



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE
DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E
DELL'AMBIENTE

Corso di Laurea Magistrale in Biologia Molecolare e Applicata

*Nuovi gel sopramolecolari basati su acido folico: proprietà
strutturali e meccaniche*

*New supramolecular gels based on folic acid: mechanical and
structural properties*

Tesi di Laurea Magistrale di:

Lorenzo Mainetti

Relatore
Chiar.mo Prof.

Paolo Mariani

Correlatore

Alessia Pepe

Sessione autunnale

Anno Accademico 2023-2024

INDICE

Scopo della tesi	6
1. INTRODUZIONE	10
1.1. Gel	10
1.2. Acido folico: struttura chimica e ruolo del pH	14
1.3. Solventi	18
<i>1.3.1. Soluzione salina di ZnSO₄</i>	18
<i>1.3.2. Dimetilsolfossido (DMSO)</i>	19
<i>1.3.3. 1-Etil-3-metilimidazolio metansolfonato</i>	21
2. MATERIALI E METODI	24
2.1. Preparazione campioni	24
<i>2.1.1. Campioni analizzati</i>	26
2.2. Reologia	27
<i>2.2.1. Schema dell'apparato sperimentale: reometro</i>	27
<i>2.2.2. Amplitude sweep test</i>	28
<i>2.2.3. Frequency sweep test</i>	32
<i>2.2.4. Curve di viscosità</i>	33

2.3. Stampante 3D	33
<i>2.3.1. Schema dell'apparato sperimentale</i>	33
2.4. Microscopia AFM	35
<i>2.4.1. Schema di un microscopio AFM</i>	35
2.5. Sincrotrone Elettra	40
<i>2.5.1. Struttura del sincrotrone</i>	40
<i>2.5.2. SAXS e WAXS</i>	39
2.6. FTIR	44
<i>2.6.1. Principi teorici e schema dell'apparato sperimentale</i>	44
<i>2.6.2. Modi di vibrazione</i>	47
3. RISULTATI E DISCUSSIONE	50
3.1. Nuovi protocolli per la preparazione di gel di acido folico	50
<i>3.1.1. Preparazione di un idrogel di acido folico/$ZnSO_4$ a diversi pH</i>	50
<i>3.1.2. Preparazione di un organogel: acido folico in acqua: DMSO</i>	54
<i>3.1.3. Preparazione di uno ionogel: acido folico in acqua: liquido ionico</i>	55
3.2. Misure di reologia	57
3.3. Esperimenti SAXS e WAXS	61

3.4. Analisi FTIR	64
3.5. Caratterizzazione morfologica tramite AFM	68
3.6. Test di iniettabilità	73
4. CONCLUSIONI	75
BIBLIOGRAFIA	79
RINGRAZIAMENTI	82

Scopo della tesi

Lo scopo della presente tesi sperimentale è la preparazione e la caratterizzazione di nuovi gel a base di acido folico, che abbiamo indicato come FA-gel. È noto infatti che l'acido folico è in grado di formare in acqua strutture sopramolecolari simili a quelle osservate per autoassemblaggio di derivati della guanosina. In certi solventi ed in particolari condizioni di pH e/o forza ionica è anche stata osservata la formazione di fasi gel. Dunque, il primo obiettivo della tesi è stato quello di ottenere e ottimizzare dei protocolli per la preparazione di gel stabili e omogenei. Come risultato, gel di acido folico, stabili e trasparenti, sono stati preparati utilizzando diversi solventi, tra cui una soluzione salina a base di $ZnSO_4$, una miscela di acqua e dimetilsolfossido (DMSO) e una soluzione di acqua con un liquido ionico, ovvero uno dei cosiddetti solventi "green". Si noti che i gel preparati con questi solventi appartengono a sistemi differenti chiamati rispettivamente idrogel, organogel e ionogel. Il secondo obiettivo della tesi è relativo alla caratterizzazione dei differenti FA-gel ottenuti. Al fine di poter immaginare possibili applicazioni biotecnologiche, l'approccio che si è pensato di utilizzare è quello multi-tecnica, che ci permettesse di avere un quadro completo sia sulle proprietà strutturali (presenza di quartetti di acido folico stabili, formazione di quadruplessi per impilamento di quartetti, presenza di una rete 3D, ecc) che sulle proprietà visco-meccaniche

dei gel sintetizzati. Il terzo obiettivo è relativo alle possibili applicazioni dei gel prodotti. Idrogel e ionogel potrebbero essere interessanti nell'ambito degli scaffold per l'ingegneria tissutale, in particolare per la produzione di culture cellulari 3D e di organoidi. Data la loro ovvia biocompatibilità, i gel da acido folico potrebbe essere idonei a sostenere e a guidare la rigenerazione funzionale dei tessuti. D'altra parte, gli organogel e di nuovo gli ionogel potrebbero avere un ruolo per lo sviluppo di nuovi biomateriali nanostrutturati di interesse, ad esempio, per nanofiltrazione e il risanamento delle acque.

Come detto, la scelta dell'acido folico quale principale costituente di questi gel è da ricercare nella stretta somiglianza che questa molecola mostra con alcuni derivati della base azotata guanina, che sono in grado di formare idrogel con un elevato contenuto di acqua. I derivati della guanosina, infatti, rappresentano alcune tra le principali molecole oggetto di studio del Laboratorio di Biofisica Molecolare del DiSVA, presso il quale è stato svolto il lavoro di tesi. All'interno della comunità scientifica sono già note le proprietà della guanosina come molecola in grado di formare aggregati tramite un meccanismo di auto-assemblaggio e alcuni derivati sono già stati utilizzati per la preparazione di idrogel con caratteristiche differenti. In diverse pubblicazioni (*F. Ciuchi et al. 1994*, *G. Gottarelli et al. 1996*, *F. Federiconi et al. 2011*) sono state evidenziate similitudini della stessa con la molecola di acido folico. Queste molecole,

infatti, possiedono una struttura chimica caratterizzata da una disposizione simile di gruppi accettori e donatori di legame idrogeno, ed in soluzioni isotropiche si assemblano formando strutture tetrameriche caratterizzate da una geometria di *Hoogsteen*, in grado di impilarsi tra loro dando origine a lunghe strutture cilindriche dette quadruplessi.

Nel corso dello svolgimento di questa tesi mi sono quindi focalizzato sul mettere a punto dei nuovi protocolli per la formazione di gel di acido folico preparati con i diversi solventi sopra menzionati e sulla caratterizzazione delle loro proprietà utilizzando tecniche sperimentali diverse. In particolare, esperimenti di scattering a basso angolo (svolti presso il sincrotrone Elettra di Trieste) sono stati combinati con misure di reologia per valutare rispettivamente la presenza dei quadruplessi di acido folico all'interno dei gel e la viscosità dei campioni. Inoltre, misure di spettroscopia infrarossa hanno permesso di ricavare una caratterizzazione vibrazionale a livello molecolare degli stati aggregati. Sono state inoltre ottenute informazioni sulla morfologia della rete 3D tramite microscopia a forza atomica. Questo approccio multi-tecnica ci ha permesso quindi di ottenere un quadro completo delle proprietà strutturali e fisico-chimiche dei gel preparati. Come studio preliminare sulle possibili applicazioni, l'idrogel a base di acido folico e ZnSO_4 è stato utilizzato come "bio-inchiostro" in una stampante 3D. Anche se si tratta di test

preliminari, il risultato ci ha permesso di dimostrare l'ottima iniettabilità di questo materiale e la buona stabilità degli scaffold prodotti, aprendo la strada all'utilizzo dei FA-gel nella crescita 3D di colture cellulari.

1.INTRODUZIONE

1.1: Gel

Un gel è un sistema colloidale che si trova in uno stato semi-solido o solido, costituito da una rete tridimensionale di molecole che intrappola una grande quantità di liquido. È un materiale con due fasi distinte: una fase continua (liquida) dispersa in una fase strutturata e reticolata, che è formata da polimeri, proteine, o altre macromolecole. La rete del gel è abbastanza densa da conferire al sistema una consistenza solida, pur mantenendo una grande quantità di solvente. In base al tipo di solvente che si utilizza si suddividono in idrogel, organogel e ionogel.

Gli *idrogel* sono materiali polimerici con una struttura idrofilica caratteristica che consente di immagazzinare grandi quantità di acqua e fluidi biologici nella loro rete tridimensionale. Possiedono interessanti proprietà biomimetiche, come notevole flessibilità, capacità di assorbimento, biodegradabilità e proprietà meccaniche modulabili. Alcuni dei loro vantaggi sono la loro biocompatibilità e la capacità di essere iniettati *in vivo* come liquido che gelifica alla temperatura corporea. Inoltre, garantiscono un buon trasporto di nutrienti e prodotti alle cellule, e il loro ambiente acquoso ha la capacità di trasportare farmaci. Il motivo della grande capacità di assorbimento d'acqua di questi sistemi è l'elevato contenuto di gruppi funzionali idrofili all'interno del

polimero usato come matrice. Tutto questo li rende ottimali per una vasta gamma di applicazioni. Alcuni esempi di applicazioni sono mostrati in Fig. 1.1.

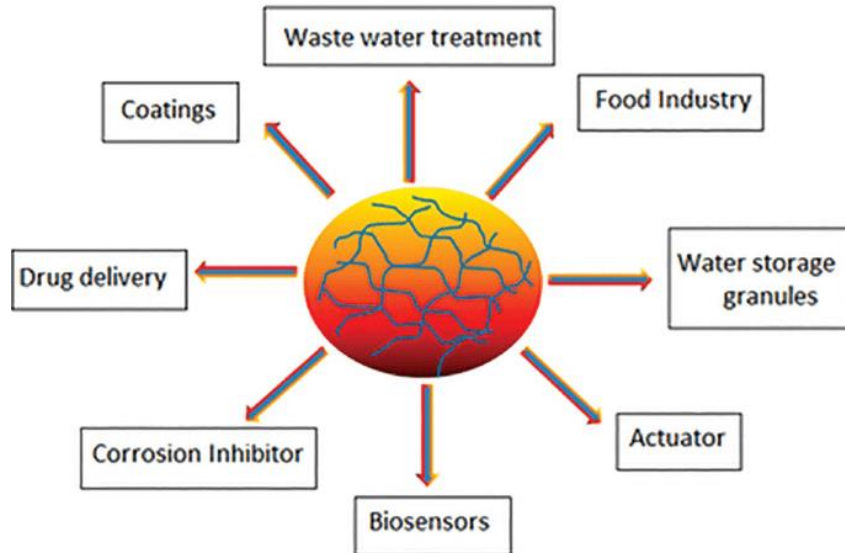


Fig.1.1: Possibili campi di applicazione degli idrogel.

Gli idrogel possono essere classificati in due diverse categorie, a seconda della natura del legame tra le molecole polimeriche che ne costituiscono la struttura: idrogel *fisici* o *chimici*. Negli idrogel fisici le interazioni tra le molecole che lo costituiscono sono deboli e temporanee, come forze idrofobiche e legami idrogeno, che sono reversibili e possono essere alterate da fattori esterni (ad esempio, temperatura e pH) e non producono alcuna modifica nella struttura chimica. Gli idrogel chimici invece sono caratterizzati da interazioni permanenti e forti tra le loro catene polimeriche, che sono connesse tra loro da legami covalenti (P. Sanchez-Cid et al. 2022).

Gli organogel sono gel in cui il solvente intrappolato all'interno della rete tridimensionale è un liquido organico (non acquoso), mentre la fase strutturale è costituita da una rete di molecole organiche auto-assemblanti, come polimeri o lipidi, che formano una struttura capace di intrappolare il solvente. Gli organogel possono presentare proprietà uniche come biocompatibilità, capacità di ritenzione di solventi organici e una struttura flessibile. Sono utilizzati in vari settori, come nella farmaceutica, nella cosmetica e in applicazioni ingegneristiche, grazie alla loro capacità di incapsulare sostanze chimiche lipofile.

Infine, negli ionogel, il solvente intrappolato nella rete tridimensionale è un liquido ionico, anziché un liquido tradizionale come l'acqua o un solvente organico. I liquidi ionici sono sali che esistono in forma liquida a temperatura ambiente e sono costituiti da cationi e anioni. Gli ionogel combinano le proprietà tipiche dei gel con le caratteristiche uniche dei liquidi ionici, come l'elevata conduttività ionica, la bassa volatilità e la stabilità termica, trovando applicazioni in campi come l'elettronica, l'elettrochimica e lo stoccaggio di energia grazie alla loro capacità di combinare stabilità meccanica con una conduttività ionica elevata.

La scelta dell'acido folico per la preparazione di gel ricade sul fatto che presenta analogie strutturali con la base azotata guanina, già molto nota nella

comunità scientifica per la formazione di idrogel (F. Carducci et al. 2018, G. Nava et al. 2019, A. Pepe et al. 2023). In particolare, la parte pterinica della molecola di acido folico è molto simile alla struttura aromatica eterociclica planare della base azotata del DNA (Fig. 1.2); in soluzioni isotropiche, grazie alla particolare disposizione dei gruppi donatori e accettori di legami a idrogeno, dà origine a strutture tetrameriche particolari, caratterizzate da una geometria detta di *Hoogsteen*, che sembrano svolgere importanti ruoli biologici (F. Federiconi et al. 2011).

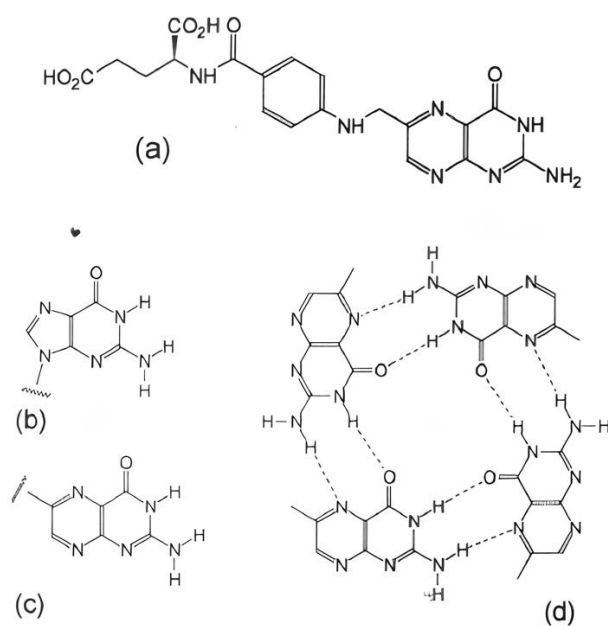


Fig. 1.2: Struttura dell'acido folico (a), similarità tra guanina (b) e pterina (c), formazione di tetradi di pterine tramite legami H di tipo Hoogsteen (d) (F. Ciuchi et al. 1994).

Tali tetrameri sono in grado di impilarsi gli uni sugli altri effettuando interazioni di π - π *stacking*, dando luogo a dei blocchi cilindrici, definiti come

quadruplessi, che sono alla base della formazione della matrice che costituisce i gel (F. Ciuchi et al. 1994, G. Gottarelli et al. 1996).

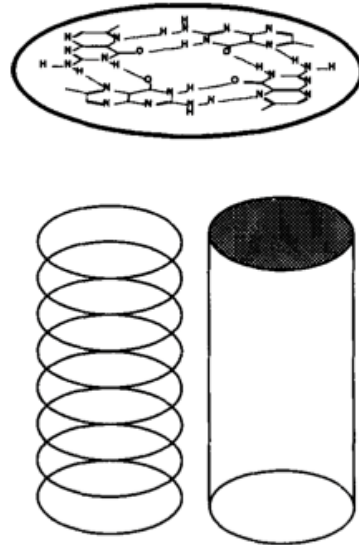


Fig. 1.3: Cilindri formati dall'impilamento delle tetradi
(G. Gottarelli et al. 1996).

L'obiettivo, quindi, è di sfruttare i quadruplessi di acido folico per creare un reticolo in presenza di un opportuno solvente in modo tale da ottenere un gel stabile.

1.2: Acido folico: struttura chimica e ruolo del pH

Il termine "folato" è un termine generico per una famiglia di vitamine del gruppo B che si trova in natura, costituite da un anello aromatico di pteridina legato all'acido para-aminobenzoico e a uno o più residui di glutammato; è indispensabile per la sintesi del DNA, delle proteine e per la formazione

dell'emoglobina; svolge un ruolo particolarmente importante per i tessuti che vanno incontro a processi di proliferazione e differenziazione, come i tessuti embrionali. Si trova naturalmente in una varietà di alimenti, tra cui verdure a foglia verde, frutta, fegato e lievito.

L'acido folico è una forma sintetica e più ossidata del folato (Fig. 1.4), ampiamente utilizzata negli integratori e per l'arricchimento degli alimenti.



Fig. 1.4: Acido folico in polvere.

Diversi studi hanno dimostrato che la supplementazione di acido folico durante la gravidanza può prevenire fino a due terzi dei difetti del tubo neurale e potrebbe anche ridurre il rischio di altre malformazioni congenite come le fessure oro-facciali. Un alto apporto di folato (o alti livelli ematici di folato) è anche in grado di contribuire alla prevenzione di altre situazioni di rischio per la salute: ad esempio, la sua presenza diminuisce i livelli dell'amminoacido omocisteina, associato al rischio di malattie cardiovascolari ed infarti, e sembra

portare a un minore declino cognitivo legato all'età (A. Tyagi; A. Penzkofer 2010, EFSA Meeting Summary Report 2009, H. Pertiwi et al. 2022).

