



LAURA POLITO
CNR - ISTITUTO DI SCIENZE E TECNOLOGIE MOLECOLARI (ISTM)
MILANO
LAURA.POLITO@ISTM.CNR.IT

LA NANOPARTICELLA D'ORO, UN NOBILE ALLEATO PER LO SVILUPPO DELLA NANOMEDICINA

Negli ultimi anni abbiamo assistito a numerosi progressi nell'ambito delle nanotecnologie, grazie ai notevoli sviluppi dei metodi di sintesi, della manipolazione e della ingegnerizzazione dei nanosistemi. Le nanoparticelle di oro hanno giocato un ruolo cruciale in questi avanzamenti, in virtù delle singolari proprietà ottiche, elettroniche e chimico-fisiche. Sfruttando tali caratteristiche, le nanoparticelle di oro sono state ampiamente utilizzate in molti campi della nanomedicina, diventando a pieno titolo i candidati più innovativi come futuri agenti terapeutici e diagnostici.

L'oro, sin dalla sua scoperta avvenuta 5000 anni fa, ha affascinato le popolazioni per le proprietà terapeutiche e decorative, la stabilità nel tempo e l'estrema malleabilità. Già nei secoli passati gli orefici avevano imparato a modellare il metallo in forme diverse e la coppa di Licurgo, risalente all'epoca romana e ben conservata al British Museum di Londra (Fig. 1), è senza dubbio il reperto che meglio testimonia come le proprietà dell'oro nanometrico fossero già ben note e sfruttate [1]. Ridotto in strutture di dimensioni inferiori ai 100 nm, l'oro esplica proprietà nuove, completamente diverse da quelle possedute in condizioni massive. Nonostante un diffuso utilizzo, solo nel 1857 Faraday dimostrò che l'intenso colore rosso rubino di una soluzione di oro colloidale dipendeva proprio dalla presenza di nanoparticelle di oro (AuNP). Successivamente, nel 1908, Mie diede un ulteriore e fondamentale contributo alla comprensione di tali colloidali, dimostrando che il colore rosso derivava dall'interazione delle AuNP con la luce [1, 2]. Quando la luce colpisce una AuNP gli elettroni del metallo risentono del campo elettromagnetico, oscillando collettivamente. Questo fenomeno, chiamato risonanza plasmonica superficiale localizzata (LSPR), può essere osservato in qualsiasi nanomateriale che abbia un'adeguata



Fig. 1 - La coppa di Licurgo, risalente al IV secolo d.C., e conservata al British Museum di Londra

densità di elettroni liberi confinati (come metalli nobili o semiconduttori drogati). La LSPR per le AuNP di circa 5 nm di diametro è centrata intorno ai 520



Fig. 2 - Numero di pubblicazioni per anno (fonte Web of Science), filtrando i risultati utilizzando come parole chiave *gold nanoparticles* e *nanomedicine*

nm, ma è fortemente dipendente dalla dimensione, dalla forma e dal solvente [1, 2]. Scegliendo con attenzione i metodi di sintesi e quindi modulando la forma, è possibile controllare in modo molto fine la lunghezza d'onda della banda, spostandola verso una finestra ottica nel vicino infrarosso (NIR) [3].

Queste peculiari interazioni luce-materia sono alla base delle numerose applicazioni delle AuNP in campo biomedico, ma non sono gli unici motivi che giustificano il grande interesse suscitato da queste NP e la numerosa produzione di articoli scientifici basati sulla loro produzione ed impiego in ambito medico (Fig. 2).

L'oro, infatti, è caratterizzato da un'estrema inerzia chimica che lo rende un eccellente candidato per la messa a punto di dispositivi (anche miniaturizzati) per applicazioni *in vivo*. Nonostante questa straordinaria stabilità, l'oro è in grado di formare legami Au-S molto forti (circa 184 kJ/mol) con composti contenenti tioli (-SH) o disolfuri (S-S). Questo tipo di legami permette di ottenere AuNP "intelligenti", tramite l'ingegnerizzazione della loro superficie e la formazione di monostrati ordinati di molecole sulla superficie metallica. Le AuNP, manipolate in modo adeguato, possono essere impiegate in numerose applicazioni mediche che vanno dalla dia-

gnostica, alla sensoristica, alla terapia e al rilascio controllato e mirato di farmaci (Fig. 3) [2, 4, 5]. In questo contributo faremo una rassegna delle tecniche più utilizzate per la sintesi di AuNP, dei metodi di funzionalizzazione e dei possibili impieghi di questi materiali in ambito nanomedico.

