



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

Corso di Laurea Magistrale in Biologia Molecolare e Applicata

Quadruplessi formati da acido folico: precipitazione e
ridissoluzione in presenza di ioni e poliammine

Quadruplex made by folic acid: precipitation and
redissolution in the presence of ions and polyamines

Tesi di Laurea Magistrale di:

Relatore:

Francesco Tavoletta

Prof. Paolo Mariani

Sessione Autunnale

Anno Accademico 2019-2020

INDICE

Scopo della tesi pag. 2

1. INTRODUZIONE

1.1 Guanosina 5'-monofosfato pag.6

1.2 Acido folico pag. 9

1.3 Sali utilizzati pag. 14

2. MATERIALI E METODI

2.1 Spettroscopia UV-Visibile pag. 18

2.1.1 Legge di Lambert-Beer pag. 24

2.1.2 Determinazione della concentrazione della sostanza pag. 27

2.1.3 Struttura generale di uno spettrofotometro UV-Visibile pag. 29

2.2 Diffrazione dei raggi X pag. 34

2.2.1 Diffrattometro a raggi X pag. 36

2.2.2 Allestimento del campione pag. 39

2.2.3 Legge di Bragg pag. 40

2.2.4 Calibrazione del diffrattometro pag. 44

2.3 Transilluminatore-UV pag. 47

2.4 Microscopio a Forza Atomica pag. 48

2.4.1 Strumentazione per analisi in AFM pag. 49

<u>2.5 Preparazione dei campioni</u>	pag. 52
2.5.1 Preparazione del folato di potassio	pag. 56
2.5.2 Preparazione delle soluzioni madre	pag. 60
<u>2.6 Preparazione dei campioni da analizzare in spettrofotometria</u>	pag. 64

3. RISULTATI SPERIMENTALI

<u>3.1 Analisi spettroscopica dei sovrantanti</u>	pag. 67
3.1.1 Analisi dei campioni in soluzione con cationi monovalenti	pag. 69
3.1.2 Analisi dei campioni in soluzione con cationi divalenti	pag. 72
3.1.3 Analisi dei campioni in soluzione con poliammine	pag. 75
<u>3.2 Analisi in diffrazione a raggi X</u>	pag. 78
3.2.1 Diffrazione a raggi X dei campioni contenenti folato e sali	pag. 79
3.2.2 Diffrazione a raggi X dei campioni con folato e sali divalenti	pag. 80
3.2.3 Diffrazione a raggi X dei campioni con folato e poliammine	pag. 82
<u>3.3 Analisi qualitativa mediante il Transilluminatore-UV</u>	pag. 86
<u>3.4 Analisi con tecniche di Microscopia a Forza Atomica</u>	pag. 90

4. DISCUSSIONE DEI RISULTATI

<u>4.1 Spettrofotometria</u>	pag. 95
<u>4.2 Diffrazione a raggi X</u>	pag. 98

<u>4.3 Transilluminatore-UV</u>	pag. 100
<u>4.4 Microscopia a Forza Atomica</u>	pag. 102
5. CONCLUSIONI	pag. 105
BIBLIOGRAFIA	pag. 108
RINGRAZIAMENTI	pag. 111

Scopo della tesi

Questa tesi ha come scopo quello di studiare e caratterizzare materiali nanostrutturati ottenuti da biomolecole capaci di assemblarsi spontaneamente in acqua. Il capostipite di queste molecole è la guanina, una delle quattro basi azotate che costituiscono il DNA e l'RNA. Mentre negli acidi nucleici lega in maniera complementare la citosina secondo lo schema di Watson e Crick, la guanina può formare legami idrogeno complementari con altre tre guanine secondo una geometria detta di Hoogsteen. Il risultato è la costruzione di tetrameri planari (detti G-quartets o G-tetramers), a loro volta capaci di formare aggregati supramolecolari stabili a struttura elicoidale (G-quadruplex).

Questa particolare caratteristica della guanina è stata osservata nelle regioni ricche di G del DNA (come ad esempio le regioni telomeriche) o in alcuni promotori oncogeni. Tuttavia, è sorprendente notare come il fenomeno del self-assembly in G-quartets si verifica anche nel caso del singolo nucleotide fosfato (guanosina 5'-monofosfato o GMP) quando viene sciolto in acqua.

L'osservazione della GMP in acqua mostra che, già in condizioni diluite, si ha la formazione di questi tetrameri che, a causa delle loro caratteristiche anfifiliche, tendono a impilarsi gli uni sugli altri sino a formare lunghe strutture cilindriche pur trovandosi in basse concentrazioni. In presenza di

ioni metallici di piccole dimensioni, come Na^+ e K^+ , le interazioni di stacking sono integrate dalla formazione di complessi tra gli ioni metallici con gli ossigeni delle guanine che si affacciano nella cavità centrale della struttura tetramerica, rendendo i cilindri molto stabili. Si noti che i tetrameri non sono impilati "in registro", ma risultano ruotati regolarmente di circa 30° l'uno rispetto all'altro a causa delle cariche negative presenti sui fosfati che si affacciano sulla superficie esterna dei quartetti (e quindi dei cilindri). La presenza di cariche negative sulla superficie del cilindro ha altri due effetti: il primo è quello di renderlo particolarmente rigido; il secondo è quello di determinare le forze repulsive di tipo idrostatico tra quadruplessi differenti, evidenziando la formazione di fasi liquido-cristalline di tipo liotropico.

All'aumentare della concentrazione di GMP, si osservano fasi colonnari di tipo colesterico ed esagonale. Recentemente, è stato dimostrato che riducendo le forze elettrostatiche repulsive tra i G-quadruplex (ad esempio sostituendo in parte molecole di GMP con molecole di guanosina G, prive dunque di cariche negative) le capacità di self-assembling rimangono praticamente inalterati. Sia la formazione dei tetrameri che quella dei quadruplessi non viene compromessa, ma in questo scenario i quadruplessi risultano più flessibili e capaci di associarsi tra loro in alcuni punti (nodi) determinando la formazione di gel fisici capaci di assorbire notevoli quantità di acqua (fino a circa il 98%

in peso). Le caratteristiche di questi idrogel, quali auto-assemblaggio, biocompatibilità, totale trasparenza, alta viscosità, elevata stabilità, reversibilità termica e adattamento a modifiche dell'ambiente (pH, temperatura, attività enzimatica, ecc..), li rendono particolarmente idonei per molte applicazioni in campo biomedico e biotecnologico.

Analogamente alla guanina, anche l'anello eterociclico pterinico della molecola dell'acido folico mostra lo stesso schema multiplo di gruppi donatori e accettori per la formazione di legami idrogeno. È stato inoltre dimostrato che i folati alcalini in acqua formano quadruplessi, seguendo lo stesso schema di auto-assemblaggio della GMP: i monomeri del folato si associano a formare tetrameri che, a loro volta, si sovrappongono l'uno sull'altro a formare strutture elicoidali. Come già osservato per la guanosina 5'-monofosfato, l'associazione in quadruplessi è seguita dalla formazione di fasi liotropiche di tipo liquido-cristallino. Lo studio delle caratteristiche strutturali e dell'effetto dei controioni sul polimorfismo non è ancora completo, e potrebbe rivelare degli aspetti particolarmente interessanti.

In questo contesto, si è voluto valutare il comportamento dei quadruplessi formati dal folato in soluzioni contenenti differenti concentrazioni di ioni monovalenti e divalenti, e di cationi trivalenti e tetravalenti organici.

Gli ioni in soluzione sono di notevole importanza, dato che da una parte determinano la stabilità (e quindi la lunghezza) delle strutture a quadrielica, mentre dall'altra interagiscono con le cariche negative presenti sulla superficie esterna della quadrielica stessa, determinando variazioni nelle interazioni laterali tra gli aggregati e dando origine a fenomeni di condensazione e precipitazione degli stessi.

In breve, i quadruplessi in soluzione si comportano da elettroliti, determinando accumulo di controioni positivi attorno alla loro superficie esterna (la cosiddetta condensazione atmosferica), che tendono a ridurre la carica netta e quindi le forze repulsive di tipo elettrostatico che controllano le interazioni laterali tra le quadrieliche.

All'aumentare della concentrazione di controioni in soluzione si assiste ad un processo particolare: ad un valore soglia di forza ionica si osservano fenomeni di condensazione (precipitazione) spontanea delle quadrieliche, che porta ad un fenomeno di ridissoluzione dovuto al raggiungimento di un'elevata concentrazione di ioni divalenti, che causa di una inversione di carica.

Risultati molto particolari sono stati ottenuti utilizzando poliammine organiche. L'analisi è stata condotta mediante l'ausilio di due tecniche principali: la spettrofotometria UV-Vis e la diffrazione dei raggi X. Nel primo caso è stato possibile determinare le curve di precipitazione delle quadrieliche

di folati al variare della concentrazione di sali aggiunti, mentre nel secondo caso sono state analizzate le strutture delle fasi condensate e determinati i parametri di cella che li caratterizzano.

1. INTRODUZIONE

1.1 Guanosina 5'-monofosfato

La guanosina (Fig. 1.1, A) è un nucleoside composto dalla guanina (Fig. 1.2, B), una base azotata purinica, a cui è coniugato uno zucchero pentoso attraverso un legame β -N9-glicosidico.

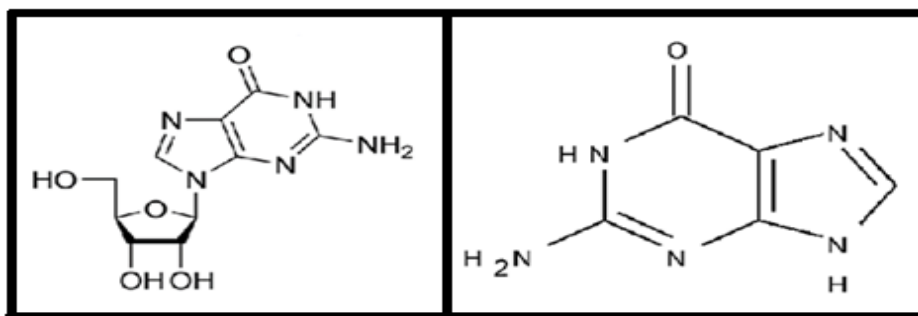


Figura 1.1: Struttura chimica della guanosina (sinistra) e della guanina (destra).

La guanosina è presente sia nel RNA che nel DNA appaiata con la citosina secondo le interazioni di Watson-Crick attraverso tre legami a idrogeno (Fig. 1.2). A causa del suo legame con lo zucchero, la guanosina è molto più solubile in acqua della guanina.

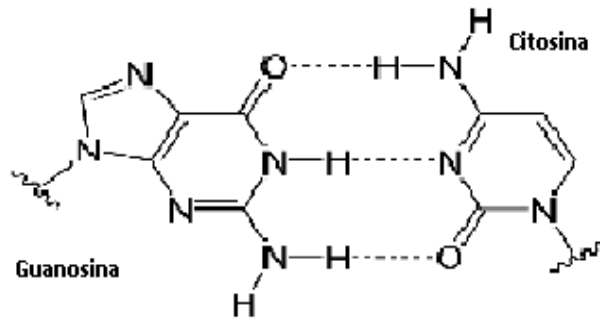


Figura 1.2: Legame tra guanosina e citosina.

La guanosina 5'-monofosfato (o GMP) (Fig. 1.3) è un nucleotide derivato della guanina e possiede capacità autoassemblanti nel formare strutture più complesse (G-quartets).

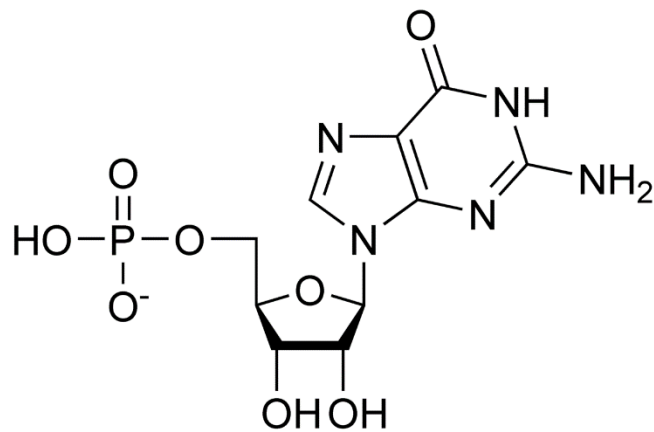


Figura 1.3: Guanosina 5'-monofosfato (GMP).

Precedenti studi hanno permesso di comprendere la natura e le capacità auto-aggreganti della GMP che la distinguono dalle altre basi azotate che compongono il DNA. La GMP è in grado di formare quartetti: strutture complesse formate da quattro unità singole che si legano tra loro tramite due legami a idrogeno detti di Hoogsteen. I tetrameri formati da queste interazioni si impilano su sé stessi a loro volta formando strutture cilindriche ed elicoidali (Mariani *et al* 2009) (Fig. 1.4).

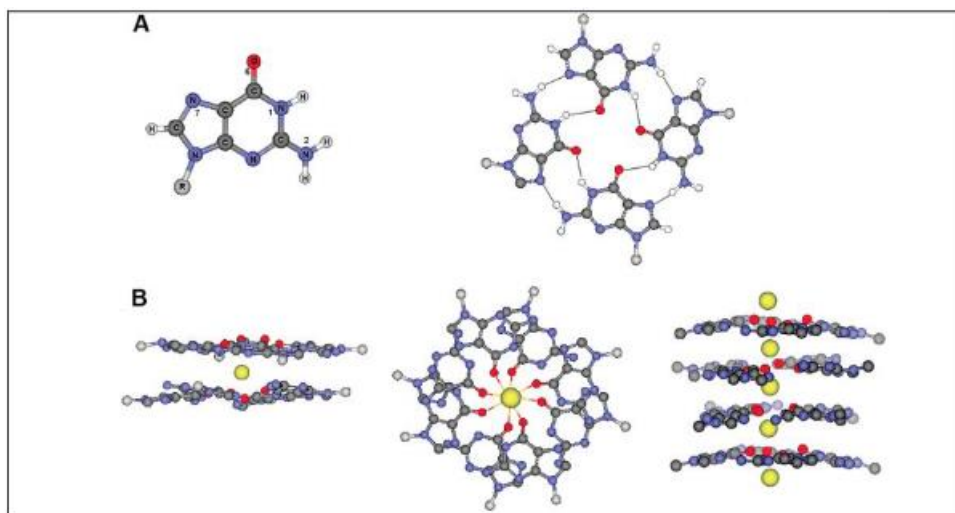


Figura 1.4: Rappresentazione del self-assembly della GMP in acqua. A) monomero (sinistra) e tetramero (destra) assemblato tramite legami di Hoogsteen. B) Impilamento di tetrameri e formazione dei quadruplessi (Mariani *et al*, 2009).

Si è osservato come, aggiungendo ioni metallici positivi (Na^+ o K^+) in una soluzione con GMP, i diversi quartetti che formano i vari quadruplessi tramite la complessazione dello ione con gli ossigeni della guanosina esposti nella

cavità centrale del tetramero si stabilizzino, portando alla formazione di lunghi cilindri (*Carducci et al. 2018*) (Fig. 1.5).

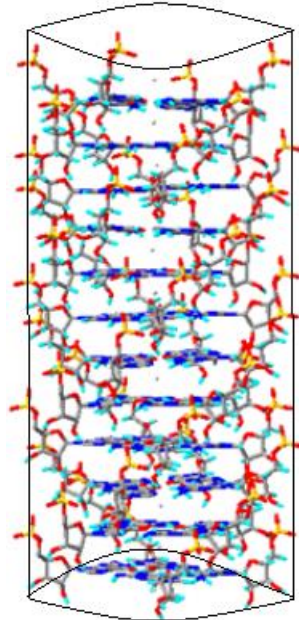


Figura 1.5: Cilindro formato da strutture tetrameriche di GMP impilate tra di loro.

I tetrameri di GMP sono impilati tramite interazioni di stacking π - π e sono ruotati di circa 30° l'uno rispetto all'altro a causa delle repulsioni delle cariche negative dei gruppi fosfato presenti all'esterno del cilindro.

1.2 Acido folico

L'acido folico è conosciuto anche con il nome di vitamina M o come acido pteroil(mono)-glutammico. È stato isolato per la prima volta dal fegato e dai

vegetali, successivamente è stato caratterizzato chimicamente (Fig. 1.6) e si è capito che costituisce un fattore di crescita importante per lo sviluppo di alcuni microrganismi in terreni di coltura. Questa vitamina è necessaria per tutte le reazioni di sintesi, riparazione e metilazione del DNA e di altre importanti reazioni biochimiche. Rappresenta dunque un fattore essenziale per il corretto svolgimento del ciclo cellulare e di alcuni meccanismi epigenetici.