La molecola di acido folico è costituita da tre blocchi: una componente aromatica eterociclica planare chiamata *pterina*, che come accennato precedentemente consente la formazione di tetradi formando legami idrogeno di tipo *Hoogsteen* con altre tre pterine, una componente centrale costituita da *acido p-aminobenzoico* e una coda terminale costituita da *acido glutammico* (Fig. 1.5).

La caratteristica interessante della molecola è che risulta poco solubile in acqua (0.1069 mmol kg⁻¹ a 25 °C, 1 bar e pH = 4.28), ma osservando la struttura è facile notare che possiede dei gruppi funzionali con diverse costanti di dissociazione pK_a, che con opportuni valori di pH si dissociano, permettendo di affermare che la solubilità in acqua è pH-dipendente.

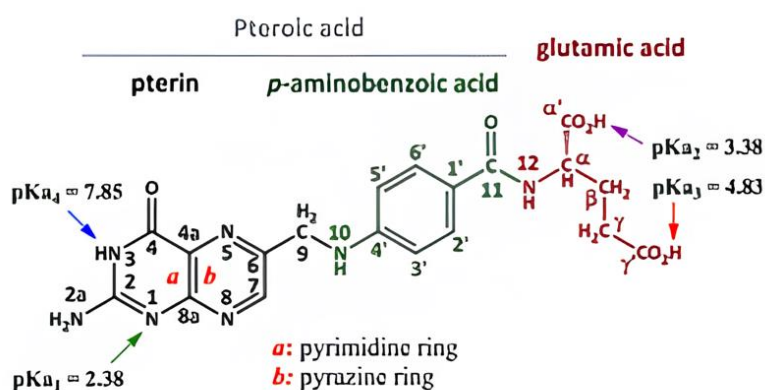


Fig. 1.5: Struttura molecolare dell'acido folico e le sue apparenti costanti di dissociazione (V. R. Magri et al. 2022).

Infatti, si osserva che la solubilità in acqua aumenta significativamente a valori di pH superiori a 5, dove le forme dianionica (HFol^{2-}) e trianionica (Fol^{3-}) diventano le specie predominanti (Fig. 1.6). Pertanto, le specie anioniche del folato, che spesso sono trascurate negli studi, devono essere considerate per i seguenti motivi: a valori di pH fisiologico HFol^{2-} è predominante, la preparazione di molti materiali e composti viene eseguita a pH superiori a 5, le strutture sopramolecolari assemblate dall'acido folico sono sensibili al pH. Inoltre, i sali dianionici dei folati hanno mostrato una maggiore velocità di dissoluzione e una maggiore stabilità termica rispetto all'acido folico neutro (V. R. Magri et al. 2022).

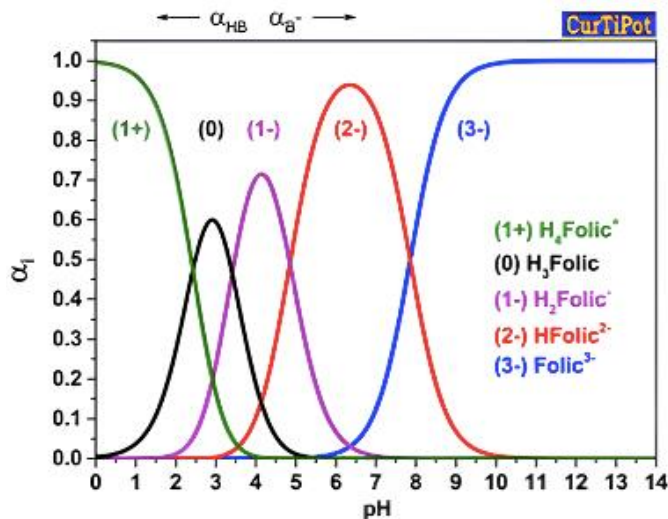


Fig. 1.6: Specie predominanti dell'acido folico in un range di pH da 0 a 14 (V. R. Magri et al. 2022).

1.3: Solventi

1.3.1: Soluzione salina di $ZnSO_4$

Il solfato di zinco è un composto chimico con formula $ZnSO_4$. È un sale inorganico che si presenta tipicamente sotto forma di cristalli bianchi e solubili in acqua (Fig. 1.7). Può esistere in diverse forme idrate, le più comuni sono:

- $ZnSO_4 \cdot H_2O$ (monoidrato)
- $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ (eptaidrato)

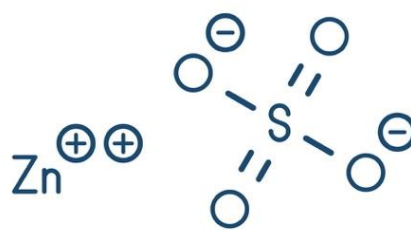


Fig. 1.7: Aspetto e struttura chimica del solfato di zinco.

Viene impiegato in diversi ambiti: in industria è utilizzato come additivo nei fertilizzanti per correggere la carenza di zinco nel suolo; in medicina è usato per preparazioni farmaceutiche, come integratore alimentare e in alcuni colliri. Può essere utilizzato per il trattamento delle acque reflue e come agente di flottazione nella raffinazione dei metalli, inoltre viene aggiunto ai mangimi per garantire l'apporto adeguato di zinco agli animali.

Il solfato di zinco è dunque un composto chimico versatile con molteplici applicazioni, particolarmente significativo in agricoltura e industria, ma

richiede una gestione accurata per evitare problemi di tossicità e impatto ambientale.

Data la bassa solubilità dell'acido folico in acqua, è stato necessario effettuare regolazioni di pH per solubilizzarlo; poi è stato sfruttato il catione bivalente Zn^{2+} sotto forma di $ZnSO_4$ per andare a coordinare le varie code glutammiche dell'acido folico che sono esposte all'esterno dei quadruplessi (Fig. 1.8) in modo tale da ottenere un reticolo termicamente stabile e persino iniettabile (P. Xing et al. 2013, K. Liu et al. 2018).

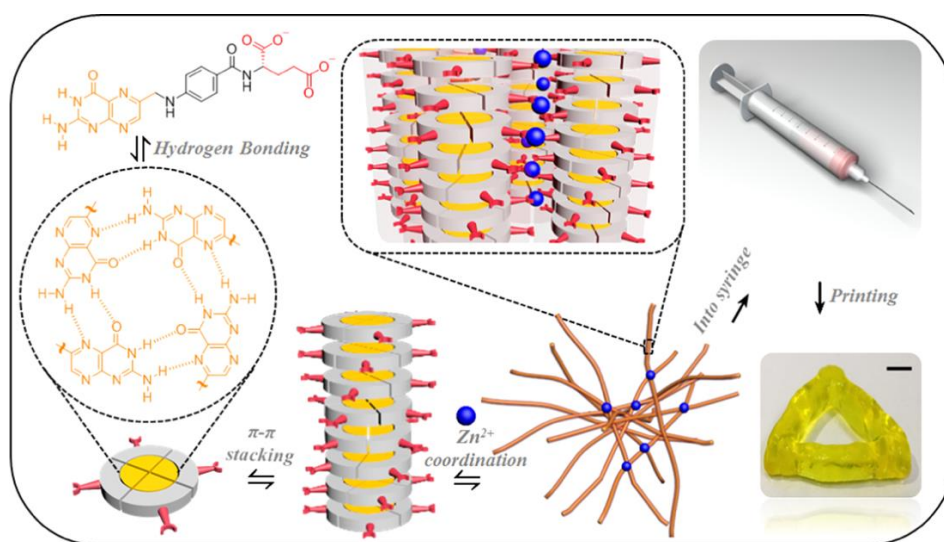


Fig. 1.8: Serie di interazioni che avvengono nella formazione dell'idrogel di acido folico

(K. Liu et al. 2018).

1.3.2: Dimetilsolfossido (DMSO)

Il dimetilsolfossido (DMSO) è un composto organico dello zolfo con la formula $(CH_3)_2SO$ (Fig. 1.9). Questo liquido incolore è un importante solvente polare

aprotico che dissolve i composti sia polari che non polari ed è miscibile in un'ampia varietà di solventi organici e in acqua. In biologia viene utilizzato nella reazione a catena della polimerasi (PCR) per inibire le strutture secondarie nel DNA o nei primer. Viene aggiunto alla miscela PCR prima di reagire, dove interrompe l'autocomplementarità del DNA, riducendo al minimo le reazioni di interferenza; può anche essere usato come crioprotettore, aggiungendolo ai mezzi cellulari per ridurre la formazione di ghiaccio e prevenire la morte cellulare durante il processo di congelamento. È spesso combinato con farmaci antimicotici, che consentono loro di penetrare non solo nella pelle, ma anche nelle unghie dei piedi e delle mani. Se presente in concentrazioni elevate tuttavia risulta essere tossico, può causare irritazioni cutanee e una sensazione di bruciore, reazioni allergiche, danni a fegato e reni, disturbi gastrointestinali, effetti sul sistema nervoso centrale. Inoltre, il DMSO può interagire con altri farmaci, aumentando l'assorbimento di queste sostanze attraverso la pelle. Questo può potenzialmente portare a sovradosaggi o a effetti collaterali indesiderati. In sintesi, il DMSO non è considerato altamente tossico se usato in modo appropriato, ma è importante seguire le linee guida di sicurezza e consultare un medico prima di usarlo, specialmente se si intende utilizzarlo per trattamenti medici ([https://www.laboratoriumdiscounter.nl/it/sostanze-chimiche/a-z/d/dimetilsolfossido-dmso/](https://www.laboratoriumdiscounter.nl/it/sostanze-chimiche/a-z/d/dimetilsolfossido-dms/)). Date le sue caratteristiche di solvente

organico, è possibile utilizzarlo come “buon” solvente (un solvente in cui l’acido folico riesce a solubilizzare facilmente creando una soluzione omogenea) in rapporto 1:1 con l’acqua che invece funge da “cattivo” solvente, permettendo di ottenere un organogel stabile (P. Xing et al. 2014).

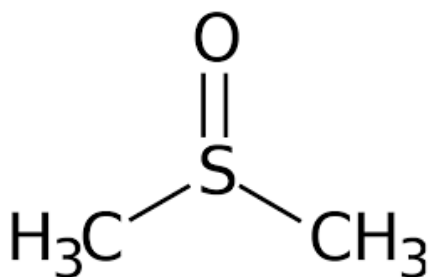


Fig. 1.9: Struttura chimica del DMSO.

1.3.3: 1-Etil-3-metilimidazolio metansolfonato

Un liquido ionico è un sale che esiste in forma liquida a temperature inferiori a 100 °C. A differenza dei sali convenzionali, i liquidi ionici sono costituiti interamente da ioni e mantengono la loro natura liquida a basse temperature. Hanno temperature di fusione relativamente basse rispetto ai sali comuni, a causa della natura asimmetrica e voluminosamente ingombrante degli ioni che compongono il liquido che impedisce loro di organizzarsi in un reticolo cristallino stabile a temperatura ambiente; inoltre sono generalmente stabili a temperature elevate, rendendoli utili per applicazioni che richiedono stabilità termica. A causa della forte interazione ionica, hanno una pressione di vapore

estremamente bassa, il che li rende non volatili, riducendo il rischio di evaporazione e inquinamento atmosferico; mostrano poi una buona conduttività ionica, quindi sono ideali per applicazioni elettrochimiche. I liquidi ionici possono dissolvere una vasta gamma di composti, inclusi polimeri, materiali organici e inorganici, grazie alla loro polarità e capacità di formare legami ionici o a idrogeno. Le loro proprietà fisico-chimiche possono essere modificate cambiando i cationi e gli anioni che li compongono, rendendo possibile la progettazione di liquidi ionici "su misura" per specifiche applicazioni. Questi composti sono considerati "solventi green", dal momento che riducono l'impatto ambientale dei processi chimici, e rappresentano una classe versatile e innovativa di materiali con un ampio spettro di applicazioni industriali e di ricerca. La loro capacità di essere personalizzati per soddisfare specifiche esigenze li rende particolarmente interessanti per la scienza dei materiali, la chimica verde e l'ingegneria chimica (Z. Lei et al. 2017).

Allo scopo di sintetizzare uno ionogel di acido folico, sono stati testati diversi liquidi ionici come possibili solventi, in particolare: l'*1-butil-1-metilpirrolidinio bis(trifluorometilsulfonil)immide*, il *dietilmetilammonio triflato*, l'*N,N,N-trimetil-N-butilammonio bis(trifluorometansulfonil)immide*, l'*1-etil-3-metilimidazolio triflato* e il *dietilmetilammonio metansulfonato*. Questi solventi non hanno portato a buoni risultati, dato che con il loro utilizzo

non è possibile ottenere un gel. Tuttavia, l'*1-Etil-3-metilimidazolio metansolfonato* (Fig. 1.10) si è dimostrato l'unico in grado di solubilizzare completamente l'acido folico. Infatti, esso ha permesso la formazione di un gel stabile, dotato di reversibilità termica entro certi range di temperatura e particolari proprietà viscoelastiche.

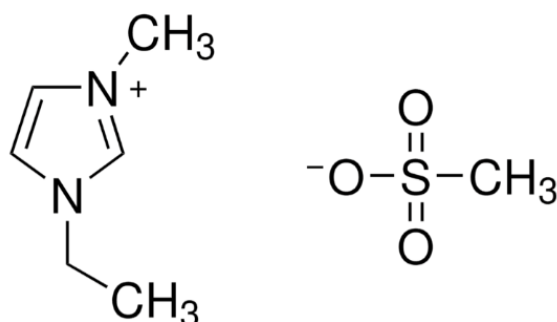


Fig. 1.10: Struttura chimica degli ioni che costituiscono il liquido ionico *1-Etil-3-metilimidazolio metansolfonato*.

2. MATERIALI E METODI

2.1: Preparazione dei campioni

Per la preparazione dell'idrogel FA/ZnSO₄ è stato utilizzato acido folico in polvere della Sigma Aldrich, fatto sciogliere in acqua milli-Q. Considerando la bassa solubilità dell'acido folico in acqua è stato necessario effettuare delle regolazioni di pH per solubilizzarlo completamente tramite l'aggiunta di gocce progressive di una soluzione 1M di NaOH. Per conoscere il valore di pH effettivo al quale si ottiene la solubilizzazione è stato fondamentale il pHmetro, uno strumento utilizzato per misurare il grado di acidità o basicità di una soluzione.



Fig. 2.1: pHmetro da banco.

Infine, è stato utilizzato ZnSO₄ eptaidrato acquistato da Sigma Aldrich.

Durante la preparazione dei campioni inoltre abbiamo notato che, utilizzando acido folico in polvere proveniente da un diverso lotto (Fig. 2.2), il gel prodotto

sembra avere un aspetto diverso da quello utilizzato in precedenza (vedi Fig. 2.3). Questo probabilmente perché anche piccoli cambiamenti nel processo di produzione dell'acido folico possono causare variazioni nel colore del prodotto finale. Differenti lotti di produzione potrebbero quindi avere leggere variazioni nella purezza o nella composizione degli eccipienti.

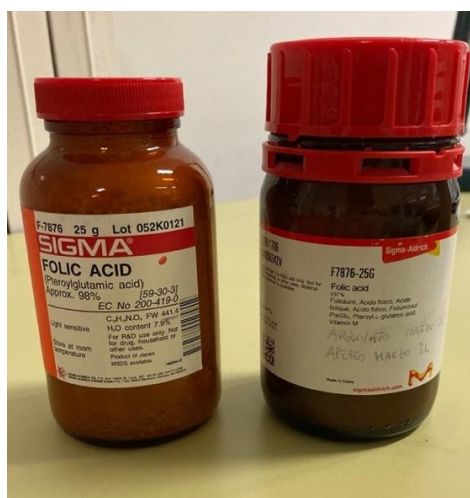


Fig. 2.2: I due lotti di acido folico usati per la preparazione dei gel.

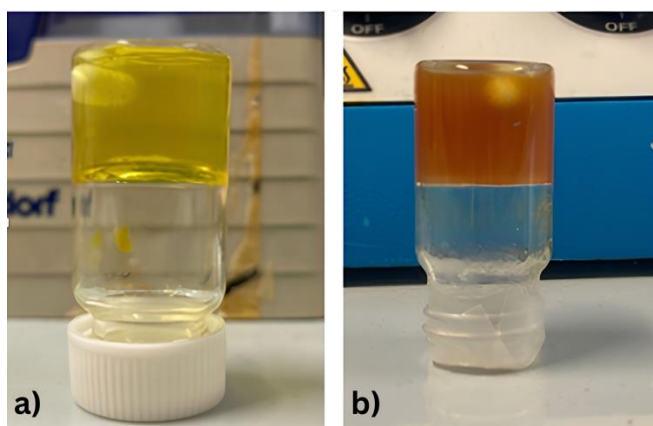


Fig. 2.3: a) gel FA-ZnSO_4 preparato con la prima confezione di acido folico, b) gel FA-ZnSO_4 preparato con la nuova confezione di acido folico.

Per la preparazione dell'organogel, oltre all'acido folico, è stata utilizzata una miscela di acqua milli-Q e DMSO (acquistato da Sigma Aldrich) in rapporto 1:1.

