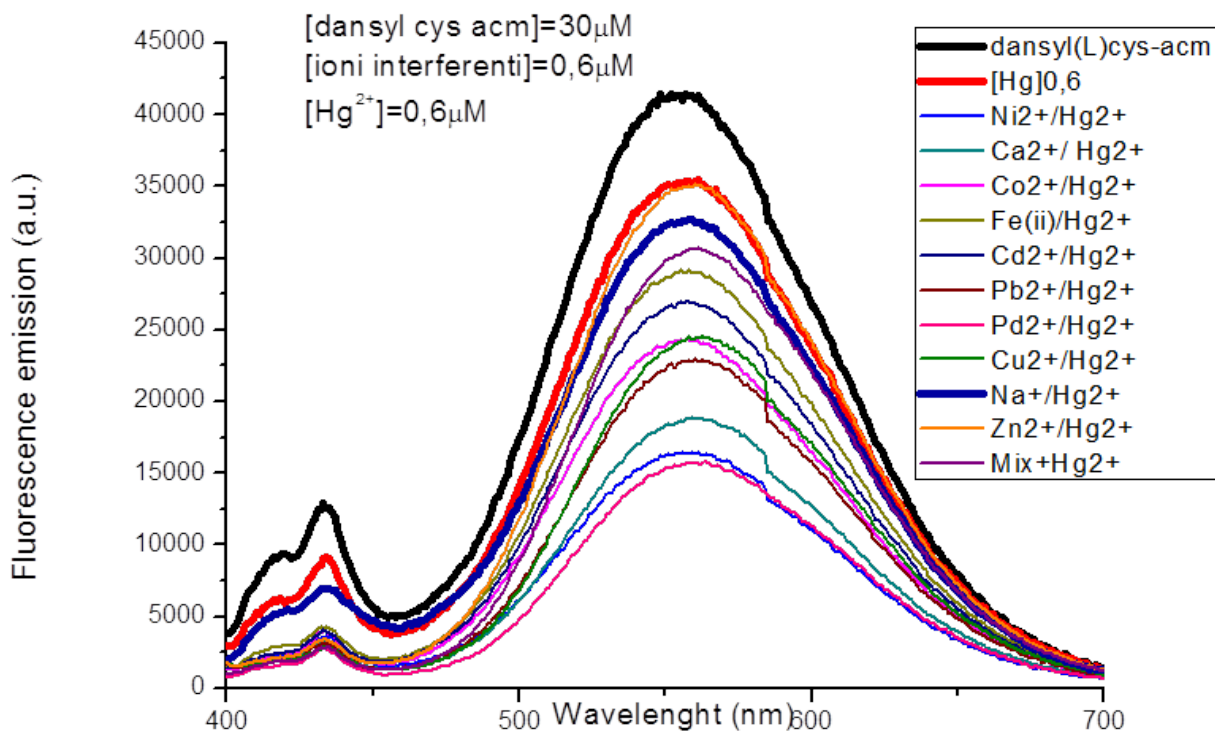


Figura 26: Spettri di emissione in fluorescenza del Composto VI in presenza di Hg²⁺ e di ioni interferenti Ca²⁺, Cd²⁺, Co²⁺, Pb²⁺, Fe²⁺, Pd²⁺, Cu²⁺, Na⁺, Ni²⁺, Zn²⁺

Tutti i cationi bivalenti seppur presenti in bassa concentrazione (0.6 μ M) interferiscono con la risposta del composto VI in presenza di Hg²⁺ 0.6 μ M (curva rossa). In particolare, anche il catione Na⁺ (curva blu) risulta influenzare la risposta del composto VI in presenza di Hg²⁺, dando luogo ad un ulteriore spegnimento della fluorescenza del complesso del dansyl derivato con il catione mercurio.

- **[120 μ M] metalli interferenti + dansyl derivato [30 μ M]**

È stato valutato l'effetto sull'intensità di emissione di fluorescenza del composto VI in presenza di concentrazioni di cationi interferenti pari a 120 μ M. Lo scopo di tali misure è di valutare l'effetto dei cationi interferenti sulla fluorescenza del composto VI in assenza di Hg²⁺ ed in condizioni in cui il derivato dansyl(L)Cys-Acm risulta essere stechiometricamente in difetto (1:4) rispetto alla concentrazione dei cationi metallici (Figura 27).

Dansyl(L)Cys-acm: selettività-Fluorescenza

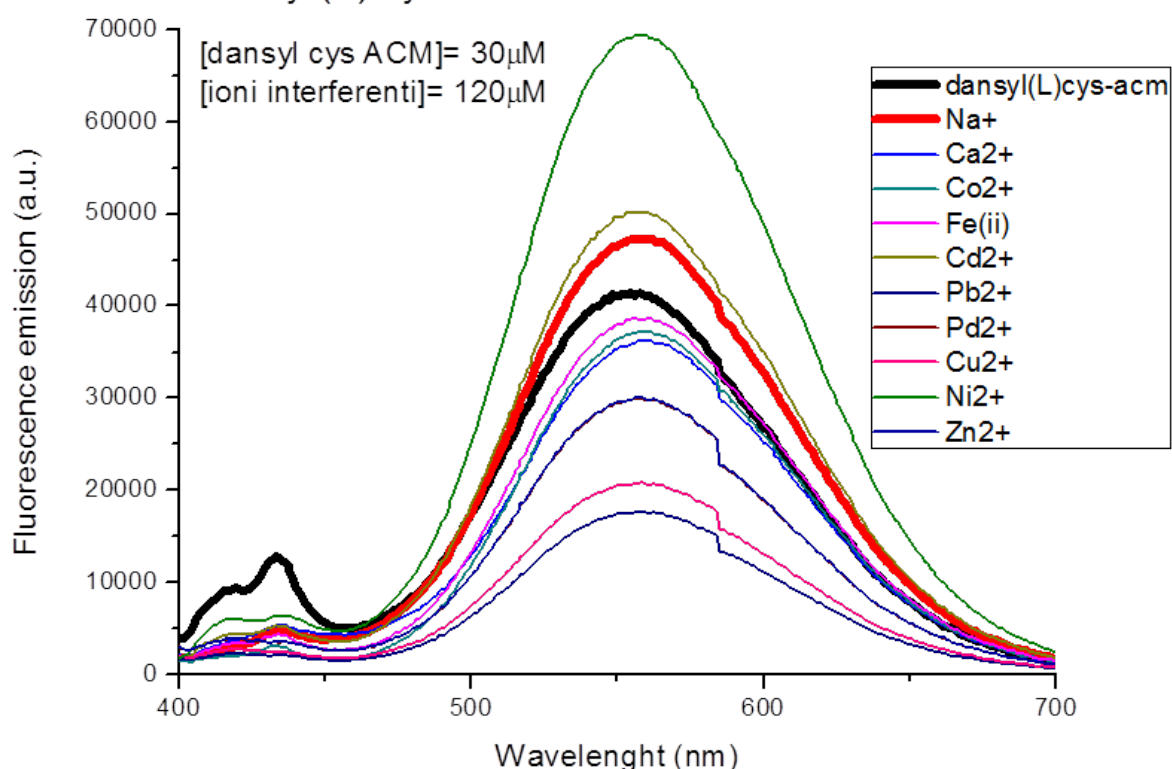


Figura 27: Spettri di emissione in fluorescenza del Composto VI in presenza di ioni interferenti Ca^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+} , Pb^{2+} , Fe^{2+} , Pd^{2+} , Cu^{2+} , Na^{+} , Ni^{2+} , Zn^{2+}

I cationi Ca^{2+} , Co^{2+} , Na^{+} danno luogo ad un incremento dell'emissione di fluorescenza del composto VI di riferimento (curva nera). Nel caso particolare di Na^{+} (curva rossa), l'effetto sulla fluorescenza di tale catione risulta essere non molto pronunciato. Tutti gli altri cationi danno invece luogo ad uno spegnimento non trascurabile dell'emissione in fluorescenza della dansyl(L)Cys-Acm di riferimento (curva nera).

- **[120 μ M] metalli interferenti + dansyl derivato [30 μ M] + Hg^{2+} [120 μ M]**

È stata la risposta sull'intensità di emissione di fluorescenza del composto VI in presenza di uguali concentrazioni (120 μ M) di cationi interferenti e di Hg^{2+} . Lo scopo di tali misure è di valutare l'effetto dei cationi interferenti sulla risposta in fluorescenza del composto VI in presenza di Hg^{2+} ed in condizioni in cui il derivato dansyl(L)Cys-Acm risulta stechiometricamente in difetto (1:8) rispetto alla concentrazione dei cationi metallici (Figura 28).

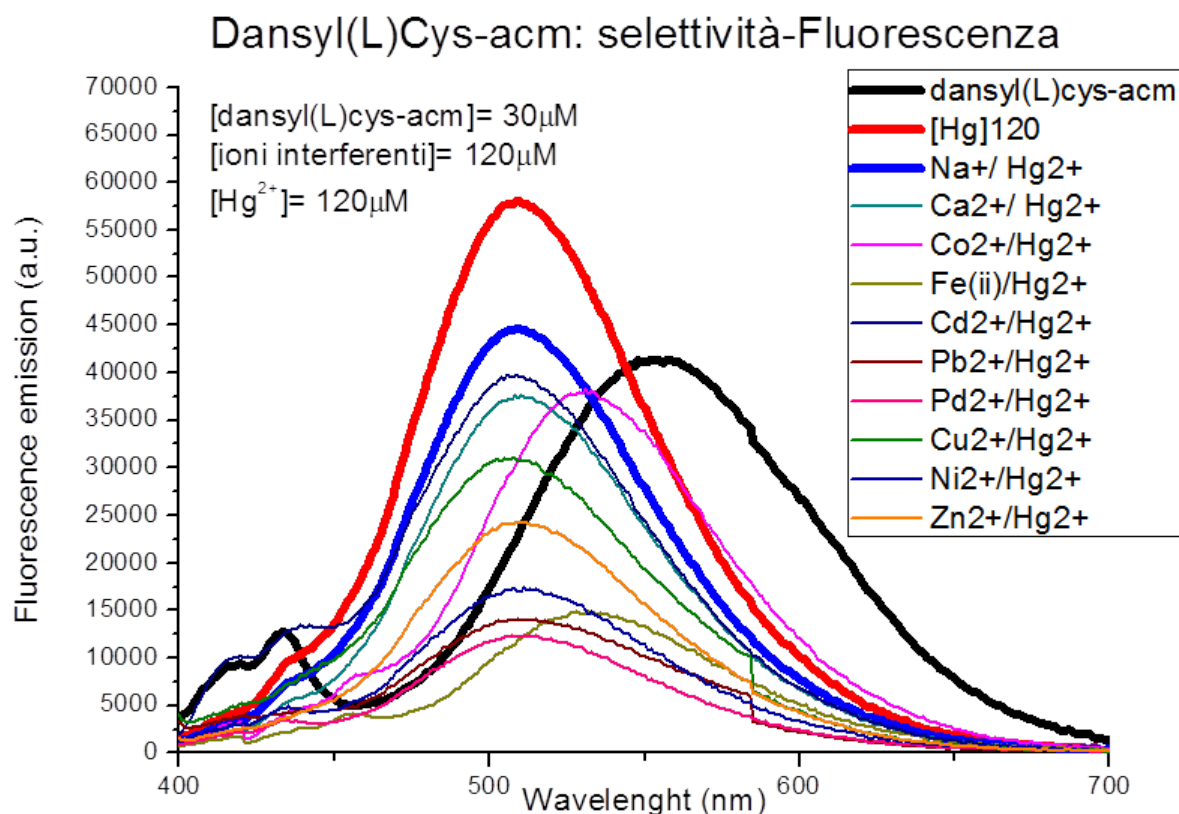


Figura 28: Spettri di emissione in fluorescenza del Composto VI in presenza di Hg²⁺ e di ioni interferenti Ca²⁺, Cd²⁺, Co²⁺, Pb²⁺, Fe²⁺, Pd²⁺, Cu²⁺, Na⁺, Ni²⁺, Zn²⁺

Tutti i cationi interferiscono con la risposta in fluorescenza della dansyl(L)Cys-Acm in presenza di [Hg²⁺] 120 μ M (curva rossa). È ancora possibile osservare uno shift del picco di emissione del il derivato dansyl(L)Cys-Acm inseguito alla complessazione con Hg²⁺, ma la presenza di alte concentrazioni di cationi genera un parziale spegnimento di tale fluorescenza.

Gli studi di selettività hanno evidenziato come per il composto I ed il composto VI si abbia una interferenza non trascurabile sugli spettri di emissione in fluorescenza dovuta alla presenza dei cationi interferenti presi in esame. Una situazione analoga è stata riscontrata in presenza di basse (0.6 μ M) e di alte (120 μ M) concentrazione di Hg²⁺. Per alte concentrazioni di Hg²⁺ e di cationi interferenti si è osservato in tutti i casi l'atteso shift della posizione del picco di emissione di fluorescenza, ma con sostanziali effetti sull'intensità di emissione di tale picco.

Particolare attenzione è stata rivolta all'effetto non sottovalutabile del catione Na⁺, uno dei cationi presenti in quantità elevate in ambiente marino, il cui effetto è stato definitivamente valutato effettuando prove di selettività in acqua di mare sintetica. Infatti, per completare quindi il pannello di saggi di selettività delle molecole prescelte (composti I e VI), sono stati effettuati titolazioni di Hg²⁺ in acqua di mare sintetica. La composizione dell'acqua di mare sintetica utilizzata è la seguente: 0.6 M NaCl e 0.06 M NaHCO₃, ed il pH misurato è pari ad 8.

Per valutare le prestazioni del nostro saggio in acqua di mare sintetica la concentrazione di dansyl derivato è stata fissata 10 μM , e sono state usate concentrazioni di Hg^{2+} nell'intervallo 0.6-100 μM . Sono stati comparati gli spettri di emissione in fluorescenza nel buffer Hepes 10 mM (pH = 7.4) e quelli in acqua di mare sintetica in funzione di concentrazioni crescenti di Hg^{2+} .

Gli spettri di emissione in fluorescenza del composto I per concentrazioni crescenti di Hg^{2+} (intervallo di concentrazioni 0.6 - 100 μM) in Hepes buffer sono riportati in Figura 29. L'intensità e la posizione del picco di emissione del dansile sono funzione della concentrazione di Hg^{2+} . È stato osservato che per basse concentrazioni di Hg^{2+} (inferiori a 3.6 μM) si ha una diminuzione della emissione di fluorescenza (o quenching) e successivamente per concentrazioni crescenti una 'accensione' della intensità di emissione a 500 nm ed un blue-shift di 40 nm della massima intensità di emissione (550-500 nm).

Dansyl Met [$10\mu\text{M}$]: titolazione-Fluorescenza

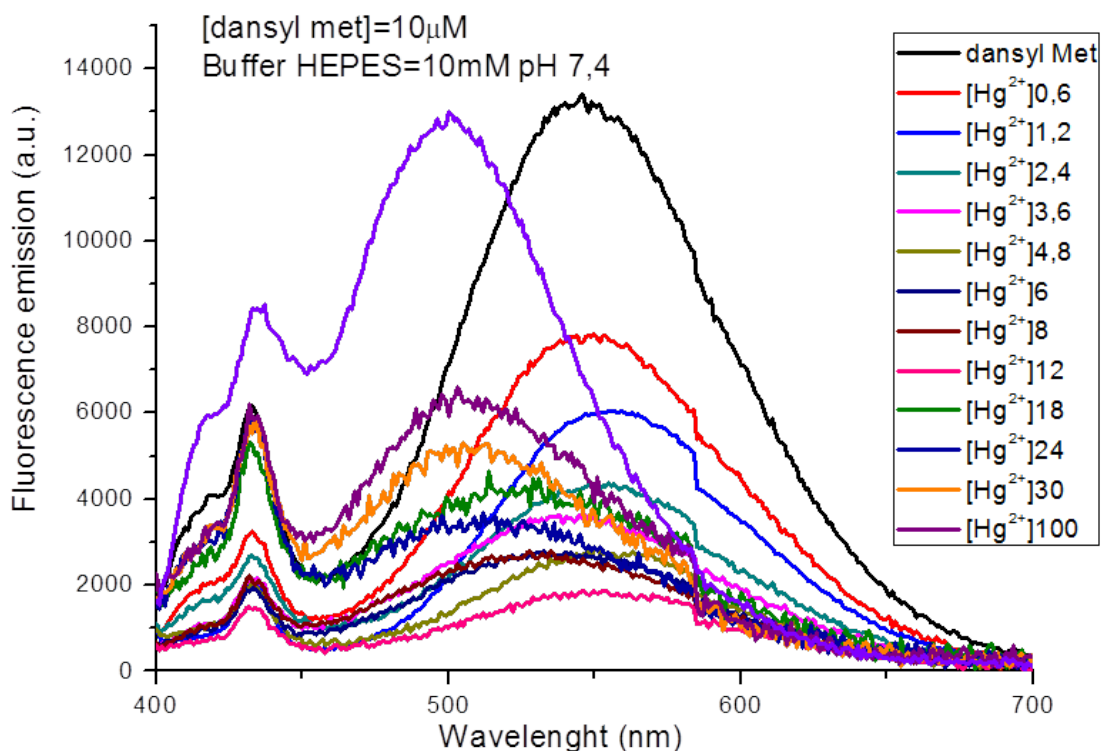


Figura 29: spettri di emissione in fluorescenza del composto I per concentrazioni crescenti di Hg^{2+} (intervallo di concentrazioni 0.6 - 100 μM) in Hepes buffer 10 mM.

Gli spettri di emissione in fluorescenza del composto I per concentrazioni crescenti di Hg^{2+} (intervallo di concentrazioni 0.6 - 100 μM) in acqua di mare sintetica sono riportati in Figura 30.

Dansyl Met[10 μ M]: titolazione in H₂O sintetica-Fluorescenza

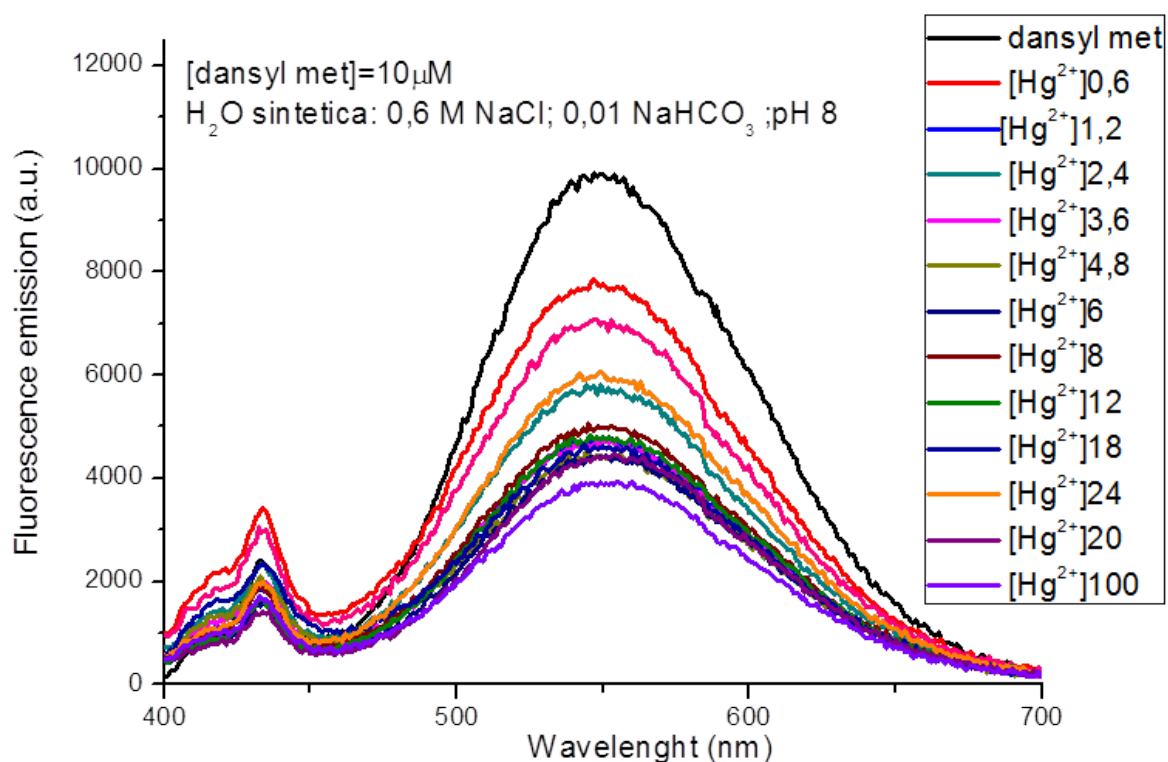


Figura 30: Spettri di emissione in fluorescenza del composto I per concentrazioni crescenti di Hg²⁺ (intervallo di concentrazioni 0.6 - 100 μ M) in acqua di mare sintetica.

In acqua di mare è possibile seguire un andamento di spegnimento della fluorescenza ad un valore minimo corrispondente alla massima concentrazione di Hg²⁺ (100 μ M). Probabilmente, per concentrazioni di NaCl così elevate (0.6 M), la presenza di sodio e di cloruri dà luogo ad equilibri di speciazione differenti che: i) possono interferire con la formazione del complesso Hg²⁺/dansyl derivato; ii) possono interferire con il meccanismo di trasferimento elettronico responsabile dello shift e dell'accensione della fluorescenza.

La verifica delle performance del saggio in HEPES buffer ed acqua di mare sintetica è stata effettuata anche per il composto VI. Gli spettri di emissione in fluorescenza del composto VI per concentrazioni crescenti di Hg²⁺ (intervallo di concentrazioni 0.6 - 100 μ M) in HEPES buffer sono riportati in Figura 31.

Dansyl(L)cys-acm[10 μ M]: titolazione-Fluorescenza

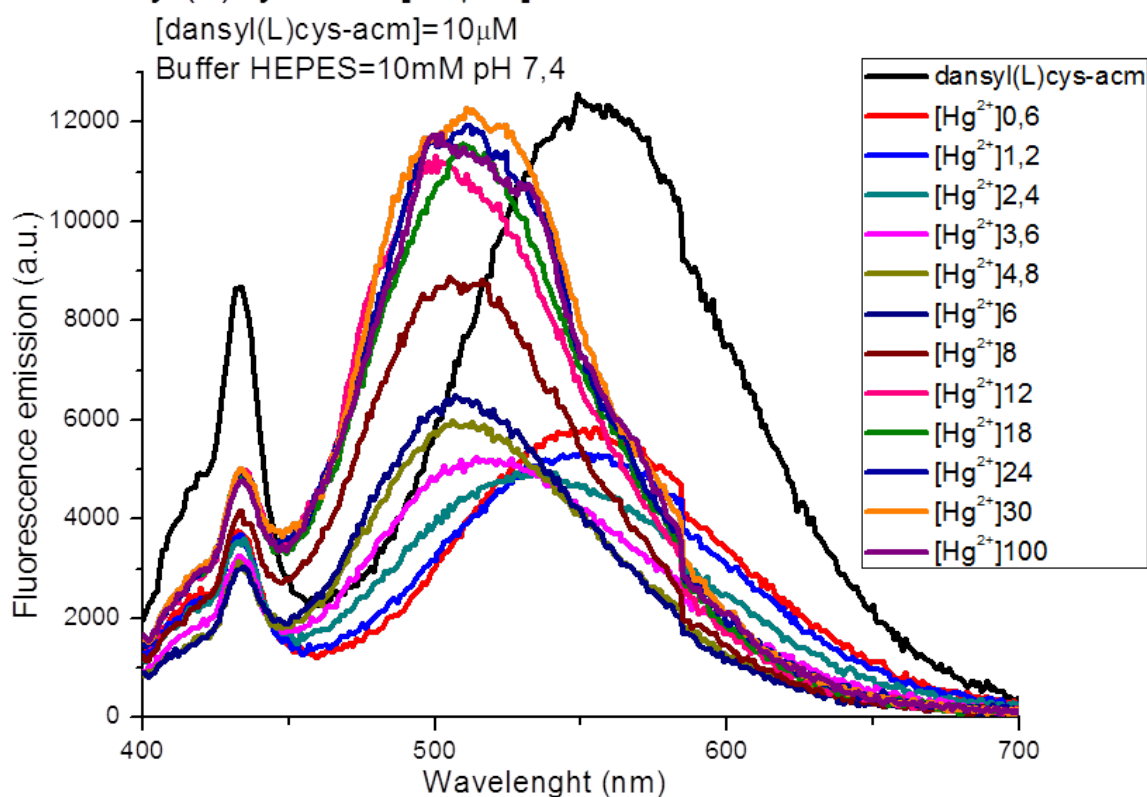


Figura 31: spettri di emissione in fluorescenza del composto VI per concentrazioni crescenti di Hg²⁺ (intervallo di concentrazioni 0.6 - 100 μ M) in HEPES buffer 10 mM.