Sintesi delle AuNP

Due sono le strade per operare a livello nanometrico. La prima, descritta come "top down", prevede la riduzione delle dimensioni delle strutture verso livelli nanometrici con metodi fisici. La seconda, conosciuta come "bottom up", è un approccio tipicamente impiegato in ambito chimico nel quale precursori metallici e piccole molecole vengono impiegate come unità costitutive di architetture molecolari più complesse. In letteratura sono riportati numerosi protocolli che descrivono la sintesi di AuNP con dimensione e forma controllata [2, 3]. Il metodo sintetico più diffuso si basa sulla riduzione chimica dell'acido tetracloroaurico (HAuCl_4), tramite diversi agenti riducenti, come citrato di sodio (Na_3Ct), acido ascorbico o sodio boro idruro (NaBH_4). Il primo protocollo, messo a punto nel 1951 da Turkevich e modificato da Frens negli anni Settanta, consiste in una riduzione di Au^{3+} con Na_3Ct in soluzione acquosa a $100\text{ }^\circ\text{C}$ [6, 7]. Con questo sistema è possibile sintetizzare AuNP con diametro medio che varia dai 10 ai 150 nm, modulando la concentrazione del riducente e il rapporto tra Na_3Ct e HAuCl_4 . Negli anni Novanta è stato sviluppato il metodo Brust-Shiffrin [8], attualmente uno dei più utilizzati per la sintesi di AuNP di dimensioni comprese tra i 2 e gli 8 nm. Questa procedura preve-

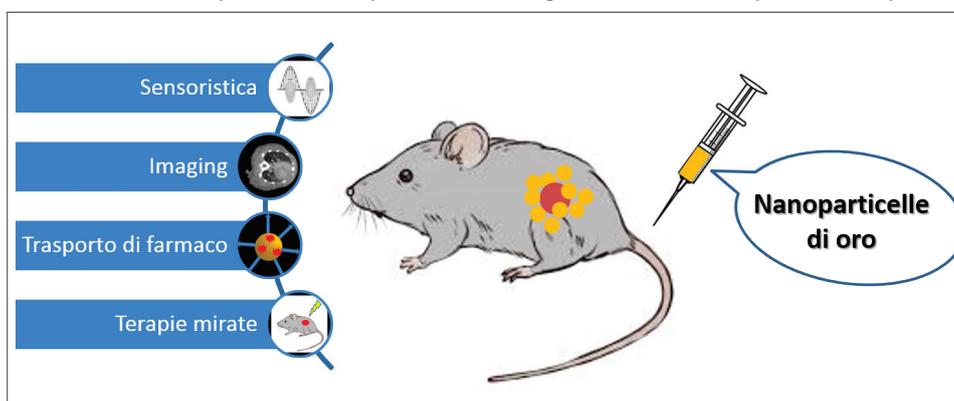
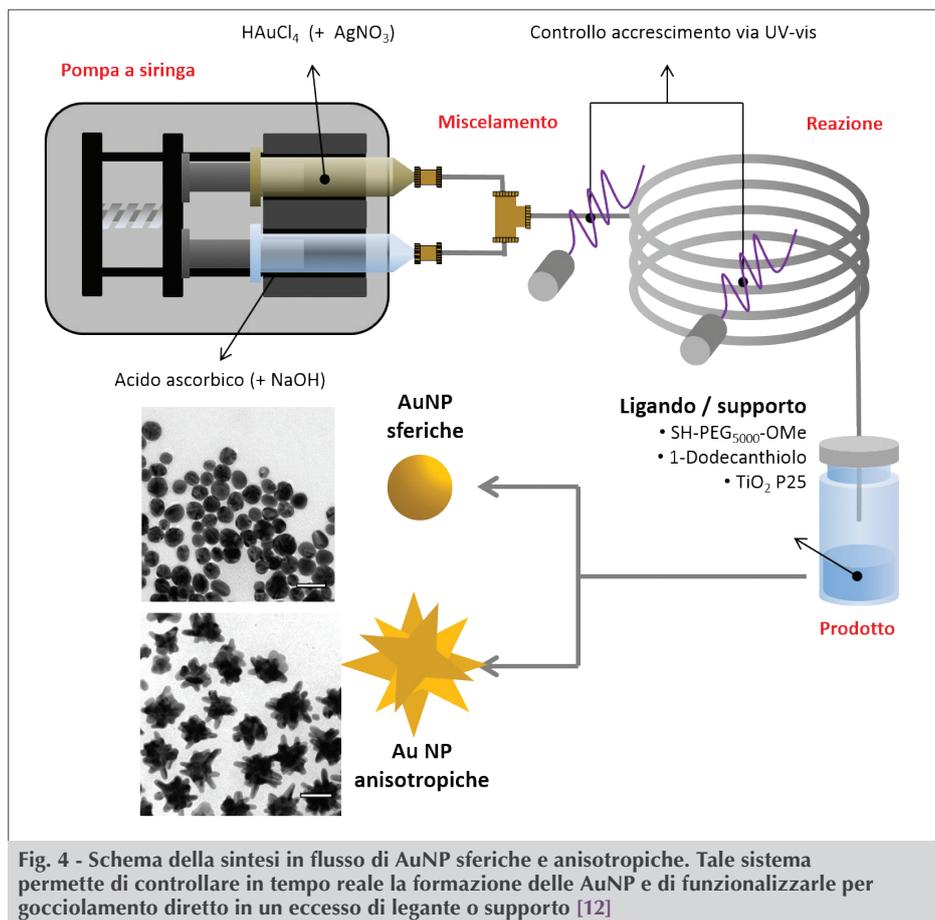