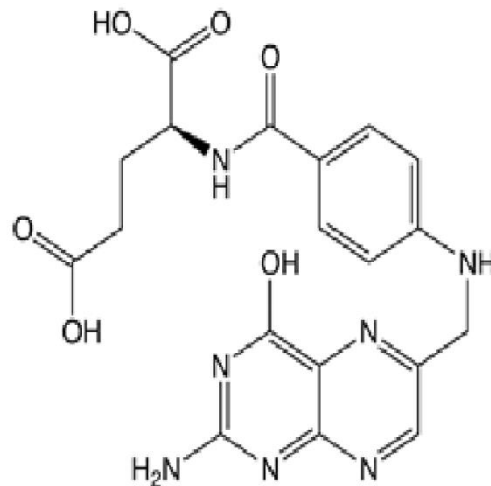
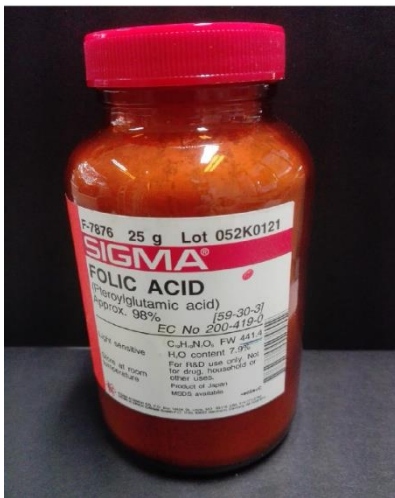


Figura 1.6: Foto dell'acido folico(sinistra) e rappresentazione molecolare dell'acido folico (destra).

L'acido folico è composto da tre molecole unite tra loro: 6-metilpterina, acido p-aminobenzoico (PABA) e acido glutammico (Fig. 1.7). La 6-metilpterina e il PABA legandosi formano una molecola di acido pterico, da cui il nome di acido pteroil(mono)glutammico a seguito del legame col glutammato.

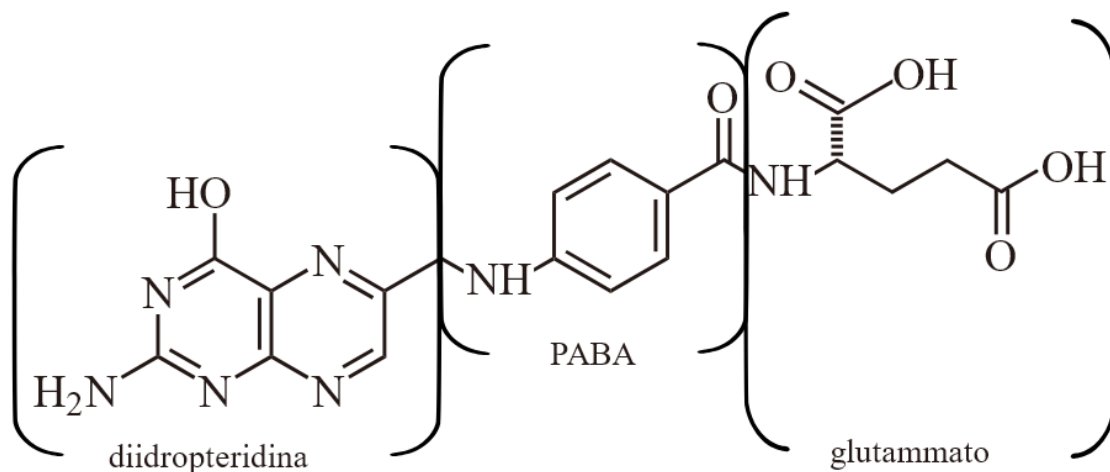


Figura 1.7: Composizione di una molecola di acido folico. L'acido pterico, formato dall'unione di una molecola di PABA con una molecola di 6-metilpterina, si unisce col glutammato per formare una molecola di acido pteroil(mono)-glutammico.

Il legame con il glutammato è essenziale per la sua attività biologica. L'acido folico viene assunto dall'organismo solamente sotto la forma di acido pteroil(mono)-glutammico. I folati intervengono nei processi metabolici coinvolti nella sintesi delle purine e della deossitimidina (dTMP), nella formazione della metionina a partire dall'omocisteina, nel catabolismo dell'istidina e nella interconversione tra glicina e serina.

I folati alcalini costituiscono l'oggetto di studio di questa tesi poiché è stato dimostrato che in acqua sono in grado di formare quartetti seguendo lo stesso

schema di self-assembly della GMP: quattro monomeri di folato si legano tra loro per formare un tetramero (Fig. 1.8) che a loro volta può impilarsi con altri tetrameri per formare una struttura cilindrica più complessa (quadruplesso). In particolare, si è voluto andare ad osservare cosa succede a questi quadruplessi quando viene aggiunto un sale, poiché gli ioni in soluzione dovrebbero svolgere una duplice funzione: stabilizzare il complesso favorendo l'allungamento del cilindro e interagire con le cariche negative esterne favorendo fenomeni di condensazione e precipitazione.

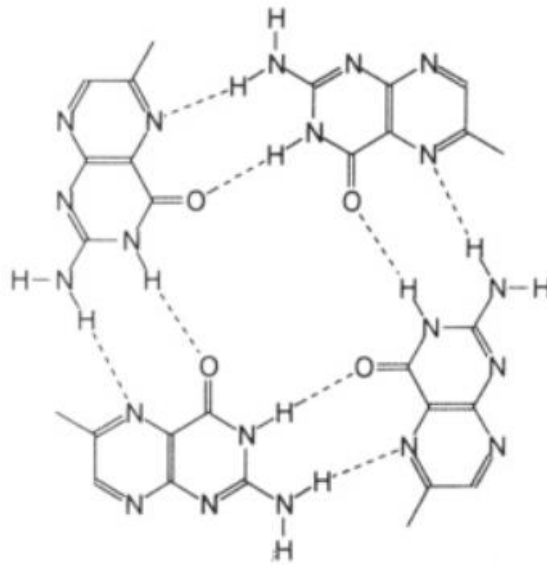


Figura 1.8: Tetramero formato da quattro monomeri di sali di acido folico (*Federica Ciuchi et al. 1994*).

L'idea di partenza è che, in seguito all'aggiunta di un sale monovalente oltre una certa concentrazione, si dovrebbe osservare un fenomeno di precipitazione di questi quadruplessi, dato dall'annullamento di alcune delle cariche negative esposte sulla superficie esterna dei cilindri (che porta ad una diminuzione delle forze repulsive tra cilindri) e dall'azione stabilizzante del sale sui tetrameri (che porta all'allungamento dei cilindri). Invece, in seguito all'aggiunta di un sale divalente, si dovrebbe osservare un iniziale e graduale avvicinamento e condensazione (precipitazione) dei quadruplessi dato dalla formazione di ponti salini e dalla diminuzione delle forze repulsive tra i cilindri. Oltre un certo valore soglia, il sale divalente dovrebbe saturare le cariche negative esterne dei quadruplessi portando ad un fenomeno di ridissoluzione.

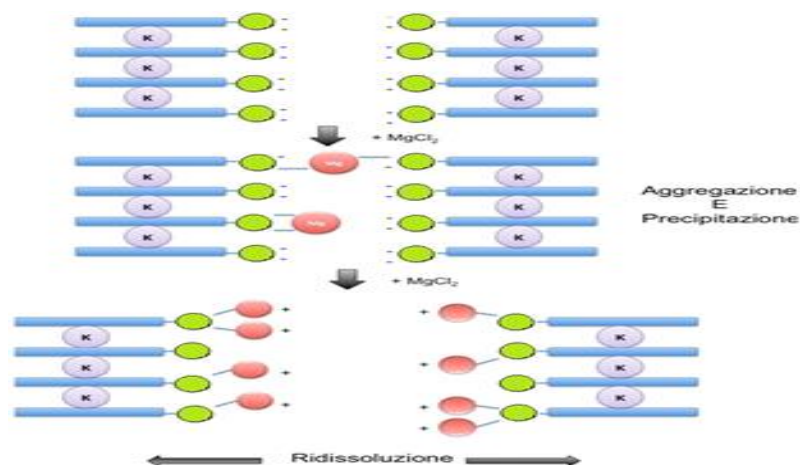


Figura 1.9: Rappresentazione schematica dell'effetto stabilizzante che lo ione monovalente K⁺ ha sui tetrameri che formano i quadruplessi di folato (in alto). Rappresentazione schematica dell'azione aggregante del magnesio (sale divalente) in basse concentrazioni (centro). Rappresentazione schematica dell'azione disaggregante del sale divalente in alte concentrazioni (in basso).

1.3 Sali utilizzati

Come già accennato, per lo studio dell'aggregazione e precipitazione dei quadruplessi di folato sono state utilizzate quattro tipologie di sali: monovalenti, divalenti, trivalenti e tetravalenti. I sali scelti non sono stati selezionati casualmente, infatti ci si è basati su studi precedentemente effettuati su quadruplessi in soluzione di GMP che precipitavano con l'aggiunta in determinate concentrazioni di questi sali.

Per i sali monovalenti sono stati utilizzati KCl e NaCl (Fig. 1.10) poiché studi passati hanno dimostrato che questi sali, presenti in determinate concentrazioni (2.0 M e 2.12 M), causano la precipitazione dei G-quadruplex, fino ad avere soltanto metà della GMP iniziale in soluzione.

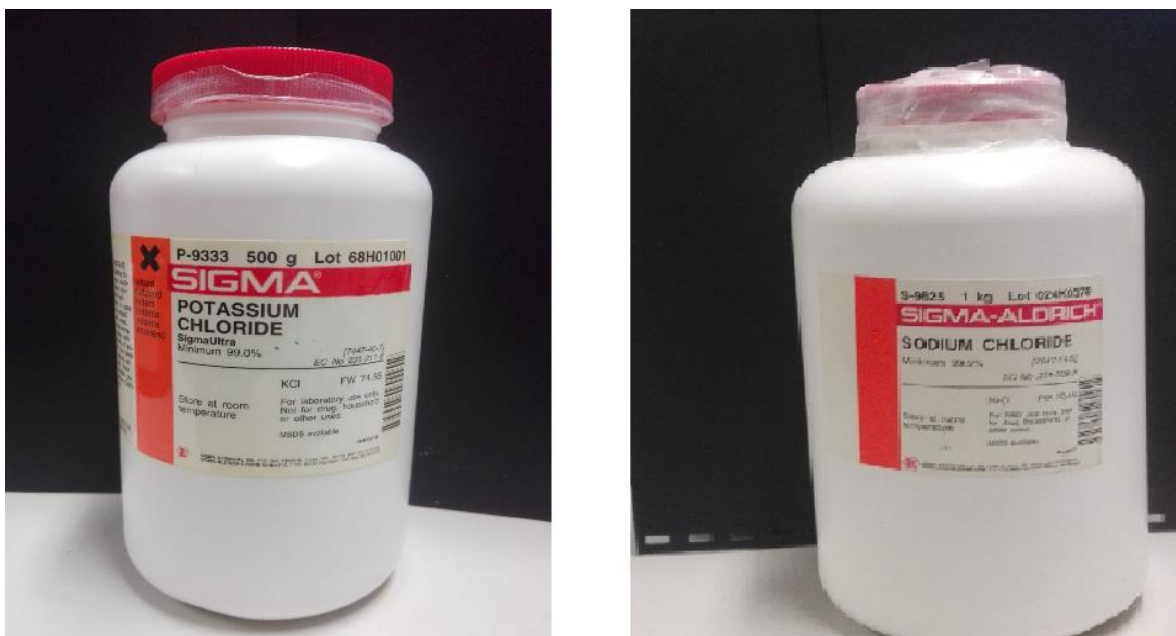


Figura 1.10: Cloruro di potassio (sinistra) e cloruro di sodio (destra) utilizzati per gli esperimenti di precipitazione.

Per i sali divalenti invece, si è scelto di utilizzare MnCl_2 ; MgCl_2 e CaCl_2 (Fig. 1.11). Bisogna precisare che studi passati effettuati sui G-quadruplex hanno dimostrato che i cationi divalenti hanno dimensioni tali da non permettere loro di entrare all'interno della cavità dei quadruplessi in soluzione (cosa che invece accade con i sali monovalenti), dunque rimangono in superficie andando a spegnere le cariche negative esposte sulla parte esterna dei quadruplessi. A causa della loro natura, i sali divalenti possono andare a saturare due cariche situate su di un unico G-quadruplex o possono legare due di questi ultimi andando ad agire sulla carica di uno e sulla carica dell'altro, determinando così fenomeni di condensazione e ridissoluzione (Fig. 1.10).



Figura 1.11: Cloruro di calcio (sinistra), di magnesio (centro) e di manganese (destra).

Per quanto riguarda i sali tri- e tetravalenti, sono stati utilizzati rispettivamente spermidina tri-idrocloridica e spermina tetra-idrocloridica (Fig. 1.12).

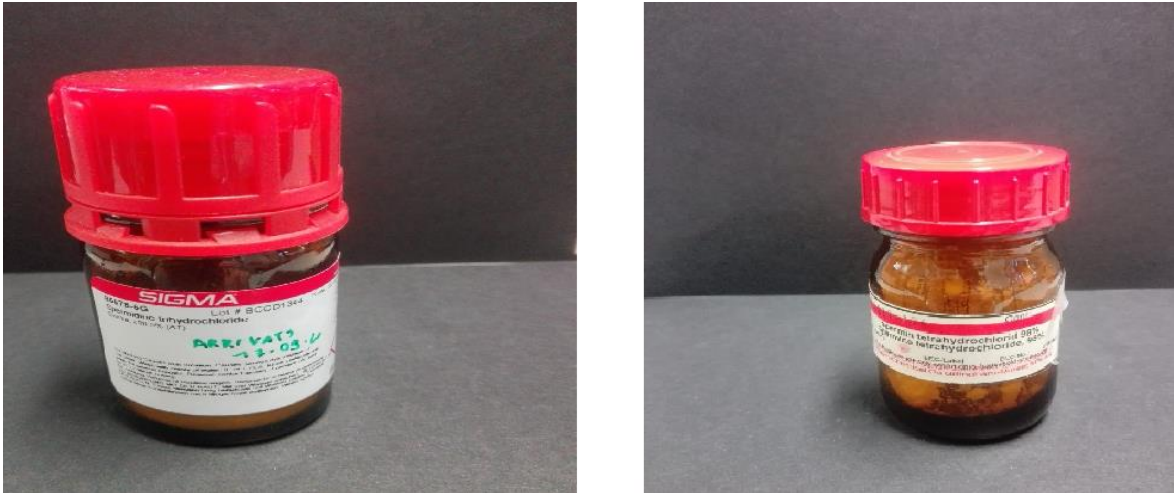


Figura 1.12: Spermidina tri-idrocloridica (sinistra) e spermina tetra-idrocloridica (destra).

Questi due sali appartengono alla classe delle poliammine e quindi si tratta di composti organici. Il loro nome deriva dal fatto che sono stati isolati all'interno dello sperma umano. La spermidina a pH fisiologico è interamente protonata e, pertanto, in grado di legare macromolecole che, a pH fisiologico, si presentano in stato di polianioni come il DNA, dando così origine a interazioni ioniche. La spermina si forma a partire dalla spermidina per addizione di un gruppo amminopropilico grazie all'azione dell'enzima spermina sintasi. A valori di pH inferiori a dieci la spermina ha almeno un

azoto protonato, mentre a pH fisiologico ha tutti gli azoti protonati (policatione). L'utilizzo di questi sali si basa su studi passati che hanno confermato che entrambi sono in grado di legare e far precipitare il DNA. L'idea di base è che, siccome il DNA è composto anche da guanosine, e i folati, come già accennato, presentano caratteristiche biofisiche equiparabili alla GMP, queste sostanze dovrebbero essere in grado di legare e far precipitare anche i quadruplessi in soluzione di folato. La natura policationica di questi sali avvalorata ulteriormente la tesi secondo la quale potrebbero legare i quadruplessi di folato, seguendo un comportamento simile a quello già osservato dai sali divalenti con i quadruplessi di GMP.

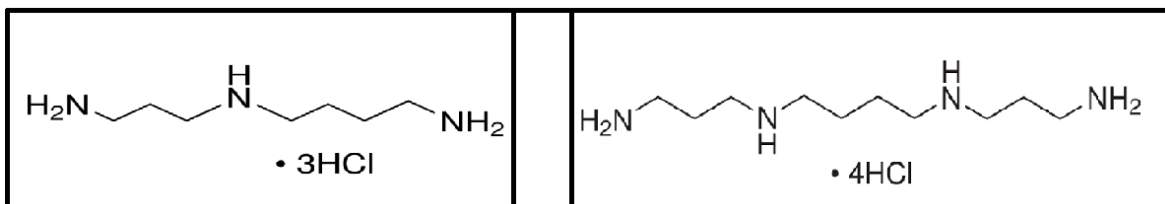


Figura 1.13: Rappresentazione molecolare della spermidina tri-idrocloridica (a sinistra) e della spermina tetra-idrocloridica (a destra).