L'intensità e la posizione del picco di emissione del composto VI sono funzione della concentrazione di Hg²⁺. È stato confermato anche per tale derivato che per basse concentrazioni di Hg²⁺ (inferiori a 3.6 μ M) si ha una diminuzione dell' emissione di fluorescenza (o quenching) e successivamente per concentrazioni crescenti una 'accensione' della intensità di emissione a 500 nm ed un blue-shift di 40 nm della massima intensità di emissione (550-500 nm).

Gli spettri di emissione in fluorescenza del composto VI per concentrazioni crescenti di Hg²⁺ (intervallo di concentrazioni 0.6 - 100 μ M) in acqua di mare sintetica sono riportati in Figura 32.

In acqua di mare sintetica è possibile seguire un andamento di spegnimento della fluorescenza fino ad una concentrazione di Hg²⁺ pari a 4.8 μ M. A seguire, concentrazioni crescenti di Hg²⁺ generano il completo spegnimento della fluorescenza che si perde nel rumore di fondo della misure acquisite.

La risposta in fluorescenza del dansyl(L)Cys-Acm, in presenza di Hg²⁺ e concentrazioni di cloruro di sodio elevate si discosta in modo rilevante da quella osservata nel buffer HEPES: valgono anche in questo caso le stesse considerazioni fatte in precedenza per la dansyl-Met.

Dansyl(L)cys-acm[10 μ M]: titolazione in H₂O sintetica-Fluorescenza

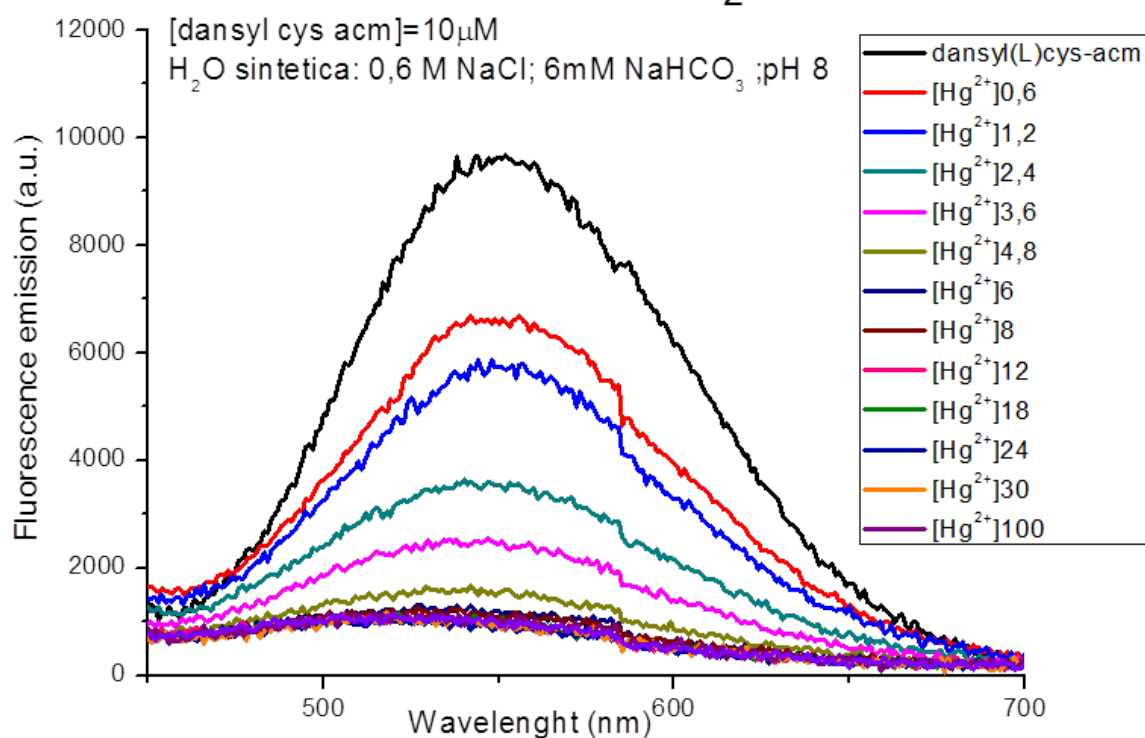


Figura 32: Spettri di emissione in fluorescenza del composto VI per concentrazioni crescenti di Hg²⁺ (intervallo di concentrazioni 0.6 - 100 μ M) in acqua di mare sintetica.

Conclusioni

In conclusione:

- Un set di biomolecole è stato progettato sulla base della recente letteratura.
- È stata messa a punto una valida strategia sintetica delle biomolecole proposte che sono state ottenute in resa eccellente.
- È stata effettuata con successo la sintesi e caratterizzazione delle molecole selezionate.
- Sono stati effettuati saggi di titolazioni in presenza di concentrazioni crescenti di Hg²⁺ e valutata la risposta delle biomolecole in fluorescenza ed in assorbanza. La concentrazione di Hg²⁺ minima rilevabile nelle condizioni sperimentali qui descritte è pari a 0.6 μ M (0.12 ppm).

Sono stati condotti studi di selettività in presenza di ioni interferenti a diverse concentrazioni.

Sono stati effettuati saggi di titolazione in acqua di mare sintetica per verificare la risposta delle molecole di elezione (derivati I e VI) in sistemi che mimano ambienti marini.



Le prove di selettività in acqua di mare sintetica evidenziano come non sia possibile effettuare i saggi di riconoscimento direttamente in acqua di mare. L'utilizzo dei dansyl derivati richiede quindi un pre-trattamento delle acque di mare che limiti la concentrazione salina. Sono in corso prove analitiche per valutare l'incidenza selettiva degli ioni sodio e ioni cloruro (che incide sulla speciazione dello ione Hg^{2+}), e a vari pH per verificare se modificando tale parametro è possibile ripristinare le proprietà del probe.

Saranno effettuate prove a diversa concentrazione salina, valutate le interferenze di altri cationi metallici nelle nuove soluzioni ed inquadrata una potenziale applicazione dei derivati della dansyl-Met per la determinazione di ioni mercurio in acque di transizione, ovvero in acque salmastre, originate dal mescolamento tra acque costiere e acque dolci dei fiumi, quali lagune, stagni costieri e laghi salmastri e zone di delta ed estuario.

RAPPORTO TECNICO 2

Progettazione, preparazione e caratterizzazione analitica di un biosensore in fibra ottica operante in soluzione con le biomolecole descritte nel Rapporto Tecnico 1 (RT1) per il riconoscimento di ioni Hg^{2+} in ambiente marino o in matrici acquose che mimano ambienti marini (acqua di mare sperimentale o sintetica).

Descrizione dell'attività

Il Rapporto Tecnico 2 (RT2) è orientato alla progettazione, realizzazione e caratterizzazione in laboratorio di un biosensore in fibra ottica per il riconoscimento di ioni Hg^{2+} in ambiente marino o in matrici che mimano ambienti marini.

L'attività in oggetto è stata rivolta alla progettazione di un biosensore in fibra ottica in grado di lavorare direttamente in soluzione, evitando dunque le problematiche di ancoraggio orientato delle molecole proposte nell'RT1 e degli spaziatori, e quindi del corretto binding sulla superficie.

In particolare, dovendo il biosensore essere in grado di registrare variazioni negli spettri di assorbanza e/o emissione in fluorescenza in seguito all'avvenuta complessazione con il catione metallico, sono state progettate ed implementate due diverse piattaforme tecnologiche:

- piattaforma per misure di assorbanza in soluzione;
- piattaforma per misure di fluorescenza in soluzione.

Le attività previste nel RT2 sono state così suddivise:

- a - Progettazione e selezione della piattaforma tecnologica sulla base di uno studio dello stato dell'arte e dei risultati presentati nel RT1.
- b - Preparazione dei biosensori in fibra ottica, sulla base della selezione effettuata in RT1.
- c- Caratterizzazione in laboratorio dei biosensori in fibra ottica realizzati e quantificazione delle prestazioni.

a - Progettazione e selezione della piattaforma tecnologica sulla base di uno studio dello stato dell'arte e dei risultati riportati nell' RT1

Di seguito si riporta una descrizione delle due piattaforme progettate.

a.1 Progettazione di un biosensore per misure di assorbanza in soluzione

Il biosensore per misure di assorbanza in soluzione è stato progettato con lo scopo di ottenere informazioni circa lo spettro di assorbanza della soluzione in esame mediante una semplice misura di riflettanza,. Con riferimento alla rappresentazione schematica riportata in Figura 1, il probe è essenzialmente composto da tre rami in fibra ottica:

- i. un ramo per l'illuminazione del campione (la soluzione in esame) da collegare alla sorgente ottica mediante un connettore standard di tipo FC/PC; questo ramo è composto da un bundle di 6 fibre (dette "di illuminazione") aventi ciascuna un diametro pari a 200 μm ;
- ii. un ramo di raccolta della luce riflessa (anche detto di "detection"), da collegare allo spettrofotometro mediante un connettore standard di tipo FC/PC; questo ramo è composto da una sola fibra di lettura avente un diametro di 200 μm ;
- iii. un ramo la cui parte terminale (detta "tip" o "probe") è chiusa mediante un coperchio metallico rivestito internamente da uno strato completamente riflettente. Il gap presente tra la terminazione della fibra ottica e il coperchio riflettente (anche detta "cavità") ospita la soluzione in esame, che così è esposta alla luce emessa e riflessa nella cavità; questo ramo è composto da un bundle di 7 fibre ottiche, tutte aventi diametro pari a 200 μm , 6 di illuminazione ed 1 di detection, collocata al centro del bundle.

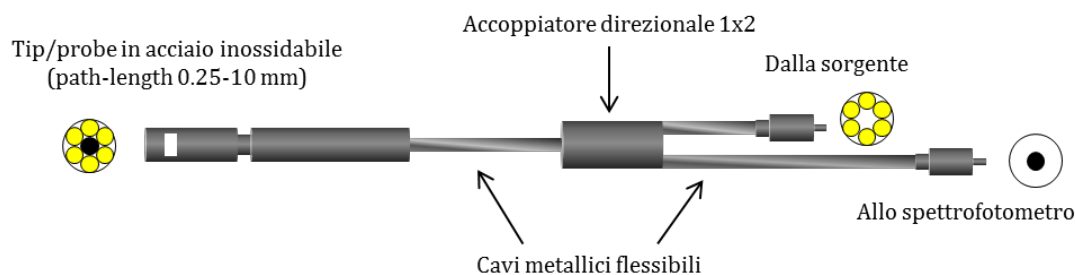


Figura 1: Rappresentazione schematica del biosensore per misure di assorbanza in soluzione.

Il biosensore, quindi, consiste essenzialmente di un probe in riflessione, che consente alla luce emessa dalla sorgente che fuoriesce dalla parte terminale della fibra di attraversare la soluzione in esame, di essere riflessa dal coperchio riflettente, di attraversare nuovamente la soluzione e rientrare nella fibra per raggiungere lo spettrofotometro (Figura 2).

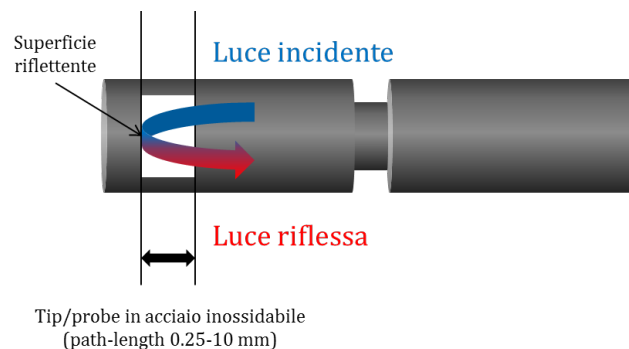


Figura 2: Rappresentazione schematica del percorso della luce all'interno del probe e della cavità a lunghezza variabile (tra 0.25 e 10 mm) del probe per misure di assorbanza in soluzione.

La fibra utilizzata per la raccolta della luce riflessa è collocata al centro del bundle di fibre di illuminazione, allo scopo di garantire un'efficiente raccolta di luce da parte del probe.

Nel punto centrale del biosensore è previsto l'inserimento di un accoppiatore direzionale 1x2, il quale ha il compito di separare le fibre nei rispettivi rami e direzionare la radiazione luminosa in ingresso verso il probe e quella riflessa verso lo spettrofotometro (Figura 1).

Per una maggiore flessibilità durante le misure di assorbanza, si è inoltre pensato di realizzare il probe in maniera tale da avere una cavità a lunghezza variabile tra un valore minimo di 0.25 mm ed un valore massimo di 10 mm (Figura 2).

Inoltre, al fine di garantire il funzionamento del biosensore anche per lunghezze d'onda nel range del basso ultravioletto (al di sotto dei 250 nm), sono state utilizzate fibre speciali (del tipo "resistenti alla solarizzazione") in grado di evitare la creazione di centri di colore dovuti all'assorbimento di luce, i quali possono portare nel tempo ad una graduale riduzione dell'intensità di luce trasmessa (ossia ad un aumento delle perdite ottiche).

Sia il ramo di illuminazione che quello di lettura sono entrambi a tenuta stagna, e sono ospitati all'interno di un rivestimento metallico flessibile realizzato in acciaio inox, mentre il probe è ospitato all'interno di un cilindro rigido, anch'esso a tenuta stagna e realizzato in acciaio inox.

a.2 Progettazione di un biosensore per misure di fluorescenza in soluzione

Il biosensore per misure di fluorescenza è stato progettato allo scopo di ottenere, mediante una semplice misura del segnale luminoso proveniente dal probe, informazioni sullo spettro di fluorescenza della soluzione in esame. Con riferimento alla rappresentazione schematica riportata in Figura 3, il biosensore per misure di fluorescenza è essenzialmente composto da tre rami in fibra ottica:

- i. un ramo "d'illuminazione" del campione (per campione si intende la soluzione in esame) da collegare alla sorgente mediante un connettore standard di tipo FC/PC; al fine di massimizzare l'intensità del segnale di fluorescenza emesso dal campione, occorre illuminare lo stesso con la massima quantità di luce possibile: per questo motivo il ramo d'illuminazione è composto da un bundle di 12 fibre aventi ciascuna un diametro pari a 200 μm ;
- ii. un ramo di raccolta (anche detto di "detection") che trasmette il segnale di fluorescenza emesso dal campione fino allo spettrofotometro, con il quale è collegato mediante un connettore standard di tipo FC/PC; tale ramo è composto da una sola fibra di lettura con un diametro di 600 μm , un valore maggiore rispetto alle altre fibre

scelto al fine di massimizzare l'efficienza di raccolta del segnale di fluorescenza (tipicamente debole) emesso dal campione;

- iii. un ramo la cui parte terminale (detta "tip" o "probe") è inclinata a 45° e chiusa mediante uno speciale coperchio (detto "riflettore") che svolge il triplice compito di:
- minimizzare la quantità di luce che dall'ambiente entra nel probe interferendo con il segnale di fluorescenza emesso dal campione in esame;
 - riflettere la radiazione luminosa di eccitazione nuovamente verso il campione in esame, incrementando l'intensità del segnale di fluorescenza emesso;
 - convogliare nella fibra di raccolta la luce emessa anche in direzione diversa da quella della fibra di raccolta.

Il "canale" esistente tra la terminazione della fibra ottica e il riflettore ospita la soluzione in esame, esponendola al passaggio della luce e permettendone la raccolta del segnale di fluorescenza emesso. Questo ramo è composto da un bundle di 13 fibre ottiche, di cui 12 fibre di illuminazione con un diametro pari a 200 μm , ed 1 fibra di raccolta, posizionata al centro del bundle, con un diametro pari a 600 μm .

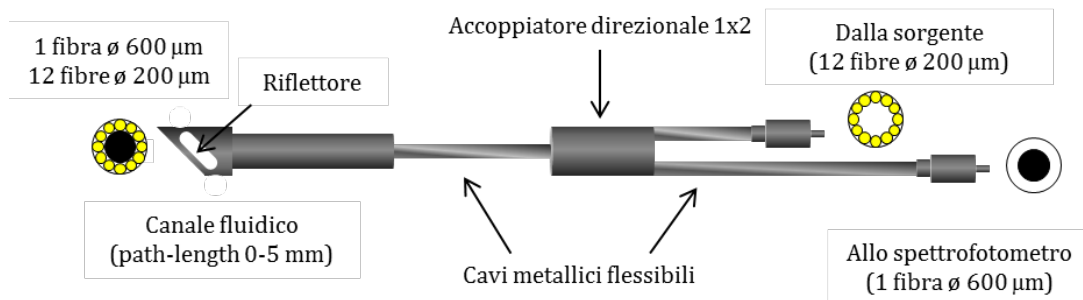


Figura 3: Rappresentazione schematica del biosensore per misure di fluorescenza in soluzione.

Il biosensore, quindi, consiste essenzialmente di un probe in riflessione, che consente alla luce emessa dalla sorgente che fuoriesce dalla terminazione della fibra di illuminare la soluzione in esame, e di generare l'emissione da parte di quest'ultima di un segnale di fluorescenza (Figura 4). Data la configurazione del probe e la caratteristica di isotropia dell'emissione, solo una piccola parte del segnale di fluorescenza rientra all'interno del probe attraverso la terminazione angolata della fibra e viene trasportata fino allo spettrofotometro dal ramo di raccolta.

Nel punto centrale del biosensore è previsto l'inserimento di un accoppiatore direzionale 1x2, il quale ha il compito di separare le fibre nei rispettivi rami e direzionare la radiazione luminosa in ingresso verso il probe e quella emessa verso lo spettrofotometro (Figura 3).

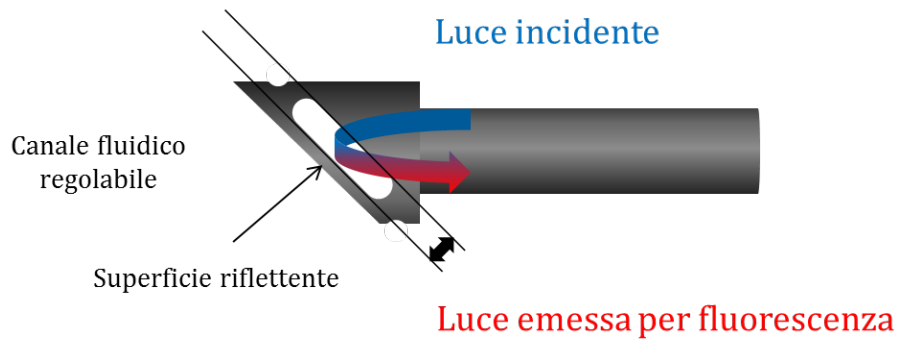


Figura 4: Rappresentazione schematica del percorso della luce all'interno del probe e del canale a lunghezza variabile (tra 0 e 5 mm) del probe per misure di fluorescenza in soluzione.

Per una maggiore flessibilità durante le misure di fluorescenza, si è inoltre pensato di realizzare il probe in maniera tale da avere una larghezza variabile del canale da 0 a 5 mm.

Inoltre, al fine di garantire il funzionamento del biosensore anche per lunghezze d'onda nel range del basso ultravioletto (al di sotto dei 250 nm) le fibre ottiche utilizzate sono fibre speciali (del tipo "resistenti alla solarizzazione") in grado di evitare la creazione di centri di colore dovuti all'assorbimento di luce, i quali possono portare nel tempo ad una graduale riduzione dell'intensità di luce trasmessa (ossia ad un aumento delle perdite).

Sia il ramo di illuminazione che quello di lettura sono entrambi a tenuta stagna, e sono ospitati all'interno di un rivestimento metallico flessibile realizzato in acciaio inox, mentre il probe è ospitato all'interno di un cilindro rigido, anch'esso a tenuta stagna e realizzato in acciaio inox.

b. Preparazione dei biosensori in fibra ottica.

Di seguito si riporta una descrizione delle due piattaforme realizzate.

b.1 Preparazione di un biosensore per misure di assorbanza in soluzione

Il biosensore per misure di assorbanza in soluzione è stato realizzato secondo le specifiche definite in fase di progettazione. Il biosensore per misure di assorbanza è stato realizzato allo scopo di ottenere informazioni sullo spettro di assorbanza della soluzione in esame mediante una semplice misura del segnale luminoso proveniente dal probe. Il biosensore consiste essenzialmente di un probe in trasmissione, che consente alla luce emessa dalla sorgente che fuoriesce dalla parte terminale della fibra di attraversare la soluzione in esame, di essere riflessa dal coperchio riflettente, di attraversare nuovamente la soluzione e rientrare nella fibra per raggiungere lo spettrofotometro (

Figura 5). Come descritto in fase di progettazione, il biosensore per misure di assorbanza è costituito da tre rami:

- i. un ramo per l'illuminazione della soluzione in esame da collegare alla sorgente ottica mediante un connettore standard di tipo FC/PC; questo ramo è composto da un bundle di 6 fibre (dette "di illuminazione") aventi ciascuna un diametro pari a 200 μm ;
- ii. un ramo di raccolta ("detection") della luce riflessa, da collegare allo spettrofotometro mediante un connettore standard di tipo FC/PC; questo ramo è composto da una sola fibra di lettura avente un diametro di 200 μm ;
- iii. un ramo la cui parte terminale (detta "tip" o "probe") è chiusa mediante un coperchio metallico rivestito internamente da uno strato completamente riflettente. Il gap presente tra la terminazione della fibra ottica e il coperchio riflettente (anche detta "cavità") ospita la soluzione in esame, che così è esposta alla luce emessa e riflessa nella cavità; questo ramo è composto da un bundle di 7 fibre ottiche, tutte aventi diametro pari a 200 μm , 6 di illuminazione ed una di detection, collocata al centro del bundle; per una maggiore flessibilità durante le misure di assorbanza, il probe è dotato di una cavità a lunghezza variabile tra un valore minimo di 0.25 mm ed un valore massimo di 10 mm (Figura 6).

Un accoppiatore direzionale 1x2 separa le fibre nei rispettivi rami di illuminazione e raccolta, direzionando la radiazione luminosa in ingresso verso il probe e quella riflessa verso lo spettrofotometro (

Figura 5).

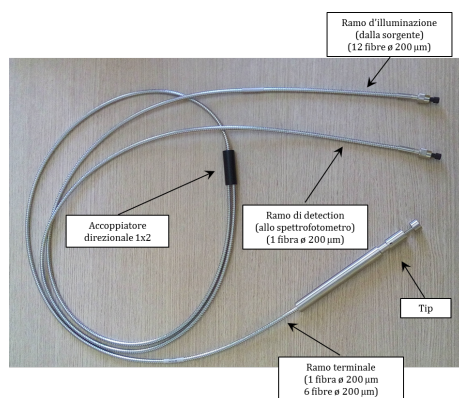


Figura 5: Foto del biosensore per misure di assorbanza in soluzione.

Al fine di garantire il funzionamento del biosensore anche per lunghezze d'onda nel range del basso ultravioletto (al di sotto dei 250 nm) le fibre ottiche utilizzate sono fibre speciali (del tipo "resistenti alla solarizzazione") in grado di evitare la creazione di centri di colore dovuti all'assorbimento di luce, i quali possono portare nel tempo ad una graduale riduzione dell'intensità di luce trasmessa (ossia ad un aumento delle perdite). Sia il ramo di illuminazione che quello di

lettura sono entrambi a tenuta stagna, e sono ospitati all'interno di un rivestimento metallico flessibile realizzato in acciaio inox (

Figura 5), mentre il probe è ospitato all'interno di un cilindro rigido, anch'esso a tenuta stagna e realizzato in acciaio inox (Figura 6).