Fig. 3 - Rappresentazione schematica delle principali applicazioni delle AuNP in nanomedicina



de l'impiego di NaBH₄ come riducente e la presenza di alcantioli che, formando un forte legame con la superficie d'oro, passivano la NP controllandone la dimensione. Anche se molto popolari, questi protocolli soffrono per una scarsa riproducibilità tra i diversi lotti ed una difficoltà nello scale-up della produzione. Per superare questi problemi la chimica in flusso si è dimostrata una tecnologia particolarmente affidabile in quanto permette un maggiore controllo su tutti i parametri di reazione oltre che una produzione in continuo [9-11]. Mediante questo approccio è possibile, infatti, controllare con precisione la velocità di miscelamento, la concentrazione locale dei reagenti ed il tempo di reazione, modulando in modo fine la morfologia finale. Recentemente è stato messo a punto un sistema microfluidico (Fig. 4) che permette la sintesi controllata di AuNP sia sferiche (20 nm) che con forme anisotrope, senza l'utilizzo di agenti templanti, spesso incompatibili con applicazioni biomediche [12]. Grazie alla LSPR, l'ac-

crescimento e la qualità delle NP è facilmente monitorabile mediante spettroscopia UV, in continuo. Inoltre, la versatilità del sistema permette una funzionalizzazione diretta per ottenere AuNP idrofiliche, idrofobiche o disperse su supporti insolubili.

Funzionalizzazione delle AuNP

Dopo la sintesi, solitamente, le AuNP presentano sulla loro superficie molecole stabilizzanti (leganti) o templanti che, spesso, non hanno i requisiti necessari per l'impiego in applicazioni biomediche. Di conseguenza sono necessarie delle modifiche che diano origine a soluzioni colloidali termodinamicamente più stabili e che assicurino un'elevata idrofilicità [2-4]. Tale stabilizzazione può prevedere l'impiego di polimeri od oligomeri in grado di