2. MATERIALI E METODI

Il lavoro in questa tesi è stato svolto principalmente tramite l'utilizzo di due tecniche per l'analisi dei campioni preparati: la spettroscopia UV-Vis e la diffrazione dei raggi X. La spettroscopia UV-Vis è stata applicata per comprendere a quali concentrazioni di sali, il folato forma aggregati, precipita e risolubilizza. La diffrazione a raggi X invece, è stata utilizzata per misurare la distanza interassiale tra i quadruplessi, determinando i corrispettivi parametri di cella.

Si è voluto osservare inoltre l'eventuale presenza di fluorescenza dei campioni folato + sale, tramite l'utilizzo di un trans-illuminatore UV, dal momento che studi passati hanno dimostrato che l'acido folico emette fluorescenza a determinati pH (A. Tyagi, A. Penzkofer, 2009).

Visti i risultati molto interessanti ottenuti con l'aggiunta dei sali organici tri- e tetraivalenti, si è voluta effettuare un'ulteriore analisi tramite microscopia a forza atomica, per osservare più da vicino i quadruplessi formati in quelle condizioni.

2.1 Spettroscopia UV-Visibile

Le tecniche spettroscopiche basano il loro funzionamento sullo scambio di energia che si verifica fra l'energia elettromagnetica emessa e la materia. La spettrofotometria di assorbimento si interessa ai fenomeni di assorbimento

delle radiazioni luminose della regione dello spettro elettromagnetico, appartenenti al campo del visibile (350-700 nm) e del vicino ultravioletto (200-300 nm). Con questa tecnica è possibile analizzare anche l'assorbimento nell'UV lontano (10-200 nm), tuttavia in questo scenario bisogna operare sottovuoto, o in atmosfera di gas inerte, poiché l'ossigeno atmosferico, assorbendo la radiazione ultravioletta, rischia di nascondere i segnali delle sostanze in analisi. L'assorbimento di questo tipo di radiazioni da parte delle molecole è in grado di produrre delle transizioni energetiche (o transizioni di stato) degli elettroni esterni (sia che siano impiegati in dei legami o che non lo siano). Gli elettroni in questione possono essere di tipo sigma (σ) o di tipo pi-greco (π). Nel primo caso costituiscono una nube elettronica addensata lungo l'asse di unione dei nuclei degli atomi interessati al legame, si tratta degli elettroni implicati nei legami semplici. Gli elettroni di tipo pi-greco (π), sono a maggior densità elettronica dei primi e sono situati al di fuori dell'asse di unione dei nuclei (come accade nei legami doppi o tripli).

Gli elettroni di tipo π sono "meno legati" degli elettroni σ poiché i legami doppi e tripli sono meno rigidi dei legami singoli (che necessitano di un maggior apporto energetico per poter essere sciolti), perciò questo tipo di elettrone è più facilmente eccitabile rispetto alla tipologia σ .

La λ necessaria per la transizione di stato (Fig. 2.1) è tanto maggiore quanto minore è il dislivello energetico. Se poi in una molecola sono presenti doppi legami coniugati, si verifica una delocalizzazione elettronica che porta ad una diminuzione energetica tra un livello e l'altro. Ciò vuol dire che per effettuare transizioni di stato occorreranno radiazioni di minor energia, quali ad esempio quelle nel campo visibile.

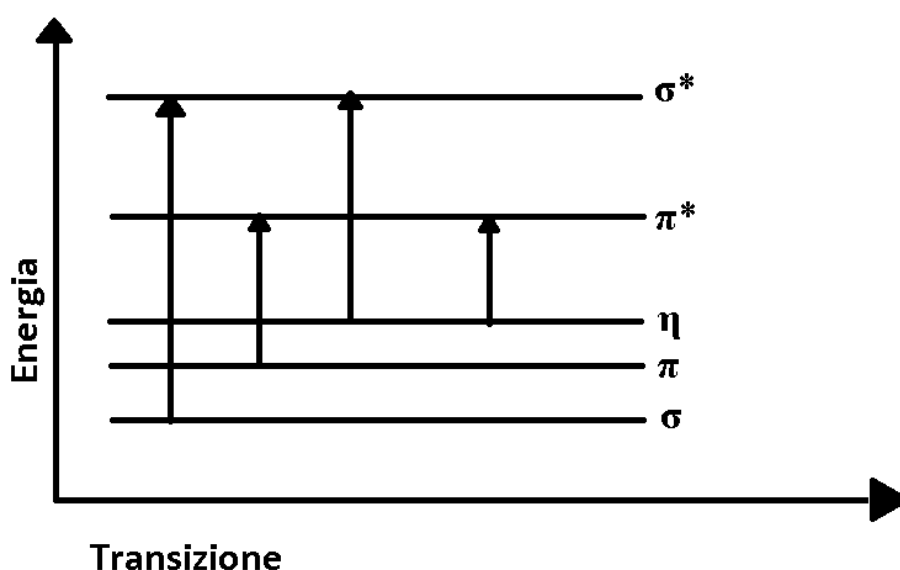


Figura 2.1: Tipologie di transizione di stato.

Solitamente, sono proprio gli elettroni delocalizzati ad entrare in gioco nella spettroscopia di assorbimento, ad esempio quelli che partecipano al legame π nel doppio legame $C=C$ e quelli del doppietto libero dell'azoto e dell'ossigeno.

Gli spettri nel visibile sono dovuti dagli elettroni di tipo π più o meno ampiamente delocalizzati. Tale delocalizzazione può essere estesa su tutta la molecola, oppure può risultare limitata a determinate regioni, separate fra loro all'interno della molecola da un insieme di legami saturi che fungono da isolante e che quindi impediscono la delocalizzazione. Nel primo caso lo spettro di assorbimento è unico e difficilmente interpretabile secondo regole semplici; nel secondo caso, invece, può essere considerato come la somma degli assorbimenti dovuti ai vari gruppi insaturi che vengono chiamati "cromofori". Per "cromoforo" si intende un raggruppamento chimico insaturo, responsabile di un assorbimento situato nella regione delle lunghezze d'onda comprese tra 180 e 1000 nm. I cromofori più semplici sono i gruppi etilenici, acetilenici, carbonilici e carbossilici.

Per effettuare analisi qualitative si fa uso di raggi policromatici a spettro continuo separati, tramite monocromatori nelle varie componenti (diventando radiazioni monocromatiche). In pratica, le singole radiazioni monocromatiche di tale raggio vengono fatte passare una alla volta attraverso la sostanza in esame, la quale assorbirà in modo diverso (con diversa intensità) le diverse radiazioni. Riportando i valori registrati in un grafico lunghezza d'onda/assorbimento, si ottiene lo spettro di assorbimento della sostanza esaminata. Ogni sostanza possiede il proprio spettro di assorbimento, come se

fosse un'impronta digitale che può distinguerla da tutte le altre in soluzione. L'identificazione avviene tramite l'esame degli spettri, che dovranno essere confrontati tramite banche dati degli stessi, o valori noti della sostanza esaminata. Sempre secondo questo principio, è possibile controllare anche il grado di purezza di una sostanza con uno spettro di assorbanza già noto. Date le difficoltà di avere raggi dotati di queste proprietà, si impiegano fasci di radiazioni comprendenti una banda molto ristretta dello spettro, ossia fasci quasi monocromatici (costituiti da radiazioni di una sola frequenza). Le determinazioni quantitative si basano sul fatto che quando una radiazione attraversa una soluzione, essa viene assorbita più o meno intensamente a seconda della concentrazione. In altre parole, l'assorbimento di una sostanza dipende anche dalla sua concentrazione.

L'assorbimento appunto esprime quale frazione della luce incidente ha attraversato il campione senza essere stata assorbita, e può assumere valori compresi tra 0 e 1. Tale rapporto è tanto più piccolo quanto maggiore è stato l'assorbimento.

Appositi dispositivi (i rilevatori) sono in grado di misurare l'intensità di flusso luminoso: viene misurata l'intensità del flusso luminoso all'ingresso della

cella con il campione (I_0) e l'intensità del flusso luminoso all'uscita della cella con il campione (I).

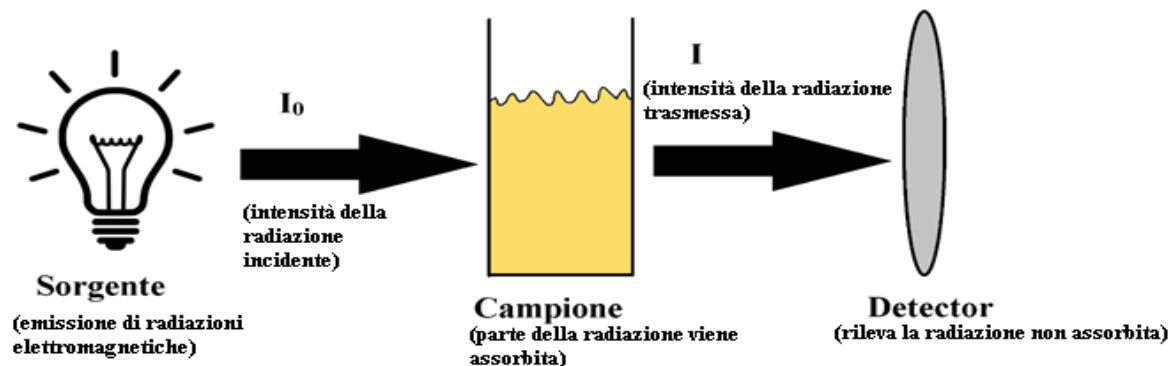


Figura 2.2: Rappresentazione schematica di come avviene la rilevazione di assorbanza all'interno di uno spettrofotometro.

Il rapporto tra l'intensità del raggio uscente e quella del raggio entrante viene chiamato trasmittanza:

$$T = \frac{I}{I_0}$$

Questa grandezza esprime quale frazione della luce incidente (I_0) ha attraversato il campione senza essere assorbita. T può assumere valori tra 0 e 1. La trasmittanza quasi sempre è espressa in percentuale, assumendo valori compresi tra 0 e 100. Quando:

$$T\% = 100$$

significa che il raggio non ha subito alcun indebolimento, cioè non vi è stato alcun assorbimento da parte del campione (I coincide con I_0). Quando invece si ha:

$$T\% = 0$$

significa che il raggio è stato completamente assorbito ($I = 0$).

Altra grandezza di fondamentale importanza è l'assorbanza, conosciuta anche come densità ottica o estinzione:

$$A = -\log T$$

Trasmittanza, trasmittanza percentuale e assorbanza sono valori adimensionali (senza unità di misura).

2.1.1 Legge di Lambert-Beer

La legge di Lambert-Beer (o legge dell'assorbimento) afferma che, utilizzando una cuvetta contenente una sostanza in soluzione attraversata da un raggio di luce monocromatica, si ha:

$$A: \varepsilon * b * C$$

Dove:

A= assorbanza (valore adimensionale)

ε = coefficiente di assorbimento molare, caratteristico della sostanza ($\frac{L}{mol \times cm}$)

b = cammino ottico della cuvetta, cioè il suo spessore (cm)

C = concentrazione molare della sostanza ($\frac{mol}{L}$)

Questa legge descrive i fenomeni di assorbimento delle radiazioni elettromagnetiche ed è valida quando si utilizzano radiazioni monocromatiche

e soluzioni diluite. L'equazione di Lambert-Beer rappresenta graficamente una retta passante per l'origine degli assi, in cui il coefficiente angolare è rappresentato dal prodotto: $\epsilon * b$ (Fig. 2.3).

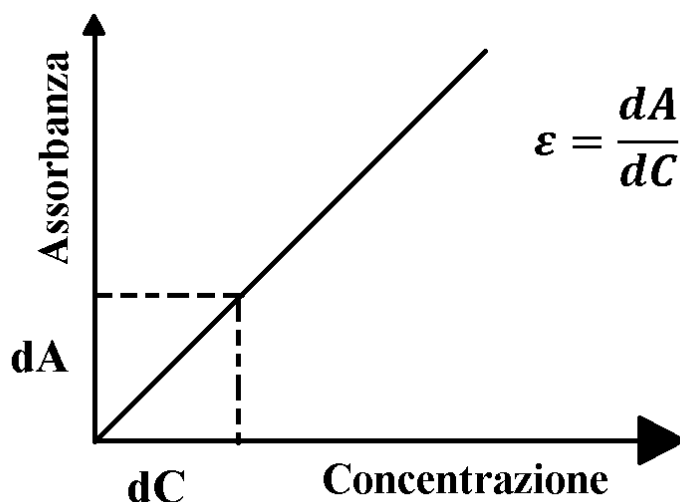


Figura 2.3: Rappresentazione grafica della retta designata dall'equazione di Lambert-Beer. Per un cammino ottico unitario (1 cm), il coefficiente angolare corrisponde proprio al coefficiente di estinzione molare ϵ .

L'assorbanza risulta essere direttamente proporzionale alla concentrazione di soluto, perciò all'aumentare di essa è probabile che si verifichino notevoli deviazioni della misurazione, ottenendo un dato analitico di scarsa attendibilità. Per spiegare le cause che provocano queste deviazioni sono state formulate diverse ipotesi, quella più accreditata afferma che all'aumentare della concentrazione aumenta il numero di particelle in soluzione. In questo scenario si osserva anche un aumento del numero di urti fra queste particelle. Le forze interioniche e/o intermolecolari aumenterebbero portando alla

formazione di molecole (o aggregati) di particelle più complesse e con strutture diverse da quelle iniziali in esame, per cui si potrà avere una deviazione del massimo di assorbimento.

Per lavorare in queste condizioni è richiesto che le soluzioni con all'interno il campione, siano estremamente diluite compatibilmente con la sensibilità dello strumento. Questa diluizione ha come obiettivo quello di poter ottenere dei valori accettabili di assorbanza.

Bisogna tenere a mente che all'aumentare della concentrazione si ha un aumento dell'indice di rifrazione, che ha come risultato una maggiore dispersione del raggio durante l'attraversamento della soluzione stessa. Oltre a dover ottenere valori non eccessivamente elevati di assorbanza,

l'applicazione della legge di Lambert-Beer richiede che le radiazioni luminose che attraversano la soluzione con la sostanza in esame siano monocromatiche. In realtà, le radiazioni impiegate non sono mai totalmente monocromatiche a causa soprattutto di limitazioni strumentali. Per ottenere risultati corretti è sufficiente che la banda continua di radiazione centrata attorno ad un valore nominale, sia la più ristretta possibile. In certi casi si osservano anche deviazioni dovute all'instaurarsi di un equilibrio chimico sensibile al pH.

2.1.2 Determinazione della concentrazione della sostanza

La maggior parte degli strumenti sono dotati di cellule fotoelettriche, le quali producono un segnale elettrico dipendente dall'intensità luminosa che le colpisce. Il segnale prodotto viene modulato in forma elettronica da un apposito software, fino ad ottenere una lettura analogica o digitale di assorbanza e trasmittanza.

Prima di effettuare l'analisi dell'assorbanza del campione, bisogna effettuare l'azzeramento col bianco (acqua). Per risalire alla concentrazione del campione in soluzione si possono seguire diversi metodi, sempre tenendo a mente che per concentrazioni nella norma (non eccessivamente elevate) assorbanza e concentrazione sono direttamente proporzionali secondo l'equazione:

$$A: \varepsilon * b * C$$

Le strade da seguire sono principalmente due: metodo diretto e metodo della curva (retta) di lavoro. Il metodo diretto si basa sulla relazione ricavata dalla legge di Lambert-Beer:

$$C = \frac{A}{(\varepsilon * b)}$$

Essendo la dimensione della cella già nota (b) si deve disporre del valore ε relativo alla sostanza in esame. Se il coefficiente di assorbimento molare è noto grazie a precedenti esperienze o perché tabulato in letteratura, la

concentrazione della sostanza in soluzione può essere facilmente calcolata.

Quando ε non è noto, bisogna ricavarlo misurando l'assorbanza (A_0) di una soluzione a concentrazione nota (C_0):

$$\varepsilon = \frac{A_0}{(\varepsilon * b)}$$

A questo punto, una volta che si dispone sia di ε che di b , è possibile effettuare tutte le analisi che si desiderano su campioni a concentrazione incognita calcolando direttamente le concentrazioni tramite la legge di Lambert-Beer. Tuttavia, questa metodica ha come presupposto quello di dover essere certi che si stia lavorando in una situazione di proporzionalità diretta tra assorbanza e concentrazione. Se questo principio viene meno non è possibile applicare la relazione di Lambert-Beer per ricavare la concentrazione del campione in soluzione.