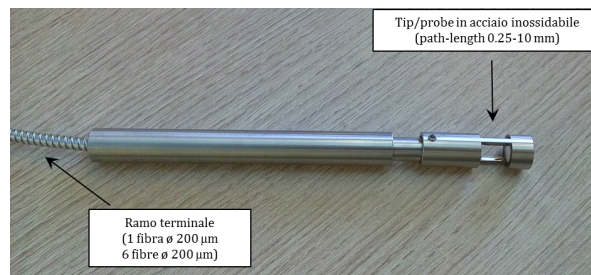


Figura 6: Particolare del probe (parte terminale) del biosensore per misure di assorbanza in soluzione.

b.2 Preparazione di un biosensore per misure di fluorescenza in soluzione

Il biosensore per misure di fluorescenza in soluzione è stato realizzato secondo le specifiche definite in fase di progettazione. Il biosensore per misure di fluorescenza è stato realizzato allo scopo di ottenere informazioni sullo spettro di fluorescenza della soluzione in esame mediante una semplice misura del segnale luminoso proveniente dal probe. Il biosensore consiste essenzialmente di un probe in riflessione, che consente alla luce emessa dalla sorgente che fuoriesce dalla parte terminale della fibra di attraversare la soluzione in esame, generando in tal modo l'emissione da parte di quest'ultima di un segnale di fluorescenza, raccolto nuovamente dal probe e trasmesso ad uno spettrofotometro per la rilevazione (Figura 7).

Come descritto in fase di progettazione, il biosensore per misure di assorbanza è costituito da tre rami:

- i. un ramo "d'illuminazione" del campione (la soluzione in esame) da collegare alla sorgente mediante un connettore standard di tipo FC/PC; al fine di massimizzare l'intensità del segnale di fluorescenza emesso dal campione, occorre illuminare lo stesso con la massima quantità di luce possibile: per questo motivo il ramo d'illuminazione è composto da un bundle di 12 fibre aventi ciascuna un diametro pari a 200 μm ;
- ii. un ramo di raccolta (o di "detection") che trasmette il segnale di fluorescenza emesso dal campione fino allo spettrofotometro, con il quale è collegato mediante un connettore standard di tipo FC/PC; tale ramo è composto da una sola fibra di lettura con un diametro di 600 μm , un valore maggiore rispetto alle altre fibre scelto al fine di

massimizzare l'efficienza di raccolta del segnale di fluorescenza (tipicamente debole) emesso dal campione;

- iii. un ramo la cui parte terminale (detta “tip” o “probe”) è inclinata a 45° e chiusa mediante uno speciale coperchio (detto “riflettore”) che svolge il duplice compito di:
- evitare che la luce dall'ambiente possa entrare nel probe ed interferire con il segnale di fluorescenza emesso dal campione in esame;
 - riflettere la radiazione luminosa di eccitazione nuovamente verso il campione in esame, incrementandone l'intensità del segnale di fluorescenza emesso.

Il “canale” esistente tra la terminazione della fibra ottica e il riflettore ospita la soluzione in esame, esponendola al passaggio della luce e permettendone la raccolta del segnale di fluorescenza emesso (

Figura 8). Questo ramo è composto da un bundle di 13 fibre ottiche, di cui 12 fibre di illuminazione con un diametro pari a 200 µm, ed 1 fibra di raccolta, posizionata al centro del bundle, con un diametro pari a 600 µm.

Un accoppiatore direzionale 1x2 separa le fibre nei rispettivi rami di illuminazione e raccolta, direzionando la radiazione luminosa in ingresso verso il probe e quella riflessa verso lo spettrofotometro (Figura 7).

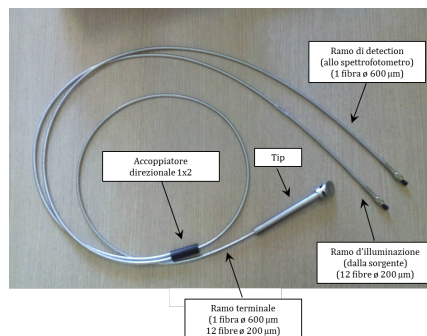


Figura 7: Sensore per misure di fluorescenza in soluzione.

Al fine di garantire il funzionamento del biosensore anche per lunghezze d'onda nel range del basso ultravioletto (al di sotto dei 250 nm) le fibre ottiche utilizzate sono fibre speciali (del tipo “resistenti alla solarizzazione”) in grado di evitare la creazione di centri di colore dovuti all'assorbimento di luce, i quali possono portare nel tempo ad una graduale riduzione dell'intensità di luce trasmessa (ossia ad un aumento delle perdite). Sia il ramo di illuminazione che quello di lettura sono entrambi a tenuta stagna, e sono ospitati all'interno di un rivestimento metallico

flessibile realizzato in acciaio inox (Figura 7), mentre il probe è ospitato all'interno di un cilindro rigido, anch'esso a tenuta stagna e realizzato in acciaio inox (

Figura 8).

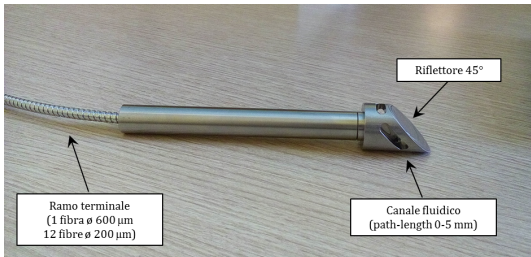


Figura 8: Particolare del probe (parte terminale) del biosensore per misure di fluorescenza in soluzione.

Caratterizzazione in laboratorio dei biosensori in fibra ottica realizzati e quantificazione delle prestazioni

Di seguito si riporta una descrizione della procedura di caratterizzazione adottata per i due biosensori realizzati e le rispettive prestazioni raggiunte.

c.1 Caratterizzazione in laboratorio del biosensore per misure di assorbanza in soluzione

Il biosensore per misure di assorbanza è stato caratterizzato attraverso la raccolta di misure di riflettanza (dalla quale è stato poi calcolato lo spettro di assorbanza) immergendolo in soluzioni contenenti il composto selezionato nell'OR1, vale a dire la dansyl metionina (in seguito indicato come *DansylMet*) con diverse concentrazioni di ioni Hg^{2+} .

Nel seguito di questo paragrafo sono riportati in dettaglio:

- le modalità di acquisizione degli spettri ottici;
- i dati sperimentali ottenuti e le relative curve di calibrazione.

c.1.1 Modalità di acquisizione degli spettri ottici per misure di assorbanza in soluzione

Ciascuna delle soluzioni impiegate per la caratterizzazione in laboratorio del probe per misure di assorbanza è posta all'interno di un provettone a fondo conico con una capacità di 50 mL.

Le soluzioni impiegate per la caratterizzazione (per un volume di 10 mL) sono state:

- Hepes filtrato, utilizzato come soluzione “buffer”;
- *DansylMet* disciolta in Hepes con una concentrazione 30 μM ;
- *DansylMet* (come sopra, 30 μM) con disciolte all'interno diverse concentrazioni di ioni Hg^{2+} , in un intervallo compreso tra 0.01 μM e 6 μM .

In una prima fase, il sensore per misure di assorbanza è stato immerso all'interno della soluzione buffer e in alcune soluzioni contenenti *DansylMet* e ioni Hg^{2+} per determinare il valore ottimale del tempo di integrazione dello spettrofotometro¹ così da massimizzare il segnale riflesso nell'intervallo di lunghezze d'onda di interesse (dove l'assorbanza delle soluzioni testate risulta essere più alta) e al tempo stesso evitare di incorrere nella saturazione dello spettrofotometro.

Una volta stabilito il tempo di integrazione ottimale, si spegne la sorgente e si acquisisce (e si salva su file) il segnale di “dark”, vale a dire il segnale acquisito dallo spettrofotometro quando il biosensore non è illuminato dalla luce emessa dalla sorgente, rappresentando in pratica il rumore di sottofondo dello strumento di acquisizione. A questo punto, riaccesa (meccanicamente) la sorgente, si immerge il biosensore all'interno della soluzione “buffer” e si acquisisce il segnale riflesso (detto

¹ Per maggiori informazioni sullo spettrofotometro utilizzato, nonché sulle sorgenti, si faccia riferimento alla sezione dedicata nell'OR3.

“scope”), avendo cura di impostare la correzione (sottrazione) del segnale di “dark” acquisito in precedenza (ottenendo lo “scope differenziale S_d ”).

$$S_d = (\text{scope} - \text{dark})$$

Tale segnale viene acquisito (e salvato su file) come segnale di riferimento (detto “reference”), per le successive acquisizioni che convertiranno in automatico la lettura del segnale riflesso in una lettura di assorbanza, secondo la formula:

$$A = -\log_{10} \left(\frac{\text{scope} - \text{dark}}{\text{reference} - \text{dark}} \right)$$

Si procede quindi all’immersione del probe all’interno delle soluzioni contenenti DansylMet e concentrazioni crescenti di ioni Hg^{2+} , nell’intervallo 0.01 μM e 6 μM . Ad ogni immersione, si effettua l’acquisizione e il salvataggio di un file, che memorizza, oltre alle informazioni sulle impostazioni di acquisizione, anche il segnale di “dark”, il segnale di “reference”, il segnale riflesso e l’assorbanza calcolata.

Per ogni concentrazione sono effettuate diverse immersioni successive, intervallate tra loro di alcune decine di secondi, allo scopo di ottenere uno spettro di assorbanza calcolato come media su più acquisizioni e quindi di minimizzare eventuali errori di misura.

Nel passaggio tra due diverse soluzioni, si procede con un rapido lavaggio del probe con acqua distillata (DDW) allo scopo di eliminare eventuali residui di sostanze lasciate dalla soluzione interrogata in precedenza.

Dati sperimentali ottenuti e relative curve di calibrazione per misure di assorbanza in soluzione

In Figura 9 sono riportati gli spettri acquisiti per tre diverse soluzioni: Hepes (in rosso), Dansyl-Met 30 μM (in verde), Dansyl-Met 30 μM con aggiunta di ioni Hg^{2+} 0.6 μM (in ciano), riportati secondo il calcolo dello “scope differenziale” e dell’assorbanza precedentemente descritti. Nel grafico relativo allo “scope differenziale” è possibile individuare un abbattimento dello spettro riflesso nel passaggio da Hepes a Dansyl-Met (anche con aggiunta di ioni Hg^{2+}). Il dato è interpretabile ancor meglio se si fa riferimento al grafico dell’assorbanza, a destra. Nel caso dell’Hepes, adottato come segnale di riferimento, il calcolo dell’assorbanza produce un valore nullo su tutto l’intervallo acquisito. Per le soluzioni contenenti DansylMet sono invece apprezzabili due picchi di assorbanza, localizzati intorno ai 247 nm e ai 330 nm. In corrispondenza di queste due lunghezze d’onda sono state tracciate delle linee tratteggiate, riportate anche nel grafico dello “scope differenziale”, così da appurare che il valore di assorbanza letto (a destra) non sia condizionato da un segnale di partenza (a sinistra) troppo debole o saturato.

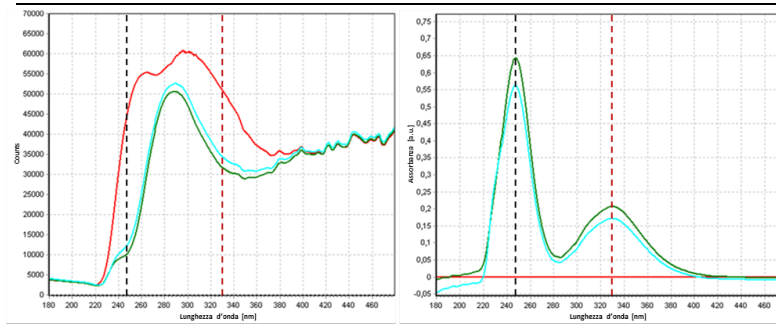


Figura 9: Scope differenziale e assorbanza per tre diverse soluzioni: Hepes (in rosso), Dansyl-Met 30 μM (in verde), Dansyl-Met 30 μM con aggiunta di ioni Hg^{2+} 0.6 μM (in ciano).

L'andamento dell'assorbanza ottenuta con il biosensore per le seguenti concentrazioni: Dansyl-Met 30 μM e Dansyl-Met 30 μM con aggiunta di ioni Hg^{2+} con concentrazioni crescenti: 0.01 – 0.05 – 0.1 – 0.3 – 0.6 – 1.2 – 2.4 – 3 – 6 μM , è riportato in Figura 10.

Tale andamento è stato confrontato con quello ottenuto attraverso l'uso di uno spettrofluorimetro (Reader) EnSpire (Perkin Elmer), riportato in Figura 11. È possibile apprezzare un incremento di un fattore 2 nell'assorbanza misurata con il biosensore in fibra ottica dovuto all'utilizzo di un cammino ottico circa il doppio rispetto a quello usato nel Reader.

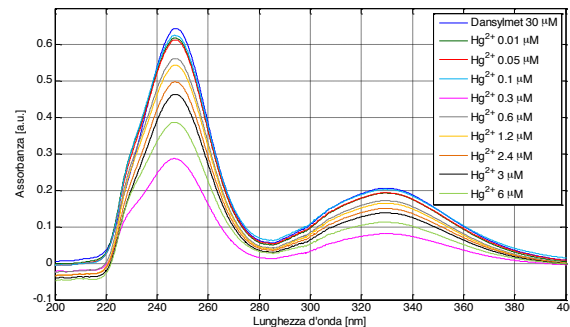


Figura 10: Andamento dell'assorbanza ottenuta con il biosensore in fibra ottica per soluzioni contenenti Dansyl-Met 30 μM con aggiunta di ioni Hg^{2+} con concentrazioni crescenti nell'intervallo 0 – 6 μM .

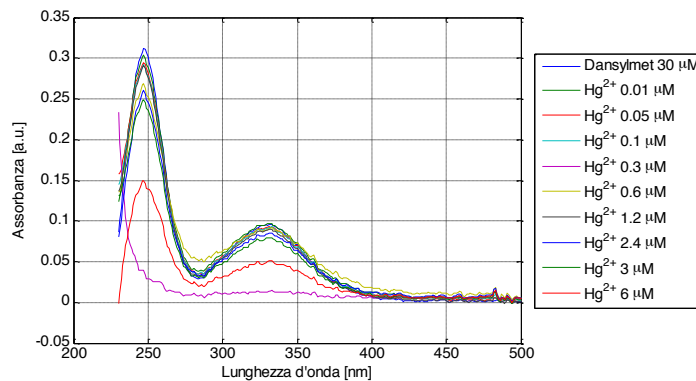


Figura 11: Andamento dell'assorbanza ottenuta con il Reader da banco per soluzioni contenenti Dansyl-Met 30 μM con aggiunta di ioni Hg^{2+} con concentrazioni crescenti nell'intervallo 0 – 6 μM .

Come accennato in precedenza, le acquisizioni svolte con il biosensore per misure di assorbanza hanno rivelato la presenza di due picchi nello spettro di assorbanza della Dansyl-Met (con aggiunta di ioni Hg^{2+}), localizzati intorno ai 247 nm e ai 330 nm.

Per apprezzare le differenze esistenti tra gli spettri relativi alle diverse concentrazioni di ioni Hg^{2+} si è deciso di individuare la posizione (in lunghezza d'onda) e l'assorbanza (in ampiezza) del punto di massimo di ciascuno dei due picchi individuati.

Per il picco centrato intorno ai 247 nm, il grafico relativo alla lunghezza d'onda è riportato in Figura 12. È immediato osservare che, a parte un'anomalia comparsa in corrispondenza della concentrazione $0.3 \mu\text{M}$, non si ha alcuno spostamento della lunghezza d'onda del picco di assorbanza al variare della concentrazione. Si è deciso pertanto di non eseguire ulteriori analisi su questo parametro, focalizzando l'attenzione sul valore di assorbanza di picco.

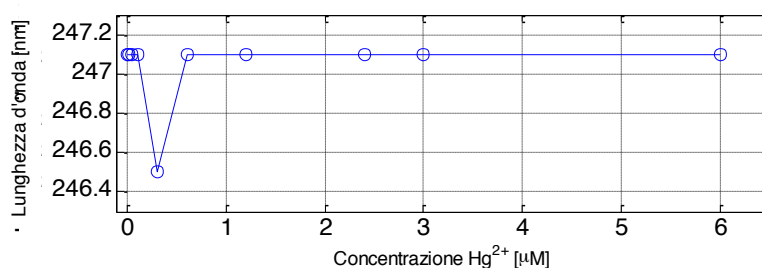


Figura 12: Andamento della lunghezza d'onda del punto di massima assorbanza (picco intorno ai 247 nm) ottenuta con il biosensore in fibra ottica per soluzioni contenenti Dansyl-Met $30 \mu\text{M}$ con aggiunta di ioni Hg^{2+} con concentrazioni crescenti nell'intervallo $0 - 6 \mu\text{M}$.

L'assorbanza misurata nel picco a più basse lunghezze d'onda è riportata nel grafico mostrato in Figura 13. È possibile riscontrare un andamento complessivo decrescente dell'assorbanza massima all'aumentare della concentrazione di ioni Hg^{2+} . Nel grafico è evidenziato il punto a $0.3 \mu\text{M}$, che non rispetta l'andamento monotono. Tale comportamento anomalo si è presentato nel corso di diverse prove sperimentali (anche con il Reader) eseguite su soluzioni preparate in momenti diversi, anche per concentrazioni vicine a $0.3 \mu\text{M}$ (0.2 e $0.4 \mu\text{M}$). Ciò suggerisce che nell'intorno di questa concentrazione possa verificarsi una variazione della stechiometria e/o della conseguente geometria del complesso.

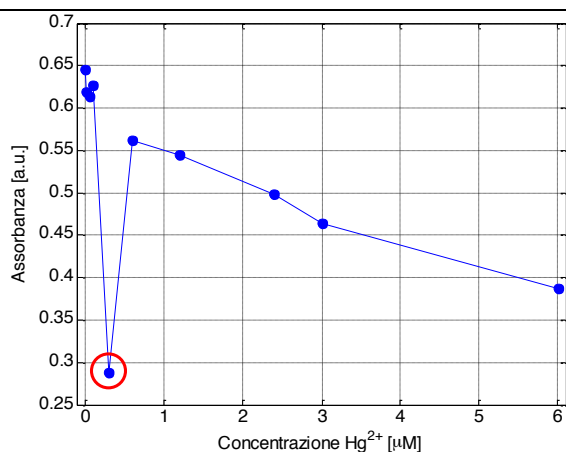


Figura 13: Andamento dell'assorbanza nel punto di massimo (picco intorno ai 247 nm) ottenuta con il biosensore in fibra ottica per soluzioni contenenti Dansyl-Met 30 µM con aggiunta di ioni Hg²⁺ con concentrazioni crescenti nell'intervallo 0 – 6 µM. È evidenziato il punto anomalo a 0.3 µM.

Allo scopo di verificare la capacità del biosensore di rilevare la presenza di basse concentrazioni di ioni Hg²⁺, si è deciso di eseguire delle nuove prove focalizzandoci sulle basse concentrazioni, nell'intervallo 0 – 0.1 µM, come riportato in Figura 14. Tale grafico mostra l'assenza di linearità tra i punti 0, 0.01, 0.05 e 0.1 µM, indicando che in questo intervallo di concentrazioni non è possibile interpolare le concentrazioni di ioni Hg²⁺ da misure di assorbanza. Si è deciso pertanto di non inserire queste concentrazioni nella successiva curva di calibrazione.

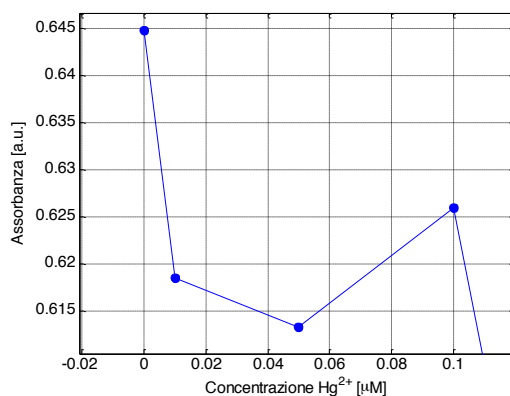


Figura 14: Andamento dell'assorbanza nel punto di massimo (picco intorno ai 247 nm) ottenuta con il biosensore in fibra ottica per soluzioni contenenti Dansyl-Met 30 µM con aggiunta di ioni Hg²⁺ con concentrazioni crescenti nell'intervallo 0 – 0.1 µM.

Sulla base di quanto mostrato in precedenza, si è deciso di costruire una curva di calibrazione con fitting lineare nell'intervallo 0.6 – 6 µM, scartando così le concentrazioni al di sotto di questo intervallo che non rispettano un andamento lineare (0 – 0.3 µM).

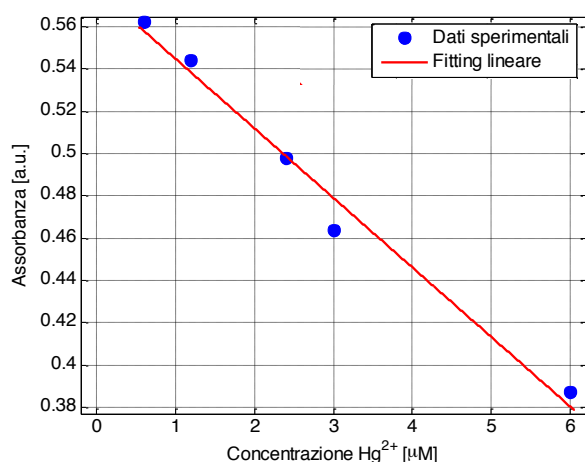


Figura 15: Curva di calibrazione e fitting lineare: assorbanza nel punto di massimo (picco intorno ai 247 nm) ottenuta con il biosensore in fibra ottica per soluzioni contenenti Dansyl-Met 30 µM con aggiunta di ioni Hg²⁺ con concentrazioni crescenti nell'intervallo 0.6 – 6 µM.

Prendendo in considerazione il grafico mostrato in Figura 15, è possibile constatare la bontà del fitting lineare, i cui parametri sono riportati nella Tabella 1 mostrata qui di seguito. In particolare, si può apprezzare un buon valore del parametro R², superiore al 98%.

Linear model Poly1:
f(x) = p1*x + p2
Coefficients (with 95% confidence bounds):
p1 = -0.0329 (-0.04083, -0.02497)
p2 = 0.5779 (0.5522, 0.6036)
Goodness of fit:
SSE: 0.0003298
R-square: 0.9831
Adjusted R-square: 0.9774
RMSE: 0.01049

Tabella 1: Parametri di fitting della curva di calibrazione per l'assorbance nel punto di massimo (picco intorno ai 247 nm) ottenuta con il biosensore in fibra ottica per soluzioni contenenti Dansyl-Met 30 µM con aggiunta di ioni Hg²⁺ con concentrazioni crescenti nell'intervallo 0.6 – 6 µM.

Per il picco concentrato intorno ai 330 nm, il grafico relativo alla lunghezza d'onda è riportato in Figura 16. È immediato osservare che, a parte un'anomalia comparsa in corrispondenza della concentrazione 0.3 µM (come nel caso precedente), non si ha alcuno spostamento della lunghezza d'onda del picco di assorbance al variare della concentrazione. Si è deciso pertanto di non investigare ulteriormente questo parametro, focalizzando l'attenzione sul valore di assorbance di picco.

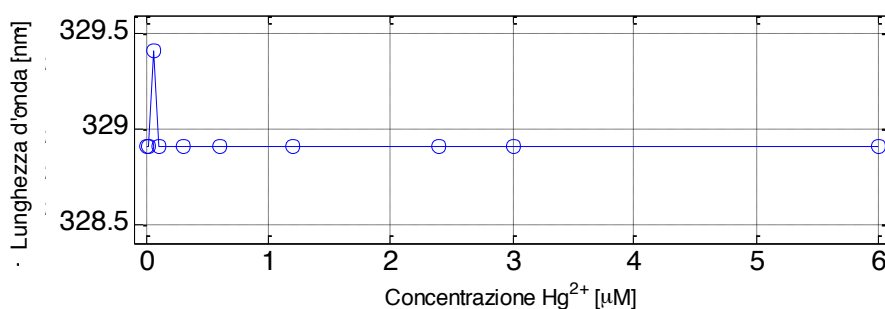


Figura 16: Andamento della lunghezza d'onda del punto di massima assorbanza locale (picco intorno ai 330 nm) ottenuta con il biosensore in fibra ottica per soluzioni contenenti Dansyl-Met 30 µM con aggiunta di ioni Hg²⁺ con concentrazioni crescenti nell'intervallo 0 – 6 µM.