stabilizzare le NP per via sterica, fra i quali i più comuni sono il polivinilpirrolidone, il chitosano e il destrano. In alternativa, sfruttando il legame Au-S, è possibile ricoprire la superficie metallica con molecole solubili in ambiente acquoso contenenti gruppi funzionali tiolici che sostituiscono il legante originario (*ligand exchange*). In numerosi esempi riportati in letteratura, la superficie delle AuNP è funzionalizzata con polietilenglicol tiolato (PEG-SH), che limita l'adsorbimento non specifico di proteine sulla superficie della nanostruttura e l'internalizzazione delle AuNP da parte del sistema reticoloendoteliale, permettendo una presenza prolungata nel sistema circolatorio [13]. Fondamentale per la loro applicazione è la possibilità di rendere le AuNP "intelligenti", funzionalizzandole con molecole attive (come anticorpi o peptidi) in grado di legare recettori specifici, come quelli espressi sulla superficie di cellule tumorali e di promuovere l'accumulo delle NP selettivamente nel sito desiderato.



AuNP come nanosensori

Il rilevamento e l'identificazione di agenti chimici e biologici gioca un ruolo fondamentale in molti campi, dal biomedico all'ambientale. Tipicamente i sensori sono strutturati in due componenti: un elemento di riconoscimento che instaura un legame selettivo o specifico con l'analita d'interesse e un componente trasduttore che segnala l'avvenuta formazione del legame. Le AuNP possiedono caratteristiche tali da essere degli ottimi candidati per la fabbricazione di sensori innovativi [14]. L'interazione tra l'elemento di riconoscimento e l'analita, infatti, può provocare una variazione delle proprietà chimico-fisiche della AuNP trasduttrice, come ad esempio la fotoluminescenza, la LSPR e l'amplificazione superficiale della spettroscopia Raman (SERS). Recentemente sono stati

sviluppati diversi tipi di sensori basati su piccoli aggregati (cluster) fluorescenti di oro, particolarmente fotostabili, per la determinazione di proteine, ioni metallici, glucosio e altre piccole molecole. La LSPR delle AuNP è molto utilizzata nello sviluppo di nanosensori poiché può variare a seguito di modifiche di alcuni parametri, come lo stato di aggregazione o l'indice di rifrazione locale. Per esempio, una sospensione di AuNP risulterà rossa quando la distanza tra le NP è sostanzialmente più grande del loro diametro medio. Quando tale distanza diminuisce (aggregazione) in seguito al riconoscimento di un analita, il colore della soluzione colloidale cambierà da rosso a blu. Questo fenomeno è stato sfruttato per progettare e fabbricare sensori per la determinazione colorimetrica di diversi tipi di analiti, quali DNA, ioni metallici, piccole molecole e proteine. Particolarmente interessanti ed estremamente sensibili sono i sistemi basati su SERS. Il fenomeno fisico che sta alla base della spettroscopia Raman è lo scattering anelastico di fotoni derivanti da molecole che posseggono livelli vibrazionali quantizzati.