Per la preparazione dello ionogel, come descritto nell'introduzione di questa tesi, sono stati testati diversi liquidi ionici: l'*1-butil-1-metilpirrolidinio bis(trifluorometilsulfonyl)immide*, il *dietilmetilammonio triflato*, l'*N,N,N-trimetil-N-butilammonio bis(trifluorometansulfonyl)immide*, l'*1-etil-3-metilimidazolio triflato* e il *dietilmetilammonio metansulfonato*; ma l'unico che ha portato a un buon risultato è stato l'*1-Etil-3-metilimidazolio metansolfonato*. Quest'ultimo viene miscelato in rapporto 1:1 con acqua milli-Q.

2.1.1: Campioni analizzati

Nelle tabelle seguenti è riportata la lista di campioni analizzati tramite reologia (Tab. 1) e tecniche di diffusione a piccolo e grande angolo dei raggi X (rispettivamente SAXS e WAXS, Tab. 2)

Campione	pH	Temperatura (°C)
<i>Idrogel FA/ZnSO4</i>	8	25
<i>Idrogel FA/ZnSO4</i>	9.5	25
<i>Organogel FA/DMSO</i>		25
<i>Ionogel FA/LI</i>		25
<i>Ionogel FA/LI</i>		da 35 a 90
<i>Ionogel FA/LI esposto a UV</i>		25

Tab. 1: Campioni sottoposti ad analisi reologiche.

Campione	pH
<i>Idrogel FA/ZnSO4</i>	7.5
<i>Idrogel FA/ZnSO4</i>	8.5
<i>Idrogel FA/ZnSO4</i>	9.5
<i>Ionogel FA/LI</i>	

Tab. 1: Campioni sottoposti ad analisi SAXS e WAXS.

2.2: Reologia

2.2.1: Schema dell'apparato sperimentale: reometro

Le misure di reologia sono state condotte utilizzando il reometro Anton Paar MCR702e MultiDriver presente presso il Dipartimento di Scienze della Vita e dell'Ambiente (UNIVPM).

La scelta di utilizzare questa tecnica nasce dal fatto che i gel di acido folico presentano interessanti proprietà dinamiche in relazione ad una forza di deformazione ad essi applicata.

I campioni sono stati misurati disponendoli tra due dischi, chiamati "geometrie", che variano in base alla natura del campione in esame. I gel di acido folico sono caratterizzati da una natura viscoelastica e quindi si è scelto di utilizzare la geometria *plate-plate* (vedi Fig. 2.4) con un diametro del piatto di 50 mm e a una distanza di 1 mm.

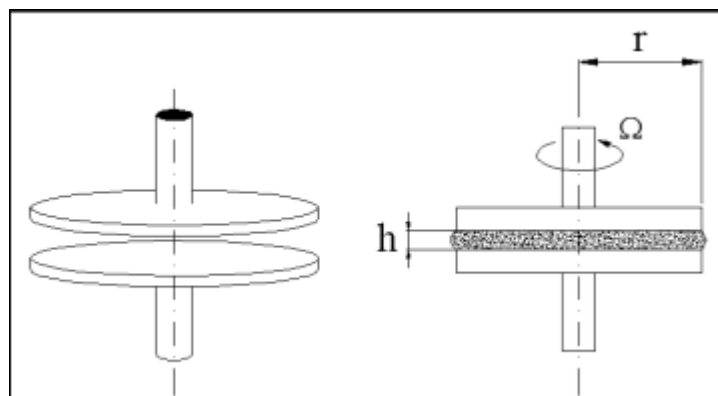


Fig. 2.4: Geometria plate-plate utilizzata per misurare i campioni di gel di acido folico. Il parametro h indica lo spessore del campione che viene analizzato, nel nostro caso è di 1 mm.

Sono stati eseguiti due test di deformazione dinamica, denominati *Amplitude sweep* e *Frequency sweep*, seguiti poi da una misura della curva di viscosità. Ciascuna di queste analisi è stata condotta a temperatura ambiente, fatta eccezione per il campione di ionogel (FA-gel con liquido ionico) per il quale abbiamo osservato variazioni al variare della temperatura. Per questo motivo, data la natura termo-responsiva di questo materiale, sono state condotte misure in funzione della temperatura (da 30 a 90°C).

2.2.2: *Amplitude sweep test*

Le misure in regime oscillatorio (*amplitude sweep*) prevedono che venga mantenuta costante la frequenza di oscillazione, come mostrato in Fig. 2.5.

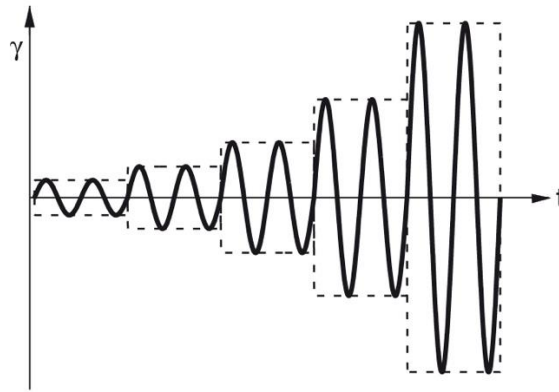


Fig. 2.5: Profilo del test "Amplitude sweep". Viene mostrata la deformazione in funzione del tempo (<https://wiki.anton-paar.com/it-it/>).

Nei casi riportati in questa tesi, la frequenza di oscillazione è stata mantenuta costante a 10 rad/s, mentre lo *shear strain* (γ) considerato era compreso tra 1000 e 0.1 %, dove per *shear strain* si intende la percentuale di deformazione subita dal campione. Come risultato si ricavano il modulo elastico (G') e il modulo viscoso (G'') del campione. In particolare, il modulo elastico G' dà idea dell'energia immagazzinata nel campione durante il processo di deformazione. È quindi relativo alla rigidità del materiale. Al contrario, il modulo viscoso G'' rappresenta l'energia dissipata dal gel in seguito alla deformazione. Nel caso di materiali polimerici, i grafici che descrivono G' e G'' presentano l'andamento mostrato in Fig. 2.6.

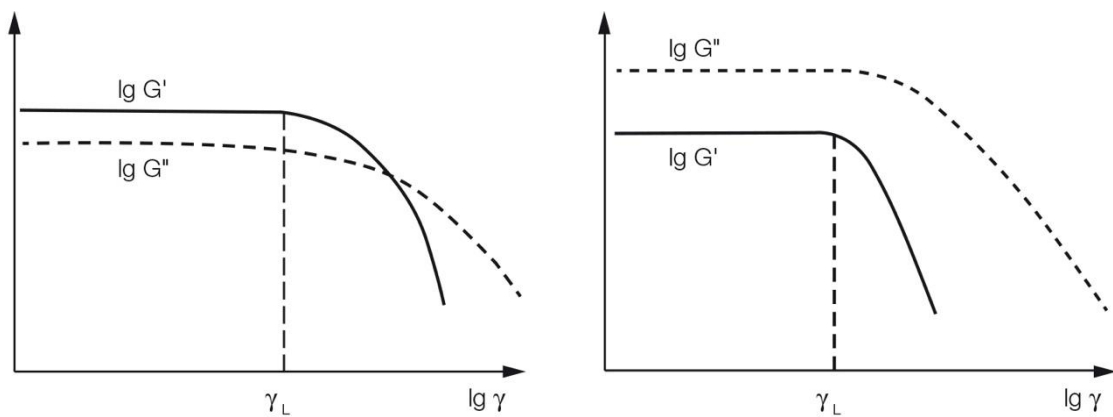


Fig. 2.6: $\log G'$ e $\log G''$ vs $\log \gamma$. Il profilo a sinistra fa riferimento ad un campione di natura solida o gel, mentre il grafico a destra si riferisce a un campione liquido (<https://wiki.anton-paar.com/it-it/>).

Quando $\log G' > \log G''$ (si usa la scala logaritmica perché migliora la leggibilità, la chiarezza e l'interpretabilità dei grafici reologici) si fa riferimento a un campione di natura solida o gel. Al contrario, quando $\log G'' > \log G'$ ci si riferisce a un campione liquido. Inoltre, il profilo del grafico rappresentato a sinistra in Fig. 2.6 evidenzia la Regione Viscoelastica Lineare (LVE): si tratta della regione che va da bassi valori di deformazione (γ) fino al punto γ_L e rappresenta la regione in cui il test può essere fatto senza distruggere il campione. Man mano che aumenta la deformazione applicata, si raggiunge il cross-point, ovvero il punto in cui $\log G' = \log G''$. In queste particolari condizioni il campione si distrugge e non è più in fase gel. A valori ancora più alti di deformazione, $G'' > G'$ e questo indica che il campione è in fase liquida. In seguito alla valutazione della curva $\log G''$ (vedi Fig. 2.7) è possibile ricavare informazioni sulla frammentazione del gel. A differenza della curva

$\log G'$, a valori via via più alti di deformazione, la curva $\log G''$ presenta un picco massimo. Il momento in cui si inizia a formare il massimo indica la formazione iniziale di piccole fratture nel campione. Aumentando ancora di più la deformazione si passa ad una rottura completa del gel, fino a quando esso passa in fase del tutto liquida ($\log G'' > \log G'$).

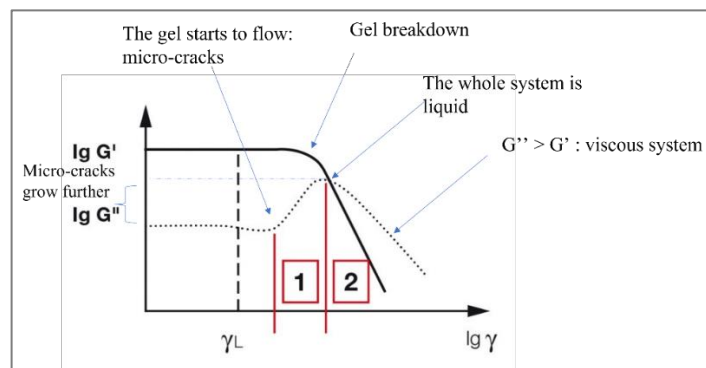


Fig. 2.7: Valutazione della curva $\log G''$ in funzione della deformazione (γ)

(<https://wiki.anton-paar.com/it-it/>).

Il rapporto tra questi i moduli G'' e G' permette di ricavare informazioni

sull'angolo di fase (δ): $\tan(\delta) = \frac{G''}{G'}$

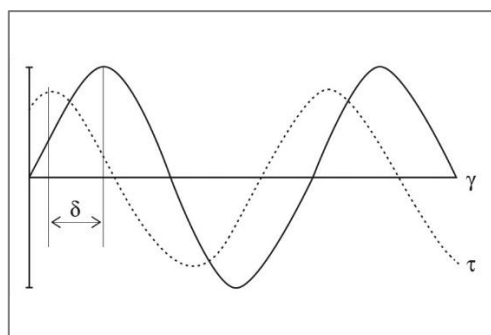


Fig. 2.8: Differente ampiezza di oscillazione tra forza applicata (τ) e deformazione (γ)

(<https://wiki.anton-paar.com/it-it/>).

Come mostrato in Fig. 2.8, misure di reologia permettono di evidenziare le proprietà viscoelastiche dei materiali, paragonando lo sfasamento fra le sinusoidi dello stress applicato sui gel e la deformazione del gel stesso. Il valore dell'angolo δ ci dà informazioni sulla natura del materiale: nel caso dei materiali viscoelastici come i gel di guanosina risulta $0^\circ < \delta < 90^\circ$.

2.2.3: Frequency sweep test

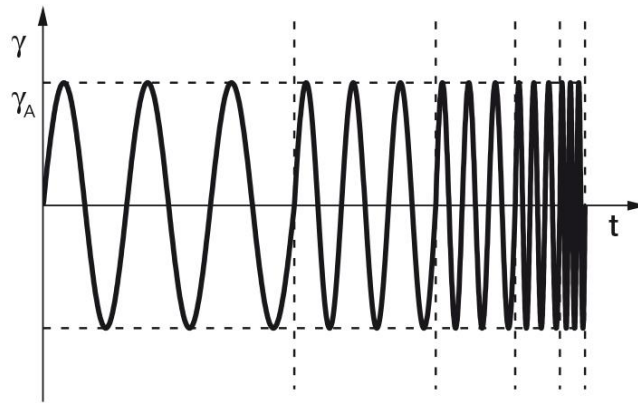


Fig. 2.9: Profilo di "Frequency sweep". Viene mostrata la deformazione in funzione del tempo. Si noti come sia evidente la variazione della frequenza (sito Anton Paar).

Il test di scansione di frequenza (*frequency sweep*) prevede un'analisi del campione andando a variare la frequenza di oscillazione. In particolare, questo test descrive il comportamento dipendente dal tempo di un campione nel range di deformazione non-distruttiva (Fig. 2.9). Da questa modalità si ricavano informazioni sulla viscosità complessiva del campione (*complex viscosity*, $|\eta^*|$). Le misure riportate in questa tesi sono state eseguite in un range di

frequenze comprese tra 0.1 e 100 rad/s, mentre lo *shear strain* è stato mantenuto costante ad un valore del 10%.

2.2.4: Curve di viscosità

La viscosità (espressa in Pa·s) è stata misurata in funzione della velocità di deformazione (espressa in 1/s). Questa misura è stata effettuata a temperatura ambiente.

2.3: Stampante 3D

2.3.1: Schema dell'apparato sperimentale

È stata testata l'iniettabilità del gel FA/ZnSO₄ utilizzando la bio-stampante *Inkreadible+ 3D* presente presso il Dipartimento di Medicina Sperimentale e Clinica (UNIVPM).



Fig. 2.10: Stampante Inkreadible+ 3D.

La bio-stampa 3D è una tecnica avanzata che consente di creare strutture biologiche tridimensionali, che fungono da impalcature (o scaffold), utilizzando materiali biologici, cellule viventi e idrogel. Il processo combina tecnologie di stampa 3D con materiali biologici per costruire strutture complesse con potenziali applicazioni in medicina rigenerativa, ingegneria dei tessuti e ricerca biologica. La bio-stampante 3D funziona depositando il bio-ink in strati successivi, costruendo così la griglia tridimensionale in modo simile alla stampa 3D tradizionale. La stampa avviene all'interno di una piastra 6-well e prevede la formazione di una griglia creata tramite uno script G-code di AutoCAD. La dimensione della griglia è di 10x10x0.8 mm, l'altezza di ogni strato stampato è di 0.4 mm, mentre lo spazio tra ciascuna linea della griglia è di 2 mm.

Il bio-ink utilizzato è un elemento fondamentale e può essere costituito da una miscela di: cellule viventi (come cellule staminali o altri tipi di cellule specializzate); biomateriali, come idrogel o polimeri biocompatibili (ad esempio collagene, alginato, chitosano), che forniscono una struttura temporanea e favoriscono l'adesione e la crescita cellulare; nutrienti e fattori di crescita, che aiutano a sostenere la vitalità e la proliferazione delle cellule.

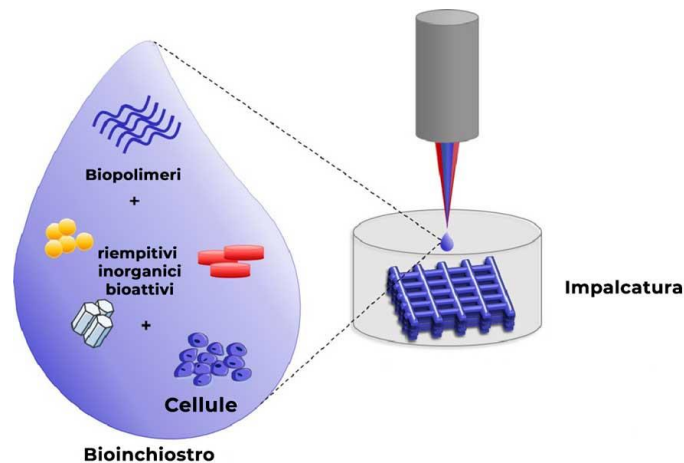


Fig. 2.11: Schema di utilizzo del bioinchiostro da parte della bio-stampante 3D per la formazione di una griglia

Dopo la stampa, il materiale viene spesso mantenuto in condizioni controllate (ad es. in incubatori) per permettere la maturazione cellulare, durante la quale le cellule proliferano e colonizzano la struttura. La griglia bio-stampata serve spesso come scaffold temporaneo per supportare la crescita cellulare e la formazione di tessuti. Con il tempo, può degradarsi in modo controllato, lasciando che le cellule formino un nuovo tessuto; oppure rimanere integrata come parte della struttura finale, a seconda del materiale utilizzato.

2.4: Microscopia AFM

2.4.1: Schema di un microscopio AFM

Il Microscopio a Forza Atomica (AFM) è uno strumento di analisi che consente di visualizzare e caratterizzare superfici a livello atomico, utilizzando una

sonda per misurare le forze intermolecolari tra la superficie del campione e la punta del microscopio.