L'assorbanza misurata nel picco a più alte lunghezze d'onda è riportata nel grafico mostrato in Figura 17. È possibile riscontrare un andamento complessivo decrescente dell'assorbanza di picco all'aumentare della concentrazione di ioni Hg²⁺. Nel grafico è possibile individuare l'anomalia del punto a 0.3 µM, che non rispetta l'andamento monotono.

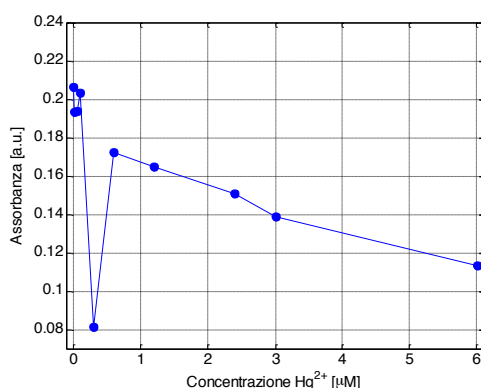


Figura 17: Andamento dell'assorbanza nel punto di massimo (picco intorno ai 330 nm) ottenuta con il biosensore in fibra ottica per soluzioni contenenti Dansyl-Met 30 µM con aggiunta di ioni Hg²⁺ con concentrazioni crescenti nell'intervallo 0 – 6 µM.

Allo scopo di verificare la capacità del biosensore di rilevare la presenza di basse concentrazioni di Hg²⁺ mediante misure di assorbanza si è deciso delle nuove prove focalizzandoci sulle basse concentrazioni, nell'intervallo 0 – 0.1 µM, come riportato in Figura 14. Tale grafico mostra l'assenza di linearità tra i punti 0, 0.01, 0.05 e 0.1 µM, permettendo di constatare che in questo intervallo di concentrazioni non è possibile interpolare le concentrazioni di ioni Hg²⁺ in soluzione a partire da una misura di assorbanza. Si è deciso pertanto di non inserire queste concentrazioni nella successiva curva di calibrazione.

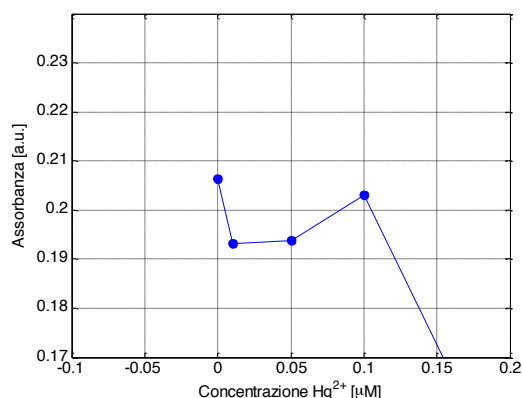


Figura 18: Andamento dell'assorbanza nel punto di massimo (picco intorno ai 330 nm) ottenuta con il biosensore in fibra ottica per soluzioni contenenti Dansyl-Met 30 µM con aggiunta di ioni Hg²⁺ con concentrazioni crescenti nell'intervallo 0 – 0.1 µM.

Sulla base di quanto mostrato in precedenza, si è deciso di costruire una curva di calibrazione con fitting lineare nell'intervallo 0.6 – 6 µM, scartando così le concentrazioni al di sotto di questo intervallo che non rispettano un andamento lineare (0 – 0.3 µM).

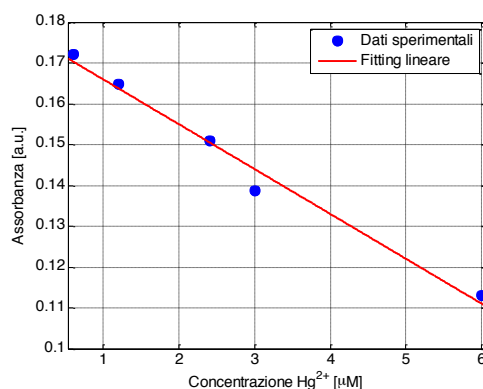


Figura 19: Curva di calibrazione e fitting lineare dell'assorbanza nel punto di massimo (picco intorno ai 330 nm) ottenuta con il biosensore in fibra ottica per soluzioni contenenti Dansyl-Met 30 µM con aggiunta di ioni Hg²⁺ con concentrazioni crescenti nell'intervallo 0.6 – 6 µM.

Prendendo in considerazione il grafico mostrato in Figura 19, è possibile constatare la bontà del fitting lineare, i cui parametri sono riportati nella Tabella 2 mostrata qui di seguito. In particolare, si può apprezzare un buon valore del parametro R², superiore al 98%.

Linear model Poly1:
$f(x) = p1 \cdot x + p2$
Coefficients (with 95% confidence bounds):
p1 = -0.01099 (-0.0136, -0.008371)
p2 = 0.177 (0.1685, 0.1855)
Goodness of fit:
SSE: 3.59e-005

R-square: 0.9835
Adjusted R-square: 0.978
RMSE: 0.003459

Tabella 2: Parametri di fitting della curva di calibrazione dell'assorbanza nel punto di massimo locale (picco intorno ai 330 nm) ottenuta con il biosensore in fibra ottica per soluzioni contenenti Dansyl-Met 30 μM con aggiunta di ioni Hg^{2+} con concentrazioni crescenti nell'intervallo 0.6 – 6 μM .

c.1.2 Caratterizzazione in laboratorio del biosensore per misure di fluorescenza in soluzione

Il biosensore per misure di fluorescenza è stato caratterizzato attraverso misure di riflettanza (dalla quale è stato poi calcolato lo spettro di fluorescenza) immergendolo in soluzioni contenenti il composto descritto nel RT1, vale a dire la Dansyl-Met con diverse concentrazioni di ioni Hg^{2+} .

Nel seguito sono riportati in dettaglio, nell'ordine:

- le modalità di acquisizione degli spettri ottici;
- i dati sperimentali ottenuti e le relative curve di calibrazione.

c.2.1 Modalità di acquisizione degli spettri ottici per misure di fluorescenza in soluzione

Ciascuna delle soluzioni impiegate per la caratterizzazione in laboratorio del probe per misure di fluorescenza è posta all'interno di provette a fondo conico con una capacità di 50 mL.

Le soluzioni impiegate per la caratterizzazione (per un volume di 10 mL) sono state:

- Hepes filtrato, utilizzato come soluzione “buffer”;
- Dansyl-Met disciolta in Hepes con una concentrazione 30 μM ;
- Dansyl-Met (come sopra, 30 μM) con disciolte all'interno diverse concentrazioni di ioni Hg^{2+} , in un intervallo compreso tra 0.01 μM e 6 μM .

In una prima fase, il sensore per misure di fluorescenza è stato immerso all'interno della soluzione buffer e in alcune soluzioni contenenti Dansyl-Met e ioni Hg^{2+} per determinare il valore ottimale del tempo di integrazione dello spettrofotometro, così da massimizzare il segnale riflesso nell'intervallo di lunghezze d'onda di interesse (dove la fluorescenza emessa dalle soluzioni testate risulta essere più alta) e al tempo stesso evitare di incorrere nella saturazione dello spettrofotometro.

Una volta stabilito il tempo di integrazione ottimale, si spegne la sorgente e si acquisisce (e si salva su file) il segnale di “dark”, vale a dire il segnale acquisito dallo spettrofotometro quando il biosensore non è raggiunto dalla luce emessa dalla sorgente, rappresentando in pratica il rumore di sottofondo dello strumento di acquisizione. A questo punto, riaccesa (meccanicamente) la sorgente, si immerge il biosensore all'interno della soluzione “buffer” e si acquisisce il segnale riflesso (detto “scope”), che viene assunto come il nuovo segnale di “dark”. Tale segnale sarà poi sottratto

mediante una misura differenziale allo scope acquisito nelle soluzioni contenenti Dansyl-Met e Hg^{2+} , ottenendo così lo “scope differenziale” che rappresenta il segnale di fluorescenza, secondo la definizione:

$$\text{Fluorescenza} = S_d = (\text{scope} - \text{dark})$$

La fluorescenza, secondo questa definizione, costituisce dunque la differenza tra il segnale acquisito in riflessione interrogando soluzioni contenenti Dansyl-Met e Hg^{2+} e il segnale acquisito in riflessione interrogando la soluzione “buffer” (Hepes).

Si procede quindi all’immersione del probe all’interno delle soluzioni contenenti Dansyl-Met e concentrazioni crescenti di Hg^{2+} , nell’intervallo 0.01 mM e 6 mM. Ad ogni immersione, si effettua l’acquisizione e il salvataggio di un file, che memorizza, oltre alle informazioni sulle impostazioni di acquisizione, anche il segnale di “dark”, il segnale riflesso e lo scope differenziale, che rappresenta la fluorescenza calcolata.

Per ogni concentrazione sono effettuate diverse immersioni successive, intervallate tra loro per alcune decine di secondi, allo scopo di ottenere uno spettro di fluorescenza calcolato come media su più acquisizioni, al fine di compensare eventuali errori di misura.

Nel passaggio tra due diverse soluzioni, si procede con un rapido lavaggio del probe con acqua distillata (DDW) allo scopo di eliminare eventuali residui di sostanze lasciate dalla soluzione interrogata in precedenza.

Dati sperimentali ottenuti e relative curve di calibrazione per misure di fluorescenza in soluzione

In Figura 20 si riporta lo spettro ottenuto collegando una patch-cord in fibra ottica diretta tra la sorgente (solo Deuterio) e lo spettrofotometro, con un tempo di integrazione settato in modo da non incorrere nella saturazione dello strumento. La sorgente emette in un range di lunghezze d’onda in cui la Dansyl-Met presenta i suoi due picchi di assorbanza (~247 e ~330 nm), risultando in grado di eccitare l’emissione per fluorescenza da parte della Dansyl-Met.

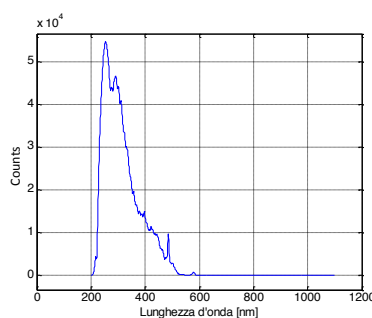


Figura 20: Spettro emesso dalla sorgente *AvaLight-DH-S-BAL Balanced Power* (solo Deuterio) con tempo di integrazione dello spettrofotometro di 150 ms.

Si osservi che il tempo di integrazione impostato per acquisire la sorgente è decisamente inferiore rispetto a quello necessario ad effettuare misure di fluorescenza. Infatti, a causa della bassa

emissione in fluorescenza prodotta da basse concentrazioni di Dansyl-Met, tali misurazioni richiedono tempi di integrazione dell'ordine di qualche secondo. Si osservi inoltre che la scelta del tempo di integrazione dello spettrofotometro incide sull'intensità degli spettri acquisiti, ed essendo le misure di fluorescenza misure non normalizzate, ma misure di intensità del segnale, tale scelta si riflette sui valori di fluorescenza riportati in questo documento.

In Figura 21 sono mostrati gli spettri in riflessione per l'Hepes e per una soluzione contenente una specifica concentrazione di ioni Hg^{2+} ($3 \mu\text{M}$) acquisita tre volte a distanza di alcune decine di secondi. I quattro spettri mostrati sono sottratti del "dark". È possibile apprezzare una significativa differenza tra lo spettro in Hepes e quello in Dansyl-Met con aggiunta di ioni Hg^{2+} $3 \mu\text{M}$ nell'intervallo compreso tra 500 e 800 nm. Tale differenza può essere imputata all'emissione per fluorescenza da parte della Dansyl-Met.

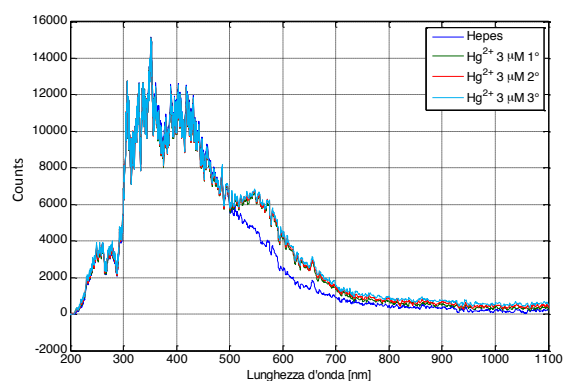


Figura 21: Spettri in riflessione acquisiti in Hepes e in una specifica concentrazione di ioni Hg^{2+} ($3 \mu\text{M}$) interrogata per tre volte a distanza di alcune decine di secondi. I quattro spettri sono sottratti del "dark".

In Figura 22 sono mostrati gli spettri in fluorescenza ottenuti con il biosensore in fibra ottica sottraendo lo spettro acquisito in HEPES a quello misurato in soluzioni contenenti Dansyl-Met 30 μM con aggiunta di ioni Hg^{2+} con concentrazioni crescenti nell'intervallo 0 – 6 μM (“scope differenziale”). Si può osservare un segnale positivo nell'intervallo 500 – 800 nm circa.

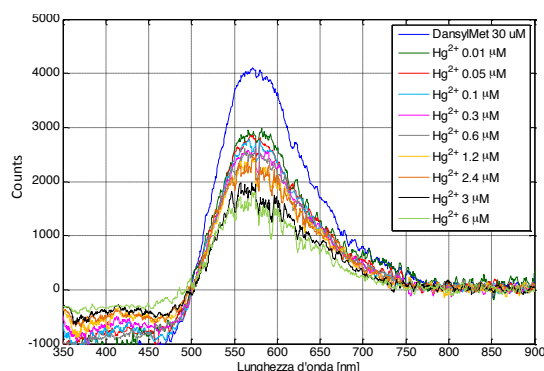


Figura 22: Spettri di fluorescenza (“scope” – HEPES) ottenuta con il biosensore in fibra ottica per soluzioni contenenti Dansyl-Met 30 μM con aggiunta di ioni Hg^{2+} con concentrazioni crescenti nell'intervallo 0 – 6 μM .

Osservando la figura precedente, appare evidente la necessità di filtrare lo spettro acquisito in modo tale da agevolare la successiva elaborazione degli spettri. A tale scopo, sono state valutate diverse strategie di filtraggio dello scope differenziale tenendo conto delle caratteristiche dei segnali in questione. Da questa analisi, il filtraggio più adeguato è risultato essere il filtro di Butterworth del secondo ordine con taglio pari a 0.02. I grafici mostrati in seguito riportano pertanto segnali sottoposti a questo tipo di filtraggio. Da un esame della Figura 23, è possibile individuare un picco di fluorescenza concentrato intorno ai 560 – 580 nm.

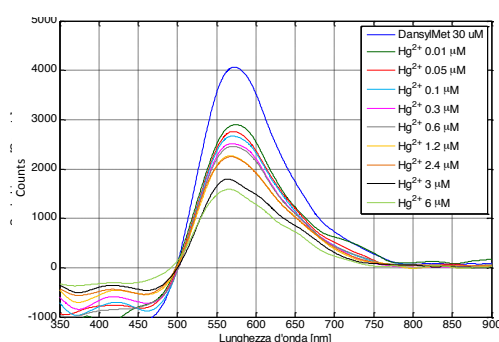


Figura 23: Filtraggio degli spettri di fluorescenza (“scope” – HEPES) ottenuta con il biosensore in fibra ottica per soluzioni contenenti Dansyl-Met 30 μM con aggiunta di ioni Hg^{2+} con concentrazioni crescenti nell'intervallo 0 – 6 μM .

In Figura 24 è invece riportato uno zoom della porzione di spettro di fluorescenza intorno al punto di massimo con le relative barre di errore in ogni punto (deviazione standard su tre acquisizioni ravvicinate). Osservando questo grafico è possibile apprezzare che le misurazioni eseguite con questo tipo di sensore sono caratterizzate, per questo intervallo di concentrazioni di Hg^{2+} , da un buon grado di ripetibilità, poiché le diverse curve sono sufficientemente distanziate nel tratto in cui

la fluorescenza è più elevata, evitando in questo modo di confondere tra loro le diverse concentrazioni. Ciò risulta vero ad eccezione delle concentrazioni 1.2 e 2.4 μM , che appaiono quasi sovrapposte in prossimità del punto di massimo.

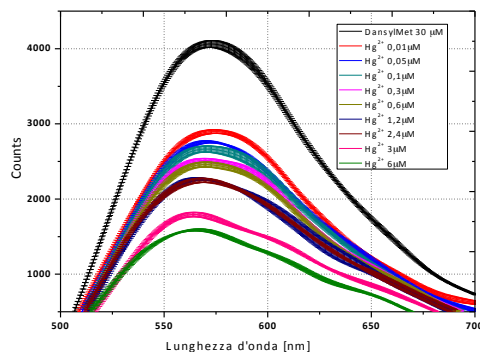


Figura 24: Zoom della porzione di spettro di fluorescenza intorno al punto di massimo con le relative barre di errore. Gli spettri, filtrati, sono ottenuti mediante il biosensore in fibra ottica per soluzioni contenenti Dansyl-Met 30 μM con aggiunta di ioni Hg^{2+} con concentrazioni crescenti nell'intervallo 0 – 6 μM .

In Figura 25 è riportato lo spettro di fluorescenza acquisito con il Reader da banco, adottando 380 nm come lunghezza d'onda di eccitazione per soluzioni contenenti Dansyl-Met 30 μM con aggiunta di ioni Hg^{2+} con concentrazioni crescenti nell'intervallo 0 e 0.6 – 6 μM . In Figura 26 sono riportate le stesse curve con le relative barre di errore (deviazione standard su tre acquisizioni ravvicinate). È importante sottolineare che le concentrazioni comprese nell'intervallo 0.01 – 0.3 mM interrogate dal Reader non producono degli spettri in fluorescenza distinguibili, pertanto, con questo setup, non si riesce a rilevare la presenza di concentrazioni di Hg^{2+} inferiori a 0.6 μM .

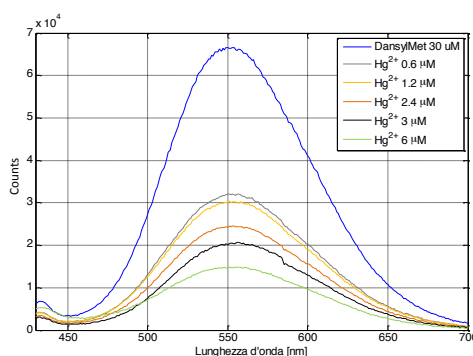


Figura 25: Spettri di fluorescenza (“scope” – Hepes) acquisiti con il Reader da banco interrogando soluzioni contenenti Dansyl-Met 30 μM con aggiunta di ioni Hg^{2+} con concentrazioni crescenti nell'intervallo 0, 0.6 – 6 μM .

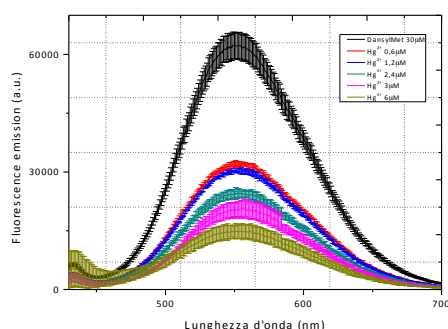


Figura 26: Spettri di fluorescenza (“scope” – Hapes) e relative barre di errore acquisiti con il Reader da banco interrogando soluzioni contenenti Dansyl-Met 30 μM con aggiunta di ioni Hg^{2+} con concentrazioni crescenti nell’intervallo 0, 0.6 – 6 μM .

Dal confronto tra le acquisizioni svolte con il Reader da banco e il sensore in fibra ottica, emerge una differenza nell’intensità, nella forma dello spettro di fluorescenza e nella posizione del punto di massimo, che nel Reader risulta essere collocato intorno ai 550 nm, rispetto ai 560 – 580 nm del picco avuto col sensore in fibra ottica. Tale differenza è imputabile alla differente metodologia di eccitazione adottata nei due setup: nel caso del Reader da banco, si è utilizzata una lunghezza d’onda di eccitazione di 380 nm, laddove per il sensore in fibra ottica si è adottata una sorgente a banda larga tra ~ 200 e ~ 500 nm.

Al fine di apprezzare le differenze esistenti tra gli spettri relativi alle diverse concentrazioni di Hg^{2+} si è deciso di individuare la posizione (in lunghezza d’onda) e l’intensità (in ampiezza) del punto di massima fluorescenza. Il grafico relativo alla lunghezza d’onda del massimo è riportato in Figura 27. Si può facilmente osservare che non si ha un andamento monotono, anche se, nel complesso, ad un aumento della concentrazione di Hg^{2+} corrisponde un abbassamento della lunghezza d’onda di picco.

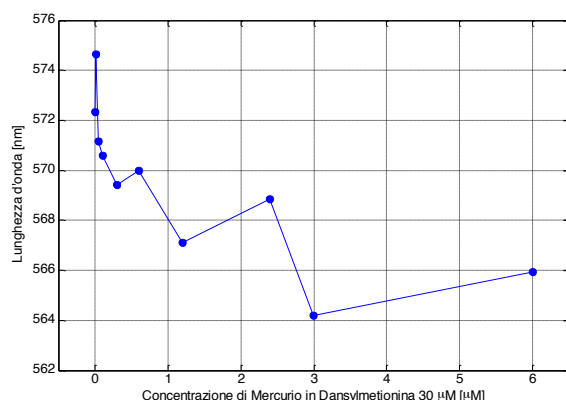


Figura 27: Andamento della lunghezza d’onda del punto di massima fluorescenza ottenuta con il sensore in fibra ottica per soluzioni contenenti Dansyl-Met 30 μM con aggiunta di ioni Hg^{2+} con concentrazioni crescenti nell’intervallo 0 – 6 μM .

Anche effettuando uno zoom per le concentrazioni più basse (Figura 28), non si riesce ad apprezzare una monotonia. Ciò spinge a non svolgere ulteriori analisi su questo parametro e a focalizzare l'attenzione sul valore di massima fluorescenza.

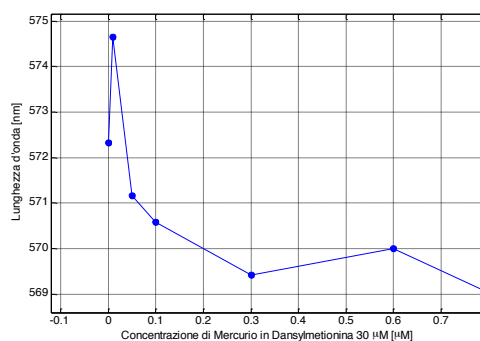


Figura 28: Zoom dell'andamento della lunghezza d'onda del punto di massima fluorescenza ottenuta con il sensore in fibra ottica per soluzioni contenenti Dansyl-Met 30 µM con aggiunta di ioni Hg^{2+} con concentrazioni crescenti nell'intervallo 0 – 0.6 µM.

L'andamento della massima fluorescenza è riportato nel grafico mostrato in Figura 29. È possibile riscontrare un andamento complessivo decrescente della massima fluorescenza all'aumentare della concentrazione di Hg^{2+} . Si nota tuttavia un'anomalia nel punto a 2.4 µM, troppo vicino a quello ottenuto per 1.2 µM.

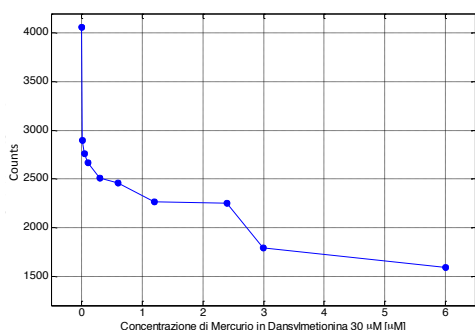


Figura 29: Andamento della massima fluorescenza ottenuta con il sensore in fibra ottica per soluzioni contenenti Dansyl-Met 30 µM con aggiunta di ioni Hg^{2+} con concentrazioni crescenti nell'intervallo 0 – 6 µM.