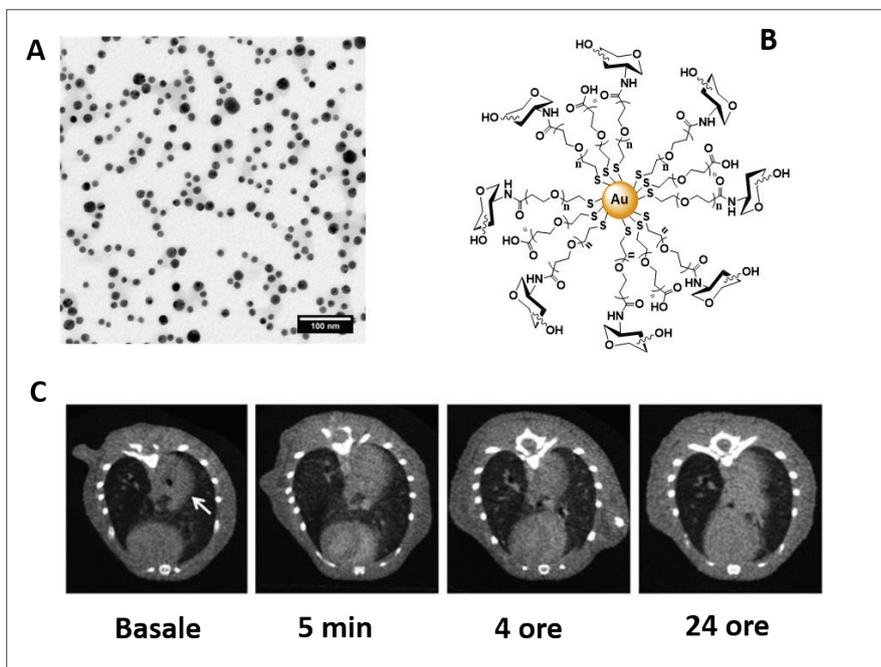


Fig. 5 - A) TEM delle AuNP sferiche sintetizzate per agire come agenti di contrasto selettivo in un modello murino recante polmonite chimica; B) schema della AuNP funzionalizzata con glucosamina-PEG-SH utilizzata come agente di contrasto; C) immagine TAC della sezione dei polmoni del modello murino trattato con AUNP. Nella fotografia basale la freccia bianca indica il danno polmonare. Con il passare delle ore le AUNP si accumulano nel danno come si evidenzia dall'immagine registrata dopo 24 ore dall'infusione dell'agente di contrasto [17]

Tuttavia, l'efficienza di scattering è bassa e comporta un segnale debole che può essere amplificato dal campo magnetico locale indotto dalla LSPR delle AuNP. L'amplificazione del segnale delle impronte digitali di molecole organiche ha reso la SERS una tecnica estremamente interessante per la progettazione di sensori innovativi, principalmente basati su AuNP anisotropiche [15].

AuNP come agenti di contrasto per imaging

La tomografia assiale computerizzata (TAC) è una tecnica di imaging tessutale estesamente impiegata in campo clinico. Essendo il contrasto tra diversi tipi di tessuti molli molto basso, per poter avere diagnosi affidabili e precoci è necessario utilizzare un agente di contrasto esogeno. I mezzi più efficaci devono contenere atomi con un elevato numero atomico ed elevata densità e quelli più comunemente usati contengono iodio e bario. Le AuNP rappresentano un agente di contrasto ideale, in quanto l'oro possiede proprietà ottimali di attenuazione dei raggi X avendo sia un'elevata densità sia un elevato

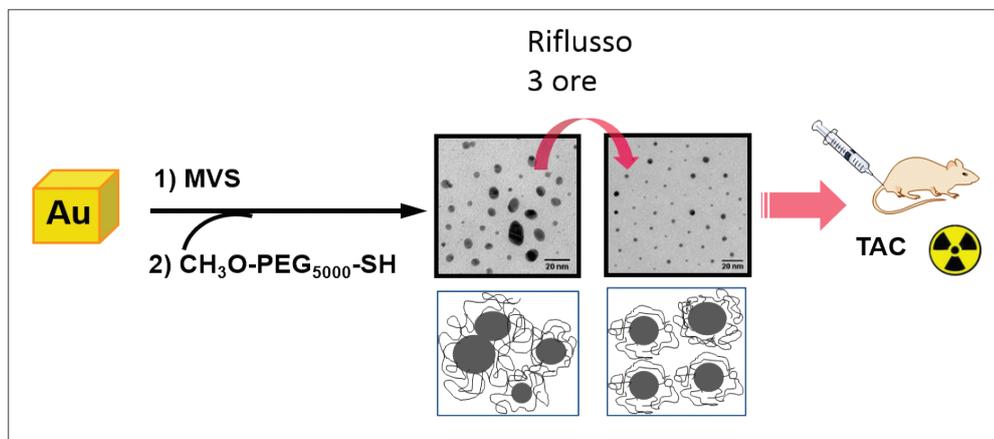


Fig. 6 - AuNP sintetizzate via MVS ricoperte da PEG-SH. L'iniziale campione disomogeneo viene convertito in uno monodisperso dopo 3 ore di riflusso in presenza del legante. Le AuNP sono state utilizzate come agenti di contrasto facilmente eliminabili attraverso il glomerulo renale [19]