Il metodo della curva (o retta) di taratura viene utilizzato quando non si è certi delle condizioni di proporzionalità diretta tra A e C . Si inizia preparando un certo numero di soluzioni contenenti la sostanza in esame a diverse concentrazioni note, poi viene misurata la loro assorbanza. In seguito alle misurazioni, si avranno una serie di valori di concentrazione (C_1 ; C_2 ; C_3 ; ecc...) associati ai rispettivi valori di assorbanza (A_1 ; A_2 ; A_3 ; ecc...). riportando questi valori all'interno di un grafico cartesiano, si ottiene la curva (o retta) di taratura (Fig. 2.4):

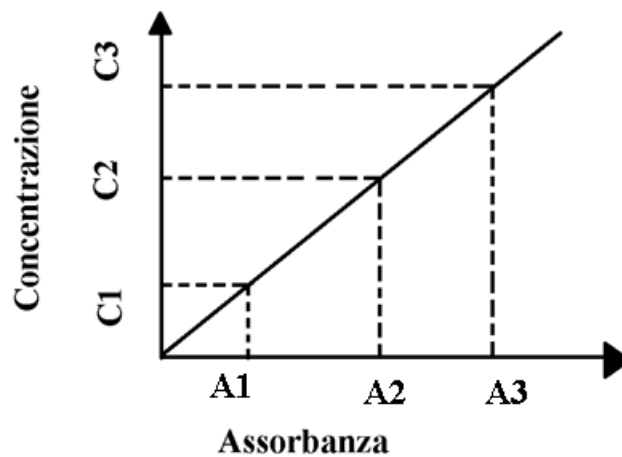


Figura 2.4: Modello di una retta di taratura.

Se la sostanza in esame segue la legge di Lambert-Beer, la curva che si ottiene è una retta. Una volta ottenuta la retta di taratura, essa viene utilizzata per soluzioni di qualsiasi concentrazione, a condizione che siano comprese nell'intervallo in cui la retta è stata tracciata.

2.1.3 Struttura generale di uno spettrofotometro UV-Visibile

Per effettuare gli esperimenti di spettrofotometria UV-Vis è stato utilizzato uno spettrofotometro da banco (Fig. 2.5).



Figura 2.5: Spettrofotometro da banco utilizzato nel lavoro di tesi.

Dal punto di vista concettuale, uno spettrofotometro è formato da quattro componenti: sorgente della radiazione, fenditura d'ingresso, monocromatore, comparto celle, rivelatore e sistema di elaborazione e presentazione dei dati.

La sorgente della radiazione è l'elemento dello strumento adibito alla generazione della radiazione policromatica (formata da tutte le lunghezze d'onda) che viene diretta sulla cuvetta contenente il campione. Negli strumenti che misurano la luce ultravioletta e visibile sono presenti due diverse lampade, in modo che la sorgente copra un intervallo di lunghezze d'onda che va da 190 nm a 800 nm. Per la regione del visibile si utilizzano lampade a incandescenza (filamento di tungsteno, quarzo-iodio o tungsteno-alogeno) mentre per la regione UV si utilizzano lampade a scarica in un gas (deuterio o idrogeno). Queste ultime sono lampade costituite da un'ampolla di quarzo contenente il gas rarefatto nella quale viene attivata, tra due elettrodi,

una scarica elettrica che causa un'emissione di radiazione con spettro continuo. Gli spettrofotometri UV-Visibile sono dotati di queste due lampade che vengono opportunamente intercambiate dal meccanismo interno. Il valore di "cambio lampada" è solitamente intorno a 350 nm.

Subito dopo la sorgente di radiazione, si trova la fenditura d'ingresso associata a lenti e/o specchi. Questo strumento ha il compito di rendere paralleli i raggi emessi ed evitare luce diffusa nello strumento.

Superata la fenditura d'ingresso, la radiazione arriva a contatto con il monocromatore, un sistema ottico utilizzato per disperdere la luce policromatica in bande monocromatiche, che vengono inviate in successione sul campione. Esistono due tipologie di monocromatori: basati su filtri o su di un elemento disperdente. I filtri possono essere ottici o interferenziali ed hanno il compito di bloccare una parte della luce lasciando passare solo la radiazione desiderata. I filtri ottici contengono opportune sostanze che assorbono gran parte delle radiazioni visibili lasciando solo la banda desiderata, cioè un certo intervallo di lunghezze d'onda con un ampio spettro di 250 nm. I filtri interferenziali si basano su di un fenomeno tipicamente ondulatorio: l'interferenza. Questa, causa rafforzamenti o indebolimenti tra le due radiazioni che si sommano a seconda che siano o meno in fase tra loro. Il prisma è in grado di disperdere le radiazioni con diversa lunghezza d'onda (λ)

grazie al fenomeno della rifrazione: quando un raggio di luce attraversa un mezzo, subisce una deviazione di un angolo inversamente proporzionale alla λ grazie al fenomeno della radiazione. Radiazioni con diversa λ subiscono diversa deviazione. I reticoli svolgono la stessa funzione del prisma, ma il loro funzionamento è basato sul fenomeno della riflessione. Sono costituiti da serie di solchi o fenditure parallele tracciati su di una superficie lucida a distanza ravvicinata: il fenomeno è quello che si osserva guardando obliquamente la superficie di un CD.

La cella è la componente destinata a contenere il campione da esaminare; questo generalmente in soluzione, viene introdotto in questi contenitori che sono chiamati cuvette. Oltre ad essere trasparenti alla radiazione impiegata, le cuvette devono avere un cammino ottico ben preciso. Per cammino ottico si intende la lunghezza percorsa dalla radiazione nel campione che dovrà essere sufficiente ad avere assorbimenti rilevabili dallo spettrofotometro.

In UV si utilizzano celle in quarzo (SiO_2). Nel visibile si utilizzano celle in vetro, quarzo o alcuni materiali plastici.

Il rivelatore rappresenta il dispositivo finale dello strumento, capace di produrre un segnale elettrico che dipende dall'energia delle radiazioni che lo investono. Tale segnale elettrico (proporzionale all'intensità luminosa) viene poi trasferito ad un indicatore analogico o elaborato per via elettronica in

modo più o meno complesso. Trattandosi della parte dello strumento che esegue la misura vera e propria, rappresenta una delle componenti principali, in particolare per quanto riguarda sia la sensibilità che l'accuratezza dello spettrofotometro. In UV-Vis si possono utilizzare tre tipologie di rivelatori: celle fotovoltaiche e fotoconduttive, fototubi e fotomoltiplicatori e fotodiodi. Le celle fotovoltaiche e fotoconduttive possiedono dei semiconduttori che generano ai loro capi una d.d.p. direttamente proporzionale all'intensità della radiazione incidente. Sono poco sensibili e non coprono tutto l'UV-Visibile, tuttavia sono molto resistenti ed economiche. I fototubi e i fotomoltiplicatori sono basati sull'effetto fotoelettrico, che consiste nell'emissione di elettroni da parte di un materiale quando viene colpito da radiazioni luminose: il numero di elettroni emessi (misurabile per via elettrica) è proporzionale all'intensità della radiazione incidente. I fotodiodi sono microscopici circuiti su chip di silicio o germanio che variano la loro d.d.p. quando investiti da radiazioni luminose. Hanno una sensibilità inferiore ai fotomoltiplicatori, ma presentano il vantaggio di poter essere inseriti in grande numero su di un singolo chip di silicio (o germanio), presentandosi efficacemente alla costruzione di spettrofotometri a serie di diodi.

Infine, si ha il sistema di elaborazione e presentazione dei dati. Il segnale proveniente dal rivelatore viene opportunatamente amplificato e un

amperometro ne rileva l'intensità. Il lettore converte il segnale elettrico in un valore numerico proporzionale all'intensità del segnale e questo va da un valore minimo di 0 ad un valore massimo di 100. Nel caso di un valore di segnale pari a cento in assenza del campione, otteniamo la trasmittanza e da quest'ultima l'assorbanza.

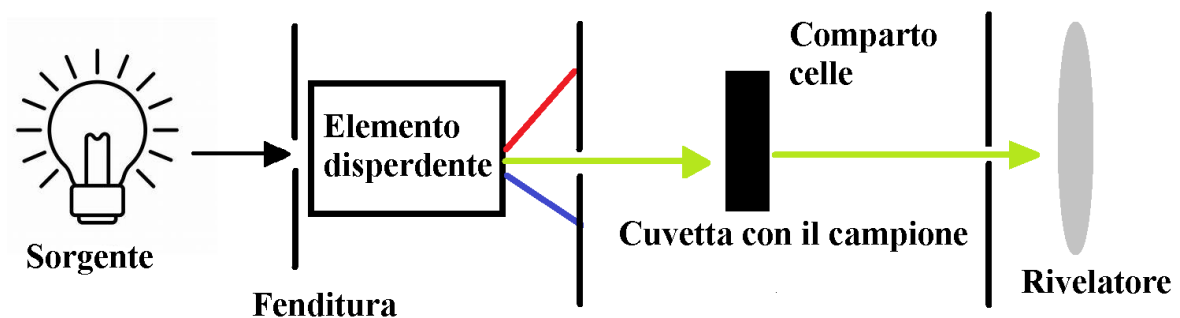


Figura 2.6: Componenti di uno spettrofotometro.

2.2 Diffrazione dei raggi X

Con il termine “diffrazione” si descrive un fenomeno che si ottiene quando delle onde (es. radiazione elettromagnetica) si propagano nello spazio e vengono deviate in seguito all'interazione con un ostacolo. La diffrattometria a raggi X è una delle tecniche più utilizzate per lo studio di strutture molecolari. Si tratta di una metodologia non distruttiva che permette la caratterizzazione strutturale del campione.

La diffrazione a raggi X utilizza la potenza di queste radiazioni elettromagnetiche chiamate così perché al momento della loro scoperta rappresentavano qualcosa di invisibile, sconosciuto. I raggi X sono delle radiazioni ad alta energia estremamente penetranti con una lunghezza d'onda compresa tra 0,01 e 10 nm, confrontabili con le distanze interatomiche dei cristalli e delle molecole.

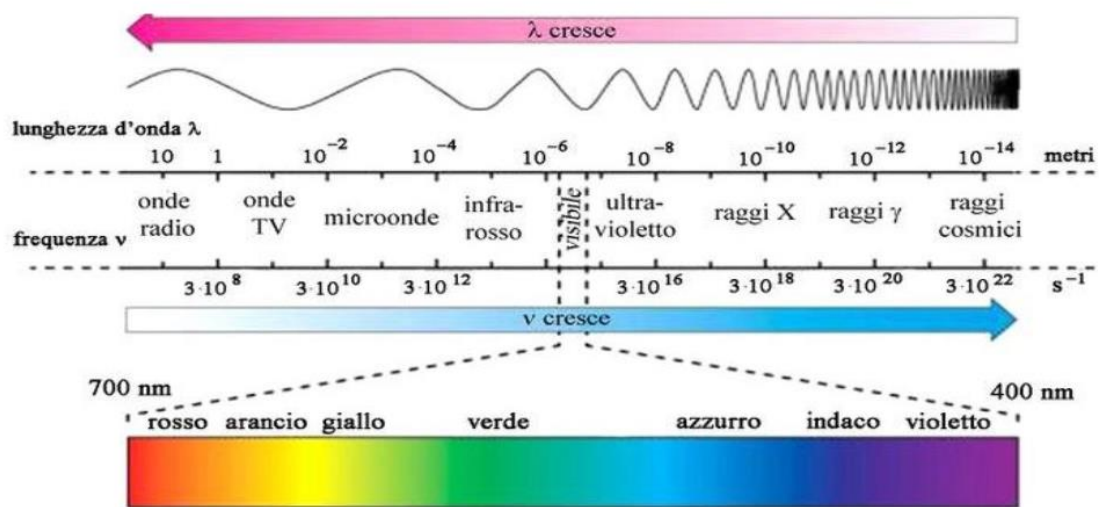


Figura 2.7: Spettro elettromagnetico.

Questi raggi sono prodotti quando un fascio di elettroni viene fermato da un bersaglio, la forte decelerazione determina un'emissione di onde elettromagnetiche con spettro continuo. Attraverso la cristallografia dei raggi X si può determinare la struttura terziaria di proteine o acidi nucleici con una risoluzione minore di 3 \AA . Per sistemi meno ordinati, come fibre o aggregati

lipidici, la diffrazione dei raggi X fornisce informazioni strutturali utili. Per macromolecole biologiche in soluzione, la diffusione a piccolo angolo dei raggi X permette di ottenere informazioni sulla forma e le dimensioni delle particelle. I raggi X vengono fortemente adsorbiti dalla materia e interagiscono con gli elettroni del materiale, tramite un'interazione proporzionale al numero atomico dell'elemento. La radiazione elettromagnetica interagisce con la materia e viene rifratta cambiando direzione a seconda delle caratteristiche dell'oggetto. Ciò che accade è semplicemente una modificazione della propagazione dell'onda incidente.

2.2.1 Diffratometro a raggi X

Lo strumento utilizzato per l'analisi si presenta come un lungo tubo costituito da un generatore di raggi X e altri importanti componenti. La sorgente dei raggi X contiene un filamento di tungsteno (anodo, elettrodo positivo) all'interno del quale passa la radiazione elettromagnetica, il tutto posto in un sistema in cui è presente il vuoto. Stimolando un'elevata differenza di potenziale tra l'anodo e il catodo, viene generato un campo elettrico che accelera gli elettroni. Gli elettroni, avendo carica negativa, si spostano in direzione dell'anodo subendo deviazioni delle loro traiettorie con perdita di una parte della loro energia, che viene emessa sotto forma di raggi X. Gli

elettroni si irradiano in tutto lo spazio tra anodo e catodo e fuoriescono tramite delle finestre laterali ortogonali tra loro costituite da berillio.

Dopo la sorgente del fascio di elettroni si trova il monocromatore, componente utile per selezionare un fascio monocromatico con una determinata lunghezza d'onda.

Successivamente troviamo un sistema di lenti posto in prossimità del campione per permettere la ricostruzione della sua struttura secondo lo stesso principio della microscopia.

A seguire si ha una lastra in piombo che impedisce al fascio di raggi X diretto di giungere al detector: beamstop.

Infine, si ha il detector che cattura la radiazione diffratta dal campione entro un certo range di angoli.

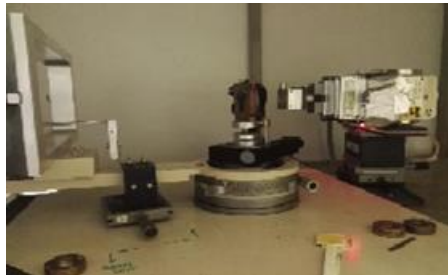


Figura 2.8: Foto del diffrattometro presente nel laboratorio di biofisica del DISVA (destra).

Come risultato finale viene generata un'immagine 2D costituita da spot luminosi, dati dall'interferenza tra fascio e campione. La distanza tra ciascun cilindro è misurata tenendo conto della legge di Bragg e quindi della formula:

$$q = \frac{4\pi * \sin\theta}{\lambda}$$

Nel momento in cui la radiazione λ espressa con il modulo k_i interagisce con gli elettroni del sistema, si verifica un'interazione elastica. Il raggio diffratto dal campione si presenta con modulo pari a k_s (Fig. 2.9).

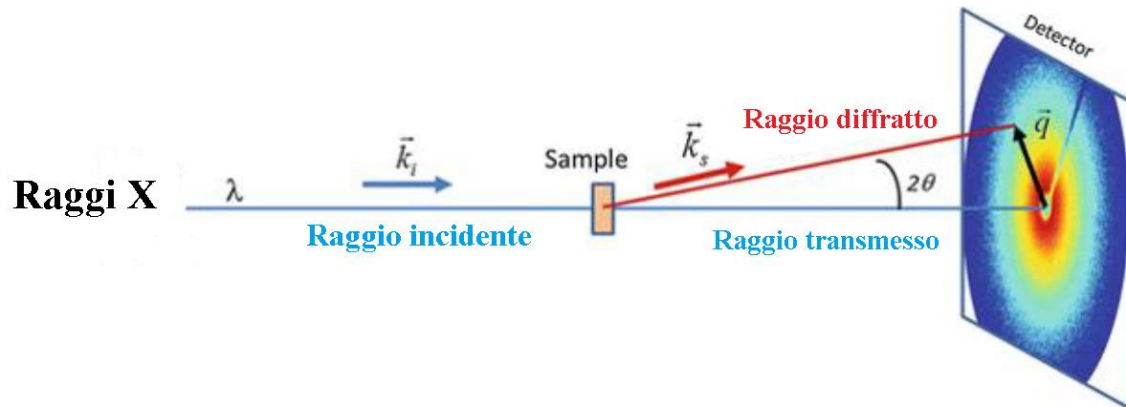


Figura 2.9: Modalità della diffrazione a basso angolo.

La differenza tra il raggio scatterato (diffratto) e quello incidente dà vita al vettore q , dipendente dall'ampiezza dell'angolo compreso tra essi (2θ).

Quindi si ha che:

$$q = k_s - k_i$$

È importante che la densità elettronica degli atomi del campione (ρ) che vogliamo studiare sia diversa da quella del solvente nel quale è posto. Se la densità fosse la stessa, le varie particelle di campione disperse nella matrice (solvente acquoso) non potrebbero essere distinte da quelle del solvente.

Questo fenomeno è chiamato contrasto ed è abbastanza intuitivo: disegnando una linea nera su di uno sfondo nero, essa non sarà percepibile, al contrario se la linea nera è disegnata su di uno sfondo bianco essa sarà nitidamente visibile.

Nel nostro esempio, la linea nera rappresenta lo scattering generato dallo scontro del fascio con le particelle del campione in analisi, mentre lo sfondo rappresenta lo scattering delle particelle del solvente in cui è sospeso il campione.