A partire da quest'analisi, si è deciso di costruire una curva di calibrazione con fitting esponenziale, considerando tutti i punti acquisiti nell'intervallo 0 – 6 µM, mostrata in Figura 30.

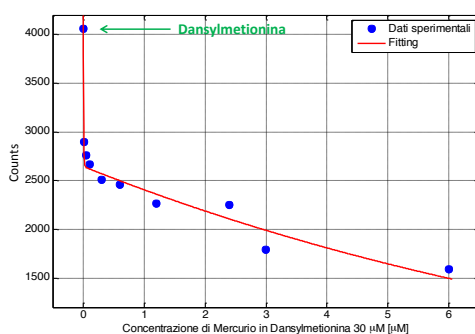


Figura 30: Curva di calibrazione e fitting esponenziale: massima fluorescenza ottenuta con il sensore in fibra ottica per soluzioni contenenti Dansyl-Met 30 µM con aggiunta di ioni Hg^{2+} con concentrazioni crescenti nell'intervallo 0.6 – 6 µM.

I parametri del fitting esponenziale sono riportati in Tabella 3.

General model Exp2:	
$f(x) = a \cdot \exp(b \cdot x) + c \cdot \exp(d \cdot x)$	
Coefficients (with 95% confidence bounds):	
a =	1416 (1064, 1768)
b =	-172.2 (-308.5, -35.93)
c =	2647 (2487, 2807)
d =	-0.09492 (-0.1269, -0.06289)
Goodness of fit:	
SSE: 9.858e+004	
R-square: 0.9762	
Adjusted R-square: 0.9643	
RMSE: 128.2	

Tabella 3: Parametri di fitting della curva di calibrazione della massima fluorescenza ottenuta con il sensore in fibra ottica per soluzioni contenenti Dansyl-Met 30 μM con aggiunta di ioni Hg^{2+} con concentrazioni crescenti nell'intervallo 0.6 – 6 μM .

Pur raggiungendo un valore accettabile di R^2 (97%), appare piuttosto evidente che la presenza dello zero nel set di punti riportati condiziona notevolmente l'andamento della curva di fitting. Si è deciso perciò di restringere l'intervallo di concentrazioni cui estendere la curva di calibrazione, prendendo in considerazione i punti compresi nell'intervallo 0.01 – 1.2 μM , escludendo così anche il punto anomalo a 2.4 μM . La nuova curva di calibrazione è riportata in Figura 31. Il fitting adottato è ancora di tipo esponenziale (Tabella 4), ma in questo caso il parametro R^2 è notevolmente migliorato, raggiungendo un valore superiore al 99%.

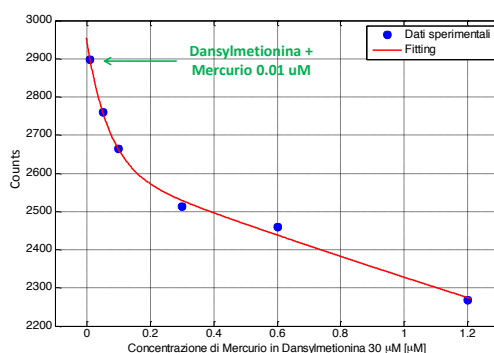


Figura 31: Curva di calibrazione e fitting esponenziale: massima fluorescenza ottenuta con il biosensore in fibra ottica per soluzioni contenenti Dansyl-Met 30 μM con aggiunta di ioni Hg^{2+} con concentrazioni crescenti nell'intervallo 0.01 – 1.2 μM .

General model Exp2:	
$f(x) = a \cdot \exp(b \cdot x) + c \cdot \exp(d \cdot x)$	
Coefficients (with 95% confidence bounds):	
a =	331 (184.8, 477.3)
b =	-14.4 (-28.51, -0.2947)

c =	2614 (2495, 2734)
d =	-0.1159 (-0.1733, -0.0585)
Goodness of fit:	
SSE:	726
R-square:	0.9972
Adjusted R-square:	0.9929
RMSE:	19.05

Tabella 4: Parametri di fitting della curva di calibrazione della massima fluorescenza ottenuta con il sensore in fibra ottica per soluzioni contenenti Dansyl-Met 30 μM con aggiunta di ioni Hg^{2+} con concentrazioni crescenti nell'intervallo 0.01 – 1.2 μM .

Si è tentato di monitorare il picco di fluorescenza seguendo anche altre strategie di elaborazione dei dati acquisiti, consistenti nel modificare la definizione di osservabile ottico. In particolare, in uno degli approcci qui riportati si è fissata una soglia in ampiezza a 1000 Counts (Figura 32), dopodiché è stata calcolata l'area di ciascuno spettro al di sopra della soglia fissata. Si ribadisce anche qui che le considerazioni fatte sugli spettri di fluorescenza sono dipendenti dalla strumentazione e dalle relative impostazioni adottate.

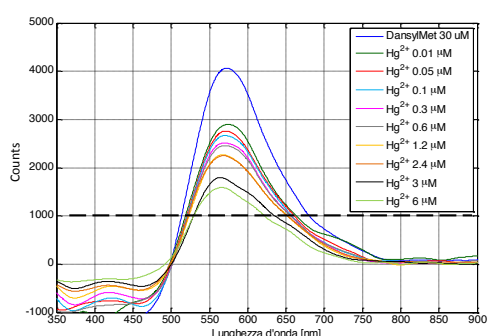


Figura 32: Spettri di fluorescenza (“scope” – Hepes) ottenuti con il sensore in fibra ottica per soluzioni contenenti Dansyl-Met 30 μM con aggiunta di ioni Hg^{2+} con concentrazioni crescenti nell'intervallo 0 – 6 μM con taglio fissato a 1000 Counts.

Il grafico dell'area calcolata al di sopra della soglia fissata a 1000 Counts è riportato in Figura 33. Si conferma un andamento decrescente all'aumentare della concentrazione di Hg^{2+} analogo a quello ottenuto sulla massima fluorescenza.

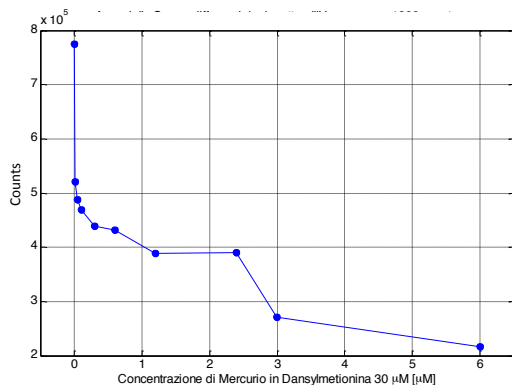


Figura 33: Andamento dell'area calcolata al di sopra di una soglia fissata a 1000 Counts nello spettro di fluorescenza ottenuto con il sensore in fibra ottica per soluzioni contenenti Dansyl-Met 30 μM con aggiunta di ioni Hg^{2+} con concentrazioni crescenti nell'intervallo 0 – 6 μM .

Anche in questo caso è stata ricavata una curva di calibrazione con fitting esponenziale, considerando tutti i punti acquisiti nell'intervallo 0 – 6 μM , mostrata in Figura 34.

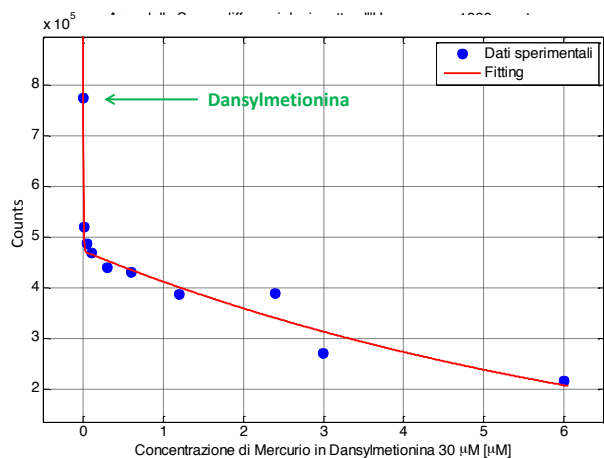


Figura 34: Curva di calibrazione e fitting esponenziale dell'area calcolata al di sopra di una soglia fissata a 1000 Counts nello spettro di fluorescenza ottenuto con il sensore in fibra ottica per soluzioni contenenti Dansyl-Met 30 μM con aggiunta di ioni Hg^{2+} con concentrazioni crescenti nell'intervallo 0.6 – 6 μM .

I parametri del fitting esponenziale sono riportati in Tabella 5.

General model Exp2:
$f(x) = a \cdot \exp(b \cdot x) + c \cdot \exp(d \cdot x)$
Coefficients (with 95% confidence bounds):
a = 3.018e+005 (2.214e+005, 3.821e+005)
b = -182.7 (-344.5, -20.92)
c = 4.729e+005 (4.355e+005, 5.103e+005)
d = -0.1364 (-0.1841, -0.08871)
Goodness of fit:
SSE: 5.067e+009
R-square: 0.9753
Adjusted R-square: 0.963
RMSE: 2.906e+004

Tabella 5: Parametri di fitting della curva di calibrazione dell'area calcolata al di sopra di una soglia fissata a 1000 Counts nello spettro di fluorescenza ottenuto con il sensore in fibra ottica per soluzioni contenenti Dansyl-Met 30 μM con aggiunta di ioni Hg^{2+} con concentrazioni crescenti nell'intervallo 0 – 6 μM .

Pur raggiungendo un valore accettabile di R^2 (97%), appare anche qui evidente che la presenza dello zero nel set di punti riportati condiziona notevolmente l'andamento della curva di fitting. Si è deciso perciò di restringere la curva di calibrazione e il conseguente fitting all'intervallo di concentrazioni 0.01 – 1.2 μM . La nuova curva di calibrazione è riportata in Figura 35.

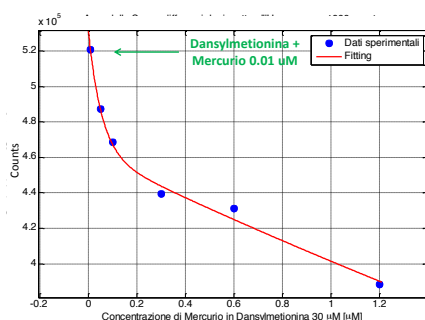


Figura 35: Curva di calibrazione e fitting esponenziale dell'area calcolata al di sopra di una soglia fissata a 1000 Counts nello spettro di fluorescenza ottenuto con il sensore in fibra ottica per soluzioni contenenti Dansyl-Met 30 μM con aggiunta di ioni Hg^{2+} con concentrazioni crescenti nell'intervallo 0.01 – 1.2 μM .

Il fitting adottato è ancora di tipo esponenziale (Tabella 6), ma in questo caso il parametro R^2 è notevolmente migliorato, raggiungendo un valore superiore al 99%.

General model Exp2:
$f(x) = a \cdot \exp(b \cdot x) + c \cdot \exp(d \cdot x)$
Coefficients (with 95% confidence bounds):
a = 7.007e+004 (2.701e+004, 1.131e+005)
b = -18.38 (-44.14, 7.374)
c = 4.63e+005 (4.305e+005, 4.955e+005)
d = -0.1424 (-0.2345, -0.05019)
Goodness of fit:
SSE: 6.346e+007
R-square: 0.9941
Adjusted R-square: 0.9853
RMSE: 5633

Tabella 6: Parametri di fitting della curva di calibrazione dell'area calcolata al di sopra di una soglia fissata a 1000 Counts nello spettro di fluorescenza ottenuto con il sensore in fibra ottica per soluzioni contenenti Dansyl-Met 30 μM con aggiunta di ioni Hg^{2+} con concentrazioni crescenti nell'intervallo 0.01 – 1.2 μM .

Un approccio alternativo consiste nel sottrarre allo spettro acquisito nella sola DansylMet (quello con il picco di fluorescenza più elevato) lo spettro acquisito nelle altre soluzioni, contenenti anche Hg^{2+} , ottenendo ancora una misura differenziale:

$$S_d = (\text{scope}_{\text{DansylMet}} - \text{scope}_{\text{DansylMet}+\text{Hg}^{2+}})$$

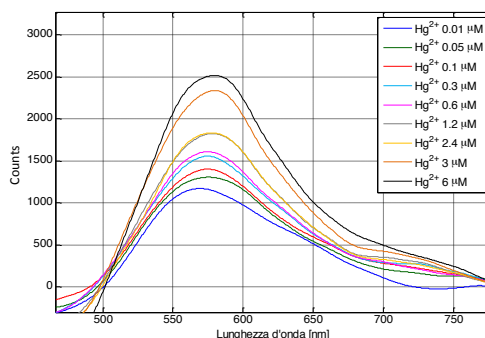


Figura 36: Spettro differenziale ottenuto sottraendo allo spettro in Dansyl-Met lo spettro acquisito in Dansyl-Met con aggiunta di ioni Hg^{2+} con concentrazioni crescenti nell'intervallo 0.01 – 6 μM . Gli spettri sono ottenuti con il sensore in fibra ottica per misure di fluorescenza.

Il risultato di questo differente approccio è ancora una curva con un picco concentrato intorno ai 560 – 580 nm (Figura 36).

L'andamento di tale picco è riportato in Figura 37. A causa della diversa definizione che è stata data allo scope differenziale rispetto agli approcci precedenti, in questo caso si ha un andamento crescente all'aumentare della concentrazione di Hg^{2+} , che conferma tra l'altro la presenza di un'anomalia a 2.4 μM .

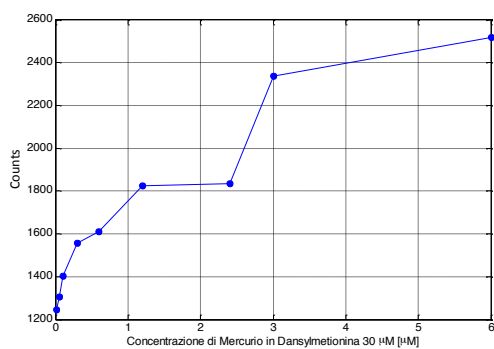


Figura 37: Andamento del massimo dello spettro differenziale ottenuto sottraendo allo spettro in DansylMet lo spettro acquisito in Dansyl-Met con aggiunta di ioni Hg^{2+} con concentrazioni crescenti nell'intervallo 0.01 – 6 μM . Gli spettri sono ottenuti con il sensore in fibra ottica per misure di fluorescenza.

La conseguente curva di calibrazione e il relativo fitting esponenziale (si riporta direttamente quello limitato all'intervallo 0.01 – 1.2 μM) sono riportati in Figura 38, mentre i parametri di fitting sono mostrati in Tabella 7, dove è possibile riscontrare un valore di R^2 analogo a quello raggiunto per il fitting nei due precedenti approcci, superiore al 99%.

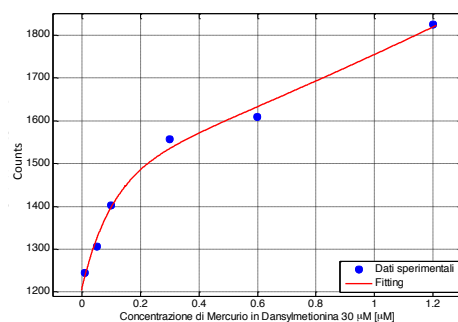


Figura 38: Curva di calibrazione e fitting esponenziale del massimo dello spettro differenziale ottenuto sottraendo allo spettro in Dansyl-Met lo spettro acquisito in DansylMet con aggiunta di ioni Hg^{2+} con concentrazioni crescenti nell'intervallo 0.01 – 1.2 μM . Gli spettri sono ottenuti con il sensore in fibra ottica per misure di fluorescenza.

General model Exp2:	
$f(x) = a \cdot \exp(b \cdot x) + c \cdot \exp(d \cdot x)$	
Coefficients (with 95% confidence bounds):	
a =	1467 (1289, 1644)
b =	0.1796 (0.04875, 0.3104)
c =	-257.5 (-456, -59.08)
d =	-9.963 (-28.43, 8.509)
Goodness of fit:	
SSE: 1455	
R-square: 0.9937	
Adjusted R-square: 0.9844	
RMSE: 26.98	

Tabella 7: Parametri di fitting della curva di calibrazione del massimo dello spettro differenziale ottenuto sottraendo allo spettro in Dansyl-Met lo spettro acquisito in DansylMet con aggiunta di ioni Hg^{2+} con concentrazioni crescenti nell'intervallo 0.01 – 1.2 μM . Gli spettri sono ottenuti con il sensore in fibra ottica per misure di fluorescenza.

Conclusioni

- Lo spettro di assorbanza mostra due picchi ben distinti: uno a ~247 nm e l'altro a ~330 nm. Analizzando il punto di massima assorbanza al variare della concentrazione di Hg^{2+} , per entrambi i picchi si è trovato un fitting lineare nell'intervallo 0.6 – 6 μM .
- Lo spettro di fluorescenza presenta un unico picco localizzato intorno a 570 nm. Analizzando il punto di massima fluorescenza al variare della concentrazione di Hg^{2+} , si è trovato un fitting esponenziale estendibile all'intervallo 0 – 6 μM e un fitting esponenziale, più accurato, limitato all'intervallo 0.01 – 1.2 μM . Sono stati proposti anche altri tipi di osservabili (area a soglia fissa, differenza rispetto alla Dansyl-Met), ottenendo trend e fitting analoghi a quelli basati sul massimo.
- Infine, confrontando le prestazioni del sistema ottenute mediante l'utilizzo del Reader da banco e del probe in fluorescenza, è possibile affermare che con il set up sperimentale in fibra ottica è possibile abbassare il limite di detection degli ioni Hg^{2+} al di sotto del valore di 0.6 μM raggiunto con il Reader. Infatti, con il probe in fluorescenza la minima concentrazione di Hg^{2+} rilevabile è dell'ordine di 0.01 μM .

Riconoscimento di ioni Hg^{2+} in ambiente marino o in matrici acquose che mimano ambienti marini

Sono stati eseguiti, mediante lettura con uno spettrofluorimetro EnSpire, saggi di titolazione in acqua di mare sintetica a diverse diluizioni per verificare la risposta della molecola selezionata (RT1). Le prove di selettività in acqua di mare sintetica, in precedenza condotte, hanno evidenziato come non sia possibile effettuare i saggi di riconoscimento direttamente in acqua di mare. L'utilizzo dei Dansyl derivati richiede quindi un pre-trattamento delle acque di mare che ne limiti la concentrazione salina.

A tale riguardo, sono state effettuate prove a diversa concentrazione salina, valutate le interferenze di altri cationi metallici nelle nuove soluzioni ed inquadrata una potenziale applicazione della Dansyl-Met per la determinazione di ioni Hg^{2+} in acque di transizione, ovvero in acque salmastre, originate dal mescolamento tra acque costiere e acque dolci dei fiumi, quali lagune, stagni costieri e laghi salmastri e zone di delta ed estuario.

La composizione dell'acqua di mare sintetica utilizzata è la seguente: 0.6 M NaCl e 0.06 M NaHCO_3 , ed il pH misurato è pari ad 8.

Per valutare le prestazioni del nostro saggio in acqua di mare sintetica a diverse diluizioni la concentrazione di Dansyl-Met stata fissata a 10 μM , e sono state usate concentrazioni di Hg^{2+} nell'intervallo 0.6-18 μM . Sono stati comparati gli spettri di emissione in fluorescenza nel buffer Hepes 10 mM (pH = 7.4) e quelli in acqua di mare sintetica diluita a diverse diluizioni: 0.06M, 0.03M, 0.006M, 0.6mM, 0.06mM, 0.006mM.

- 1) Diluizione 1/10 della concentrazione dell'acqua di mare sintetica: comparando la risposta con il sistema nel buffer classico (Hepes pH 7.4) non si ha l'atteso quenching della fluorescenza e non si registra l'atteso shift del picco verso i 500 nm per concentrazioni più alte di Hg^{2+} (18 μM) (Figura 39).

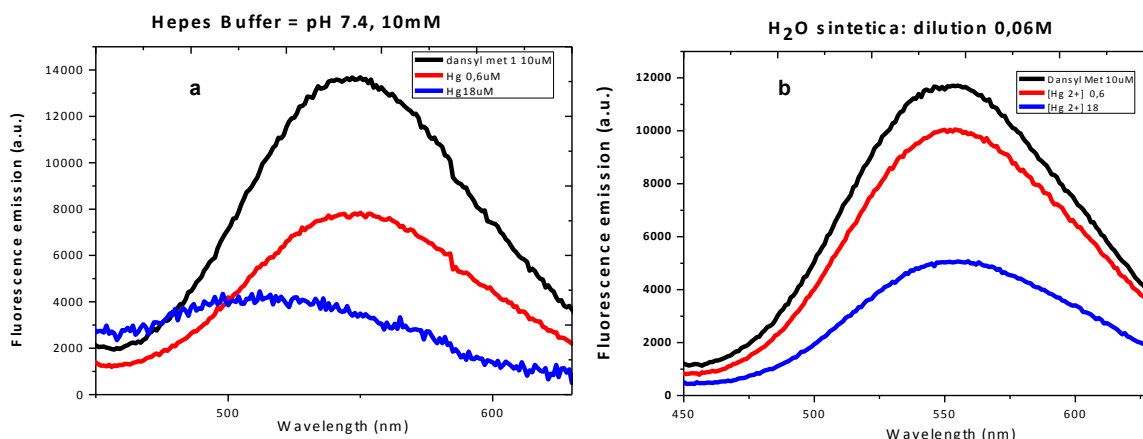


Figura 39: Spettri di emissione in fluorescenza della Dansyl-Met [10 μ M] in presenza di concentrazioni di Hg²⁺ nell'intervallo 0.6-18 μ M: a) Hepes 10 mM (pH = 7.4); b) acqua di mare sintetica ad una diluizione pari a 0.06M.

2) Diluizione 1/50 della concentrazione dell'acqua di mare sintetica: anche in tale soluzione, comparando la risposta con il sistema nel buffer classico (Hepes pH 7.4), non si ha l'atteso quenching della fluorescenza e non si registra l'atteso shift del picco verso i 500 nm per concentrazioni più alte di Hg²⁺ (18 μ M) (Figura 40).

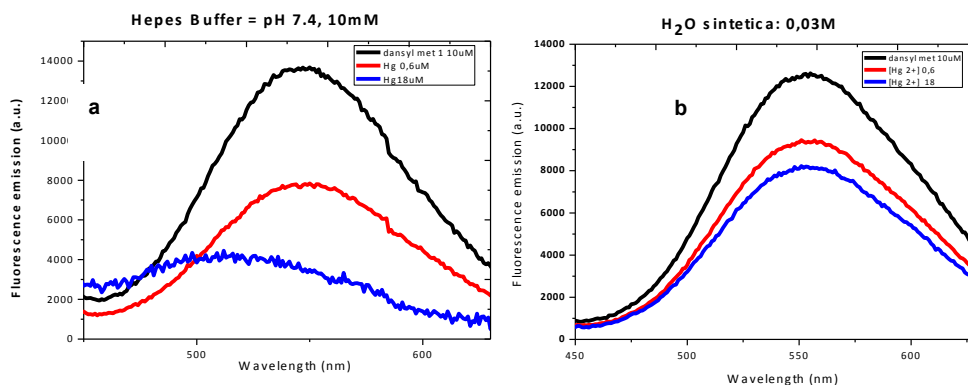


Figura 40: Spettri di emissione in fluorescenza della Dansyl-Met [10 μ M] in presenza di concentrazioni di Hg²⁺ nell'intervallo 0.6 - 18 μ M: a) Hepes 10 mM (pH = 7.4); b) acqua di mare sperimentale ad una diluizione pari a 0.03M.

3) Diluizione 1/100 della concentrazione dell'acqua di mare sperimentale: comparando la risposta con il sistema nel buffer classico (Hepes pH7.4) si osserva un quenching della fluorescenza che risulta non comparabile con quello osservato in buffer Hepes. Resta comunque non osservabile l'atteso shift del picco verso i 500 nm per concentrazioni più alte di Hg²⁺ (18 μ M) (Figura 41).