numero atomico [16]. Recentemente, è stata messa a punto la sintesi di AuNP di 20 nm ricoperte di PEG-SH estremamente stabili, ben tollerate *in vivo* e caratterizzate da una prolungata permanenza nel sistema circolatorio [17]. Avendo dimostrato una particolare efficacia come agente di contrasto in modello murino (cavia), tali AuNP sono state ulteriormente funzionalizzate con residui di glucosamina in modo da renderle selettive verso uno specifico danno infiammatorio (polmonite indotta chimicamente). Utilizzando il canale recettoriale GLUT1, sovra-espresso nei tessuti infiammati e tumorali, è stato osservato un accumulo preferenziale delle AuNP nel polmone danneggiato, permettendo di combinare efficacemente informazioni morfologiche e metaboliche con il solo impiego della TAC (Fig. 5). Un buon agente di contrasto, tuttavia, deve poter essere eliminato velocemente, limitandone l'accumulo nel fegato. Tale risultato è stato ottenuto sintetizzando AuNP di dimensioni ridotte (3-4 nm) utilizzando la tecnica del *metal vapour synthesis* (MVS) [18, 19]. Le AuNP così ottenute e funzionalizzate con PEG-SH sono caratterizzate da un diametro idrodinamico (incluso il legante) inferiore agli 8 nm: ciò consente una buona permanenza nel sistema circolatorio e la loro eliminazione attraverso il glomerulo renale (Fig. 6).

Grazie alle eccellenti proprietà ottiche e alla possibilità di regolare i picchi di eccitazione ed emissione dalla regione UV a quella del NIR, le AuNP risultano essere ottime sonde per imaging ottico. Inoltre, un

sistema innovativo che sta riscontrando molto interesse è la registrazione delle immagini utilizzando la SERS. In questo senso sono state sviluppate sonde Raman-attive basate su AuNP, ed è stato dimostrato che le immagini possono essere acquisite a grande velocità, permettendo un tracciato in tempo reale del destino delle AuNP in cellule vive [20].

AuNP come trasportatori di farmaci

Le AuNP rappresentano un'ottima piattaforma per il trasporto, la veicolazione ed il rilascio di farmaci. Il metodo più diretto per la produzione di questi sistemi è quello di incorporare sinteticamente nel farmaco un gruppo -SH o NH₂, per permettere la formazione di un legame stabile con la superficie metallica. In alternativa, sono stati proposti sistemi di adsorbimento superficiali che sfruttano interazioni elettrostatiche, forze di van der Waals e legame a idrogeno [3, 4].

AuNP nelle terapie anticancro

Le AuNP possono essere usate direttamente come agenti terapeutici e a questo fine, possiamo citare tre maggiori categorie di impiego [3-5]. La *terapia fototermica* (PTT) mediata dalle AuNP si basa sull'ipertermia per eliminare le cellule tumorali attraverso la denaturazione delle proteine. Il riscaldamento può essere indotto da laser, microonde o ultrasuoni e porta alla morte delle cellule quando queste sono soggette ad una temperatura di 41- 47 °C per almeno 10 minuti. L'impiego delle AuNP in questa terapia è particolarmente vantaggioso perché sfrutta la capacità delle NP di accumularsi in modo preferenziale per via attiva o passiva nel sito tumorale. La *terapia fotodinamica* (PDT), è in grado di danneggiare o uccidere le cellule bersaglio attraverso l'impiego dell'ossigeno singoletto, ¹O₂, generato fotochimicamente. In seguito all'irraggiamento a specifiche lunghezze d'onda, un agente fotosensibilizzante è in grado di convertire



l'ossigeno endogeno in $^1\text{O}_2$ che induce apoptosi e necrosi cellulare. In modo analogo alla PTT, la PDT può promuovere un trattamento localizzato con danni limitati ai tessuti limitrofi, offrendo migliore selettività e minori effetti negativi rispetto alla chemioterapia convenzionale. Uno dei maggiori problemi legati a questa terapia è la limitata idrofilia dei fotosensibilizzanti utilizzati e, in questo senso, le AuNP sono eccellenti candidati come veicolanti di tali molecole. La *radio-terapia* è basata sull'impiego di una radiazione ad alta energia in grado di danneggiare o uccidere cellule tumorali, impedendo o limitando la crescita del tumore. Le radiazioni che normalmente sono utilizzabili a questo scopo includono i raggi X che causano la ionizzazione dell'acqua e la conseguente formazione di radicali liberi reattivi. Anche la radioterapia è un metodo di trattamento localizzato che, purtroppo, manca completamente in selettività e l'impiego delle AuNP gioca un ruolo fondamentale nel rendere la terapia mirata e maggiormente efficace.