In base al grado di diluizione del campione possiamo studiarne l'orientazione delle particelle servendoci di un grafico 2D sul quale è riportata l'intensità calcolata di ognuna di esse.

2.2.2 Allestimento del campione

Il campione viene inserito all'interno di uno slot di ottone (Fig. 2.10), precisamente all'interno di un disco di teflon forato al centro, dallo spessore di un millimetro che viene racchiuso tra due foglietti di mylar. Questi foglietti, che racchiudono il disco di teflon contenente il campione, sono a

loro volta protetti da due dischetti di alluminio. Le due componenti in ottone dello slot vengono chiuse e sigillate da quattro viti per evitare la disidratazione del campione.

Una volta assemblato, lo slot viene posto in una fessura in cui il campione viene raggiunto dai raggi X. All'interno della camera in cui è posto il campione è generato il vuoto necessario per mantenere un background a basso angolo.



Figura 2.10: Singoli costituenti dello slot (sinistra) e slot assemblato (destra).

2.2.3 Legge di Bragg

Quando gli elettroni del campione vengono a contatto con i raggi X, iniziano ad oscillare diventando a loro volta una sorgente di raggi X. Così facendo, iniziano ad irradiare in tutte le direzioni. I raggi X generati dagli atomi che compongono il campione irradiato, devono sommarsi costitutivamente per dare un'intensità misurabile. Questo scenario viene spiegato dalla legge di Bragg (Fig. 2.11), che considera i cristalli come dei piani paralleli reticolari.

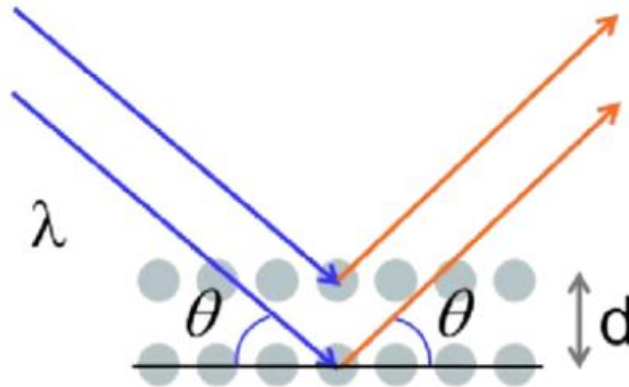


Figura 2.11: Rappresentazione schematica della legge di Bragg.

La diffrazione è a tutti gli effetti un fenomeno di scattering in cui l'interferenza dovuta all'interazione dei raggi X con il reticolo cristallino può essere costruttiva o distruttiva. Quando le radiazioni generate sono in fase e si sommano, l'interazione è costruttiva, se invece le radiazioni si trovano in fasi differenti, si dicono distruttive.

La diffrazione si verifica quando viene soddisfatta la condizione di Von Laue, che indica la relazione tra l'interferenza di tipo costruttivo e la distanza degli atomi all'interno di un cristallo. Questo postulato è descritto dalla legge di Bragg:

$$\lambda = 2d * \sin\theta$$

Dove:

λ = lunghezza d'onda della radiazione incidente

d = distanza tra i piani del reticolo atomico

θ = angolo formato tra il fascio incidente e i piani

Ponendo il campione davanti a un detector, si ottiene un segnale in una posizione legata all'angolo di diffrazione. In realtà il fascio non viene deviato in una sola direzione, ma in più direzioni, ciascuna con angoli 2θ differenti.

La legge di Bragg può essere riscritta in funzione di $\frac{1}{d}$:

$$\frac{1}{d} = \frac{2 * \sin\theta}{\lambda} = s$$

Oppure, in funzione di Q :

$$Q = \frac{4\pi * \sin\theta}{\lambda}$$

Q è una grandezza proporzionale all'angolo di scattering (θ).

L'immagine che si otterrà al termine dell'esperimento rappresenterà l'interferenza ottenuta tra i raggi X e il campione. Questo segnale viene rappresentato graficamente tramite dei picchi di diffrazione su di un diagramma. Analizzando il profilo di questi picchi, è possibile individuare la loro posizione (indica la simmetria del campione tramite cui è possibile calcolare la dimensione della cella unitaria) e rilevarne l'intensità (indice dell'intensità elettronica del campione).

All'interno di uno spettro di diffrazione è possibile individuare due regioni principali: regione del basso angolo e regione dell'alto angolo. La prima è riscontrabile in prossimità del beamstop, con valori che descrivono la macrostruttura del cristallo. Un buon segnale a basso angolo è essenziale per calcolare il parametro di cella unitaria (Fig. 2.12). La regione dell'alto angolo invece ci fornisce informazioni sulla microstruttura del campione.

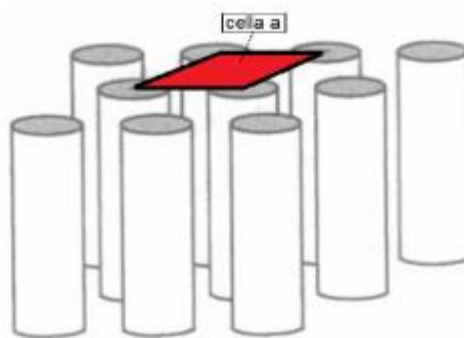


Figura 2.12: Cella unitaria.

Per cella unitaria si intende la parte più piccola ripetuta all'interno di una struttura cristallina. Traslando attraverso lo spazio, la cella unitaria (a) origina l'intera struttura cristallina.

Il reticolo reciproco invece (Fig. 2.13), è lo spazio in cui ogni piano del reticolo diretto è rappresentato da un punto.

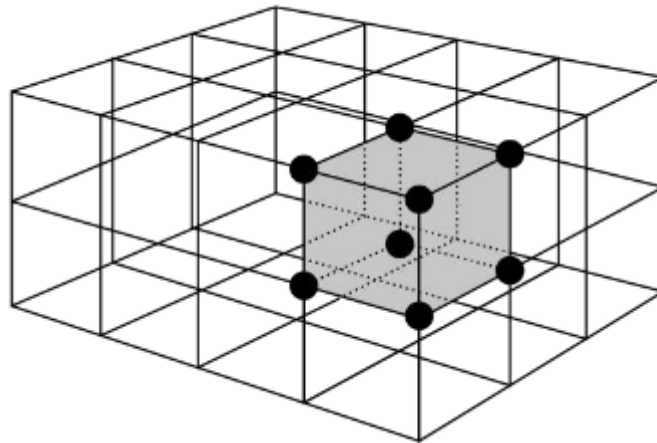


Figura 2.13: Reticolo reciproco.

2.2.4 Calibrazione del diffrattometro

Come in ogni misurazione, prima di effettuare una qualsiasi analisi, bisogna effettuare la calibrazione dello strumento tramite il tricosano. Si tratta di un composto organico con una struttura molto ordinata e ripetuta che genera uno spettro costituito da linee concentriche ad intervalli regolari.

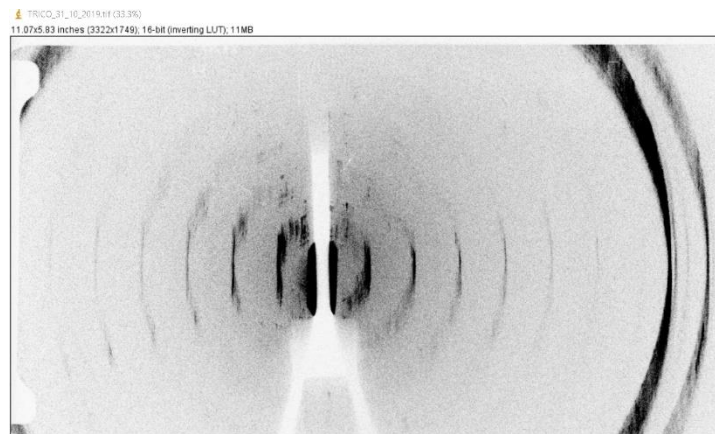


Figura 2.14: Immagine del tricosano.

L'area centrale bianca che si osserva in figura (Fig. 2.14) è dovuta al beamstop, mentre i cerchi concentrici altro non sono che il risultato della diffrazione simmetrica del composto.

L'immagine del tricosano (come tutte quelle analizzate in questa tesi) è stata visualizzata tramite un apposito software: ImageJ. Questo programma ci permette anche di calcolare la media relativa a tutti i punti, potendo costruire l'apposito grafico monodimensionale (Fig. 2.15).

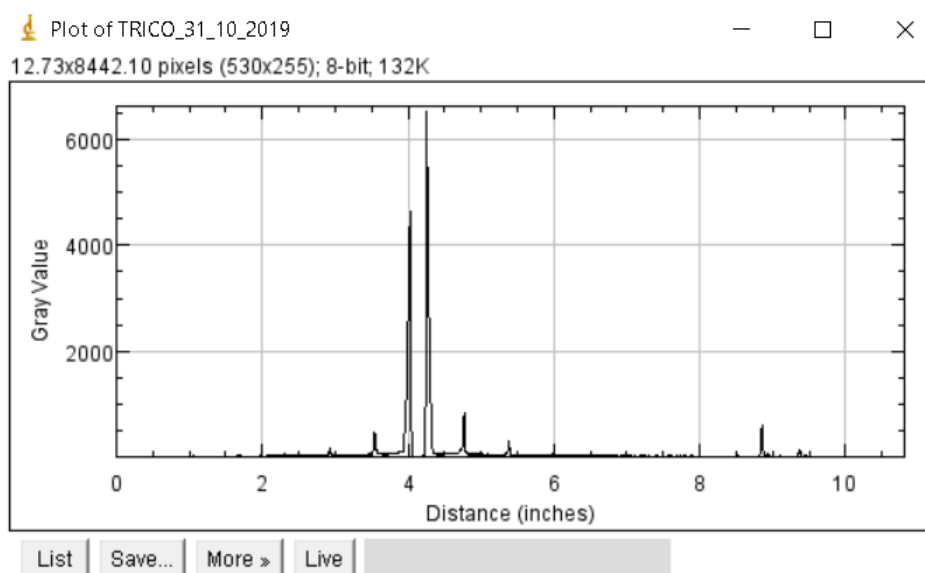


Figura 2.15: Grafico monodimensionale del tricosano.

Una volta ottenuto il grafico, bisogna salvarlo in formato di testo (.txt) per poterlo aprire successivamente con un altro software: IgorPro. Una volta aperto su questo secondo software, bisogna identificare il punto 0 del grafico, ovvero il punto attraversato dalla line di simmetria (Fig. 2.16).

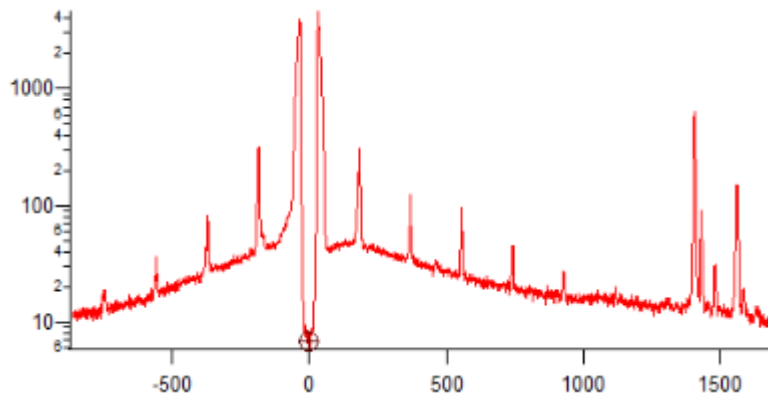


Figura 2.16: Grafico della figura 2.15 importato su IgorPro.

Per l'identificazione del punto 0 bisogna posizionare due cursori sull'apice dei primi due picchi adiacenti a quelli più alti. Sarà possibile visualizzare la posizione dei due cursori sull'asse x, questo permetterà di calcolare la media impartendo un semplice comando al programma:

$$print = \frac{(x_1 + x_2)}{2}$$

Se si sottrae ai pixel (x) il valore ottenuto, si ottiene il grafico centrato.

Riportando in un grafico con in ordinata i valori relativi al 2θ (angolo di diffrazione) noti per il tricosano in funzione dei valori dei picchi determinati nel grafico, in pixel, (i valori delle x per i picchi principali) si ottengono dei punti che vengono filtrati con una retta (Fig. 2.17). Ciò che compare è una retta dall'equazione:

$$y = a + bx$$

dove b rappresenta il coefficiente angolare. Quest'ultimo è importante per la normalizzazione dei dati sperimentali di diffrazione, dei campioni analizzati in seguito.

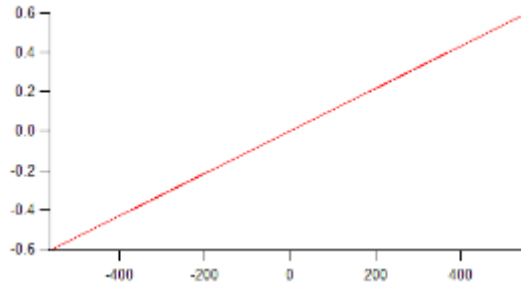


Figura 2.17: Retta di calibrazione.

Il valore a dell'equazione della retta non è importante poiché si tratta di una retta passante per l'origine.

Tutti i passaggi finora effettuati (ad eccezione della creazione della retta di calibrazione) sono ripetuti anche durante l'analisi del campione.

2.3 Transilluminatore-UV

Come già accennato, per verificare un eventuale fluorescenza del sistema folato alcalino + sale si è reputato utile effettuare analisi con un transilluminatore-UV. In particolare, lo strumento che è stato impiegato è il ChemiDocTMXRS+ System (Bio-Rad Laboratories) presente all'interno del MASBIC. Questo strumento permette la visualizzazione di DNA target o di

proteine, tramite l'emissione di elevati livelli di radiazioni UV. Le eppendorf contenenti i campioni da analizzare vengono semplicemente posizionate sulla superficie a livello della quale trapassano le radiazioni UV. Ciò permette di ottenere un'analisi qualitativa immediata.



Figura 2.18: Transilluminatore-UV utilizzato.

È importante applicare l'apposita protezione prima di effettuare l'analisi (Fig. 2.18) poiché le radiazioni UV emesse dal macchinario sono nocive per l'uomo.

2.4 Microscopio a Forza Atomica

Si tratta di un microscopio dalle straordinarie prestazioni. L'analisi con l'AFM è stata effettuata per risalire al profilo tridimensionale dei campioni che hanno fornito i risultati più promettenti in seguito alle analisi precedenti,

Le misure sono state realizzate servendoci del microscopio AFM-Raman del DISVA (Fig. 2.19). Il microscopio a forza atomica è in grado di fornire immagini in un range compreso tra 150 μm fino a pochi nm (10^{-9} m).



Figura 2.19: Microscopio AFM.

Per la preparazione dei campioni analizzati si è utilizzata una diluizione 1:800. Il campione diluito viene posto su di un piccolissimo dischetto (5 μl) dal diametro di 1 cm (ricoperto con della mica). Prima di effettuare la misurazione, bisogna lasciar asciugare il campione sopra il dischetto.



Figura 2.20: Dischetto per AFM rivestito da mica.

2.4.1 Strumentazione per analisi in AFM

Questo microscopio non utilizza delle lenti per formare l'immagine ma sfrutta una sottilissima punta metallica in silicio. Questa punta è posizionata

all'estremità di una leva flessibile, in modo tale da poter eseguire una scansione della superficie del campione. Durante l'analisi si vengono a creare deboli forze di interazione tra punta e campione, queste determinano una flessione della leva con una conseguente rivelazione della topografia del campione posto sul dischetto.

Il sistema ottico dello strumento è costituito da un laser e da un fotodiodo. Il laser viene riflesse dal resto del *cantilever* verso il fotomoltiplicatore che a sua volta converte l'energia luminosa in energia elettrica amplificando il segnale in entrata.

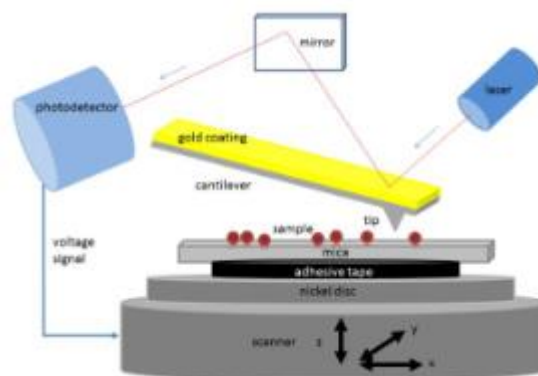


Figura 2.21: Funzionamento dell'AFM.

Esistono varie modalità di analisi, le più importanti sono tre: non-contact mode, contact mode e tapping mode. Nel primo caso, la punta è in risonanza con la superficie del campione con il quale interagisce in modo elettrostatico. Cambiamenti nella superficie del campione provocano l'instaurarsi di diversi

legami tra quest'ultimo e la punta dello strumento. Quando ciò accade, la punta deve modificare la distanza dal campione per poter mantenere la stessa risonanza. Questi cambiamenti vengono registrati e utilizzati per ricostruire l'immagine della superficie del campione.