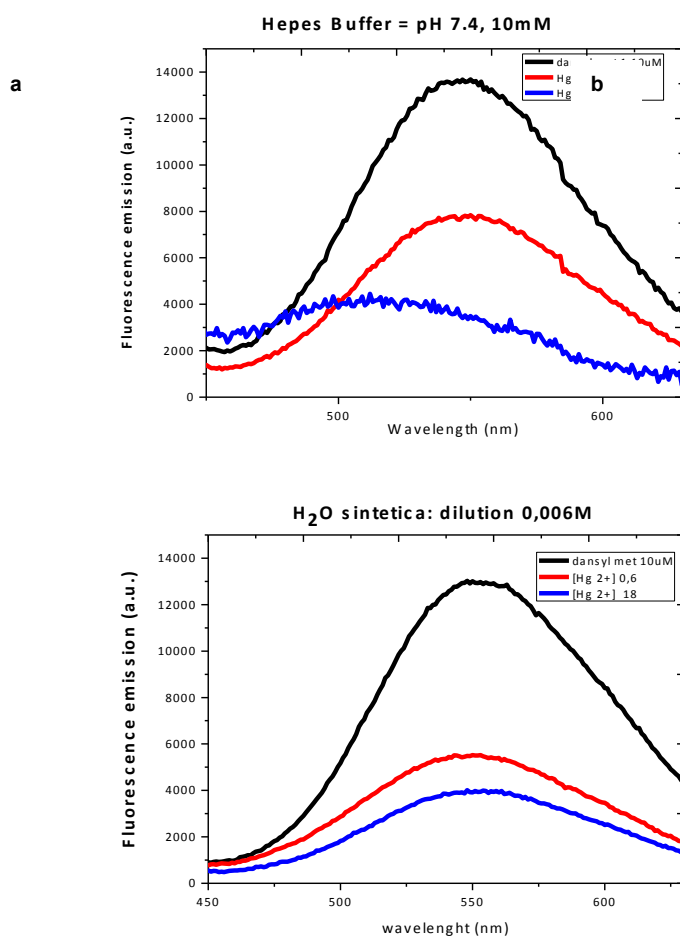


Figura 41: Spettri di emissione in fluorescenza della Dansyl-Met [10 μM] in presenza di concentrazioni di Hg^{2+} nell'intervallo 0.6-18 μM : a) Hepes 10 mM (pH = 7.4); b) acqua di mare sintetica ad una diluizione pari a 0.006M.

4) Diluizione 1/1000 della concentrazione dell'acqua di mare sintetica: comparando la risposta con il sistema nel buffer classico (Hepes pH 7.4) si osserva un quenching della fluorescenza che risulta non comparabile con quello osservato in buffer Hepes. Inoltre è possibile osservare un graduale shift del picco verso i 500 nm per concentrazioni più alte di Hg^{2+} (18 μM) (Figura 42).

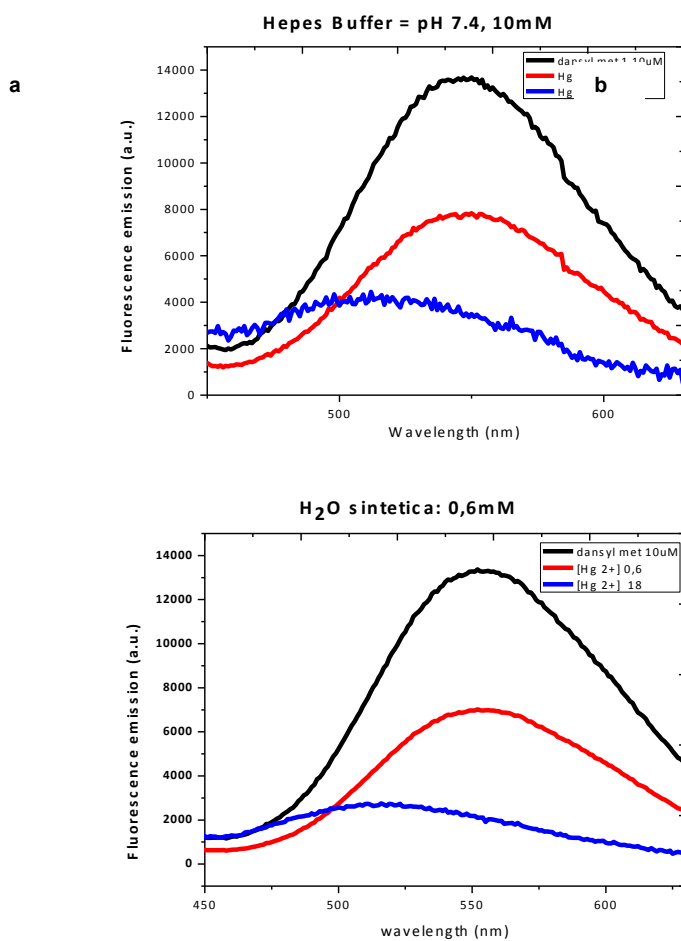


Figura 42: Spettri di emissione in fluorescenza della Dansyl-Met [10 μ M] in presenza di concentrazioni di Hg^{2+} nell'intervallo 0.6-18 μ M: a) Hepes 10 mM (pH = 7.4); b) acqua di mare sintetica ad una diluizione pari a 0.6 mM.

5) Diluizione 1/10000 della concentrazione dell'acqua di mare sintetica: comparando la risposta con il sistema nel buffer classico (Hepes pH7.4) si osserva un quenching della fluorescenza, comparabile con quello osservato in buffer Hepes. Inoltre, al diminuire della concentrazione di sale, risulta evidente il blueshift del picco verso i 500 nm per concentrazioni più alte di Hg^{2+} (18 μ M) (Figura 43).

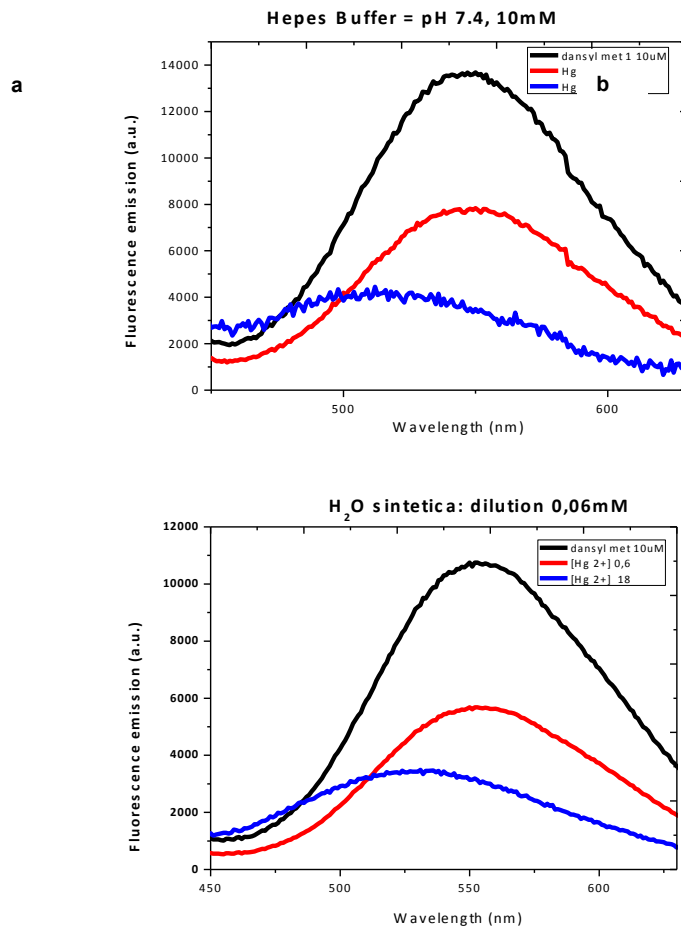


Figura 43: Spettri di emissione in fluorescenza della Dansyl-Met [10 μM] in presenza di concentrazioni di Hg^{2+} nell'intervallo 0.6-18 μM : a) Hepes 10 mM (pH = 7.4); b) acqua di mare sintetica ad una diluizione pari a 0.06 mM.

6) Diluizione 1/100000 della concentrazione dell'acqua di mare sintetica: per tali diluizioni il sistema ha recuperato le sue prestazioni in termini di quenching e shift della fluorescenza (Figura 44).

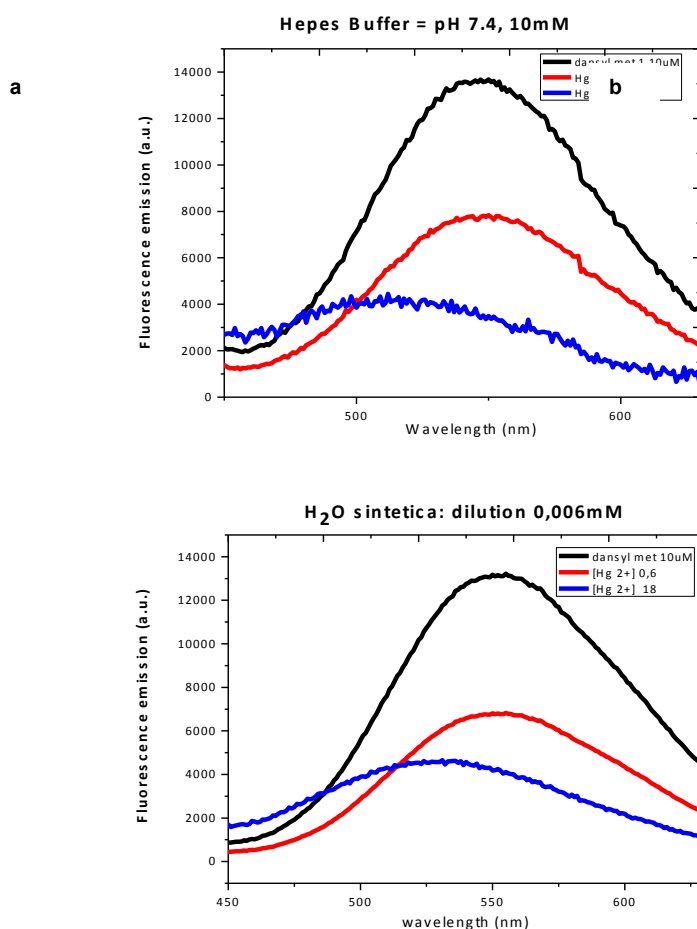


Figura 44: Spettri di emissione in fluorescenza della Dansyl-Met [$10 \mu\text{M}$] in presenza di concentrazioni di Hg^{2+} nell'intervallo $0.6\text{-}18 \mu\text{M}$: a) Hepes 10mM ($\text{pH} = 7.4$); b) acqua di mare sintetica ad una diluizione pari a 0.006mM .

Lo studio in acqua di mare a diversa concentrazione salina ha evidenziato che per evitare l'interferenza di sali con le prestazioni del saggio è necessario diluire il campione almeno di un fattore 10000.

Dopo il completamento degli studi sulla risposta della Dansyl-Met in saggi di riconoscimento di Hg^{2+} in acqua diversa concentrazione salina, è stata prescelta la migliore concentrazione salina ($[\text{C}]=0.006\text{mM}$) ed effettuato uno studio sulla selettività del riconoscimento di tale catione.

È stata valutata la selettività del riconoscimento di tale catione in presenza di cationi interferenti quali Ca^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+} , Pb^{2+} , Fe^{2+} , Pd^{2+} , Cu^{2+} , Na^+ , Ni^{2+} , Zn^{2+} (soluzioni preparate a partire dai cloruri). Sono stati effettuati differenti saggi di binding, utilizzando le seguenti condizioni sperimentali:

- i) concentrazione di Dansyl-derivato pari a $10 \mu\text{M}$;
- ii) concentrazioni limite di cationi interferenti $0.6 \mu\text{M}$. L'effetto di tale cationi sulla fluorescenza del Dansyl-derivato è stato valutato in presenza ed assenza di Hg^{2+} .

a) Fe^{2+} , Cd^{2+} , Pd^{2+}

I cationi Fe^{2+} , Pb^{2+} , Cd^{2+} danno luogo ad uno spegnimento (~10-20%) dell'emissione di fluorescenza della Dansyl-Met di riferimento (curva nera) ed interferiscono con la risposta in fluorescenza della Dansyl-Met in presenza di $[\text{Hg}^{2+}] = 0.6 \mu\text{M}$ (curva rossa).

È ancora possibile osservare uno spegnimento dell'emissione della Dansyl-Met in seguito alla complessazione con Hg^{2+} , ma la presenza di cationi interferenti inibisce l'atteso spegnimento di tale fluorescenza (Figura 45).

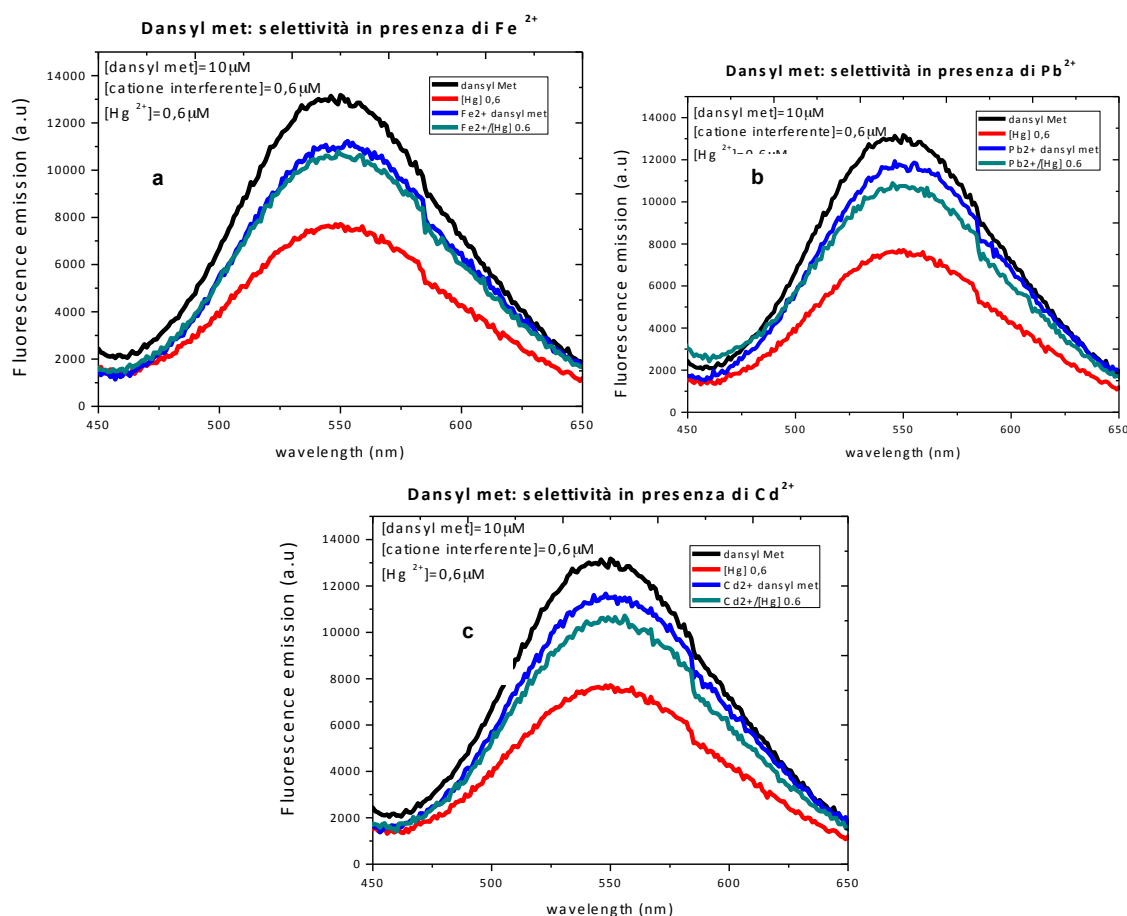


Figura 45: Spettri di emissione in fluorescenza della Dansyl-Met [$10 \mu\text{M}$] in presenza di concentrazioni di Hg^{2+} $0.6 \mu\text{M}$ e di metalli interferenti quali: a) Fe^{2+} ; b) Pb^{2+} ; c) Cd^{2+} .

b) Zn^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+}

I cationi Ni^{2+} , Zn^{2+} non interferiscono in modo sostanziale con l'emissione di fluorescenza della Dansyl-Met di riferimento (curva nera). Il catione Cu^{2+} genera uno spegnimento (~10-20%) dell'emissione di fluorescenza della Dansyl-Met di riferimento (curva nera).

I cationi Ni^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} interferiscono con la risposta in fluorescenza della Dansyl-Met in presenza di $[\text{Hg}^{2+}] = 0.6 \mu\text{M}$ (curva rossa).

È ancora possibile osservare uno spegnimento dell'emissione della Dansyl-Met in seguito alla complessazione con Hg^{2+} , ma la presenza di cationi interferenti inibisce l'atteso spegnimento di tale fluorescenza (Figura 46).

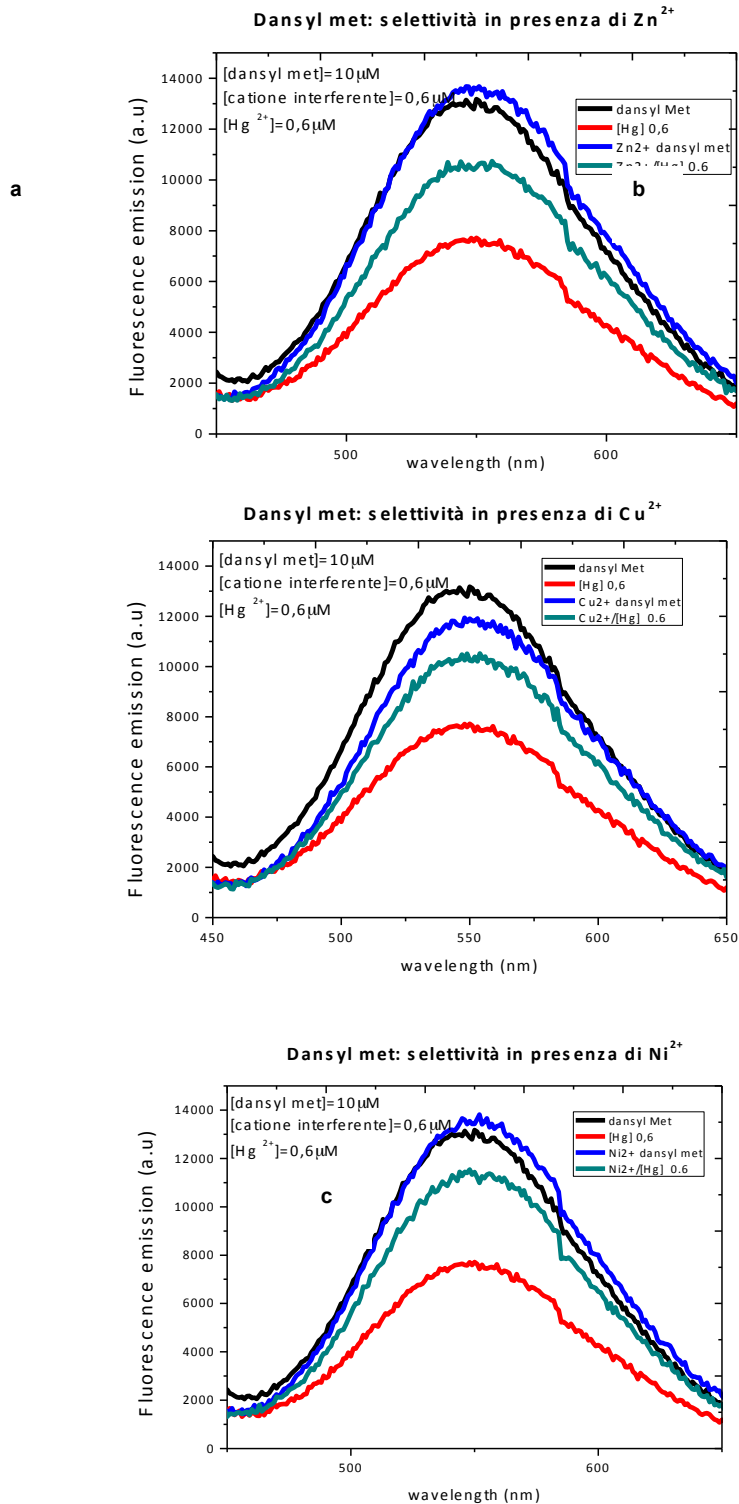
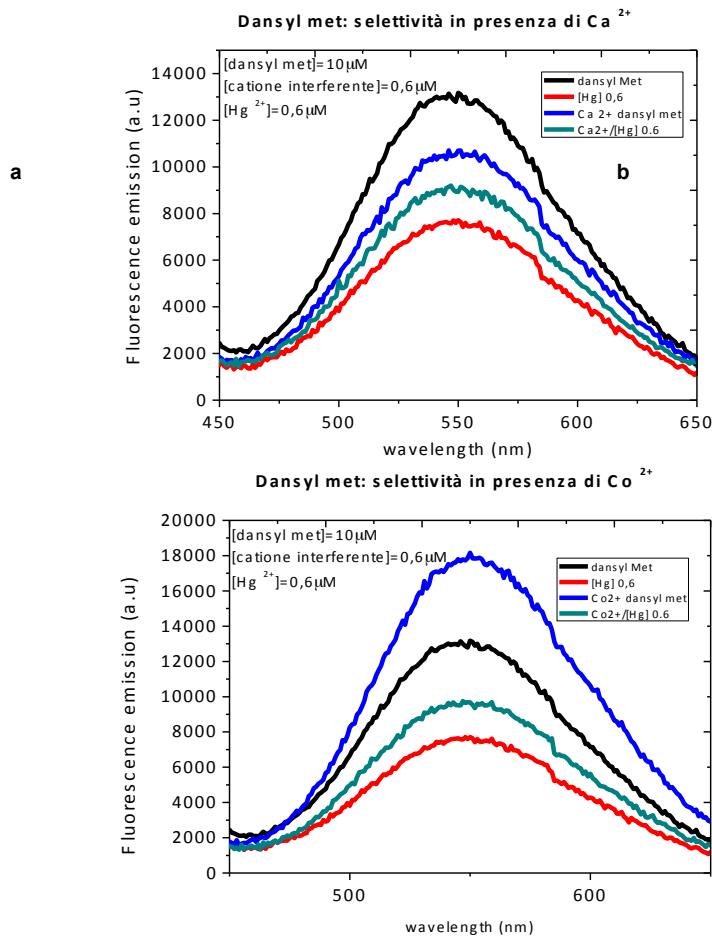


Figura 46: Spettri di emissione in fluorescenza della dansylMet [10 μM] in presenza di concentrazioni di Hg^{2+} 0.6 μM e di metalli interferenti quali: a) Zn^{2+} ; b) Cu^{2+} ; c) Ni^{2+} .

c) Ca^{2+} , Co^{2+} , Pd^{2+}

Il catione Co^{2+} dà origine ad un incremento dell'emissione di fluorescenza della Dansyl-Met di riferimento (curva nera). Il catione Ca^{2+} genera uno spegnimento ($\sim 10\text{-}20\%$) dell'emissione di fluorescenza della Dansyl-Met di riferimento (curva nera).

I cationi Ca^{2+} , Co^{2+} , $^+$ interferiscono con la risposta in fluorescenza della Dansyl-Met in presenza di $[\text{Hg}^{2+}] = 0.6 \mu\text{M}$ (curva rossa). Per i cationi Ca^{2+} , Co^{2+} è ancora possibile osservare uno spegnimento dell'emissione della Dansyl-Met in seguito alla complessazione con Hg^{2+} , ma la presenza di cationi interferenti inibisce l'atteso spegnimento di tale fluorescenza. Caso particolare risulta essere il catione Pd^{2+} per cui si ha il completo abbattimento dell'emissione in fluorescenza in presenza ed in assenza di Hg^{2+} (Figura 47).