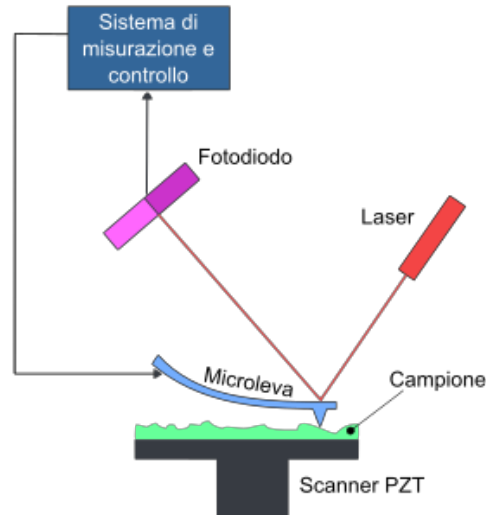


Fig. 2.12: Principio di funzionamento di un microscopio AFM

Tale microscopio è costituito da diversi componenti chiave, tra cui il cantilever, una leva flessibile, solitamente realizzata in materiali come il silicio o il nitruro di silicio, con una punta affilata montata all'estremità. Questa leva è estremamente piccola, con dimensioni tipiche dell'ordine di 100-200 μm di lunghezza, 20-40 μm di larghezza e circa 0.5-5 μm di spessore. La punta, che può essere anche conica, ha un raggio di curvatura che può arrivare a pochi nanometri. È situata all'estremità della leva, ed è la parte che interagisce direttamente con la superficie del campione. È molto affilata per garantire la risoluzione spaziale necessaria a livello atomico. La punta può essere funzionalizzata con diversi materiali per interagire in modo specifico con il

campione, ad esempio con rivestimenti in oro per applicazioni chimiche specifiche. Il campione da esaminare è montato su un sistema di scansione piezoelettrico, che permette di muoverlo con precisione sub-nanometrica in tre direzioni (X, Y, Z). Questo sistema piezoelettrico è fondamentale per realizzare le immagini, poiché consente il movimento controllato e preciso della superficie del campione sotto la punta. Il movimento della leva flessibile è monitorato da un sistema di rilevamento ottico. Un laser viene focalizzato sulla parte superiore del cantilever, e il suo riflesso viene catturato da un fotodiodo a quattro quadranti. Quando la punta del cantilever interagisce con la superficie del campione, la leva si flette e cambia l'angolo di riflessione del laser, il che consente al sistema di rilevare piccole deflessioni del cantilever con alta precisione.

Lo strumento poi è dotato di un sistema di controllo elettronico, che regola la distanza tra la punta e il campione. Quando il cantilever si avvicina troppo alla superficie e la forza di interazione diventa troppo grande, il sistema piezoelettrico si adatta per mantenere una forza costante tra la punta e il campione. Questo feedback è essenziale per ottenere immagini stabili e precise. Il microscopio AFM è controllato tramite un software che permette all'operatore di impostare i parametri di scansione, visualizzare i dati in tempo reale e analizzare le immagini risultanti. Il principio di funzionamento

dell'AFM si basa sull'interazione tra la punta del cantilever e la superficie del campione, principalmente attraverso forze intermolecolari come le forze di van der Waals, forze elettrostatiche e forze chimiche; ed è in grado di operare in diverse modalità a seconda dell'informazione desiderata (Fig. 2.13):

- Modalità a Contatto (Contact Mode): in questa modalità, la punta è in contatto diretto con la superficie del campione durante tutta la scansione. Le forze di repulsione predominano, causando la deflessione del cantilever. Il sistema di feedback mantiene costante la forza di contatto regolando la distanza tra la punta e il campione, permettendo di tracciare la topografia della superficie.
- Modalità a Non Contatto (Non-Contact Mode): qui, la punta oscilla vicino alla superficie senza toccarla direttamente. La frequenza di oscillazione del cantilever è leggermente ridotta dalle forze attrattive, e questa variazione viene monitorata per creare l'immagine topografica.
- Modalità Tapping (Tapping Mode o Semi-Contact Mode): in questa modalità, la punta oscilla e tocca leggermente la superficie del campione in punti discreti. È una situazione intermedia tra la modalità a contatto e quella a non contatto, riducendo l'attrito e i danni alla superficie o alla punta.

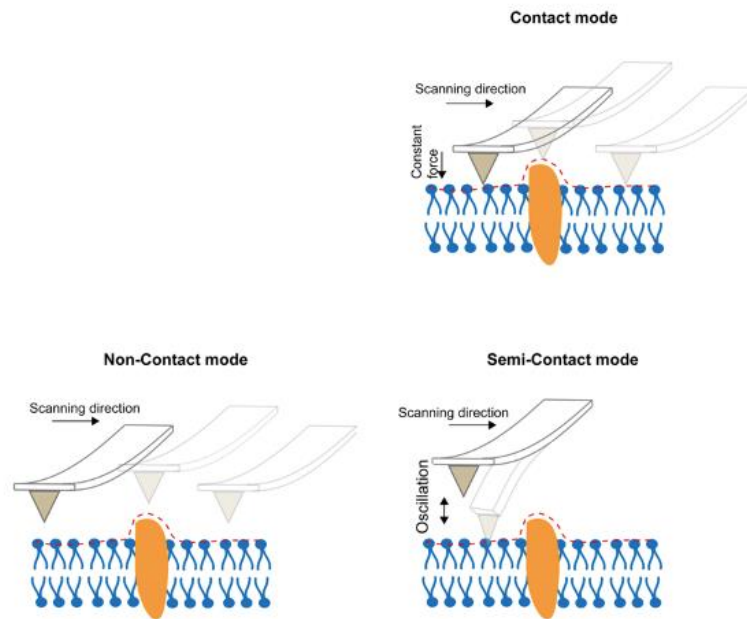


Fig. 2.13: Le tre modalità di funzionamento del microscopio AFM.

Durante la scansione, la punta esplora la superficie del campione seguendone le variazioni topografiche. Le deflessioni della leva flessibile sono convertite in segnali elettrici attraverso il sistema ottico, e questi segnali sono poi elaborati per costruire un'immagine tridimensionale della superficie. Le immagini ottenute da un AFM non solo rappresentano la topografia, ma possono anche fornire informazioni sulle forze locali tra la punta e il campione. Lo strumento può raggiungere una risoluzione laterale dell'ordine di 0.1-1 nm e una risoluzione verticale di circa 0.01 nm, rendendolo uno dei mezzi più potenti per l'analisi delle superfici su scala nanometrica.

2.5: Sincrotrone Elettra

2.5.1: Struttura del sincrotrone

Il sincrotrone è un acceleratore di elettroni con cui si producono fasci di fotoni molto intensi, utili come sonde per studiare la struttura della materia. Questo dispositivo sfrutta un campo magnetico variabile per mantenere le particelle su una traiettoria circolare mentre un campo elettrico variabile le accelera.



Fig. 2.14: Sincrotrone Elettra visto dall'alto (Trieste, Italia).

2.5.2: SAXS e WAXS

La tecnica della diffusione a piccolo angolo dei raggi X (*Small-Angle X-ray Scattering, SAXS*) viene molto utilizzata nello studio di macromolecole, e di nano-sistemi. Questo metodo ha il vantaggio di permettere l'analisi delle caratteristiche chimico-fisiche di un nanosistema in un solvente.

I raggi X sono onde elettromagnetiche di lunghezza d'onda λ compresa tra 0.1 e 100 Å (Fig. 2.15), ovvero di energia compresa tra 0.1 e 100 eV, in accordo con la legge di Planck.

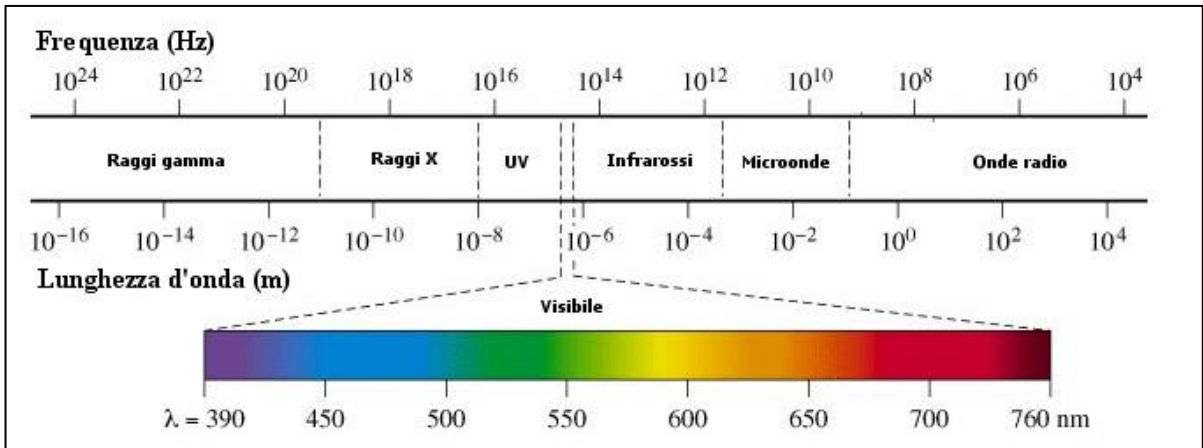


Fig. 2.15: Spettro elettromagnetico.

Quando un fascio collimato di raggi X interagisce con la materia, la radiazione può venire diffusa e/o assorbita. Si osserva una modifica della direzione di propagazione dell'onda che può essere anche accompagnata da uno scambio di energia tra fotoni e molecole del campione (*scattering* anelastico).

Quando non si osservano fenomeni di questo tipo si parla invece di *scattering* elastico (*scattering* Thomson). Quando un campione viene investito dal fascio collimato di raggi X, gli elettroni degli atomi che lo costituiscono vengono indotti ad oscillare alla frequenza dell'onda incidente e, di conseguenza, ad emettere onde secondarie. Un elettrone vibra statisticamente in tutte le

direzioni, quindi si producono onde secondarie sferiche rilevabili tramite un *detector* posto lungo una direzione qualsiasi. La tecnica SAXS si basa sull'interazione elastica tra raggi X ed elettroni del campione, i cui fenomeni di interferenza costruttiva generano un caratteristico *pattern* di diffusione e/o diffrazione.

Il fenomeno elementare di *scattering* elastico può essere schematizzato considerando un elettrone posto al centro di un sistema di riferimento colpito da un fascio collimato di raggi X, come mostrato in Fig. 2.16.

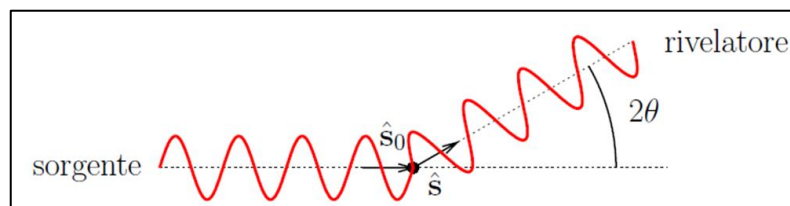


Fig. 2.16: Schematizzazione dell'interazione onda elettromagnetica-elettrone.

Tutto questo è valido anche in sistemi contenenti più elettroni. Considerando due elettroni e ponendo uno dei due al centro del sistema di riferimento, si può individuare un vettore distanza r tra le due particelle. Le onde secondarie prodotte nel contesto di un sistema di due elettroni avranno la medesima lunghezza d'onda della radiazione elettromagnetica incidente, ma presenteranno una differenza di fase (δ) dovuta alla differenza di cammino ottico tra i due fasci incidenti: $\delta = \left(\frac{1}{\lambda}\right) r(s - s_0)$

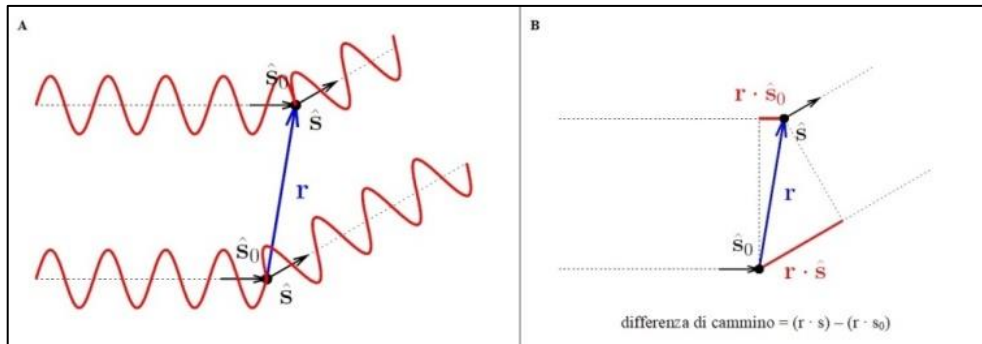


Fig. 2.17: **A** Schematizzazione dell'interazione tra onde e due elettroni.
B Differenza di cammino ottico.

Sulla base della differenza di fase e dell'angolo di *scattering* (2θ) è possibile definire il vettore di *scattering* Q (Fig. 2.18).

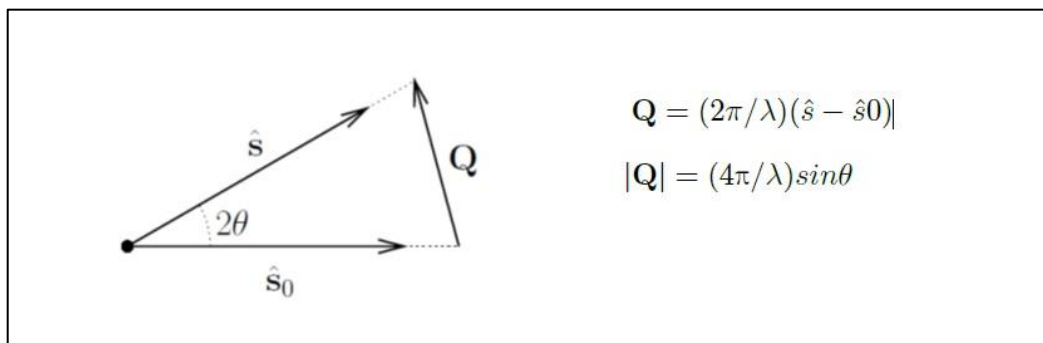


Fig. 2.18: Rappresentazione del vettore di scattering Q .

Tutti i fenomeni di *scattering* delle onde elettromagnetiche sono governati, attraverso l'operazione matematica chiamata trasformata di Fourier, da una legge di reciprocità: maggiore è la dimensione dell'oggetto irradiato, minore è l'angolo di *scattering* a cui questo sarà evidente (a parità di lunghezza d'onda della radiazione incidente). Quindi, all'approssimarsi dell'angolo 2θ a zero, ovvero alla direzione del fascio incidente, si esplorano dimensioni sempre più

grandi. In un esperimento SAXS, la lunghezza d'onda della radiazione incidente è molto più piccola delle distanze tra gli elettroni. Ne consegue che si ha interferenza costruttiva solo per angoli di *scattering* molto piccoli. Maggiore è la dimensione delle particelle, minore sarà l'angolo di *scattering* in corrispondenza del quale si verifica tale fenomeno. Nel contesto del SAXS si lavora nell'assunzione che il fascio incidente sia deviato una volta sola prima di raggiungere il detector, ovvero si considerano trascurabili gli eventi di *scattering* multiplo. Un esperimento SAXS consiste quindi nella rilevazione dello *scattering* elastico a piccolo angolo di raggi X in funzione del vettore di *scattering*. Dato che i raggi X interagiscono con gli elettroni, la diffusione a basso angolo è dovuta essenzialmente alle variazioni di densità elettronica della materia irradiata che a sua volta è funzione della lunghezza d'onda della radiazione incidente. L'appropriata elaborazione del segnale SAXS genera una curva di *scattering* da cui possiamo ottenere informazioni strutturali sul campione in esame.

2.6: FTIR

2.6.1: Principi teorici e schema dell'apparato sperimentale

La spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier (*Fourier Transform Infrared Spectroscopy, FTIR*) è una tecnica analitica utilizzata per ottenere lo spettro infrarosso di un campione. Questa tecnica è ampiamente utilizzata in

chimica e in fisica per identificare materiali e studiarne la composizione chimica. Si basa sull'interazione tra la radiazione infrarossa e la materia, al fine di studiare i movimenti vibrazionali degli atomi che costituiscono il campione. La radiazione può attraversare totalmente il campione ed essere parzialmente assorbita a seconda dei suoi legami chimici. Dalla radiazione trasmessa si possono così ricavare informazioni sulla struttura chimica del sistema in esame. Se invece il campione risulta opaco, la radiazione infrarossa non è in grado di attraversarlo tutto ma viene assorbita solo localmente, in uno strato superficiale molto sottile del campione. Attraverso la modalità in riflessione, è possibile ricavare ugualmente delle informazioni.

La FTIR sfrutta la trasformata di Fourier per analizzare i dati. Le misure sono effettuate utilizzando un interferometro che modula la luce infrarossa che attraversa il campione. Il segnale ottenuto, chiamato interferogramma, contiene informazioni su tutte le frequenze della luce infrarossa che hanno interagito con il campione. Questo segnale viene poi elaborato matematicamente mediante la trasformata di Fourier per ottenere lo spettro finale. Lo spettrometro FTIR è composto da diverse parti essenziali:

1. Sorgente di radiazione infrarossa: di solito è una lampada globar (silicio di carburo), una sorgente di radiazione che emette luce infrarossa su un ampio intervallo di lunghezze d'onda.