Nell'analisi contact mode, la punta si trova continuamente in contatto col campione, strisciando sulla sua superficie.

Nell'analisi tapping mode, la leva viene fatta oscillare ad una frequenza di qualche centinaio di KHz per stabilire un contatto intermittente.

Le analisi effettuate in questa tesi sono il risultato dell'utilizzo della non-contact mode. La punta che è stata utilizzata per ottenere le immagini ha un raggio di soli 8 nm circa.

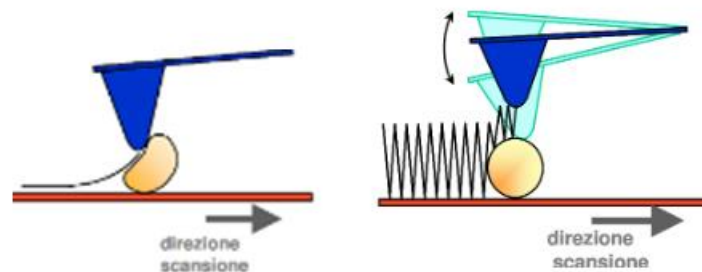


Figura 2.22: Scansione del campione tramite contact mode (sinistra) e tapping mode (destra).

Le analisi effettuate dall'AFM si presentano sotto forma di immagini. Queste mostrano la morfologia della superficie del campione in funzione dell'intensità di segnale e delle altezze ottenute durante la scansione.

Analizzando le immagini delle altezze è possibile verificare la dimensione degli oggetti e osservare eventuali differenze tra i diversi campioni (usando grafici di altezza e istogrammi di frequenze delle altezze). Tramite i grafici di altezza è possibile scegliere una parte dell'immagine per verificarne la dimensione lungo l'asse delle y, mentre con gli istogrammi di frequenze delle altezze è possibile calcolare ognuna di esse e inserirla in un grafico in funzione del numero di conteggi effettuati.

2.5 Preparazione dei campioni

I campioni analizzati in questa tesi sono stati preparati utilizzando sempre la stessa concentrazione di folato alcalino, variando la tipologia di sale aggiunto così come la sua molarità.

Campione	Molarità del sale
Folato di potassio + KCl	0.5 M
	0.625 M
	0.75 M
	0.875 M
	1 M
	1.125 M
	1.25 M

	1.5 M
Folato di potassio+ NaCl	0.005 M
	0.01 M
	0.05 M
	0.1 M
	0.15 M
	0.2 M
	0.25 M
	0.3 M
	0.35 M
	0.4 M
	0.5 M
	0.75 M
	1 M
	1.25 M
	1.5 M
Folato di potassio + CaCl ₂	0.75 M
	1 M
	1.5 M
	2 M

	2.5 M
	3 M
Folato di potassio + MnCl ₂	0.05 M
	0.1 M
	0.15 M
	0.2 M
	0.3 M
	0.5 M
Folato di potassio + MgCl ₂	0.05 M
	0.1 M
	0.15 M
	0.2 M
	0.25 M
	0.275 M
	0.3 M
	0.325 M
	0.35 M
	0.4 M
	0.45 M
	0.5 M

Folato di potassio + Spermidina	0.004 M
	0.005 M
	0.015 M
	0.025 M
	0.035 M
	0.05 M
	0.075 M
	0.1 M
	0.125 M
	0.5 M
Folato di potassio + Spermina	0.005 M
	0.010 M
	0.015 M
	0.020 M
	0.025 M
	0.035 M
	0.045 M
	0.050 M

Tabella 2.1: Campioni analizzati.

Di seguito sono riportate i metodi di preparazione dei campioni utilizzati.

2.5.1 Preparazione del folato di potassio

Come già accennato, questa tesi si incentra sull'utilizzo di folati alcalini poiché studi passati hanno dimostrato che, se sciolti in acqua, formano quadruplessi, seguendo lo stesso schema di auto-assemblaggio della GMP.

Per questo motivo, prima di procedere alla preparazione delle soluzione madre di folato, è stato necessario titolare l'acido folico (Fig. 1.6) utilizzando una soluzione 1 M di idrossido di potassio (KOH) (Fig. 2.23).



Figura 2.23: Idrossido di potassio.

Così facendo è stato possibile ottenere il folato di potassio utilizzato per tutte le preparazioni dei campioni analizzati e studiati in questo lavoro.

Per prima cosa, sono stati disciolti 500 mg di acido folico in 15 ml di acqua bidistillata facendo attenzione a scioglierne poco alla volta all'interno di un piccolo becker e mantenendo la soluzione in costante agitazione con l'ausilio

di un magnete rotante. Questo passaggio deve essere effettuato su di un ripiano riscaldato poiché il folato normalmente è scarsamente solubile in acqua, tuttavia la sua solubilità aumenta con l'aumentare della temperatura (A. Tyagi, A. Penzkofer; 2009).

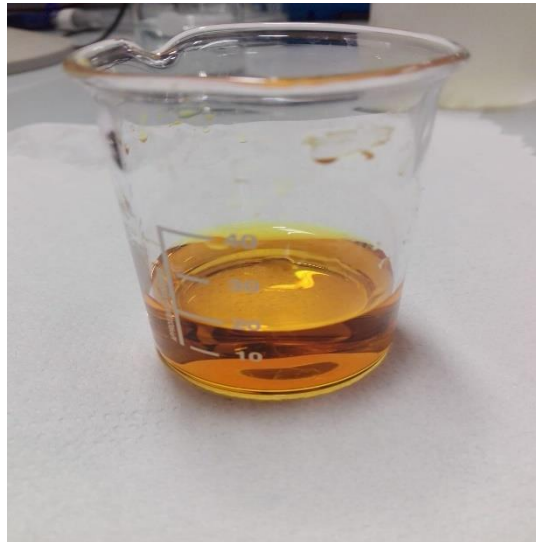


Figura 2.24: 500 mg di acido folico disciolti in 10 ml di acqua distillata.

Una volta sciolto completamente l'acido folico, la soluzione risulta essere limpida e di una colorazione tendente all'arancione (Fig. 2.24). Il pH rilevato di questa soluzione è di 3.67.

A questo punto, si procede alla titolazione aggiungendo gradualmente alcune gocce di soluzione 1 M di KOH, monitorando costantemente il pH della soluzione tramite l'utilizzo di un pHmetro (precedentemente calibrato). Si procede con questa graduale aggiunta fino ad ottenere di un pH~ 8.5,

successivamente la soluzione dovrà essere suddivisa in due falcon aggiungendo il quantitativo di etanolo assoluto necessario per portare il volume di quest'ultima a 35 ml (in ognuna delle due falcon) (Fig. 2.25).

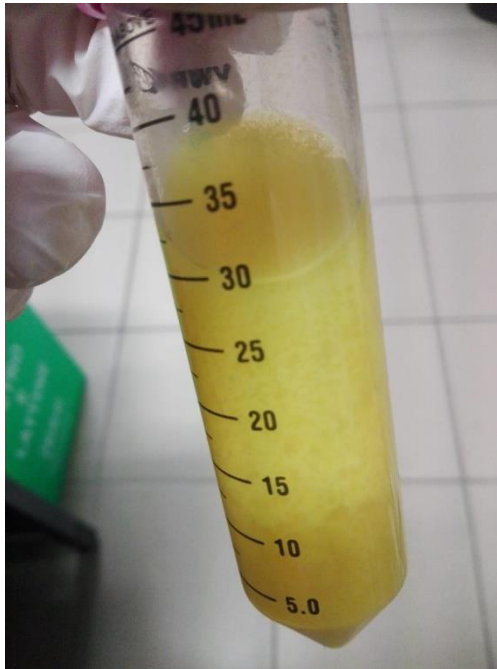


Figura 2.25: Aspetto dell'acido folico sciolto in soluzione dopo l'aggiunta di etanolo assoluto.

È curioso osservare come l'aggiunta dell'etanolo faccia assumere alla soluzione un colore decisamente più acceso, tendente al giallo, e stimoli un fenomeno che porta il folato a formare dei grumi densi e visibili. effettuata la prima centrifugazione a 4200 rpm per 15 minuti per permettere al folato di potassio di precipitare e di essere poi recuperato per il passaggio successivo. Al termine di questa prima centrifugazione, il surnatante viene eliminato e

viene aggiunto nuovamente etanolo assoluto fino al raggiungimento di 35 ml di volume finale. Successivamente, viene effettuata una seconda centrifugazione identica alla prima. Anche questa volta, al termine della stessa occorre buttare via il surnatante.

Una volta terminati questi due lavaggi, il campione è pronto per essere liofilizzato.



Figura 2.26: Centrifuga da banco (sinistra) e liofilizzatore (destra).

Per la liofilizzazione occorre appoggiare le due falcon contenenti il pellet all'interno di un rack posizionandole sotto la campana. È importante levare i tappi e ricoprire le falcon con del pellet che dovrà essere forato per permettere al vapore acqueo di fuoriuscire.

Una volta generato il vuoto, saranno necessarie almeno quattro ore per la completa essiccazione dell'acido folico. Una volta liofilizzato, il campione deve essere stoccato in frigo a 4° C (Fig. 2.27).

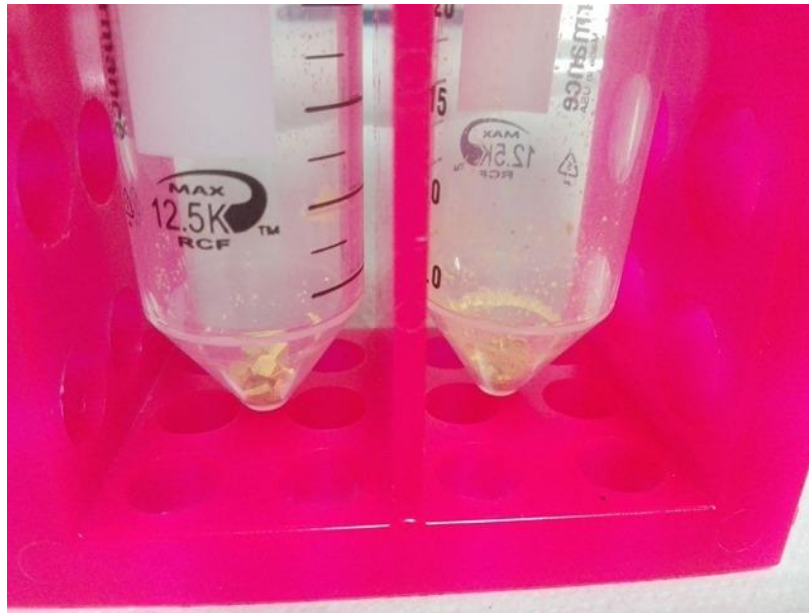


Figura 2.27: Folato di potassio liofilizzato.

2.5.2 Preparazione delle soluzioni madre

Un punto cruciale nella preparazione dei campioni è stato quello di decidere quali molarità dovessero avere le soluzioni contenenti i diversi sali. Come prima cosa, si è preso come riferimento il risultato di studi passati che

analizzavano e caratterizzavano la precipitazione di alcuni sali di GMP (causata appunto dall'aggiunta di sali). Una volta individuate le molarità desiderate, bisognava tener conto della preparazione del campione per l'analisi in spettrofotometria: la soluzione da analizzare era composta da 100 μL di soluzione madre di folato, a cui venivano aggiunti altri 100 μL di soluzione madre del sale ($V_f = 200 \mu\text{L}$). La diluizione della soluzione salina (1:2), portava al dimezzamento della molarità di partenza.

Per quanto riguarda i sali monovalenti (KCl; NaCl), studi passati condotti utilizzando sali di GMP hanno rivelato che la precipitazione della guanosina 5'-monofosfato ha il suo apice intorno a 2-2.5 M del sale in soluzione. A causa di ciò, le soluzioni madre di KCl e NaCl sono state preparate con le seguenti molarità (Tabella 2.2; Tabella 2.3):

Soluzione madre (M)	Soluzione folato + KCl (M)
1	0.5
1.25	0.625
1.5	0.75
1.75	0.875
2	1
2.25	1.125
2.5	1.25
3	1.5

Tabella 2.2: Molarità scelte per la preparazione delle soluzioni madre di KCl.

Soluzione madre di NaCl (M)	Soluzione folato + NaCl (M)
0.01	0.005
0.02	0.01
0.1	0.05
0.2	0.1
0.3	0.15
0.4	0.2
0.5	0.25
0.6	0.3
0.7	0.35
0.8	0.4
1	0.5
1.5	0.75
2	1
2.5	1.25
3	1.5

Tabella 2.3: Molarità scelte per la preparazione delle soluzioni madre di NaCl.

La scelta delle molarità per la preparazione delle soluzioni madre dei sali divalenti è stata condotta in modo analogo alle precedenti. In particolare, per quanto riguarda il cloruro di calcio (CaCl_2), il picco di precipitazione dei sali di GMP avviene intorno ad una molarità di 1.5. Nel caso del cloruro di magnesio (MgCl_2), la concentrazione minima in soluzione dei sali di GMP corrisponde ad una molarità che si aggira intorno a 0.2. Anche per quanto riguarda il cloruro di manganese (MnCl_2), la precipitazione della GMP avviene ad una molarità di circa 0.2. Di seguito, vengono riportate le molarità scelte per la preparazione delle soluzioni madre dei sali divalenti:

Soluzione madre di CaCl_2 (M)	Soluzione folato + CaCl_2 (M)	Soluzione madre di MgCl_2 (M)	Soluzione folato + MgCl_2 (M)	Soluzione madre di MnCl_2 (M)	Soluzione folato + MnCl_2 (M)
1.5	0.75	0.1	0.05	0.1	0.05
2	1	0.2	0.1	0.2	0.1
3	1.5	0.3	0.15	0.3	0.15
4	2	0.4	0.2	0.4	0.2
5	2.5	0.5	0.25	0.6	0.3
6	3	0.55	0.275	1	0.5
		0.6	0.3		
		0.65	0.325		
		0.7	0.35		
		0.8	0.4		
		0.9	0.45		
		1	0.5		

Tabella 2.4: Molarità scelte per la preparazione delle soluzioni madre di cloruro di calcio (sinistra), cloruro di magnesio (centro) e cloruro di manganese (destra).

Nel caso delle poliammine, la scelta della molarità delle soluzioni madre è stata veicolata dalla presenza di studi passati di precipitazione effettuati su piccole molecole di DNA (*Juan Pelta et al, 1995*). In questi studi si evince che la spermidina e la spermina riescono a far condensare il DNA ad una molarità di circa 10 mM (0.01 M). Di seguito vengono riportate le molarità scelte per la preparazione delle soluzioni madre di spermina e spermidina:

Soluzione madre Spermidina (M)	Soluzione folato + Spermidina (M)	Soluzione madre spermina (M)	Soluzione spermina + folato (M)
0.008	0.004	0.01	0.005
0.01	0.005	0.02	0.01
0.03	0.015	0.03	0.015
0.05	0.025	0.04	0.02
0.07	0.035	0.05	0.025
0.1	0.05	0.07	0.035
0.15	0.075	0.09	0.045
0.2	0.1	0.1	0.050
0.25	0.125		
1	0.5		

Tabella 2.5: Molarità scelte per la preparazione delle soluzioni madre di Spermidina (sinistra) e Spermina (destra).

Le soluzioni madre della spermidina sono state conservate in frigo (4° C) poiché la spermidina è volatile in acqua.

Infine, la soluzione madre di folato è stata preparata sciogliendo 10 mg di folato di potassio per ogni ml di acqua bidistillata. Il volume finale della soluzione era di 5 ml (0.005 L), quindi sono stati disciolti in essa 50 mg (0.05 g) di folato di potassio (0.02 M) (Fig. 2.28).

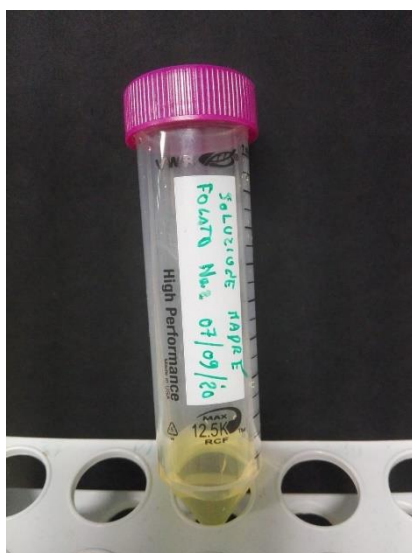


Figura 2.28: Soluzione madre di folato di potassio.

2.6 Preparazione dei campioni da analizzare in spettrofotometria

La preparazione dei campioni analizzati in spettrofotometria è stata la stessa per tutti, al fine di garantire una comparazione dei risultati finali coerente.

Per prima cosa, in ogni eppendorf della serie da analizzare sono stati inseriti 100 μL di soluzione madre di folato. Successivamente, in ognuna sono stati aggiunti 100 μL delle soluzioni madri saline a diverse molarità. Con l'aggiunta della soluzione salina, si osservava un visibile cambiamento di colore (Fig. 2.29).