In conclusione, le AuNP hanno il grande vantaggio di coniugare nella stessa entità nanometrica proprietà diagnostiche e terapeutiche, rivestendo così un ruolo chiave nello sviluppo della nanomedicina e del trattamento delle malattie a livello molecolare. Tuttavia, perché tali promesse si realizzino, è necessario superare attuali problemi legati alla riproducibilità di questi sistemi e alla loro sicurezza specialmente se utilizzati in maniera invasiva, valutando nel lungo periodo l'eventuale tossicità ed immunogenicità [21, 22].

BIBLIOGRAFIA

- [1] V. Amendola, R. Pilot, M. Frasconi *et al.*, *J. Phys.: Condens. Matter*, 2017, **29**, 203002.
- [2] X. Yang, M. Yang, B. Pang *et al.*, *Chem. Rev.*, 2015, **115**, 10410.
- [3] N. Li, P. Zhao, D. Astruc, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2014, **53**, 1756.
- [4] K. Saha, S. Agasti, C. Kim *et al.*, *Chem. Rev.*, 2012, **112**, 2739.
- [5] E.C. Dreaden, A.M. Alkilany, X. Huang *et al.*, *Chem. Soc. Rev.*, 2012, **41**, 2740.
- [6] J. Turkevich, P.C. Stevenson, *J. Discuss. Faraday Soc.*, 1951, **11**, 55.
- [7] G. Frens, *Nat. Phys. Sci.*, 1973, **241**, 20.
- [8] M. Brust, M. Walker, D. Bethell *et al.*, *Chem. Commun.*, 1994, 801.
- [9] M.K. Bayazit, J.Y. Enhong Cao, A. Gavriilidis, J. Tang, *ACS Sustainable Chem. Eng.*, 2016, **4**, 6435.
- [10] T. Rahman, E.V. Rebrov, *Processes*, 2014, **2**, 466.
- [11] S.E. Lohse, J.R. Eller, S.T. Sivapalan *et al.*, *ACS Nano*, 2013, **7**, 4135.
- [12] A. Silvestri, L. Lay, R. Psaro *et al.*, *Chem. Eur. J.*, 2017, **23**, 9732.
- [13] L. Polito, S.E. Moya *et al.*, *Nanoscale*, 2017, **9**, 14730.
- [14] W. Zhou, X. Gao, D. Liu, X. Chen, *Chem. Rev.*, 2015, **115**, 10575.
- [15] J. Reguera, J. Langer, D. Jimenez de Aberasturi, L.M. Liz-Marzan, *Chem. Rev.*, 2017, **46**, 3866.
- [16] N. Lee, S.H. Choi, T. Hyeon, *Adv. Mater.*, 2013, **25**, 2641.
- [17] G. Bellani, L. Polito *et al.*, *Contrast Media Mol. Imaging*, 2016, **11**, 405.
- [18] C. Evangelisti *et al.*, in "Gold catalysts: preparations, characterization and catalytic applications", Taylor&Francis, 2016.
- [19] L. Polito, C. Evangelisti *et al.*, *J. Colloid Interface Sci.*, 2015, **439**, 28.
- [20] V.W.K. Ng, R. Berti, F. Lesage, A. Kakkar, *J. Mater. Chem. B*, 2013, **1**, 9.
- [21] <https://www.nanopartikel.info/en/nanoinfo/materials/gold>
- [22] <https://www.etp-nanomedicine.eu/public>

Gold Nanoparticle, a Noble Support for Nanomedicine Development

In the last years we have registered many breakthroughs in nanotechnology field, thanks to the outstanding improvement done in the synthesis, manipulation and surface engineering of nanoparticles. Gold nanoparticles play a central role in this progress, due to their unique optical, electronic and physicochemical properties. By exploiting these features, gold nanoparticles have been widely employed in many applications in the nanomedical field, becoming innovative candidates as theranostic agents.