2. Interferometro: è il cuore del sistema FTIR. Il tipo più comune è l'interferometro di Michelson (Fig. 2.19), che consiste in due specchi (uno fisso e uno mobile) e un divisore di fascio. La radiazione infrarossa viene suddivisa in due fasci: uno diretto verso lo specchio fisso e l'altro verso lo specchio mobile. Dopo la riflessione, i due fasci si ricombinano. Muovendo lo specchio mobile, si ottiene una variazione della differenza di cammino ottico tra i due fasci, producendo l'interferenza.
3. Campione: il fascio modulato dall'interferometro attraversa il campione. Parte della luce infrarossa viene assorbita dal campione, e la restante viene trasmessa.
4. Rivelatore: dopo il campione, la luce infrarossa raggiunge il rivelatore, che misura l'intensità della radiazione trasmessa. I rivelatori più comuni sono i rivelatori a piroelettrici (come il DTGS, deuterated triglycine sulfate) e i rivelatori fotoconduttivi (come il MCT, mercurio-cadmio-tellururo).
5. Elaboratore: i dati acquisiti dal rivelatore sono sotto forma di interferogramma, un segnale complesso che contiene informazioni sull'intero spettro. Questo segnale viene inviato a un computer che applica la trasformata di Fourier per convertire l'interferogramma in uno

spettro IR, che mostra l'assorbimento in funzione della lunghezza d'onda o del numero d'onda della radiazione.

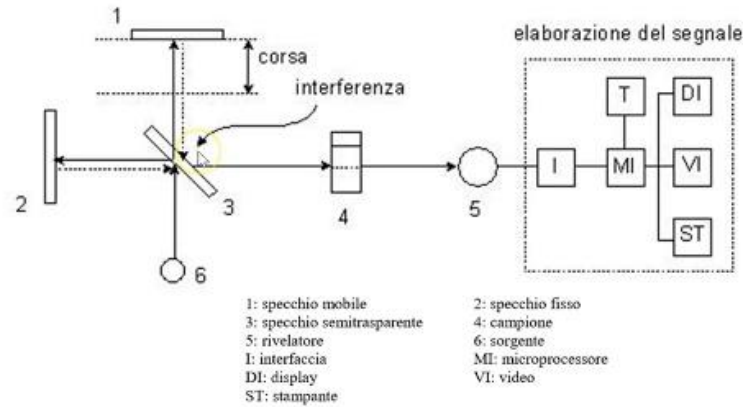


Fig. 2.19: Schema dell'interferometro di Michelson.

2.6.2: Modi di vibrazione

Gli atomi non rimangono fermi all'interno della molecola, ma vibrano attorno alla posizione di equilibrio. Quando un corpo è sottoposto ad una vibrazione, il centro di massa cambia, perché i legami si allungano o si accorciano e quindi si distorcono. La spettroscopia FTIR sfrutta queste vibrazioni fornendo informazioni sui legami e quindi sui gruppi funzionali presenti in una molecola. Si possono osservare diversi modi vibrazionali: i principali sono lo stretching e il bending che riguardano rispettivamente l'allungamento e la distorsione del legame.

In particolare, lo stretching è un movimento ritmico lungo la linea di connessione degli atomi (Fig. 2.20). Si parla di stretching simmetrico quando due legami vengono allungati o accorciati in fase; asimmetrico quando vengono allungati e accorciati in maniera sfasata.

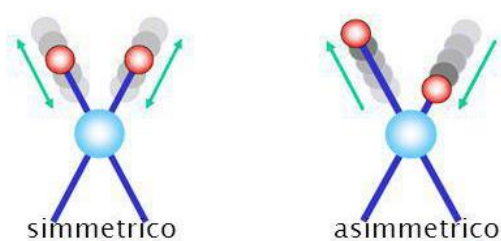


Fig. 2.20: *Stretching simmetrico e asimmetrico.*

Il bending è una deformazione dell'angolo di legame, che può avvenire nel piano o fuori dal piano della molecola ed interessa tre atomi legati tra loro. Quando abbiamo deformazione nel piano (Fig. 2.21) si parla di “*scissoring*” se l'angolo di legame si stringe e si allarga sul piano; mentre si parla di “*rocking*” quando l'angolo di legame si sposta verso destra o sinistra.

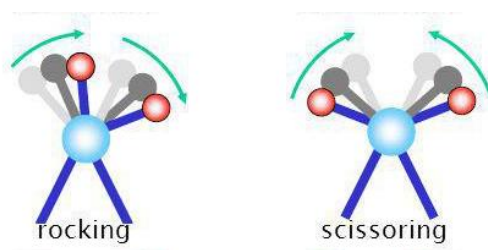


Fig. 2.21: *Deformazioni dell'angolo di legame nel piano.*

Quando abbiamo deformazione fuori dal piano (Fig. 2.22) si parla di “*twisting*” quando un legame viene verso il piano ed un altro va dalla parte opposta e viceversa; mentre si parla di “*wagging*” quando entrambi i legami si muovono fuori e dentro il piano.

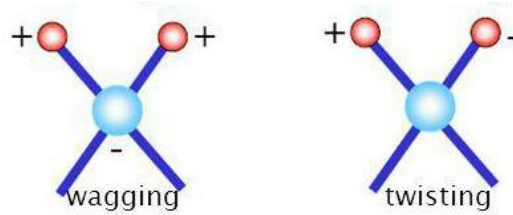


Fig. 2.22: Deformazioni dell'angolo di legame fuori dal piano.

3. RISULTATI E DISCUSSIONE

3.1: Nuovi protocolli per la preparazione di gel di acido folico

L'utilizzo della soluzione salina a base di ZnSO_4 , della miscela acqua:DMSO (1:1) e della miscela acqua:liquido ionico (1:1) hanno permesso di ottenere tre tipi di gel a base di acido folico. Il primo scopo della tesi è stato quindi l'ottimizzazione di tre differenti protocolli.

3.1.1: Preparazione di un idrogel di acido folico/ ZnSO_4 a diversi pH

Alla luce delle informazioni fornite dalla letteratura (*P. Xing et al. 2013, K. Liu et al. 2018*) siamo giunti alla conclusione che il punto cardine per la creazione di un gel FA/ ZnSO_4 è il pH.

Il primo passaggio per la preparazione di un campione è fare una soluzione 15 mM di acido folico. Nel nostro caso una volta pesati 0.02 g di acido folico, si inseriscono all'interno di una boccetta di vetro e si aggiungono 3 mL di acqua milli-Q assieme ad un'ancoretta magnetica, fondamentale per miscelare correttamente la soluzione.

Data la bassa solubilità dell'acido folico in acqua, la soluzione così ottenuta avrà un aspetto torbido, come mostrato in Fig. 3.1; sarà necessario effettuare una regolazione di pH.



Fig. 3.1: Aspetto della soluzione acquosa di FA prima della variazione di pH.

Quindi, mantenendo la nostra soluzione in agitazione, si inserisce la sonda di un pHmetro, in modo tale da conoscere esattamente i valori di pH da raggiungere per ottenere la solubilizzazione. Inizialmente il valore di pH della soluzione si aggira intorno a 4.5; per innalzare questo valore abbiamo aggiunto gocce progressive di una soluzione di NaOH 1M fino a quando non si ha la solubilizzazione completa dell'acido folico, che corrisponde ad una soluzione limpida, come riportato in Fig. 3.2. Il valore di pH dal quale si ottiene tale aspetto è 7.8, un aumento ulteriore di questo valore non causa variazioni significative nell'aspetto della soluzione.

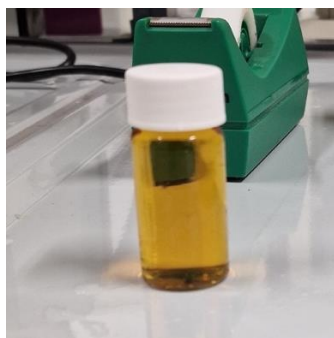


Fig. 3.2: Aspetto della soluzione acquosa di FA dopo l'aumento di pH con NaOH.

A questo valore di pH, la specie predominante in soluzione è quella trianionica (V. R. Magri et al. 2022). A questo punto si aggiunge alla soluzione una determinata quantità di $ZnSO_4$ secondo il rapporto 1 mole di FA : 1.8 moli di $ZnSO_4$; di conseguenza vengono pesati 0.023 g di $ZnSO_4$, che poi vengono aggiunti alla soluzione di FA mantenuta in agitazione. Una volta fatto sciogliere completamente il $ZnSO_4$, il risultato sarà un abbassamento del pH intorno al valore di 6.5 e un intorbidimento della soluzione. A questo punto, viene effettuato una seconda regolazione di pH in maniera analoga a quella precedente, aggiungendo NaOH 1M a gocce, fino al raggiungimento del valore di pH 8.2-8.3. Lasciando il campione a temperatura ambiente per 24 h si ottiene un idrogel stabile, come mostrato in Fig. 3.3.



Fig. 3.3: Aspetto del gel FA- $ZnSO_4$ dopo 24 h.

Il range di pH al quale il gel si forma è stato esplorato attraverso diverse prove, raggiungendo la conclusione che il gel si forma a partire da un valore minimo di pH=7.5 fino a uno massimo dove il pH=9.5 (Fig. 3.4).

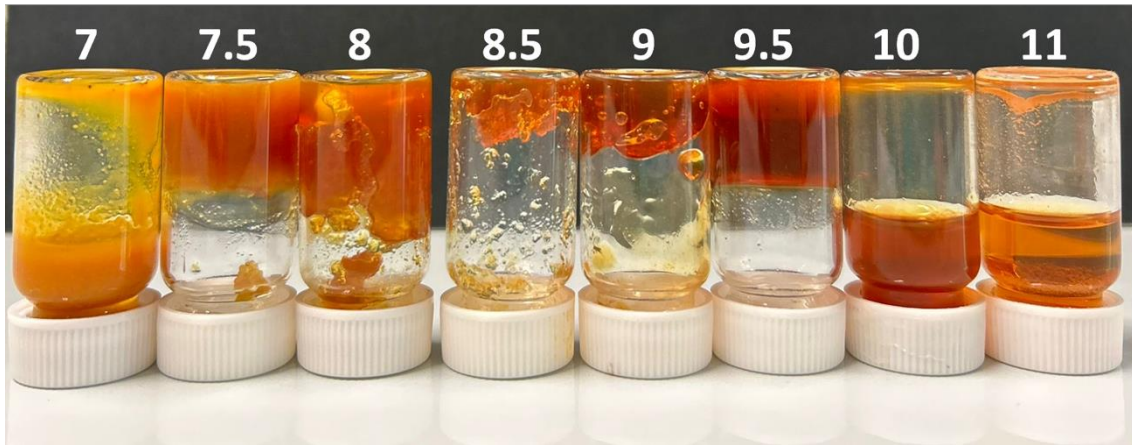


Fig. 3.4: Aspetto del gel FA-ZnSO₄ ottenuto ai vari valori di pH.

Tali gel hanno delle caratteristiche differenti che sono state analizzate attraverso diverse tecniche sperimentali.

Un'altra caratteristica importante del gel è che dopo la sua formazione, quindi dopo l'attesa di 24 h, si può osservare un ulteriore abbassamento del valore di pH, probabilmente a seguito di una riorganizzazione della sua struttura; nel caso del gel a pH iniziale 8.3, si osserva un pH finale di 7.5, un valore compatibile con il pH fisiologico, il che apre la strada a numerose applicazioni.

Il gel è stabile al variare della temperatura: dopo l'inserimento all'interno di un bagnetto termostato alla temperatura di 90 °C per un tempo di 30 min e dopo l'inserimento all'interno di un freezer a -80 °C per un uguale tempo il gel mantiene infatti la sua struttura e non manifesta cambiamenti evidenti.

3.1.2: Preparazione di un organogel: acido folico in acqua: DMSO

Per la preparazione di questo campione non sono state necessarie regolazioni di pH in quanto l'acido folico è solubile in solventi organici. Abbiamo deciso di utilizzare una concentrazione di acido folico pari a 0.04 M per creare il gel, che corrisponde ad una quantità di 0.124 g di FA disciolti in un volume di 7 mL di solvente. Tuttavia, per la preparazione del campione è necessario mantenere un rapporto DMSO:H₂O di 1:1, di conseguenza il volume totale sarà costituito da 3.5 mL di DMSO e 3.5 mL di H₂O.

A questo punto, si scioglie l'acido folico appena pesato in 3.5 mL di DMSO: la soluzione viene mantenuta in agitazione alla temperatura di 70 °C per un tempo di circa 30 min. Poi la si lascia raffreddare a temperatura ambiente ed infine si aggiungono i 3.5 mL di H₂O. Come risultato si ha l'istantanea formazione di un gel (*Y. Song et al. 2017*).

Con la preparazione di diversi campioni abbiamo potuto osservare che il gel risulta essere sensibile alla luce e alla temperatura, in quanto, se lasciato per qualche giorno sul bancone di lavoro, assume una colorazione differente e varia anche la sua consistenza. Dunque per la conservazione è opportuno mantenere il campione al buio, in frigorifero (Fig. 3.5).

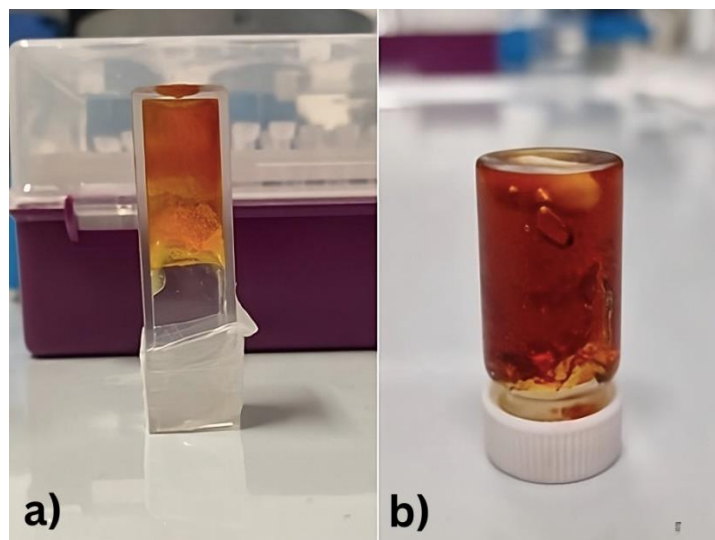


Fig. 3.5: a) Campione DMSO/FA esposto alla luce per una settimana; b) Campione DMSO/FA conservato al buio in frigorifero per una settimana.

3.1.3: Preparazione di uno ionogel: acido folico in acqua: liquido ionico

Per la preparazione di questo campione abbiamo provato a seguire il protocollo utilizzato per creare l'organogel, quindi sciogliere l'acido folico in un liquido ionico e poi aggiungere un uguale volume di acqua.

Per stabilire la giusta quantità di acido folico da sciogliere nel liquido ionico abbiamo deciso di lavorare su un volume di 2 mL, al quale poi vengono aggiunti 2 mL di acqua milli-Q per formare il gel; abbiamo lavorato su questi volumi perché con quantità superiori non si riesce a miscelare in maniera omogenea e di conseguenza non si ottiene un gel. Per i diversi tentativi effettuati, ai 2 mL di liquido ionico è stato aggiunto un numero crescente di aliquote di acido folico da 0.015 g ciascuna. Anche in questo caso la soluzione viene mantenuta

in agitazione a una temperatura di 70 °C, poi a solubilizzazione completa si lascia raffreddare a temperatura ambiente e, infine, rimettendo la soluzione in agitazione, si aggiungono i 2 mL di acqua milli-Q. Dopo 24 h la minima quantità di acido folico che consente la formazione di un gel stabile equivale a 3 aliquote, dunque 0.045 g (Fig. 3.6).



Fig. 3.6: Aspetto dello ionogel di acido folico con liquido ionico (gel FA/LI).

Il gel risultante appare stabile ed è termoresponsivo. Inoltre, abbiamo potuto osservare che la consistenza del gel varia dopo l'esposizione a un raggio UV; questo potrebbe essere dovuto alla rottura o modifica dei legami chimici all'interno della rete polimerica dello ionogel. In alcuni casi, l'esposizione ai raggi UV può causare una polimerizzazione aggiuntiva (formazione di nuovi legami tra le catene polimeriche), che porta a un aumento della rigidità del materiale; al contrario, se i legami vengono rotti, il materiale può diventare più fluido e meno elastico. Queste proprietà sono state studiate tramite studi reologici.

3.2: Misure di reologia

Sono stati eseguiti tre test reologici: l'analisi di *Amplitude* e *Frequency sweep* e la misurazione delle curve di viscosità. I campioni di FA-gel studiati attraverso la reologia sono riassunti in Tab. 1 del capitolo Materiali e Metodi. I risultati ottenuti dagli studi di reologia ci forniscono un quadro completo sulla formazione dei gel di FA considerando i tre diversi solventi.