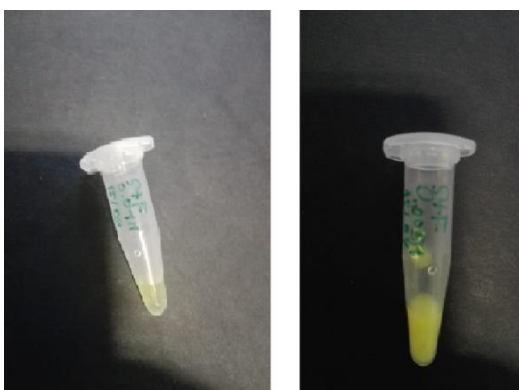


Figura 2.29: 100 μL di soluzione madre di folato di potassio prima dell'aggiunta di 100 μL di spermina (sinistra) e dopo (destra).

In seguito, i campioni venivano centrifugati a 5000 rpm per 15 minuti in modo tale da separare il surnatante e il precipitato (Fig. 2.30).

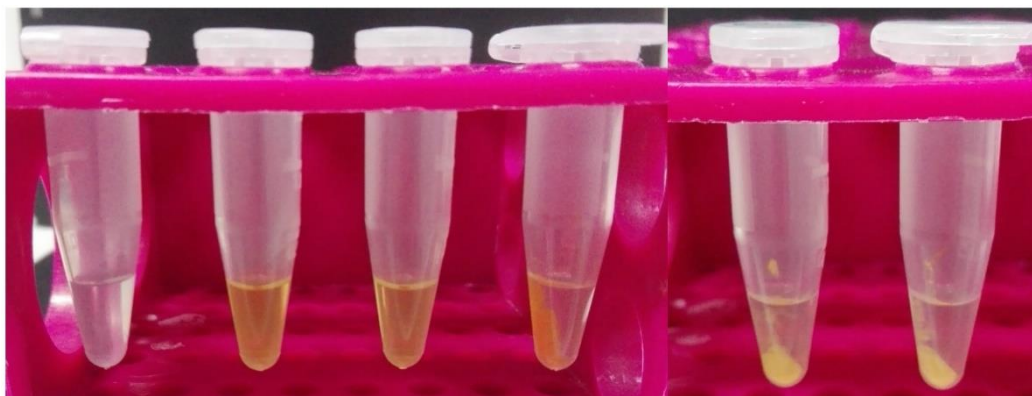


Figura 2.30: Immagine dei precipitati ottenuti dopo l'aggiunta del sale e successiva centrifugazione. Da sinistra a destra si ha rispettivamente: acqua, folato, folato + sale monovalente, folato + sale divalente, folato + spermidina, folato + spermina.

Per i sali monovalenti non si è avuta mai la formazione di alcun precipitato, mentre per gli altri sali si otteneva un pellet completamente separato dalla fase acquosa in sospensione.

A questo punto, il surnatante veniva aspirato (200 μ L) e posto in una falcon contenente 4,8 ml di acqua bidistillata ($V_f = 5$ ml). Questo passaggio era necessario al fine di diluire il campione ed ottenere un valore di assorbanza al di sotto di un valore critico pari a 2. Le soluzioni così ottenute venivano prima agitate manualmente per diversi minuti e poi lasciate “riposare” per mezz’ora.

Successivamente, per ogni misurazione venivano prelevati 500 μL di soluzione dalla falcon (dopo averla nuovamente agitata) e inseriti all'interno di una cuvetta (Fig. 2.31) per l'analisi in spettrofotometria.

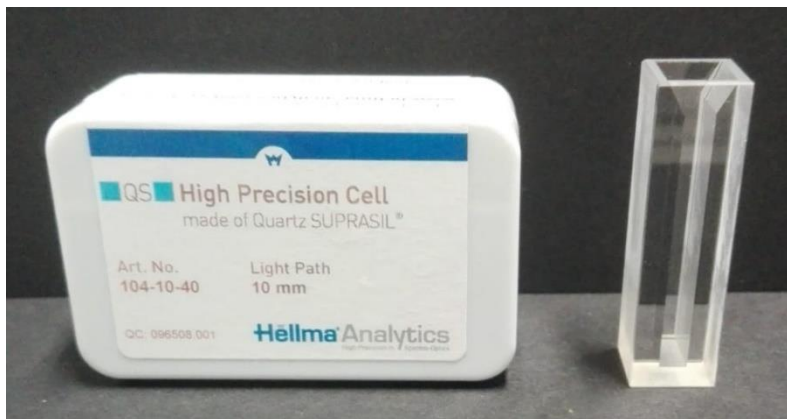


Figura 2.31: Cuvetta utilizzata per le analisi in spettrofotometria (cammino ottico 10 mm).

3. RISULTATI SPERIMENTALI

3.1 Analisi spettroscopica dei surnatanti

Le analisi spettrofotometriche sono state effettuate a partire da folato di potassio ottenuto come descritto nel capitolo 2 paragrafo 2.5.1.

Le misure spettrofotometriche dei surnatanti diluiti in acqua hanno permesso di ricavare la concentrazione di folato in soluzione, e quindi di costruire delle curve di precipitazione. Da tali curve è possibile ricavare la concentrazione dei sali a cui si ha la precipitazione degli aggregati. L'analisi dei differenti sistemi ha permesso di valutare quali ioni, nelle diverse concentrazioni, risultano più efficaci nella condensazione dei quadruplessi di folato.

Inizialmente, sono state preparate delle soluzioni acquose di folato di potassio a diversa concentrazione, utilizzate per la costruzione di una curva (retta) di taratura. Di queste soluzioni, è stata registrata l'assorbanza ottenuta a 280 nm.

La retta di taratura costruita in base a queste analisi è stata utilizzata per la costruzione della curva di precipitazione di tutti i campioni analizzati. La tabella mostra le assorbanze ottenute con le varie concentrazioni in esame:

Concentrazione folato (mg/ml)	Assorbanza (280 nm)
0.01	0.0948
0.03	0.2428
0.04	0.3906
0.06	0.4776
0.08	0.7942
0.1	0.8898
0.125	1.0325
0.142	1.286
0.166	1.4878

Tabella 3.1: Campioni utilizzati per la costruzione della retta di taratura con le relative assorbanze a 280 nm.

I punti ottenuti sono stati interpolati linearmente (vedi paragrafo 2.1.2, metodo della curva di calibrazione) e l'equazione risultante è stata utilizzata per convertire i valori di assorbanza (misurati nei campioni sottoposti a condensazione) in concentrazioni di folato in soluzione (mg/ml).

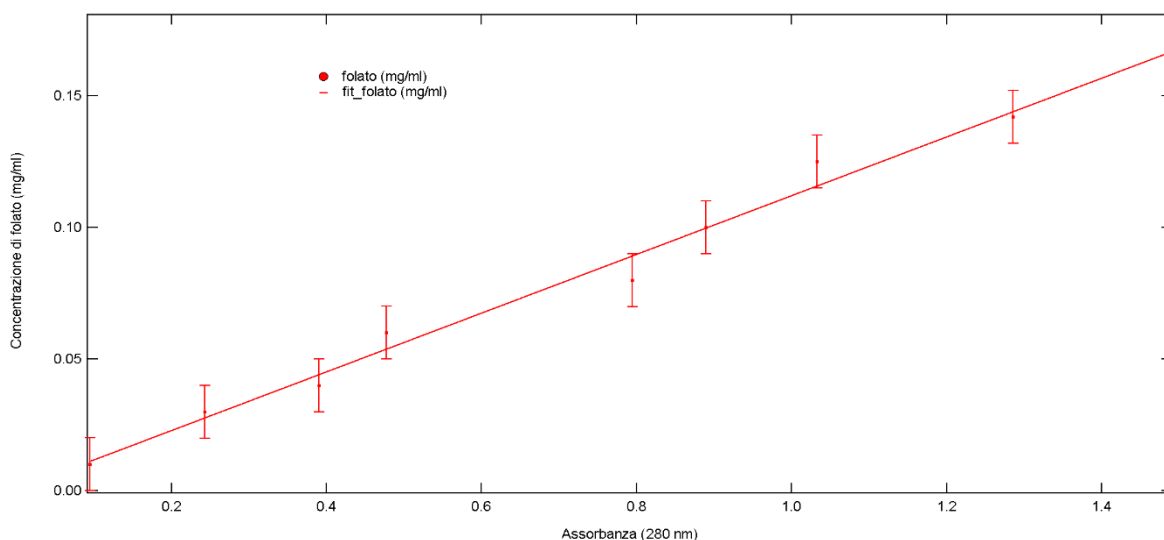


Figura 3.1: Retta di taratura del folato di potassio.

L'equazione della retta risultante è:

$$y = 0,0006 + 0,1116x$$

Sostituendo a x il valore dell'assorbanza ottenuta dalla misurazione, sarà possibile ricavare y, ovvero il valore della concentrazione di folato (mg/ml) corrispondente.

3.1.1 Analisi dei campioni in soluzione con cationi monovalenti

Per quanto riguarda l'analisi dei campioni in soluzione con il cloruro di potassio (KCl), sono state effettuate due serie di misurazioni mantenendo la stessa molarità del sale (Tabella 3.2).

Folato (mg/ml) 1° misurazione	Folato (mg/ml) 2° misurazione	KCl (M)
0.5	0.5	0
0.08	0.08	0.5
0.09	0.09	0.625
0.09	0.09	0.75
0.09	0.09	0.875
0.09	0.09	1
0.09	0.09	1.125
0.09	0.09	1.25
0.09	0.09	1.5

Tabella 3.2: Concentrazioni di folato in soluzione (mg/ml) in relazione alla molarità di sale utilizzata nelle due misurazioni.

I risultati ottenuti sono stati riportati graficamente (Fig. 3.2) in funzione della concentrazione di folato di potassio in soluzione (grazie al metodo della retta di taratura). È stato effettuato il confronto tra le due misurazioni, in modo tale da identificare l'esistenza di riproducibilità:

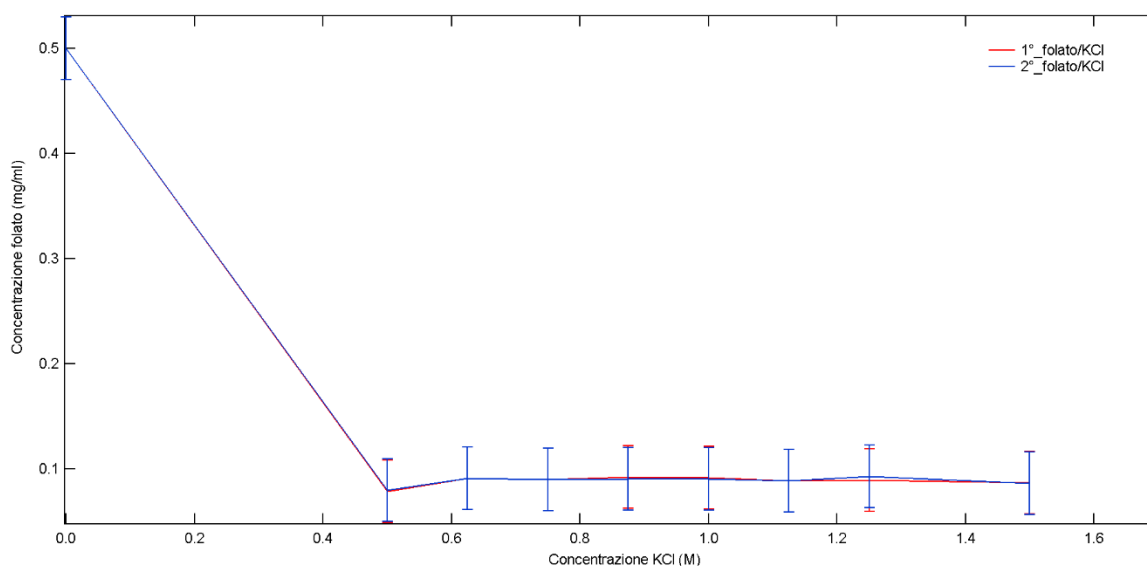


Figura 3.2: Curve di precipitazione del folato ottenute mediante l'aggiunta di cloruro di potassio (KCl). Le due curve coincidono perfettamente.

Per quanto riguarda l'analisi dei campioni in soluzione con il cloruro di sodio (NaCl), sono state ottenute le seguenti concentrazioni di folato (Tabella 3.3):

Folato (mg/ml)	NaCl (M)
0.5	0
0.08	0.005
0.09	0.01
0.09	0.05
0.09	0.1
0.09	0.15
0.09	0.2
0.09	0.25
0.09	0.3
0.09	0.35
0.09	0.4
0.09	0.5
0.09	0.75
0.09	1
0.09	1.25
0.09	1.5

Tabella 3.3: Concentrazioni di folato in soluzione (mg/ml) in relazione alle varie molarità di NaCl utilizzate.

I risultati ottenuti sono stati riportati graficamente (Fig. 3.3) in funzione della concentrazione di folato di potassio sciolto in soluzione (grazie al metodo della curva di taratura):

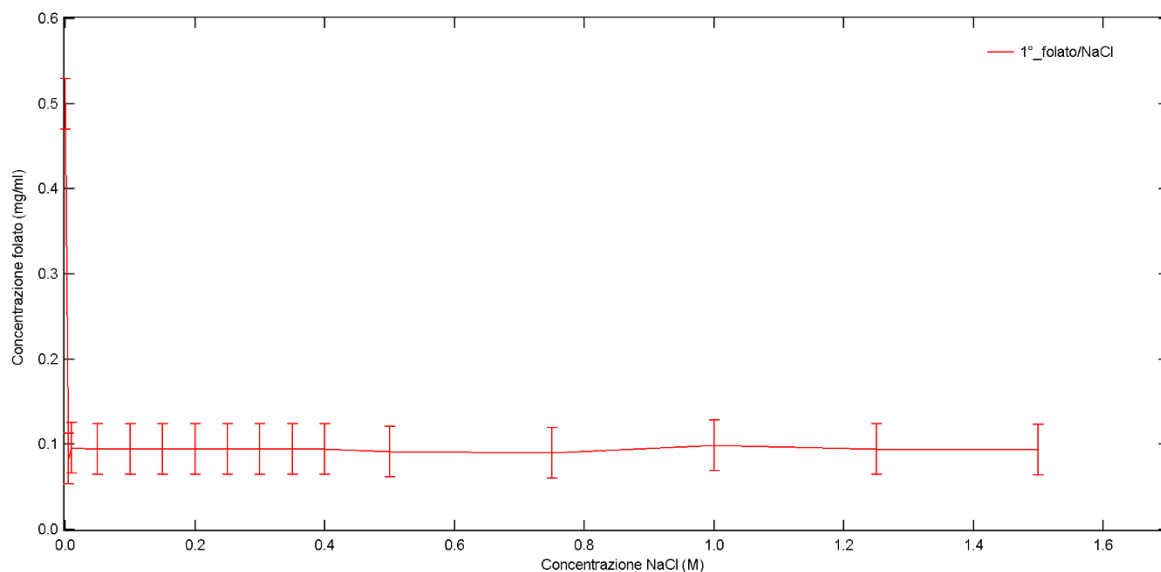


Figura 3.3: Curva di precipitazione del folato ottenuta mediante l'aggiunta di cloruro di sodio (NaCl).

3.1.2 Analisi dei campioni in soluzione con cationi divalenti

Per quanto riguarda l'analisi del folato di potassio in soluzione con il cloruro di calcio (CaCl_2), sono state ottenute le seguenti concentrazioni (Tabella 3.4):

Folato (mg/ml)	CaCl_2 (M)
0.5	0
0.15	0.75
0.13	1
0.10	1.5
0.09	2
0.16	2.5
0.23	3

Tabella 3.4: Concentrazioni di folato in soluzione ottenute in relazione alle varie molarità di CaCl_2 .

Di seguito è riportata la rappresentazione grafica di tali risultati (Fig. 3.4):

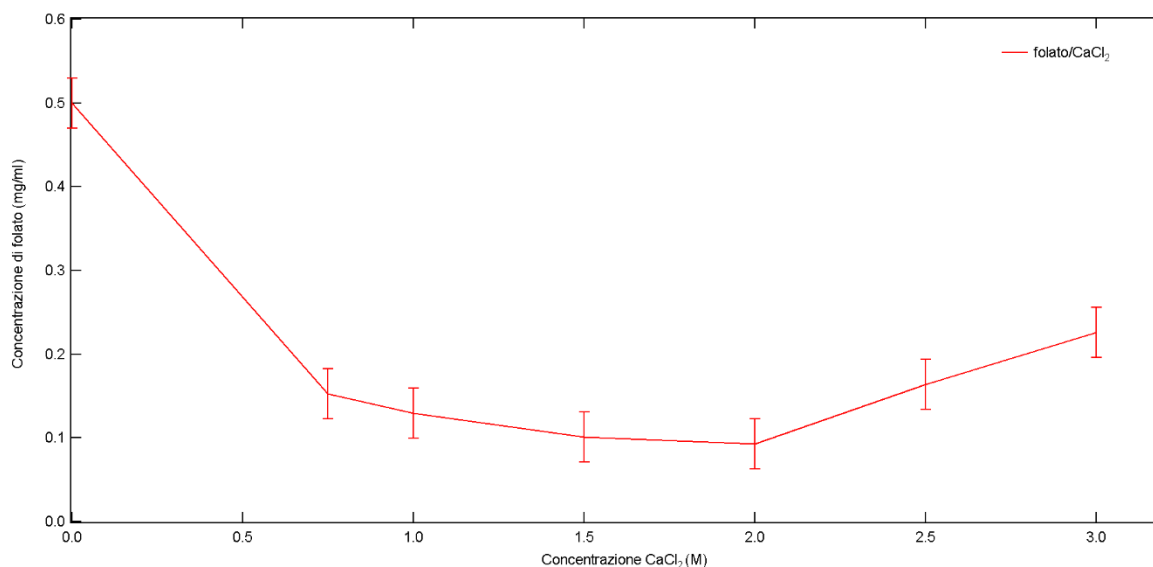


Figura 3.4: Curva di precipitazione del folato ottenuta mediante l'aggiunta di cloruro di calcio (CaCl_2).