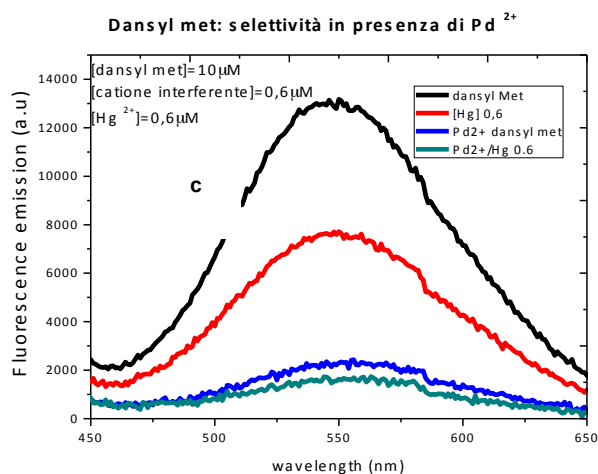


Figura 47: Spettri di emissione in fluorescenza della Dansyl-Met [10 μM] in presenza di concentrazioni di Hg²⁺ [0.6 μM] e di metalli interferenti quali: a) Ca²⁺; b) Co²⁺; c) Pd²⁺.

Gli studi di selettività hanno evidenziato come per la Dansyl-Met si abbia una interferenza non trascurabile sugli spettri di emissione in fluorescenza dovuta alla presenza dei cationi interferenti presi in esame (Ca²⁺, Cd²⁺, Co²⁺, Pb²⁺, Fe²⁺, Pd²⁺, Cu²⁺, Na⁺, Ni²⁺, Zn²⁺) anche in acqua di mare sintetica diluita.

Tali interferenze sono state riscontrate in presenza di basse concentrazioni di Hg²⁺ (0.6 μM). L'ipotesi è che in presenza di altri cationi, anche in acqua di mare sintetica, si formino complessi o si abbiano interazioni transienti, la cui stechiometria ed il cui effetto sulla fluorescenza dipendono dalle concentrazioni relative del dansyl derivato e del catione metallico.

Progettazione, preparazione e caratterizzazione analitica e funzionale di BODIPY per il riconoscimento di ioni Hg^{2+} in ambiente marino o in matrici acquose che mimano ambienti marini.

Un primo set di biomolecole è stato progettato e caratterizzato a partire dalla Dansyl-Met (Figura 48). Le molecole risultano essere particolarmente interessanti in quanto posseggono proprietà ottiche facilmente modulabili sulla base del pH, degli equivalenti di ioni Hg^{2+} o di percentuali di solventi organici. Inoltre la sintesi della Dansyl-Met e dei suoi derivati è particolarmente semplice e porta a delle rese superiori al 90% finale.

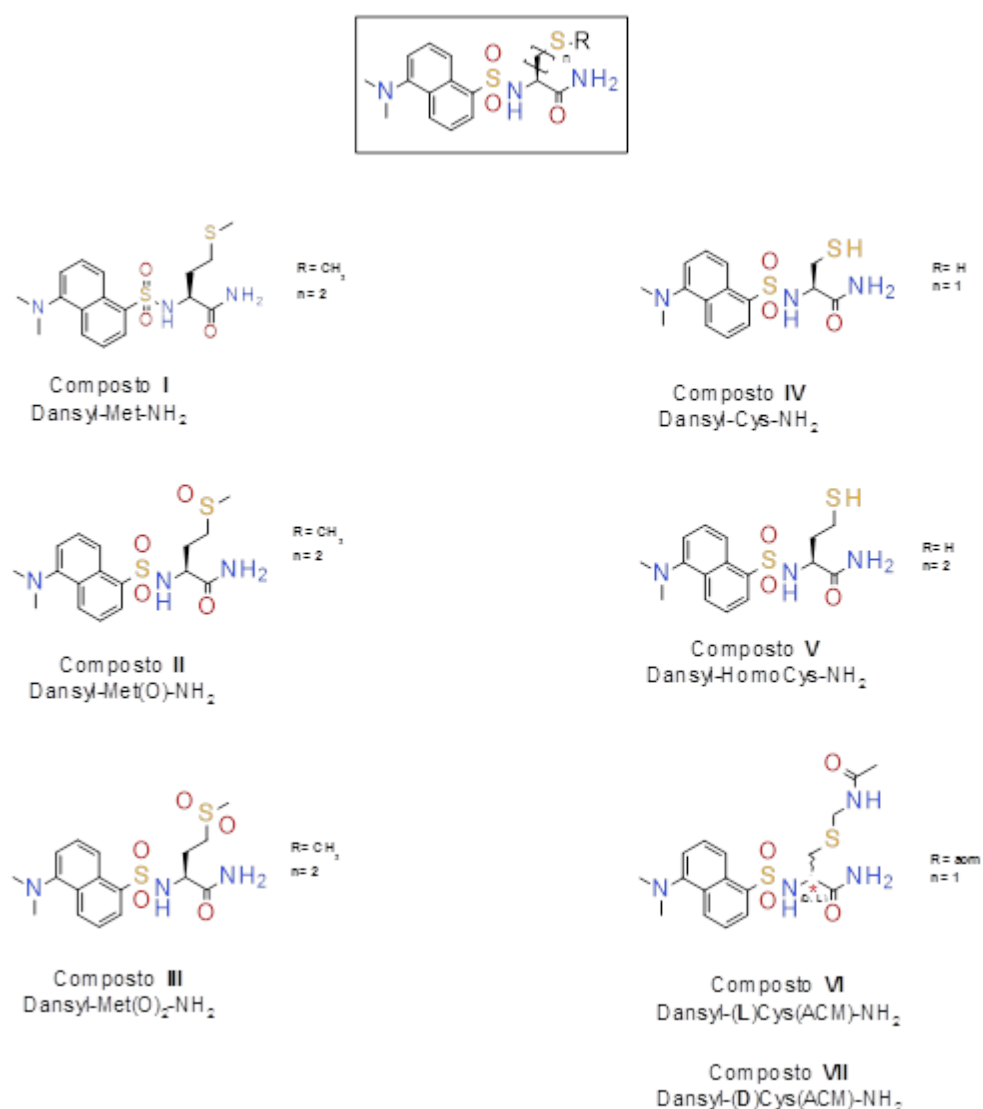


Figura 48: Lista dei dansyl derivati già studiati come probes per la rivelazione di Hg^{2+} .

In particolare, il gruppo fluorescente dansile modula e rende selettivo il riconoscimento dei cationi metallici mediante complessazione con il gruppo sulfonammidico. Il riconoscimento si traduce poi

in variazioni delle proprietà spettroscopiche (fluorescenza ed assorbanza) del dansile stesso che possono essere sfruttate per monitorare l'intensità e la specificità del legame dello ione al probe.

Per tali derivati è stata messa a punto una strategia sintetica semplice ed efficace che ha consentito di ottenere le molecole con rese eccellenti ed in tempi estremamente brevi. La caratterizzazione spettroscopica delle molecole selezionate è stata effettuata eseguendo delle titolazioni in presenza di concentrazioni crescenti di Hg^{2+} e valutando le variazioni spettrali sia in fluorescenza che in assorbanza. Impiegando la fluorescenza, la concentrazione di Hg^{2+} minima rilevabile nelle condizioni sperimentali ottimizzate è pari a $0.6 \mu\text{M}$ (0.12 ppm). Sono stati in seguito condotti studi di selettività in presenza di ioni interferenti a diverse concentrazioni e condotti saggi di titolazione in soluzioni acquose che mimano ambienti marini (acqua di mare sintetica/sperimentale) per verificare la risposta delle molecole selezionate in termini di selettività (derivati I e VI, RT1). Le prove di selettività in acqua di mare sintetica hanno evidenziato il limite dei Dansyl-derivati nel legare e rivelare lo ione mercurio in presenza di elevate concentrazioni di ioni cloruro, ma soprattutto alle concentrazioni previste nelle acque marine. L'interferente principale in questo caso è prevedibilmente proprio lo ione Cl^- , presente in elevatissime concentrazioni (circa 0.5 M), che è in grado di complessare anch'esso lo ione Hg^{2+} . L'utilizzo dei Dansyl-derivati richiederebbe quindi un eventuale pre-trattamento delle acque di mare che limiti la concentrazione di ioni cloruro. Alternativamente, l'impiego di tali molecole può essere ristretto alla rivelazione di ioni Hg^{2+} in matrici in cui la concentrazione di cloruro è notevolmente più bassa e i livelli di ione bivalente più alti come ad esempio nelle cosiddette "acque di transizione" (C.G. Daughton / *Environmental Impact Assessment Review* 24 (2004) 711–732). Per ovviare a questo inconveniente e permettere quindi la rivelazione di Hg^{2+} in matrici più simili all'acqua marina e con sensibilità più elevate, sono stati individuati derivati del difluoro-4-boro-3, 4-diaza-indacene (di seguito abbreviato come BODIPY, Figura 49).

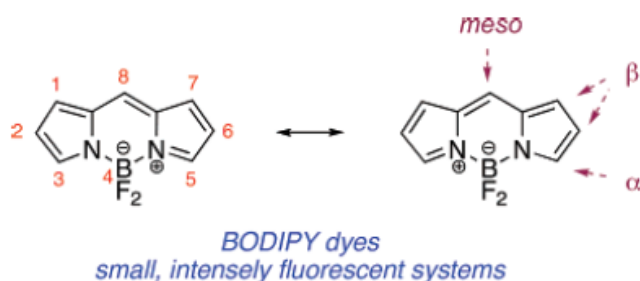


Figura 49: Struttura del Bodipy core.

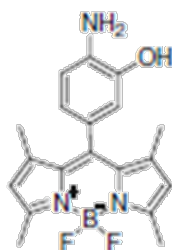
Si riportano di seguito i riferimenti di lavori recenti che descrivono alcune molecole interessanti appartenenti a questa classe:

- 1) Burgess K. et al *Chem. Rev.* **2007**, 107, 4891–4932.

- 2) Dokyoung K. et al *Tetrahedron* **2012**, 68, 5279–5282.
- 3) Culzoni, M.J. et al *Anal. Methods*, **2013**, 5, 30–49.
- 4) Fan, J. et al *J Fluoresc* **2012**, 22, 945–951

I derivati del BODIPY sono molecole fluorescenti che tendono ad avere un forte assorbimento nell'UV e sono caratterizzate da picchi di emissione in fluorescenza ben definiti e con alte rese quantiche. Il grande coefficiente di estinzione molare (ϵ), l'elevata resa quantica in fluorescenza (Φ) e l'insensibilità a polarità del solvente e pH hanno permesso lo sviluppo di molecole fluorescenti a base di BODIPY come sensori fluorescenti efficienti per diversi analiti, tra cui Hg^{2+} (riferimento 4). Tali derivati sono ragionevolmente stabili in condizioni fisiologiche e piccole modifiche delle loro strutture consentono di modulare le loro caratteristiche di fluorescenza. Infatti, questi composti sono già stati utilizzati in letteratura per ottenere sistemi a trasferimento di energia o di elettroni in presenza di molecole che fungono da accettori di energia e di elettroni.

In particolare, partendo dallo studio riportato nel riferimento 4, si propone la sintesi del derivato BODIPY-amminofenolo (VIII), altamente selettivo e sensibile per il catione Hg^{2+} (Figura 50).



VIII

Figura 50: Struttura del BODIPY–amminofenolo.

Tale derivato è costituito da due unità: i) un core di BODIPY come molecola fluorescente; ii) l'amminofenolo che è in grado di formare un complesso stabile con Hg^{2+} . In presenza di concentrazioni crescenti di Hg^{2+} si ha un'accensione della fluorescenza (Figura 51.a), ed è stato riportato LOD (limit of detection) inferiore a 2 ppb (Figura 51.b).

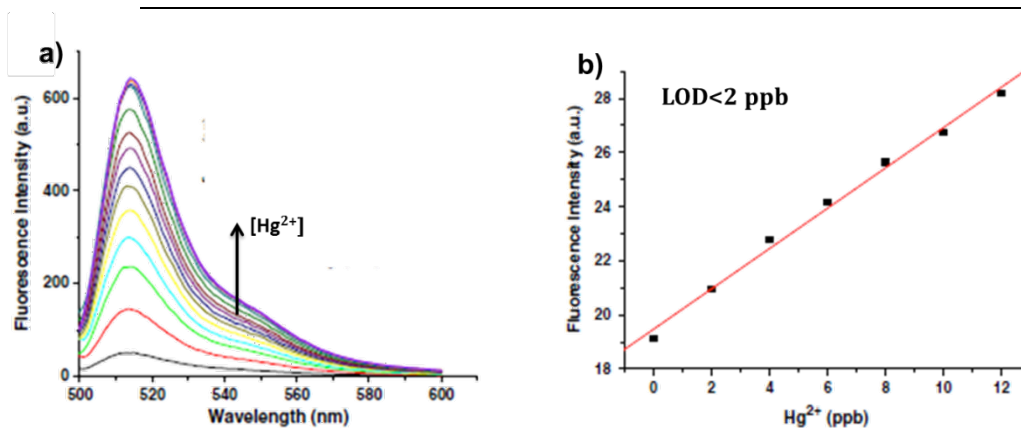


Figura 51. a) Spettro di emissione in fluorescenza di I ($\lambda_{exc} = 495\text{ nm}$) in tampone 10 mM HEPES pH 7.4, in presenza di concentrazioni crescenti di Hg^{2+} . b) Le variazioni di intensità di fluorescenza del derivato VIII ($5\ \mu\text{M}$) in seguito ad aggiunta di Hg^{2+} (0-12 ppb) in tampone 10 mM HEPES pH 7.4.

In questa molecola, il gruppo NH_2 è responsabile di un efficiente processo di trasferimento elettronico (PET) a partire dall'atomo di azoto al core del BODIPY. L'inibizione di tale processo fluorescente in seguito alla complessazione con lo ione Hg^{2+} è responsabile dell'accensione (o enhancement) della fluorescenza (Figura 52).

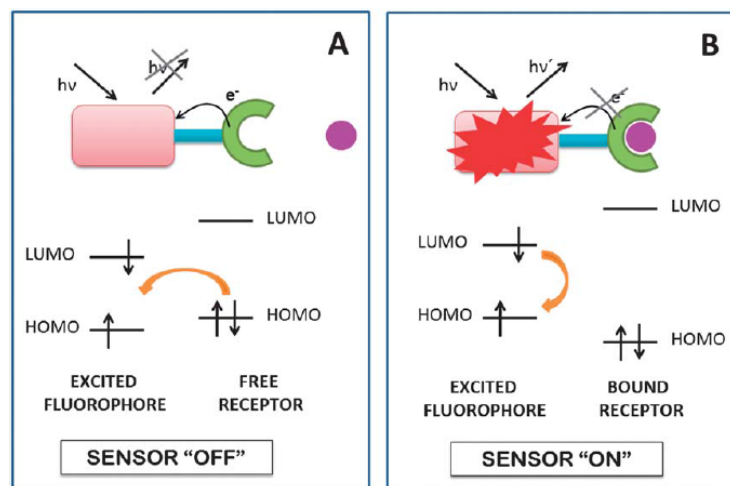


Figura 52: Processo di trasferimento elettronico (PET) per gli indicatori fluorescenti. a) Il formato a tre moduli permette il trasferimento di elettroni dal chelante al fluoroforo, spegnendo la fluorescenza del sensore. b) Quando il target si lega, il potenziale redox recettore viene perturbato e rallenta il processo di PET, con conseguente accensione del sensore.

Questo sensore presenta - in soluzioni acquose - un'elevata selettività e sensibilità per Hg^{2+} in presenza di vari ioni metallici e anioni (Figura 53a). Inoltre, anche la risposta di tale molecola è stata validata in ambienti ricchi di zolfo (Figura 53b) ed in condizioni naturali (campioni di acqua da ambienti marini, Figura 53c). Grazie a queste proprietà, tale derivato appare come un eccellente candidato per la rilevazione di Hg^{2+} in campo ambientale.

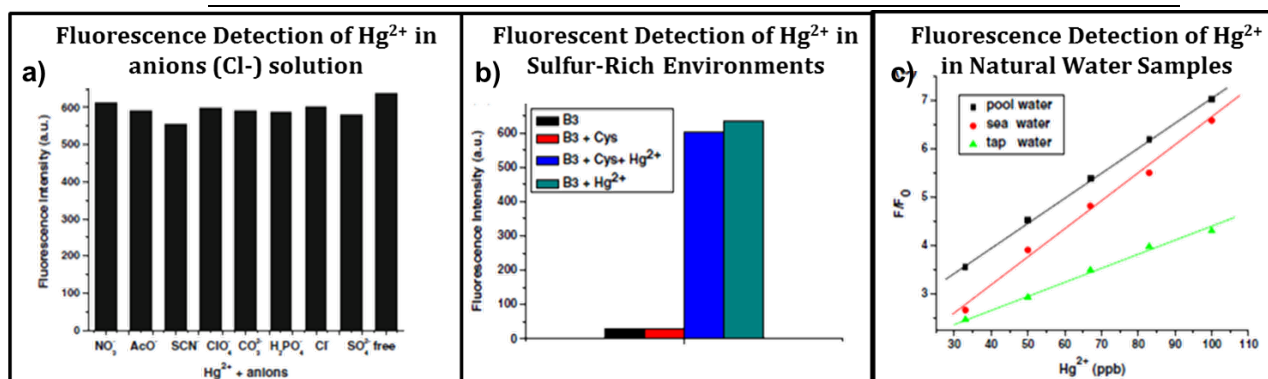


Figura 53. a) Risposte di fluorescenza del derivato VIII (10 μM) in presenza di 50 μM Hg²⁺ ed una soluzione di anioni selezionati (50 μM) in tampone HEPES pH 7.2. Lunghezza d'onda di eccitazione è stata fissata a 495 nm e l'emissione è stata integrata tra 500-600 nm. b) Risposte di fluorescenza del derivato VIII (10 μM) in presenza di 50 μM Hg²⁺ ed in presenza di cisteina (50 μM) in tampone HEPES (20 mM HEPES). c) Risposta lineare in fluorescenza (F/F₀) del derivato VIII (10 μM) dopo l'aggiunta di Hg²⁺ a diversi campioni di acqua naturale.

Nello specifico si propone quindi di preparare la molecole descritta, e caratterizzare dal punto di vista analitico le proprietà di complessazione di cationi metallici di varia natura. Il composto presenta una sintesi multisteps, come descritto in Figura 54.

La sintesi del derivato VIII si realizza a partire dal 2,4-dimetilpirrolo (X) e la 3-idrossi-4-nitrobenzaldeide (IX) e prevede 3 step di reazione. Tutti gli step di reazione richiedono ambiente anidro ed atmosfera inerte.

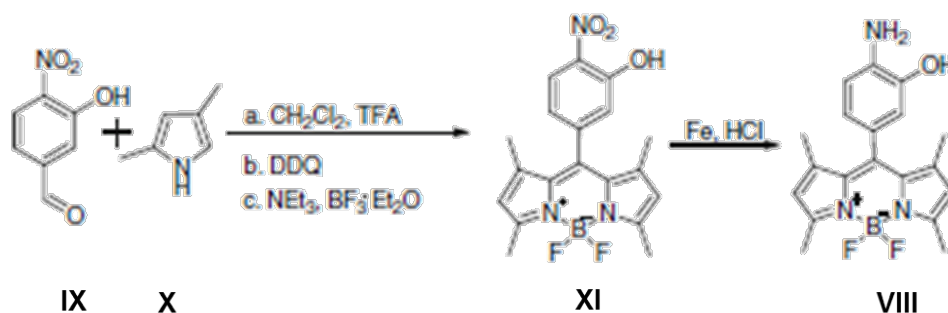


Figura 54: Schema sintetico per derivato VIII.

Sintesi – Parte sperimentale

In un pallone da 250 mL si introduce il 2,4-dimetilpirrolo (190 mg, 2 mmol) in 65 mL di diclorometano anidro in atmosfera inerte. Si aggiunge successivamente una goccia di acido trifluoroacetico (TFA), e mediante imbuto gocciolatore si aggiunge una soluzione di 3-idrossi-4-nitrobenzaldeide (167mg, 1 mmol) in diclorometano anidro (25 mL) (Figura 55). La miscela di reazione si lascia sotto agitazione per 5 ore (l'andamento della reazione è controllato via TLC).

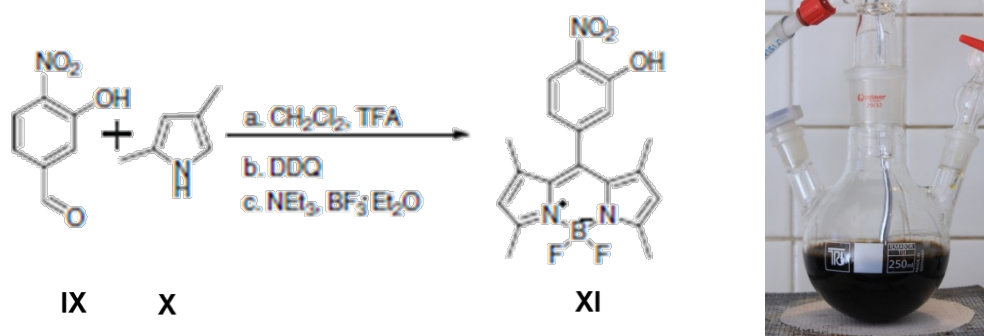


Figura 55: Schema sintetico per intermedio XI.

Il grezzo proveniente dalla reazione tra IX e X (un attacco al carbonile aldeidico sotto catalisi acida) è stato neutralizzato ed estratto prima di essere utilizzato nello step successivo di reazione. Nello step successivo sono aggiunti al pallone di reazione, nell'ordine 2,3-dicloro-5,6-dicianochinone (DDQ, 442 mg, 2 mmol) in 10 mL di diclorometano, trietilammina (2 mL) (per deprotonare l'NH pirrolico) e $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$. La miscela di reazione è stata lasciata sotto agitazione per 90 minuti. Tali passaggi hanno portato all'ottenimento del derivato XI. Alla miscela di reazione si aggiungono 40 mL di acqua e la fase acquosa. Viene estratta quindi con diclorometano (4x15 mL). Le fasi organiche ottenute (arancio scuro) sono riunite, anidificate con Na_2SO_4 anidro e concentrate al rotavapor; la fase acquosa viene invece smaltita.

Si ottiene un solido rosso che viene purificato con colonna cromatografica di tipo Flash con eluente in gradiente di polarità (Esano/Acetato di Etile 7:1 -> 6:1 -> 5:1). Si ottiene un solido rosso (120 mg, 31%), come mostrato in Figura 56.

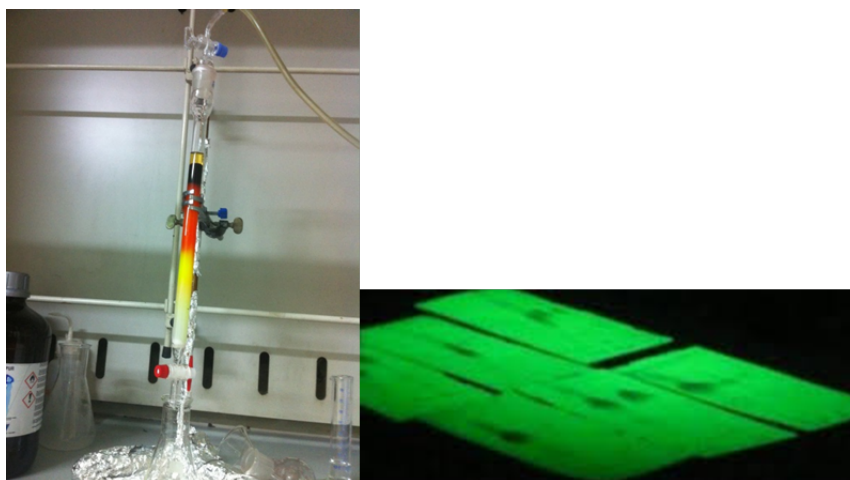


Figura 56: Colonna cromatografica di tipo Flash con eluente in gradiente di polarità (Esano/Acetato di Etile 7:1 -> 6:1 -> 5:1).

L'intermedio XI è stato caratterizzato analiticamente mediante LC-MS ed NMR. Le analisi LC-MS sono state eseguite con uno spettrometro HCT-Ultra PTM discovery system, Bruker con detector a trappola ionica (Ion Trap) accoppiato ad un sistema HPLC Waters Alliance Separation Module/Detector 2998 PDA) equipaggiato con colonne a fase inversa (colonna Phenomenex OnxY C18). In Figura 57 è riportato lo spettro di massa che ha confermato l'identità del composto sintetizzato.