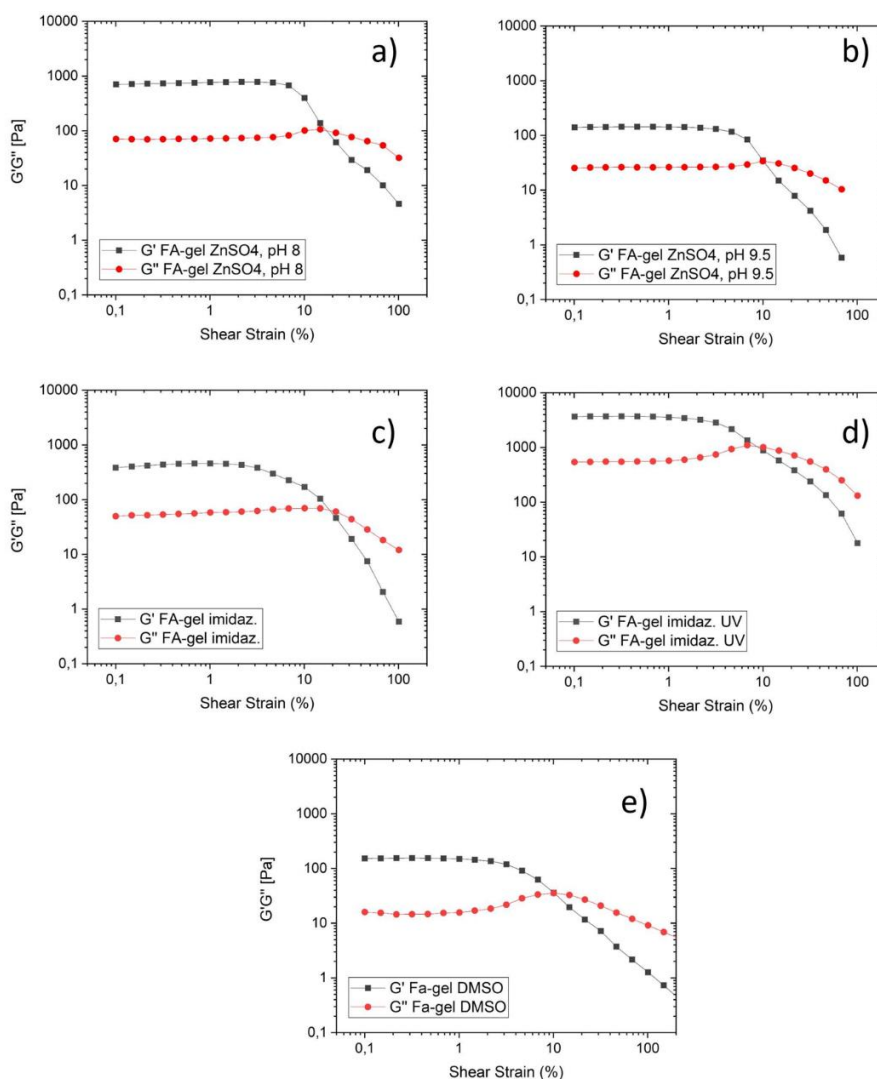


Fig. 3.7: Test di *Amplitude sweep* effettuato per idrogel FA/ZnSO₄ a pH=8 (a) e pH=9.5 (b); per ionogel non esposto a laser UV (c) ed esposto a laser UV (d); e per organogel con DMSO (e).

Confrontando i risultati del test di *amplitude sweep*, possiamo affermare che ci sono alcune lievi differenze tra i vari casi. Per quanto riguarda i dati ottenuti dai campioni di idrogel, quello preparato a $\text{pH} = 8$ è il più stabile. Confrontando i moduli G' e G'' dei campioni preparati a $\text{pH} = 8$ e a $\text{pH} = 9.5$, è evidente che a $\text{pH} = 8$ l'idrogel ha migliori proprietà viscoelastiche, grazie al valore più alto di queste grandezze (Fig. 3.7a, b). Inoltre, la differenza tra G' e G'' a bassi sforzi di taglio suggerisce che l'organizzazione strutturale del primo campione è più compatta rispetto a quella ottenuta a un valore di pH maggiore.

Per quanto riguarda il caso dello ionogel, è possibile notare che i moduli viscoelastici aumentano quando il campione viene irradiato per un certo tempo da un laser rosso (Fig. 3.7, c, d).

Inoltre, è stato interessante studiare la termoresponsività di questo campione da un punto di vista reologico. Questo studio è stato condotto misurando i moduli G' e G'' dello ionogel in funzione della temperatura (da 35 a 90 °C), come mostrato in Fig. 3.8. Si nota come i valori di G' sono sempre maggiori di quelli di G'' per tutto l'intervallo di temperatura, anche se entrambi i profili diminuiscono in maniera più accentuata a una temperatura di circa 60-70 °C.

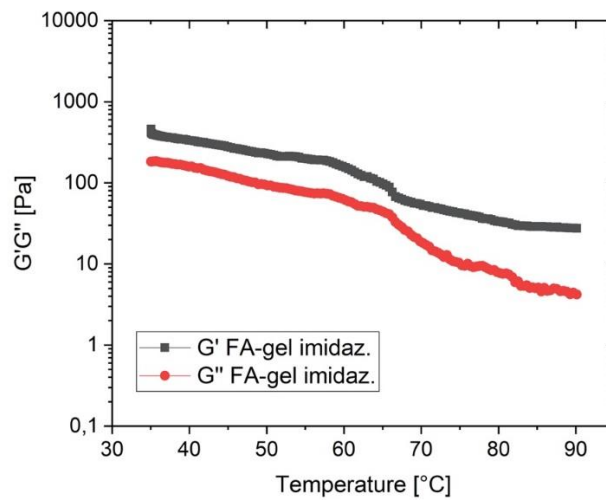


Fig. 3.8: Moduli G' e G'' misurati in funzione della temperatura, da 35 a 90°C, per un campione di FA-gel con liquido ionico.

L'ultimo campione analizzato è l'organogel (vedi Fig. 3.7c, d). Le proprietà viscoelastiche di questo tipo di FA-gel sono in accordo con quelle ottenute dagli altri casi. I dati di ampiezza sono stati confermati anche da quelli ottenuti dall'analisi di *frequency sweep* riportati in Fig. 3.9, dove i dati confermano la presenza di un'organizzazione tipica dei gel per ogni campione di FA-gel.

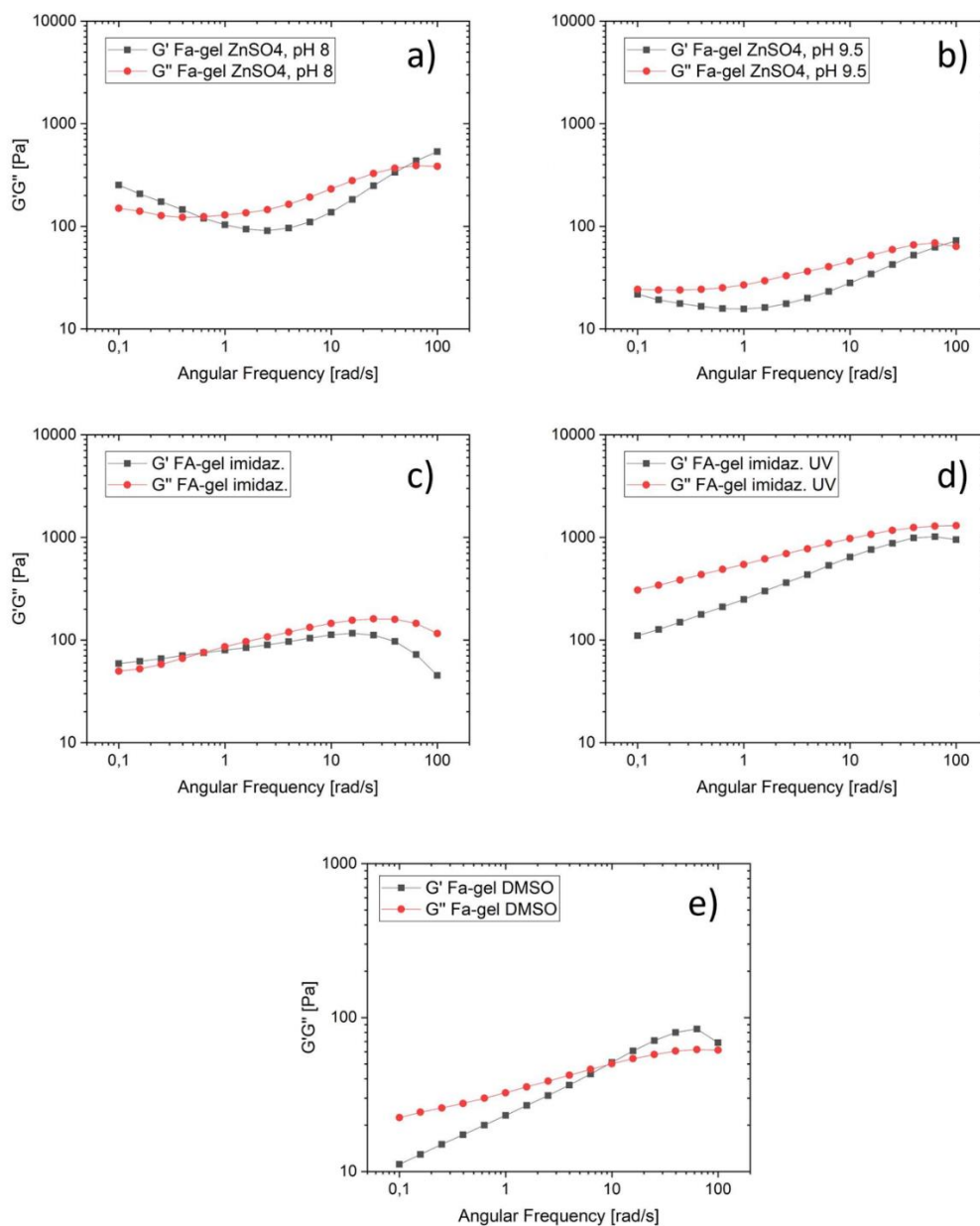


Fig. 3.9: Test di Frequency sweep effettuato per idrogel con $ZnSO_4$ a $pH=8$ (a) e $pH=9.5$ (b); per ionogel non esposto a laser UV (c) ed esposto a laser UV (d); e per organogel (e).

Infine, sono state misurate le curve di viscosità per ciascun FA-gel. La Fig. 3.10 riporta un confronto non solo tra i singoli casi con le loro peculiarità (variazione del pH, sensibilità alla luce), ma anche le differenze tra tutti i FA-gel.

Qualitativamente, la viscosità mostra lo stesso andamento per idrogel, organogel e ionogel. Le curve relative all'idrogel mostrano che, a un valore elevato di pH, il FA-gel presenta proprietà viscoelastiche inferiori, come atteso. D'altra parte, una differenza importante si verifica con il campione preparato utilizzando il liquido ionico di imidazolio. Infatti, il secondo grafico dimostra che il FA-gel esposto alla luce laser presenta una viscosità più elevata a bassa velocità di taglio.

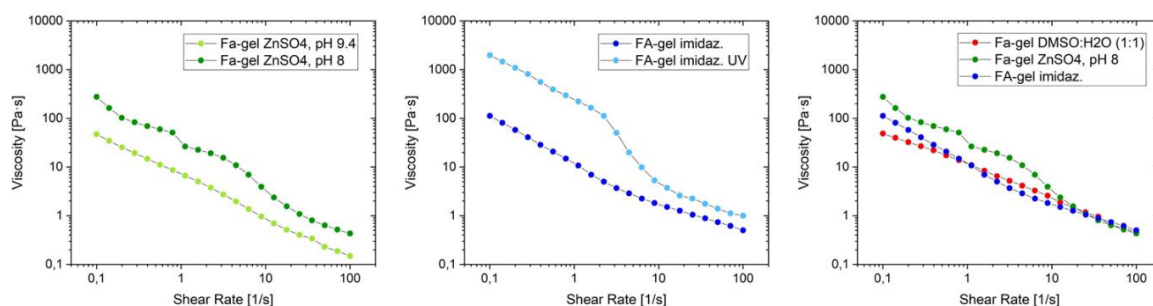


Fig. 3.10: Test di viscosità effettuati, da sinistra a destra, per: idrogel con $ZnSO_4$ a $pH=8$ e $pH=9.5$; ionogel con campione esposto a raggio UV e non esposto; organogel FA/DMSO confrontati con gli altri due campioni.

3.3: Esperimenti SAXS e WAXS

Le tecniche SAXS e WAXS hanno fornito importanti informazioni preliminari sull'organizzazione sopramolecolare dei diversi gel di acido folico (FA-idrogel a pH 7.5 e 9.5, FA-ionogel). Questi dati sono stati raccolti presso il sincrotrone Elettra (Trieste, IT) nel maggio 2024. I campioni analizzati tramite SAXS e WAXS sono elencati in Tab. 2 del capitolo dei Materiali e Metodi e le misure sono state condotte a 25 °C.

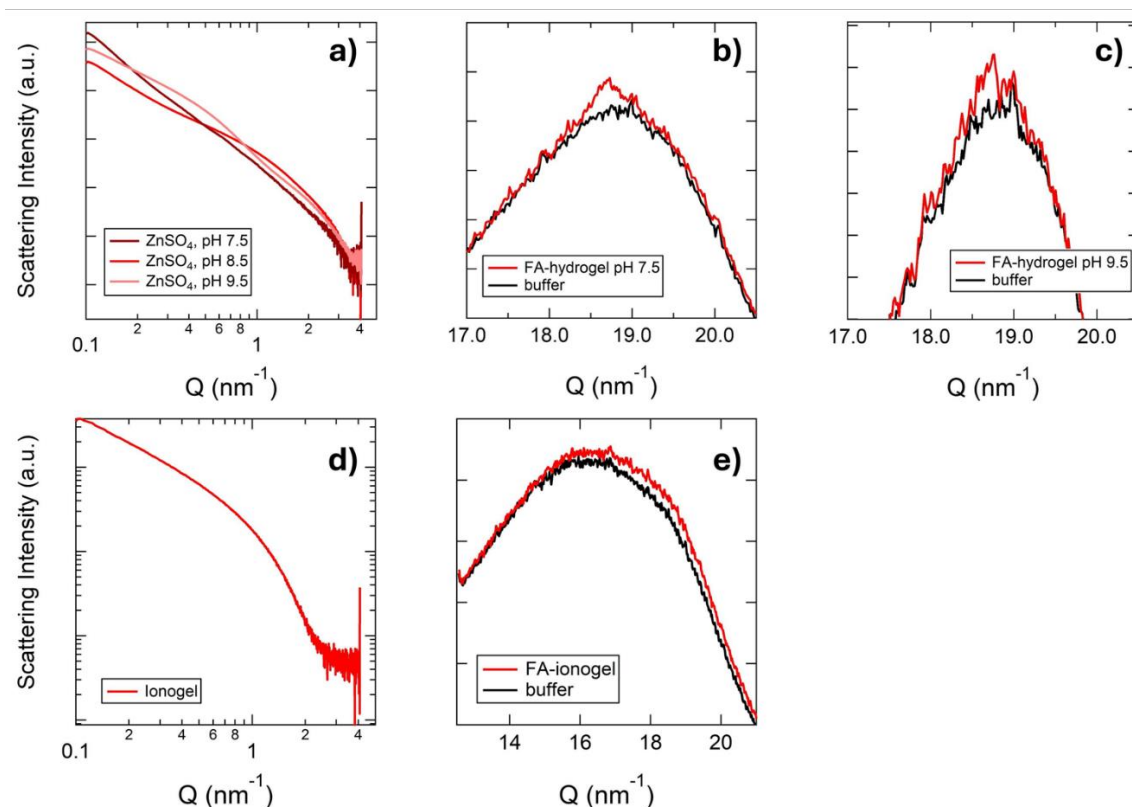


Fig. 3.11: SAXS (a, d) e WAXS (b, c, e) di idrogel con $ZnSO_4$ (riga superiore) e ionogel (riga inferiore). I profili SAXS sono simili tra loro e si riferiscono a modelli cilindrici.

Una descrizione qualitativa può essere illustrata guardando le curve riportate in Fig. 3.11. Le curve SAXS sono state ottenute sottraendo il buffer ($ZnSO_4$ e acqua per il FA-idrogel, liquido ionico di imidazolio e acqua per il FA-ionogel) ai rispettivi campioni. Al contrario, i dati WAXS offrono un confronto tra i campioni e i loro buffer, al fine di valutare la presenza o meno di un picco associato all'impilamento π - π *stacking* tipico dei quadruplessi.

Considerando i dati SAXS, la prima osservazione riguarda il profilo, che risulta simile a quello osservato per l'idrogel a base di guanosina. In effetti, la forma di queste curve suggerisce la presenza di un cilindro flessibile, che conferma

l'esistenza dei quadruplessi. Inoltre, i profili SAXS dell'idrogel con ZnSO₄ preparato a diversi valori di pH (7.5, 8.5 e 9.5) indicano alcune modifiche delle distanze e, quindi, della conformazione delle maglie di questo idrogel. La presenza dei filamenti di quadruplessi è confermata anche dalle curve WAXS relative al FA-idrogel, ma non da quella associata al FA-ionogel. Nel primo caso, le Fig. 3.11b, c evidenziano la presenza di un picco in posizione $Q = 18.676 \text{ nm}^{-1}$, che corrisponde alla distanza di impilamento tra due quartetti adiacenti di 0.336 nm. Q è il vettore di scattering, e descrive la variazione di direzione e intensità dei raggi X dopo la diffusione da parte del campione; è legato alle dimensioni caratteristiche degli oggetti nel campione, a bassi valori di Q corrispondono strutture più grandi, mentre a valori più alti si possono studiare dettagli più piccoli, come particelle di dimensioni nanometriche. È interessante notare che si tratta esattamente dello stesso valore raggiunto dall'impilamento dei quadruplessi di guanosina. Inoltre, la tendenza a formare un impacchettamento colonnare era già stata dimostrata (*G. Gottarelli et al. 1996*). Vale la pena osservare che i quadruplessi sono presenti non solo nei campioni preparati a pH 7.5, ma anche nel caso a pH 9.5. Questo risultato conferma i dati ottenuti con il test *amplitude sweep* della reologia (vedi Fig. 3.7). Sebbene il valore di pH pari a 9.5 sia considerato uno dei valori estremi a cui si può formare l'idrogel di FA, il picco è centrato nella stessa posizione del

campione più stabile. Ciò significa che variazioni di pH possono influenzare le proprietà viscoelastiche del FA-idrogel e, quindi, la sua capacità di rigonfiamento, senza però modificare l'ordine dei quadruplessi.

Considerando ora il FA-ionogel, il profilo WAXS mostra una situazione completamente diversa. L'assenza di picchi in tutti gli intervalli Q considerati nell'analisi sembra proporre l'assenza dell'assetto elicoidale. Ulteriori studi devono essere effettuati per scoprire nuove caratteristiche strutturali di questo sistema.

3.4: Analisi FTIR

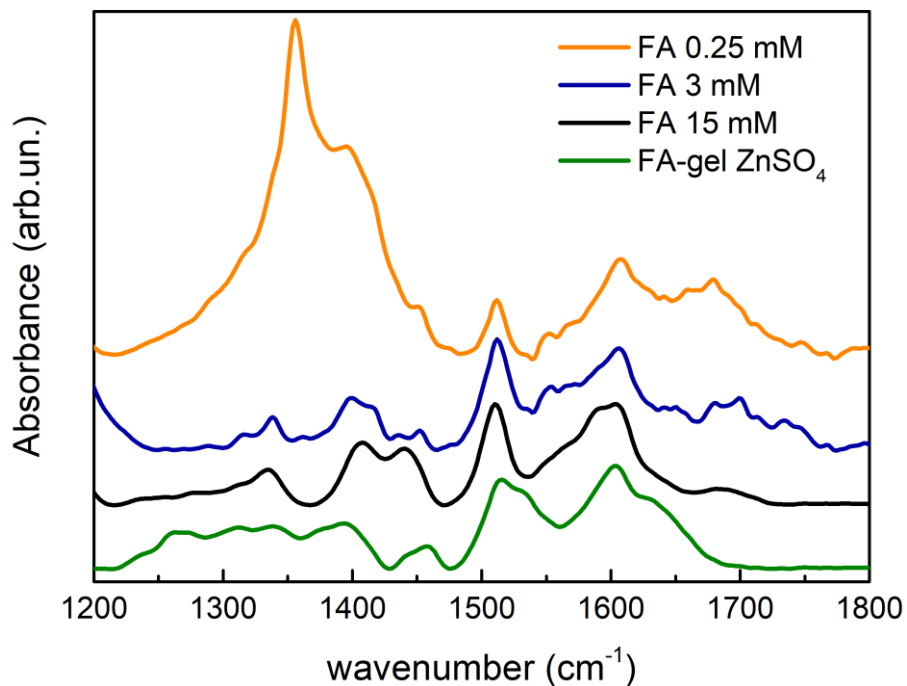


Fig. 3.12: Spettro infrarosso di: acido folico 0.25 mM in acqua (arancione), acido folico 3 mM in acqua (blu), acido folico 15 mM in acqua (nero), FA-gel con ZnSO₄ (verde).

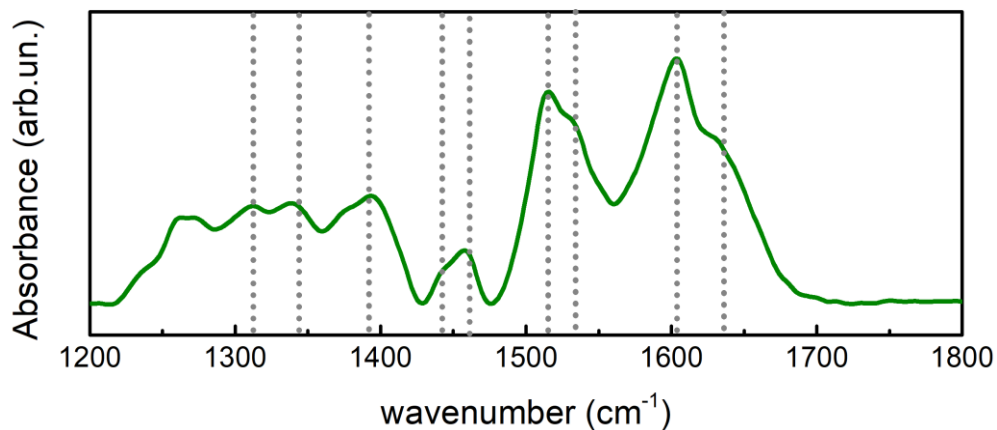


Fig. 3.13: Spettro infrarosso del FA-gel con $ZnSO_4$, le linee tratteggiate indicano le principali bande associate ai modi di vibrazione assegnati in Tab. 3.

ν (cm ⁻¹)	Assegnazione
1310	ring stretching
1338	bending OH + bending CaH
1394	bending OH + wagging CbH2
1449	scissoring CH ₂
1456	
1514	ring breathing
1530	
1603	ring breathing
1630	antisymmetric stretching C2N3

Tab. 3: Modi di vibrazione associati alle principali bande spettrali osservate per il gel FA/ $ZnSO_4$. In giallo sono evidenziati i picchi caratteristici attribuibili al gel formato.

Sono state effettuate misure su un campione di acido folico molto diluito, con una concentrazione pari a 0.25 mM (spettro arancione in Fig. 3.12) che sicuramente non presenta quadruplessi. Questo è testimoniato dalla fluorescenza che il campione mostra se esposto a radiazione ultravioletta, come mostrato in Fig. 3.14. L'acido folico contiene una parte aromatica (l'anello pteridinico) che è in grado di assorbire energia della radiazione UV. Questa energia eccita gli elettroni della molecola, portandoli a un livello di energia superiore. Dopo l'eccitazione, gli elettroni non rimangono a lungo in questo stato eccitato, ma tendono a rilasciare l'energia in eccesso tornando a uno stato di energia più basso. Questo rilascio di energia avviene spesso sotto forma di luce visibile, che è percepita come fluorescenza.

Tuttavia, a concentrazioni più elevate, l'acido folico può formare aggregati molecolari. In questi aggregati, le proprietà elettroniche delle singole molecole possono cambiare, e la loro capacità di assorbire ed emettere luce può essere ridotta o persa totalmente. Nei quadruplessi, infatti, il sistema aromatico degli anelli pterinici è impegnato ad effettuare interazioni di π - π *stacking*, rendendo di conseguenza impossibile l'assorbimento della luce UV e la conseguente emissione di fluorescenza.

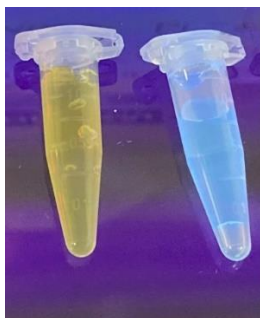


Fig. 3.14: Campione di gel FA-ZnSO₄ (sinistra) e campione di acido folico 0.25 mM in acqua (destra) esposti a luce UV; il campione di destra emette fluorescenza blu.

In seguito, sono stati misurati campioni a concentrazione crescente (Fig. 3.12) fino ad arrivare a 15 mM (concentrazione dell'acido folico nel gel FA-ZnSO₄) e si può osservare che alcuni picchi dello spettro cambiano (spettri blu e nero della Fig. 3.12), suggerendo la presenza di strutture aggregate. Infine, viene misurato il gel che si forma utilizzando il sale di zinco (spettro verde della Fig. 3.12). È interessante osservare che le principali strutture che si osservano nello spettro del gel sono molto simili a quelle presenti nei campioni più concentrati, segno di una sempre maggiore aggregazione del sistema. Tuttavia, nello spettro del gel possiamo distinguere due bande che non sono state osservate negli altri campioni, quella intorno a 1450 cm⁻¹ e quella a 1630 cm⁻¹, entrambe legate a vibrazioni sensibili alla presenza di legami idrogeno intermolecolari necessari alla formazione dei quadruplessi. Questa è un'ulteriore conferma della presenza dei quadruplessi che formano la matrice del gel.

3.5: Caratterizzazione morfologica tramite AFM

La misura di Microscopia a Forza Atomica (AFM) è stata effettuata su campioni di FA-idrogel (preparati a pH 8) opportunamente diluiti aggiungendo alcuni μL di acqua milli-Q a 25 μL di campione.

Le immagini così ottenute hanno dimostrato la presenza di un reticolo tridimensionale, i cui filamenti rappresentano i quadruplessi di acido folico (vedi Fig. 3.15a).

Successivamente, l'analisi quantitativa tramite il software per immagini *Fiji* è stata utile per ricavare informazioni riguardanti la chiralità dei quadruplessi. Questo studio è stato effettuato tracciando delle linee sia sulla lunghezza dei quadruplessi che trasversalmente ad essi. In questo modo, è stato possibile ricavare profili di altezza in funzione della distanza considerata.

L'analisi sulla lunghezza è stata effettuata considerando la regione della Fig. 3.15a evidenziata nel riquadro rosso. Come si nota dal grafico risultante (Fig. 3.15d), questa parte del reticolo tridimensionale sembra essere costituita da due quadruplessi superavvolti tra di loro, come schematizzato in Fig. 3.15c. Il grafico, infatti, dimostra la presenza di picchi che si ripetono ad una distanza costante di 47.7 nm, che solo in un caso diventa 37.8 nm. Tuttavia, questa scala spaziale dipende anche dalle dimensioni della punta. Questa

periodicità può essere correlata al passo dell'elica che deriva dal superavvolgimento dei quadruplessi.

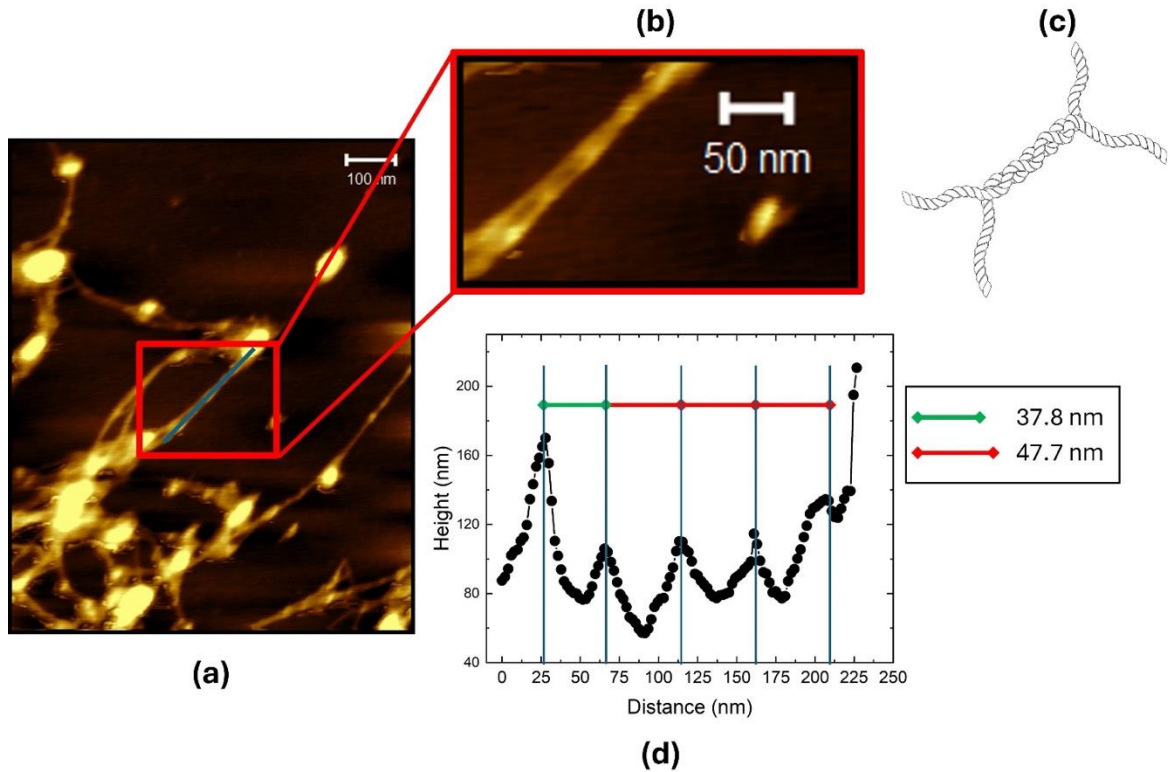


Fig. 3.15: Analisi della periodicità dei quadruplessi di acido folico. (a) Immagine AFM relative al reticolo di FA-idrogel. Nel riquadro rosso si nota l'analisi effettuata sulla lunghezza del filamento. (b) Ingrandimento della regione analizzata. (c) Grafico ottenuto tramite Fiji relativo alla periodicità dell'elica.

Tuttavia, i valori ottenuti direttamente dalle immagini di AFM rappresentano la risoluzione apparente e pertanto devono essere corretti considerando il diametro della punta utilizzata dallo strumento (per le misure mostrate in questa tesi, la punta dello strumento ha un raggio di 8 nm). Il valore vero è quindi assimilabile a poco meno di 1/10 di quello realmente misurato utilizzando una

punta di raggio 8 nm (*P. Eaton et al. 2010*). Possiamo concludere che il passo della super-elica di acido folico è pari a circa 4 nm.

La seconda analisi è stata effettuata tracciando delle linee trasversali ai quadruplessi. A tal proposito, sono state considerate due regioni dell'immagine mostra in Fig. 3.15a (vedi Fig. 3.16 e 3.17). La Fig. 3.16 mostra la regione superavvolta. Ciascuna curva mostrata nel grafico in Fig. 3.16b fa riferimento ad un segmento riportato in Fig. 3.16a. È interessante notare che spostandoci dalla curva viola a quella gialla i picchi ottenuti tornano esattamente nella stessa posizione iniziale. Questo dimostra il motivo elicoidale di questa porzione di immagine. Inoltre, una seconda considerazione riguarda il doppio picco presente nella maggior parte delle curve ottenute. Questo fa riferimento ancora una volta alla presenza di due filamenti superavvolti: la curva viola vede la prevalenza del picco di destra, successivamente le curve blu e azzurra non presentano alcuna variazione, mentre la curva verde presenta il picco di sinistra più alto di quello di destra.

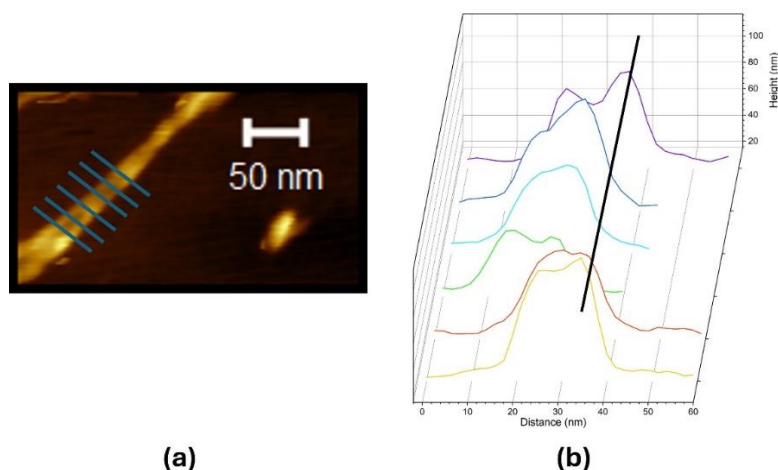


Fig. 3.16: (a) Ingrandimento dell'immagine AFM della regione considerata per l'analisi (stesso di Fig. 3.15b) in cui sono mostrate le linee trasversali al filamento. (b) Analisi delle altezze relative alle linee tracciate in Fig. 3.16a.

La Fig. 3.17 mostra l'analisi appena descritta considerando però una seconda regione dell'immagine iniziale. In questo caso possiamo affermare che non è presenta un super avvolgimento, poiché le curve in Fig. 3.17b si trovano sempre nella stessa posizione e non presentano doppi picchi. Inoltre, la larghezza delle curve corrisponde a circa 15 nm, ovvero a 1.5 nm considerando la correzione per la punta utilizzata, mentre l'altezza corrisponde a circa 40 nm. Quest'ultimo valore non necessita della correzione e quindi è da considerare come valore reale. Nel campione sono presenti quindi sia regioni con filamenti di quadruplessi superavvolti, sia regioni in cui questi filamenti non hanno una struttura sopramolecolare specifica. Tuttavia, la presenza dei quadruplessi nel campione è garantita dai dati WAXS, che mostrano la presenza del picco relativo allo stacking π - π dei quadruplessi di acido folico.

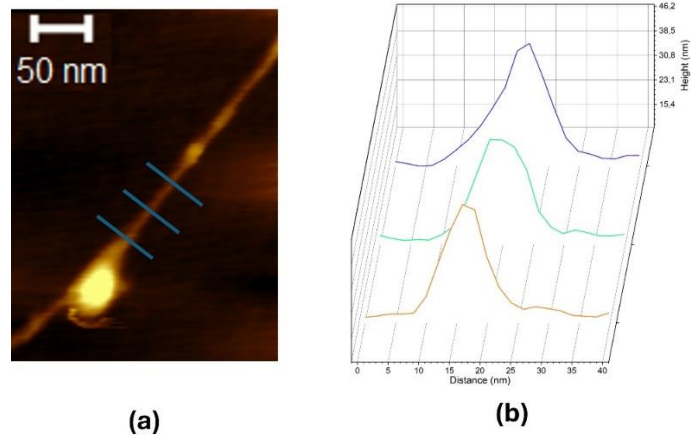


Fig. 3.17: (a) Immagine AFM di un secondo filamento in cui sono mostrate le linee trasversali su cui è stata eseguita l'analisi. (b) Analisi delle altezze relative alle linee tracciate in Fig. 3.17a.