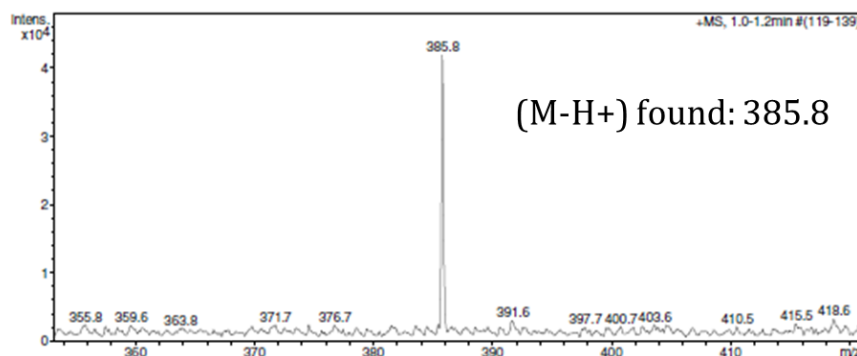


Figura 57: Spettro LC-MS del derivato XI.

Infine il derivato VIII è stato ottenuto mediante reazione di riduzione per cui si impiega Fe in polvere con HCl. In un pallone a tre colli si introduce il derivato XI (60 mg, 0.17 mmol) sciolto in 30 mL di metanolo, acqua (15 mL) a cui si aggiunge Fe in polvere 250 mg, 4.5 mmol (Figura 58). Si porta a riflusso la miscela di reazione riscaldando a 65 °C, si aggiunge HCl concentrato in metanolo (2 mL, 0.6 mol L⁻¹) e si lascia sotto agitazione a riflusso per 3 ore mL. L'andamento della reazione è controllato via TLC.

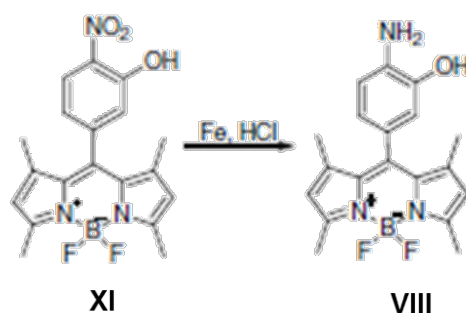


Figura 58: Schema sintetico per il composto finale VIII.

La miscela (soluzione rossa più precipitato giallo) viene poi raffreddata fino a temperatura ambiente e concentrate al rotavapor.

Si ottiene un solido rosso che viene purificato con colonna cromatografica di tipo Flash con eluente in gradiente di polarità (Esano/Acetato di Etile 5:1 -> 4:1 -> 3:1). Si ottiene un solido rosso (45 mg, 83%) (Figura 59).



Figura 59: Colonna cromatografica di tipo Flash con eluente in gradiente di polarità (Esano/Acetato di Etile 5:1 -> 4:1 -> 3:1).

Il composto finale VIII è stato caratterizzato analiticamente mediante LC-MS ed NMR. In Figura 60 è riportato lo spettro di massa che ha confermato l'identità del composto sintetizzato.

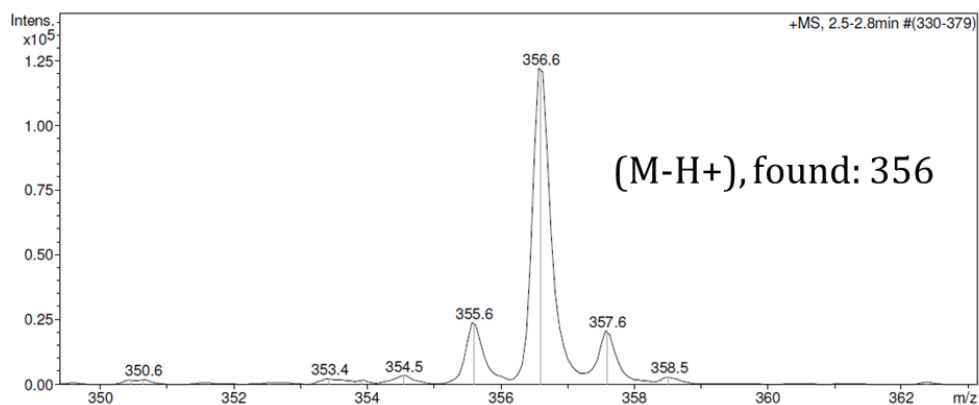


Figura 60: Spettro LC-MS del derivato VIII. Il peso molecolare teorico è 356.2

Si procederà successivamente alla caratterizzazione in assorbanza e fluorescenza del derivato VIII e saranno valutate le prestazioni in saggi di riconoscimento di ioni Hg^{2+} .

Caratterizzazione analitica e funzionale di BODIPY per il riconoscimento di ioni Hg^{2+} in ambiente marino o in matrici acquose che mimano ambienti marini.

E' stata inizialmente valutata la stabilità di emissione in fluorescenza del BODIPY-amminofenolo a tempi diversi: 1h e 3h dopo il caricamento in piastra (Figura 61). Le analisi in fluorescenza sono state eseguite acquisendo spettri di fluorescenza nel range 500 nm – 560 nm in seguito ad eccitazione a 480 nm. Gli spettri di emissione di fluorescenza sono stati registrati su soluzioni di BODIPY-amminofenolo con concentrazione pari a 5 μ M.

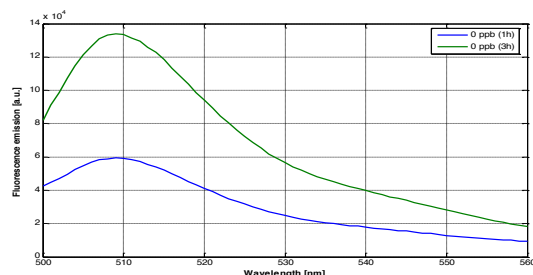


Figura 61: Spettri di emissione in fluorescenza del BODIPY-amminofenolo ($\lambda_{ex} = 480$ nm) in tampone 10 mM HEPES/etanolo (9:1) pH 7.4.

Si osserva anche che a tempi diversi (1h e 3h) si ha un incremento della emissione in fluorescenza le cui cause possono essere attribuite a:

- Variazioni di pH a seguito dell'assorbimento di CO_2 ;
- Evaporazione nel tempo del solvente (in particolare l'etanolo che è presente al 10% nel Buffer Hepes 10 mM).

Queste ipotesi sono state verificate in modo tale da validare la stabilità del BODIPY-amminofenolo in soluzione.

a) Variazioni di pH nel buffer a seguito dell'assorbimento di CO_2

Sono stati preparati 3 campioni contenenti 2 ml di soluzione buffer Hepes 10 mM/etanolo (9/1) pH 7.4. Sono state monitorate nel tempo (1, 2, 3 ore) le variazioni del pH in seguito ad adsorbimento di CO_2 e/o all'evaporazione dell'etanolo (Tabella 7). Nell'arco temporale di 3 ore, i campioni sono stati esposti all'aria (temperatura dell'ambiente $\sim 25^\circ C$) e si è registrato a fine misura una diminuzione di volume pari circa al 5% del volume iniziale.

	Tempo=0	Tempo=1h	Tempo=2h	Tempo=3h
Campione 1	pH=7,24	pH=7,06	pH=7,07	pH=7,03
Campione 2	pH=7,21	pH=7,09	pH=7,07	pH=7,07
Campione 3	pH=7,15	pH=7,05	pH=7,06	pH=7,07

Tabella 7: Valori di pH misurati a diversi tempi nei campioni in esame.

Dopo 3 h si registra una variazione di pH pari a 0.14 unità. Tale variazione può essere trascurata considerando che il valore di pKa del BODIPY-amminofenolo è pari ~ 4 , per cui le variazioni di

pH così piccole intorno ad un valore di pH=7 non incidono sull'intensità di emissione in fluorescenza.

b) Evaporazione nel tempo del solvente (in particolare l'etanolo che è presente al 10% nel Buffer Hepes 10 mM)

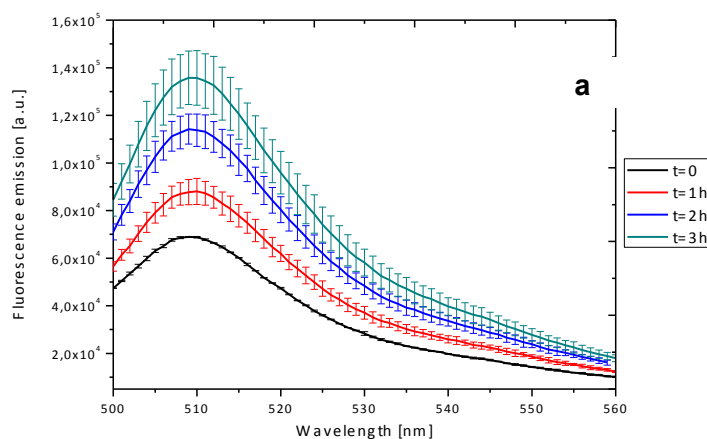
L'effetto di evaporazione del buffer (in particolare dell'etanolo) sui valori di emissione in fluorescenza è stato valutato registrando gli spettri di emissione in fluorescenza del BODIPY-amminofenolo a diversi tempi (0,1,2,3 ore) con 2 diverse modalità:

i) Una piastra è stata caricata con 200 μ L di soluzione di bodipy-amminofenolo 5 μ M, lasciata in aria e conservata a temperatura ambiente ($\sim 25^{\circ}\text{C}$) per tutta la durata dell'esperimento (Figura 62.a).

ii) Invece, per minimizzare e controllare una eventuale evaporazione del buffer durante le acquisizioni nell'arco temporale di 3h, una seconda piastra è stata caricata con 200 μ L di soluzione di BODIPY-amminofenolo 5 μ M, accuratamente chiusa e tra le diverse misure conservata in frigo (Figura 62.b).

Dagli spettri di emissione in fluorescenza emerge che con la nuova modalità di conservazione della piastra è possibile controllare (a differenza della piastra lasciata aperta) le variazioni di emissione in fluorescenza nel tempo. Infatti, dopo 1h l'effetto dell'evaporazione è praticamente assente nella piastra conservata chiusa ed in frigo (Figura 62.b). Dopo 2h sulla stessa piastra si registra un incremento pari circa al 10% del segnale iniziale e dopo 3h si ha un incremento pari circa al 20% del segnale iniziale. Nel caso della piastra lasciata aperta a temperatura ambiente (Figura 62.a), si registra nel tempo un graduale incremento dell'emissione in fluorescenza che è possibile attribuire ad un solo effetto di evaporazione del solvente durante l'esperimento.

I parametri strumentali e di lettura fin qui ottimizzati, sono stati quindi utilizzati in saggi di riconoscimento di Hg^{2+} con soluzioni di BODIPY-amminofenolo.



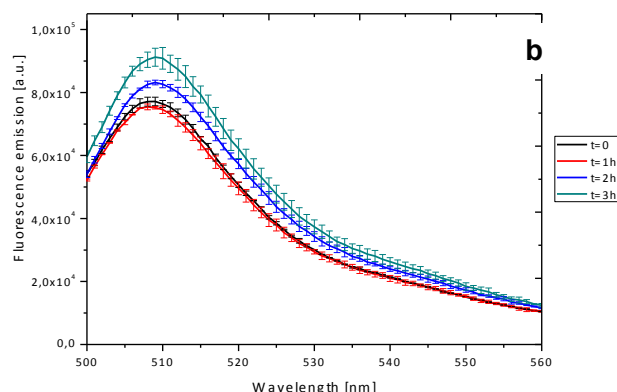


Figura 62: Spettri di emissione in fluorescenza del BODIPY-amminofenolo ($\lambda_{ex} = 480$ nm) in tampone 10 mM HEPES/etanolo (9:1) pH 7.4 registrati: **a)** su piastra lasciata in aria; **b)** su piastra accuratamente chiusa e tra le diverse misure conservata in frigo.

• Saggi di binding BODIPY-amminofenolo/ Hg^{2+} in acqua di mare sperimentale

Le titolazioni in fluorescenza sono state eseguite acquisendo spettri di fluorescenza nel range 500 nm – 560 nm in seguito ad eccitazione a 480 nm. Gli spettri di emissione di fluorescenza sono stati registrati su soluzioni di BODIPY-amminofenolo con concentrazione pari a 5 μ M. Le misure sono state effettuate mantenendo costante in ogni campione la concentrazione di BODIPY-amminofenolo, in modo tale da poter trascurare in fase di elaborazione dati l'effetto di diluizione. La caratterizzazione in fluorescenza del binding è stata eseguita in acqua di mare sperimentale /Etanolo 9:1, pH 7.4). Inoltre, poiché lo scopo ultimo dell'attività di ricerca è la determinazione quantitativa di ioni mercurio in campioni di acqua di mare in la cui concentrazione di tale catione è al di sotto di una ppm, sul BODIPY-amminofenolo sono state effettuate prove di titolazione per valutarne la risposta in intervalli di concentrazione di Hg^{2+} 0-15 ppb. In Figura 63, sono riportati gli spettri di emissione in fluorescenza registrati con il protocollo ottimizzato nel range di concentrazioni di Hg^{2+} 0-15 ppb.

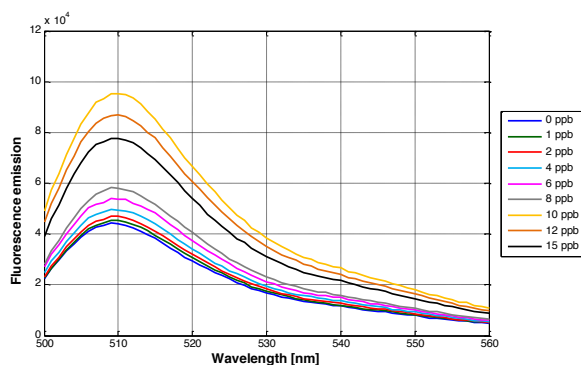


Figura 63: Spettri di emissione in fluorescenza del BODIPY-amminofenolo 5 μ M ($\lambda_{ex} = 480$ nm) in acqua di mare sperimentale /etanolo (9:1) con aggiunta di ioni Hg^{2+} con concentrazioni crescenti nell'intervallo 0 – 15 ppb.

In Figura 2463 sono riportati gli spettri di fluorescenza con le relative barre di errore in ogni punto (deviazione standard su triplicato). Osservando questo grafico è possibile apprezzare che le misurazioni eseguite con questo tipo di sensore sono caratterizzate, per questo intervallo di concentrazioni di Hg^{2+} , da un buon grado di ripetibilità, poiché le diverse curve sono sufficientemente distanziate nel tratto in cui la fluorescenza è più elevata, evitando in questo modo di confondere tra loro le diverse concentrazioni.

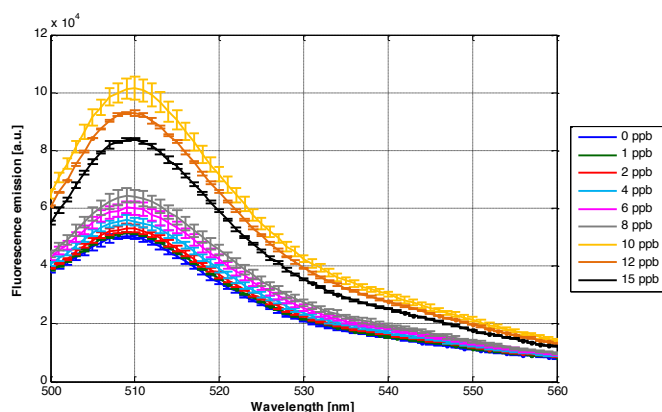


Figura 64: Spettri di emissione in fluorescenza e relative deviazioni standard del BODIPY-amminofenolo $5\mu\text{M}$ ($\lambda_{\text{ex}} = 480\text{ nm}$) in acqua di mare sperimentale /etanolo (9:1) con aggiunta di ioni Hg^{2+} con concentrazioni crescenti nell'intervallo 0 – 15 ppb.

Per apprezzare le differenze esistenti tra gli spettri relativi alle diverse concentrazioni di ioni Hg^{2+} si è deciso di studiare la posizione (in lunghezza d'onda) e l'emissione (intensità) del punto di massimo di ciascuno dei due picchi individuati. Per il picco centrato intorno ai 510 nm, il grafico relativo alla lunghezza d'onda è riportato in Figura 1264. È immediato osservare che si ha solo un piccolo spostamento della lunghezza d'onda del picco di emissione al variare della concentrazione nell'intorno di 510 nm. Si è deciso pertanto di non eseguire ulteriori analisi su questo parametro, focalizzando l'attenzione sul valore di intensità di emissione di picco.

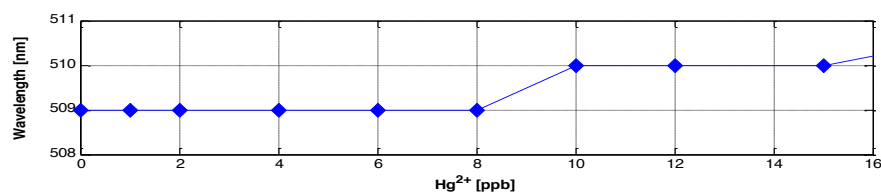


Figura 65: Andamento della lunghezza d'onda del punto di massima emissione in fluorescenza (picco intorno a 510 nm) per soluzioni di BODIPY-amminofenolo $5\mu\text{M}$ ($\lambda_{\text{ex}} = 480\text{ nm}$) in acqua di mare sperimentale/etanolo (9:1) con aggiunta di ioni Hg^{2+} con concentrazioni crescenti nell'intervallo 0 – 15 ppb.

L'intensità di emissione in fluorescenza misurata nel picco intorno a 510 nm è riportata nel grafico mostrato in Figura 13. È possibile riscontrare un andamento complessivo crescente della fluorescenza massima all'aumentare della concentrazione di ioni Hg^{2+} fino ad un valore di 10 ppb.

Dal grafico emerge che a partire dal punto a 10 ppb, non si rispetta l'andamento monotono. Ciò suggerisce che nell'intorno di questa concentrazione possa verificarsi una variazione della stechiometria e/o della conseguente geometria del complesso.

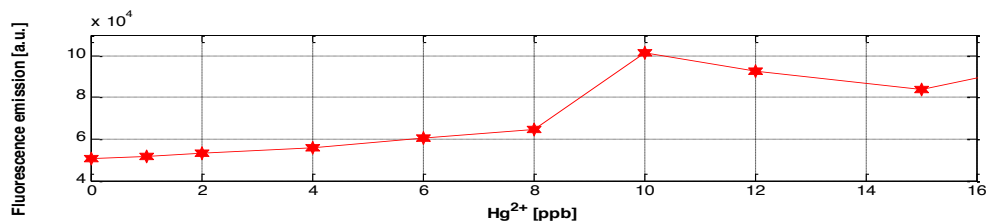


Figura 66: Andamento dell'intensità della massima emissione in fluorescenza (picco intorno a 510 nm) per soluzioni di BODIPY-amminofenolo 5 μ M (λ_{ex} = 480 nm) in acqua di mare sperimentale/etanolo (9:1) con aggiunta di ioni Hg²⁺ con concentrazioni crescenti nell'intervallo 0 – 15 ppb.

Sulla base di quanto mostrato in precedenza, si è deciso di costruire una curva di calibrazione con fitting lineare nell'intervallo 0–8 ppb, scartando così le concentrazioni al di sopra di questo intervallo che non rispettano un andamento lineare. In Figura 66 è stato riportato uno zoom degli spettri di emissione in fluorescenza nell'intervallo Hg²⁺ 0-8 ppb con relative deviazioni standard nell'intervallo preso in esame per l'elaborazione del fitting.

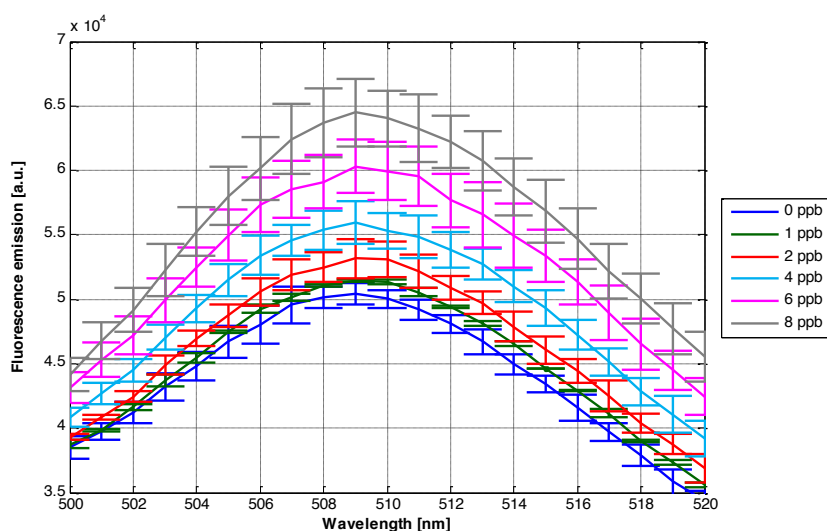


Figura 67: Zoom della porzione di spettro di fluorescenza intorno al punto di massimo con le relative barre di errore per soluzioni di BODIPY-amminofenolo 5 μ M (λ_{ex} = 480 nm) in acqua di mare sperimentale/etanolo (9:1) con aggiunta di ioni Hg²⁺ con concentrazioni crescenti nell'intervallo 0 – 8ppb.

Prendendo in considerazione il grafico mostrato in Figura 19, è possibile constatare la bontà del fitting lineare, i cui parametri sono riportati nella Tabella 2 mostrata qui di seguito. In particolare, si può apprezzare un buon valore del parametro R², superiore al 98%.

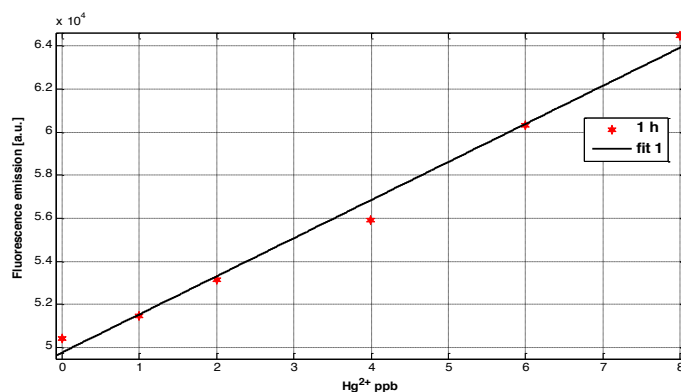


Figura 68: Curva di calibrazione e fitting lineare dell'emissione in fluorescenza nel punto di massimo (picco intorno a 510 nm) per soluzioni di BODIPY-amminofenolo 5 μM ($\lambda_{\text{ex}} = 480 \text{ nm}$) in acqua di mare sperimentale /etanolo (9:1) con aggiunta di ioni Hg^{2+} con concentrazioni crescenti nell'intervallo 0 – 8 ppb.

Linear model Poly1:
$f(x) = p1 * x + p2$
Coefficients (with 95% confidence bounds):
p1 = 1769 (1514, 2024)
p2 = 4.997e+004 (4.863e+004, 5.092e+004)
Goodness of fit:
SSE: 1.60e+006
R-square: 0.9893
Adjusted R-square: 0.9866

Tabella 8: Parametri di fitting della curva di calibrazione dell'assorbanza nel punto di massimo locale (picco intorno a 510 nm) per soluzioni di BODIPY-amminofenolo 5 μM ($\lambda_{\text{ex}} = 480 \text{ nm}$) in acqua di mare sperimentale/etanolo (9:1) con aggiunta di ioni Hg^{2+} con concentrazioni crescenti nell'intervallo 0 – 8 ppb.

Conclusioni

- Lo studio delle prove effettuate conferma che il BODIPY-amminofenolo è sensibile a concentrazioni di Hg^{2+} nel range di ppb.
- Lo spettro di fluorescenza del BODIPY-amminofenolo presenta un unico picco localizzato intorno a 510 nm. Analizzando il punto di massima fluorescenza al variare della concentrazione di Hg^{2+} , si è trovato una correlazione lineare nell'intervallo 0 – 8 ppb anche in acqua di mare sperimentale.
- Il BODIPY-amminofenolo rappresenta un potenziale ligando per ulteriori studi di selettività e specificità in saggi di riconoscimento di ioni mercurio (ppb) in matrici acquose complesse.