Passando adesso a considerare il campione FA-organogel, la Fig. 3.18 mostra la morfologia di questo campione.

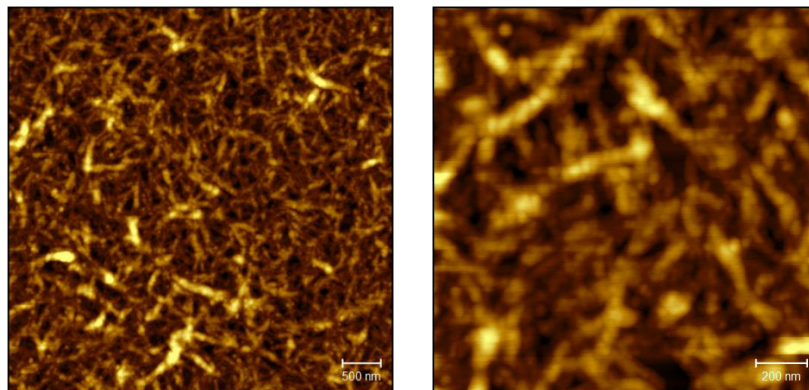


Fig. 3.18: FA-organogel visualizzato a due ingrandimenti diversi.

I risultati mostrano la presenza di un reticolo tridimensionale visibile anche per il campione di FA-organogel. Tuttavia, a differenza del FA-idrogel le maglie della rete appaiono più strette ed inoltre i filamenti di quadruplessi sembrano

essere più spessi del caso precedente. A tal proposito, l'analisi quantitativa non è stata approfondita.

L'ultimo campione considerato riguarda il FA-ionogel, il quale viene mostrato in Fig. 3.19. La preparazione del campione è la stessa già descritta per gli altri due campioni di FA-gel. Come si nota dalla Fig. 3.19, non è possibile distinguere un reticolo tridimensionale per il FA-ionogel. Questo dimostrerebbe anche la mancanza dei quadruplessi di acido folico, così come suggeriscono i dati WAXS. Ulteriori verifiche saranno necessarie in futuro per ottenere informazioni più accurate a riguardo.

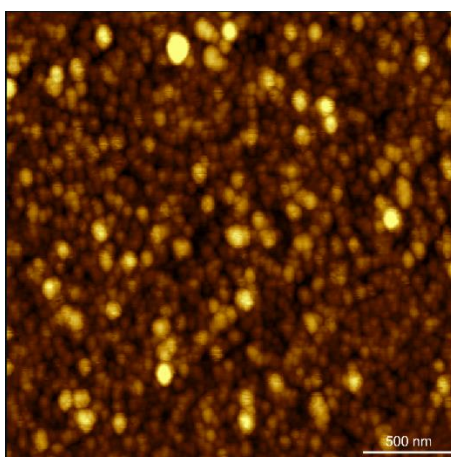


Fig. 3.19: FA-ionogel.

3.6: Test di iniettabilità

È stata poi testata l'iniettabilità del gel FA-ZnSO₄ utilizzando sia una siringa Hamilton (Fig. 3.20) che la bio-stampante *Inkreadible+ 3D* (Fig. 3.21). Da test

preliminari possiamo affermare che il gel rimane compatto e stabile, mostrando quindi un'ottima capacità di essere iniettato, incoraggiandoci nell'approfondire ulteriori studi a riguardo.



Fig. 3.20: Gel FA-ZnSO₄ iniettato tramite l'utilizzo di una siringa Hamilton.

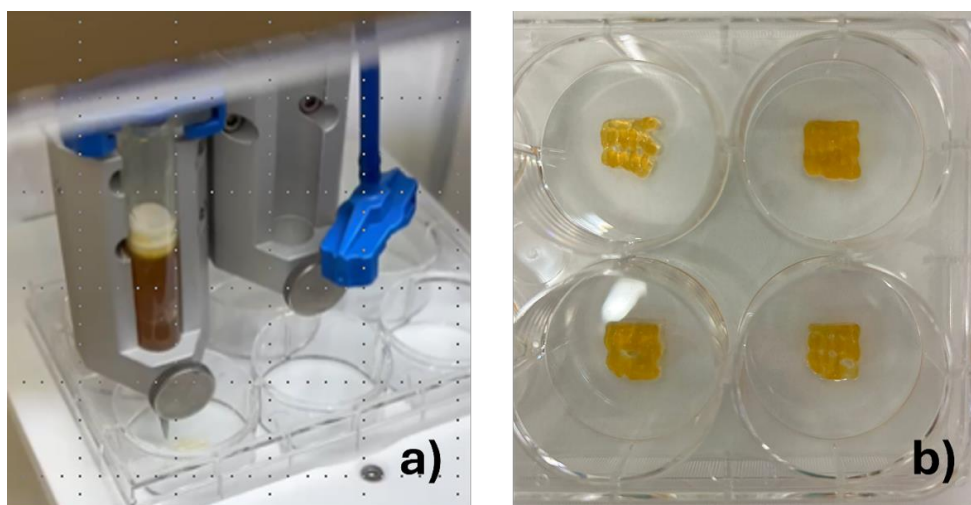


Fig. 3.21: a) Bio-stampante 3D (Inkreadible+) con idrogel FA-ZnSO₄ utilizzato come bio-inchiostro; b) griglia stampata con gel FA-ZnSO₄ all'interno di una piastra 6-wells.

I risultati ottenuti sono incoraggianti, ma sono necessari ulteriori studi per ottimizzare la stabilità del gel in funzione del tempo.

4. CONCLUSIONI

Lo scopo della presente tesi ha riguardato la preparazione e caratterizzazione di gel basati sulla molecola di acido folico, miscelata con diversi solventi: una soluzione salina di acqua e ZnSO_4 , una miscela di acqua e DMSO (1:1), una miscela di acqua e un liquido ionico (1:1). La scelta della molecola di acido folico per la formazione di questi gel è da ricercare nella sua somiglianza con la guanosina, una delle principali molecole oggetto di studio del Laboratorio di Biofisica Molecolare del DiSVA, già nota in comunità scientifica per le sue capacità di formare aggregati tramite meccanismo di auto-assemblaggio e per la formazione di idrogel con varie caratteristiche. Queste molecole possiedono una struttura con una disposizione simile di gruppi accettori e donatori di legame idrogeno ed in soluzioni isotropiche si assemblano formando strutture tetrameriche caratterizzate da una geometria di Hoogsteen, in grado di impilarsi tra loro dando origine a blocchi cilindrici detti quadruplessi. Alla luce di queste premesse sono stati messi a punto dei nuovi protocolli che hanno permesso la preparazione di gel stabili basati sulla molecola di acido folico. Sono state studiate poi le proprietà viscoelastiche di questi gel attraverso misure di reologia. I risultati di queste analisi mostrano che l'idrogel FA- ZnSO_4 a pH=8 ha migliori proprietà viscoelastiche rispetto al campione con pH=9.5, inoltre la differenza tra G' e G'' a bassi sforzi di taglio suggerisce che l'organizzazione

strutturale del primo campione è più compatta rispetto a quella ottenuta a un valore di pH maggiore (Fig. 3.7a, b del capitolo dei Risultati). Per quanto riguarda lo ionogel è possibile notare che i moduli viscoelastici aumentano quando il campione viene irradiato per un certo tempo da un laser rosso (Fig. 3.7c, d). Inoltre, è stato interessante studiare la termoresponsività di questo campione da un punto di vista reologico misurando i moduli G' e G'' dello ionogel in funzione della temperatura (da 35 a 90 °C). I risultati mostrano che G' assume valori sempre maggiori di G'' per tutto l'intervallo di temperatura considerato, anche se entrambi i profili diminuiscono in maniera più accentuata a una temperatura di circa 60-70 °C (Fig. 3.8). L'ultimo campione analizzato è l'organogel con il DMSO. Le proprietà viscoelastiche di questo tipo di FA-gel sono in accordo con quelle ottenute dagli altri casi (Fig. 3.7e). Per verificare la presenza dei quadruplessi sono state utilizzate tecniche di scattering a basso angolo. Considerando i dati SAXS, il profilo ottenuto risulta simile a quello osservato per l'idrogel a base di guanosina; la forma delle curve suggerisce la presenza di un cilindro flessibile, che conferma l'esistenza dei quadruplessi (Fig. 3.11a, d). Inoltre, i profili SAXS dell'idrogel FA-ZnSO₄ preparato a diversi valori di pH (7.5, 8.5 e 9.5) indicano che si verificano alcune modifiche delle distanze e, quindi, della conformazione delle maglie di questo idrogel. La presenza dei filamenti di quadruplessi è confermata anche dalle curve WAXS

relative al FA-idrogel (Fig. 3.11b, c). I quadruplessi sono presenti non solo nei campioni preparati a pH 7.5, ma anche nel caso a pH 9.5; sebbene questo valore di pH sia considerato uno dei valori estremi a cui si può formare l'idrogel di FA, il picco è centrato nella stessa posizione del campione più stabile. Questo significa che variazioni di pH possono influenzare le proprietà viscoelastiche del FA-idrogel e, quindi, la sua capacità di rigonfiamento, senza modificare l'ordine dei quadruplessi. Considerando il FA-ionogel, il profilo WAXS non mostra picchi in tutti gli intervalli Q considerati (Fig. 3.11e), proponendo l'assenza dell'assetto elicoidale. In questa direzione, ulteriori studi devono essere effettuati per scoprire nuove caratteristiche strutturali di questo sistema. Sono state effettuate misure di spettroscopia infrarossa che hanno permesso di ricavare una caratterizzazione vibrazionale a livello molecolare; i risultati hanno evidenziato che alcuni picchi dello spettro di assorbimento del campione di acido folico con concentrazione pari a 0.25 mM cambiano rispetto ai campioni più concentrati (Fig. 3.12) questo perché il primo campione non mostra la presenza dei quadruplessi, come dimostrato anche dalla sua fluorescenza se esposto a radiazione UV (Fig. 3.14). Infine, viene misurato il gel che si forma utilizzando il sale di zinco (Fig. 3.12); le principali strutture che si osservano nello spettro del gel sono molto simili a quelle presenti nei campioni più concentrati, segno di una sempre maggiore aggregazione del

sistema. Tuttavia, nello spettro del gel possiamo distinguere due bande che non sono state osservate negli altri campioni, quella intorno a 1450 cm^{-1} e quella a 1630 cm^{-1} (Tab. 3), entrambe legate a vibrazioni sensibili alla presenza di legami idrogeno intermolecolari necessari alla formazione dei quadruplessi, un'ulteriore conferma della presenza dei quadruplessi che formano la matrice del gel. Sono state ottenute informazioni sulla morfologia della rete 3D dei gel tramite microscopia a forza atomica; i campioni di idrogel FA/ZnSO₄ a pH=8 e di organogel FA/DMSO mostrano la presenza di una matrice reticolata (Fig. 3.15, 3.18), per quanto riguarda la caratterizzazione della morfologia dello ionogel FA/LI invece, sono necessarie ulteriori analisi (Fig.3.19). Infine, l'idrogel a base di acido folico e ZnSO₄ è stato utilizzato come “bio-inchiostro” all'interno di una bio-stampante 3D, al fine di verificarne l'iniettabilità (Fig. 3.21). Si tratta di test preliminari il cui risultato ci ha permesso di dimostrare l'ottima capacità di questo materiale per scopi futuri quali, ad esempio, la crescita 3D delle colture cellulari su scaffold formati da idrogel di acido folico, sebbene siano necessari ulteriori studi per ottimizzare la stabilità del gel in funzione del tempo.

BIBLIOGRAFIA

- Federica Carducci, Juliana S. Yoneda, Rosangela Itri and Paolo Mariani. On the structural stability of guanosine-based supramolecular hydrogels (2018) Royal Society of Chemistry.
- Federica Ciuchi, Giovanni Di Nicola, Hermann Franz, Giovanni Gottarelli, Paolo Mariani, Maria Grazia Ponzi Bossi, and Gian Piero Spada. Self-Recognition and Self-Assembly of Folic Acid Salts: Columnar Liquid Crystalline Polymorphism and the Column Growth Process (1994) *J. Am. Chem. Soc.* 1994,116, 7064-7071.
- EFSA MEETING SUMMARY REPORT. Folic acid: an update on scientific developments (2009) European Food Safety Authority.
- Peter Eaton, Paul West. Atomic force microscopy. (2010) Oxford University press.
- Francesco Federiconi, Michele Mattioni, Enrico J. Baldassarri, Maria Grazia Ortore, Paolo Mariani. How soft are biological helices? A measure of axial and lateral force constants in folate quadruplexes by high-pressure X-ray diffraction (2011) *EBSA Biophysics in Europe*
- Giovanni Gottarelli, Elisabetta Mezzina, Gian Piero Spada, Flavio Carsughi, Giovanni Di Nicola, Paolo Mariani, and Annalaura Sabatucci. The Self-Recognition and Self-Assembly of Folic Acid Salts in Isotropic Water Solution (1996) *HELVETICCAHIMICAACTA*~ Vol. 79.
- Herinda Pertiwi ,1 Mohamad Yusril Nur Mahendra,1 and Juriah Kamaludeen. Folic Acid: Sources, Chemistry, Absorption, Metabolism, Beneficial Effects on Poultry Performance and Health (2022) Hindawi.

- <https://www.laboratoriumdiscounter.nl/it/sostanze-chimiche/a-z/d/dimetilsolfossido-dmsol/>
- <https://wiki.anton-paar.com/it-it/>.
- Zhigang Lei, Biaohua Chen, Yoon-Mo Koo. Introduction: Ionic Liquids (2017) Chemical Reviews.
- Kaerdun Liu, Shihao Zang, Rongrong Xue, Jinghui Yang, Lizhi Wang, Jianbin Huang, and Yun Yan. Coordination-Triggered Hierarchical Folate/Zinc Supramolecular Hydrogels Leading to Printable Biomaterials (2018) ACS Applied Materials & Interfaces.
- Vagner R. Magri a, Michele A. Rocha a, Caroline S. de Matos a, Philippe A.D. Petersen b, Fabrice Leroux c,d, Helena M. Petrilli b, Vera R.L. Constantino. Folic acid and sodium folate salts: Thermal behavior and spectroscopic (IR, Raman, and solid-state ¹³C NMR) characterization (2022) Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy.
- Giovanni Nava, Federica Carducci, Rosangela Itri, Juliana Sakamoto Yoneda, Tommaso Bellini and Paolo Mariani. Quadruplex knots as network nodes: nanopartitioning of guanosine derivatives in supramolecular hydrogels (2019) Royal Society of Chemistry.
- Alessia Pepe, Paolo Moretti, Juliana S. Yoneda, Federica Carducci, Rosangela Itri and Paolo Mariani. Self-oriented anisotropic structure of G-hydrogels as a delicate balance between attractive and repulsive forces (2023) Royal Society of Chemistry.

- Pablo Sánchez-Cid, Mercedes Jiménez-Rosado, Alberto Romero and Víctor Pérez-Puyana. Novel Trends in Hydrogel Development for Biomedical Applications: A Review (2022) MDPI.
- Yahui Song, Jianping Gao, Xiaoyang Xu, Huilin Zhao, Ruinan Xue, Jingkuo Zhou, Wei Hong, Haixia Qiu. Fabrication of thermal sensitive folic acid based supramolecular hybrid gels for injectable drug release gels (2017) Materials Science and Engineering C.
- Tyagi A.; Penzkofer A. Fluorescence Spectroscopic Behaviour of Folic Acid. Chemical Physics 367 (2010) 83-92
- Pengyao Xing, Xiaoxiao Chu, Guangyan Du, Mingzhi Li, Jie Su, Aiyou Hao, Yuehui Hou, Shangyang Li, Mingfang Ma, Le Wu and Qiubing Yu. Controllable self-growth of a hydrogel with multiple membranes (2013) RSC Publishing.
- Pengyao Xing, Xiaoxiao Chu, Mingfang Ma, Shangyang Li and Aiyou Hao. Supramolecular gel from folic acid with multiple responsiveness, rapid self-recovery and orthogonal self-assemblies (2014) Royal Society of Chemistry.

RINGRAZIAMENTI

Giunto al termine di questo viaggio ci tengo a ringraziare tutte le persone che mi sono state vicino, la mia famiglia in primo luogo, che mi ha sempre sostenuto; ringrazio tutti i miei amici, da quelli che ci sono stati fin da quando ero bambino, ai nuovi che ho conosciuto ad Ancona durante gli anni universitari, mi ritengo fortunato ad aver trovato delle persone come voi e sappiate che ogni momento e risata che abbiamo condiviso mi ha aiutato ad alleggerire il carico che questo mio percorso ha comportato.

Ci tengo inoltre a ringraziare il professor Paolo Mariani che mi ha permesso di svolgere questa tesi presso il laboratorio di Biofisica del Dipartimento e per avermi incoraggiato anche quando i risultati tardavano ad arrivare; un grazie speciale va anche a tutto lo staff del laboratorio per la pazienza mostrata durante le giornate che noi tesisti abbiamo passato lì; in particolare ringrazio la mia correlatrice Alessia per avermi seguito durante tutto questo lavoro di tesi e per aver sopportato il mio inguaribile pessimismo cercando di trasmettermi la passione per il mondo della ricerca, mostrandosi sempre disponibile.

Grazie di cuore a tutti.

Lorenzo