Le analisi dei campioni in cui è stato aggiunto il cloruro di magnesio (MgCl_2) hanno fornito i seguenti risultati (Tabella 3.5):

Folato (mg/ml) 1° misurazione	Folato (mg/ml) 2° misurazione	MgCl_2
0.5	0.5	0
0.12	0.12	0.05
0.12	0.12	0.1
0.11	0.11	0.15
0.09	0.1	0.2
0.09	0.1	0.25
0.09	0.1	0.275
0.09	0.09	0.3
0.1	0.11	0.325
0.1	0.11	0.35
0.09	0.11	0.4
0.11	0.12	0.45
0.1	0.1	0.5

Tabella 3.5: Concentrazioni di folato in soluzione (mg/ml) in relazione alla molarità di sale utilizzata nelle due misurazioni.

A seguire troviamo le curve di precipitazione del folato con aggiunta di MgCl_2 (Fig. 3.5), messe a confronto per identificare l'esistenza di riproducibilità:

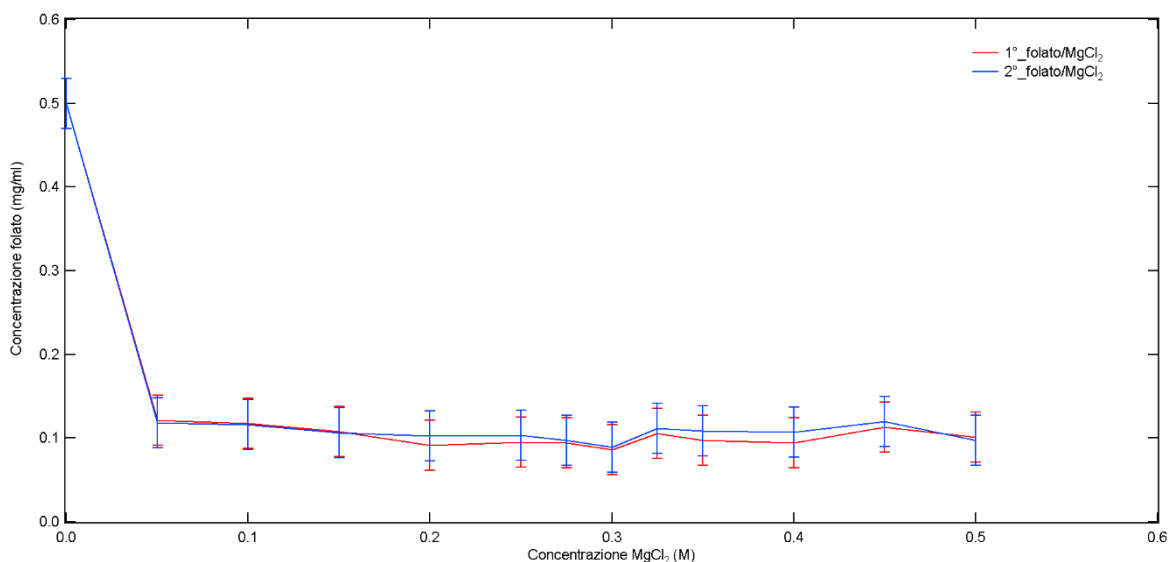


Figura 3.5: Curve di precipitazione del folato ottenute mediante l'aggiunta di cloruro di magnesio (MgCl_2).

Infine, sono state calcolate le concentrazioni di folato di potassio in soluzione, ottenute in seguito all'aggiunta di cloruro di manganese (MnCl_2) (Tabella 3.6):

Folato (mg/ml) 1° misurazione	Folato (mg/ml) 2° misurazione	MnCl_2 (M)
0.5	0.5	0
0.14	0.13	0.05
0.14	0.14	0.1
0.13	0.13	0.15
0.14	0.13	0.2
0.14	0.14	0.3
0.14	0.14	0.5

Tabella 3.6: Concentrazioni di folato in soluzione (mg/ml) in relazione alla molarità di sale utilizzata nelle due misurazioni.

Nel grafico che segue sono riportate le curve di precipitazione ottenute con l'aggiunta di MnCl_2 (Fig. 3.6), messe a confronto per identificare l'esistenza di riproducibilità:

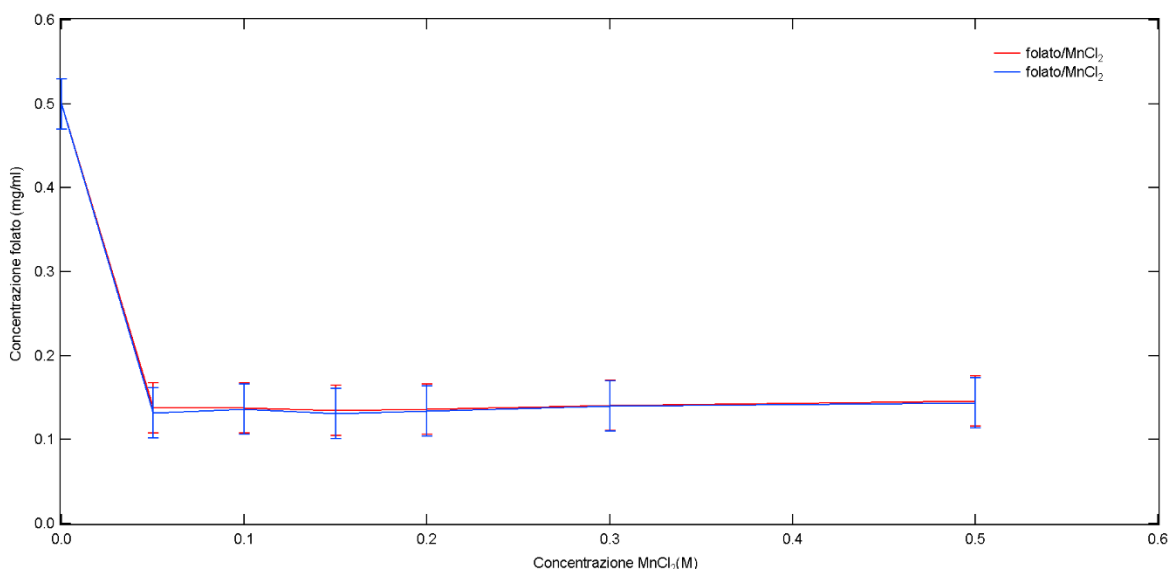


Figura 3.6: Curve di precipitazione del folato ottenute mediante l'aggiunta di cloruro di manganese (MnCl_2).

3.1.3 Analisi dei campioni in soluzione con poliammine

Come già accennato, per le analisi di condensazione del folato di potassio con poliammine sono state utilizzate la spermidina tri-idrocloridica e la spermina tri-idrocloridica.

Nel caso della spermidina sono state ottenute le seguenti concentrazioni (Tabella 3.7):

Folato (mg/ml) 1° misurazione	Folato (mg/ml) 2° misurazione	Spermidina (M)
0.5	0.5	0
0.15	0.22	0.004
0.14	0.17	0.005
0.06	0.11	0.015
0.06	0.1	0.025
0.06	0.09	0.035
0.06	0.11	0.05
0.08	0.1	0.075
0.09	0.1	0.1
0.13	0.15	0.125
0.13		0.5

Tabella 3.7: Concentrazioni di folato in soluzione (mg/ml) in relazione alla molarità di spermidina utilizzata.

In figura 3.7 sono riportate le curve di precipitazione ottenute con l'aggiunta di spermidina, messe a confronto per identificare l'esistenza di riproducibilità:

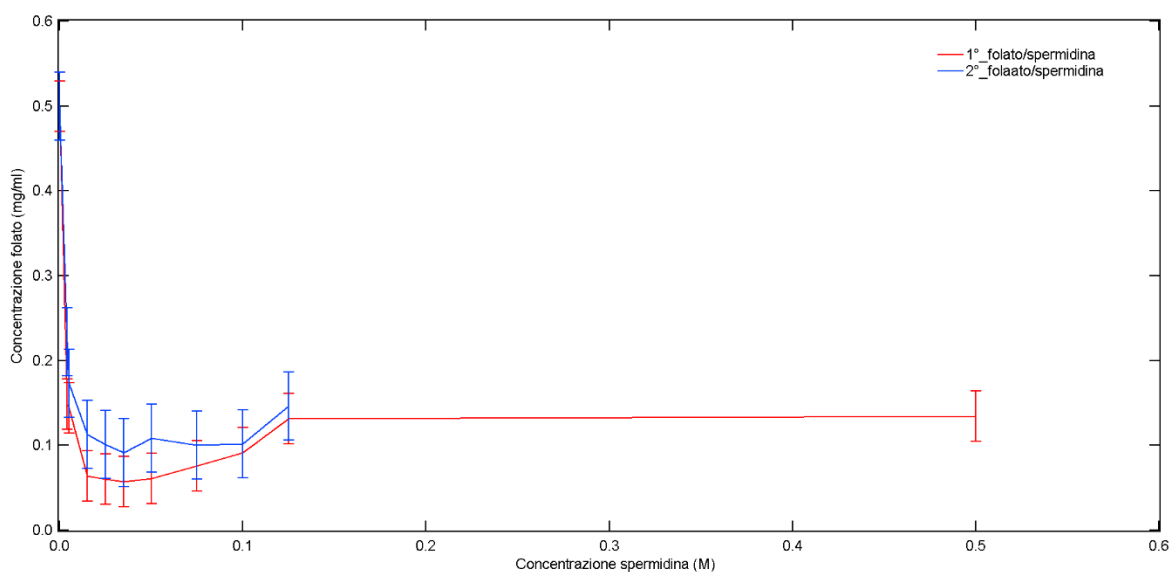


Figura 3.7: Curve di precipitazione del folato ottenute mediante l'aggiunta di spermidina.

Riferendoci ora alle analisi effettuate con la spermina, di seguito sono riportate le concentrazioni di folato ottenute (Tabella 3.8):

Folato (mg/ml) 1° misurazione	Folato (mg/ml) 2° misurazione	Spermina (M)
0.5	0.5	0
0.22	0.21	0.005
0.19		0.01
0.17	0.17	0.015
0.17		0.02
0.20	0.19	0.025
0.19	0.21	0.035
0.22	0.21	0.045
0.21	0.22	0.05

Tabella 3.8: Concentrazioni di folato in soluzione (mg/ml) in relazione alla molarità di spermidina utilizzata.

Di seguito sono riportate le curve di precipitazione ottenute con l'aggiunta di spermina (Fig. 3.9), messe a confronto per identificare l'esistenza di riproducibilità:

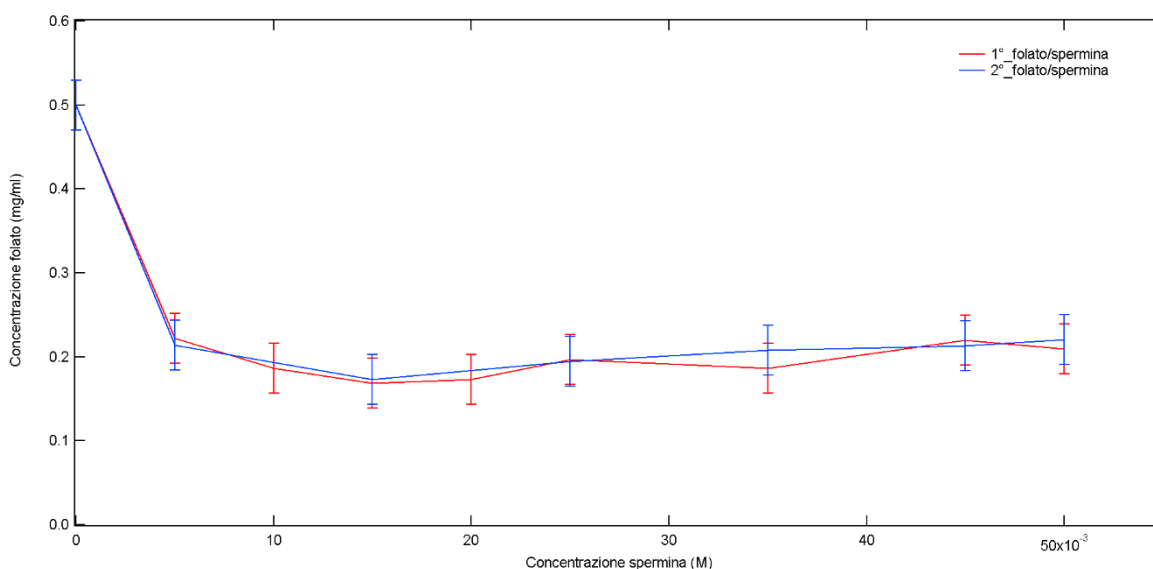


Figura 3.8: Curve di precipitazione del folato ottenute mediante l'aggiunta di spermidina.

3.2 Analisi in diffrazione a raggi X

Sono state eseguite analisi in diffrazione a raggi X per ogni tipologia di campione (folato + sale mono-, di-, tri-, tetravalente). In particolare, si è voluta osservare la presenza di eventuali quadruplessi quando la concentrazione di sale era tale da presentare il picco di precipitazione.

Per l'analisi, sono stati caricati sullo slot (Fig. 2.10) i precipitati della soluzione folato + sale ottenuti dopo una centrifugazione di 15 minuti a 5000 rpm (Fig. 2.30).

In tabella 3.9 sono riportati i campioni dai quali è stato prelevato il pellet per l'analisi in diffrazione:

Campione	Molarità del sale
Folato + NaCl	1.5 M
Folato + CaCl ₂	0.75 M 1.5 M 2 M 3M
Folato + MgCl ₂	0.25 M 0.3 M
Folato + MnCl ₂	0.1 M 0.15 M

	0.2 M
Folato + spermidina	0.004 M 0.035 M 0.045 M 0.5 M
Folato + spermina	0.005 M 0.01 M 0.015 M 0.02 M

Tabella 3.9: Campioni analizzati in diffrazione a raggi X.

3.2.1 Diffrazione a raggi X dei campioni contenenti folato e sali

monovalenti

Come già mostrato in figura 2.30, la centrifugazione dei campioni contenenti sali monovalenti non ha generato alcun precipitato da poter analizzare tramite diffrazione a raggi x. Si è cercato comunque di analizzare il campione contenente NaCl 1.5 M, poiché era il più opaco di tutti i campioni con sali monovalenti. La caricatura del campione è avvenuta aspirando la soluzione con una pipetta, e facendo molta attenzione ad applicare una pressione

costante durante l'assemblaggio dello slot (per evitare la fuoriuscita del liquido). Dall'analisi risulta che il campione analizzato è amorfo (Fig. 3.9):

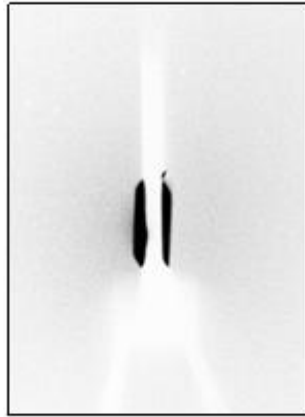


Figura 3.9: Analisi tramite ImageJ del campione di folato + NaCl 1.5 M.

Si è ritenuto superfluo analizzare ulteriori campioni con sali monovalenti.

3.2.2 Diffrazione a raggi X dei campioni con folato e sali divalenti

Come si può osservare in figura 2.30, la centrifugazione a 5000 rpm per 15 minuti dei campioni contenenti sali divalenti ha prodotto dei pellet facilmente caricabili sullo slot.

Nel caso del cloruro di calcio, si è deciso di analizzare i campioni con le molarità di sale indicate in tabella 3.9, in modo tale da poter osservare cosa succede quando la concentrazione di folato in soluzione è ai suoi massimi e ai suoi minimi (Fig. 3.4, curva di precipitazione del folato di potassio con

aggiunta di cloruro di calcio). Dalle analisi effettuate, risulta che i precipitati analizzati sono amorfi (Fig. 3.10):

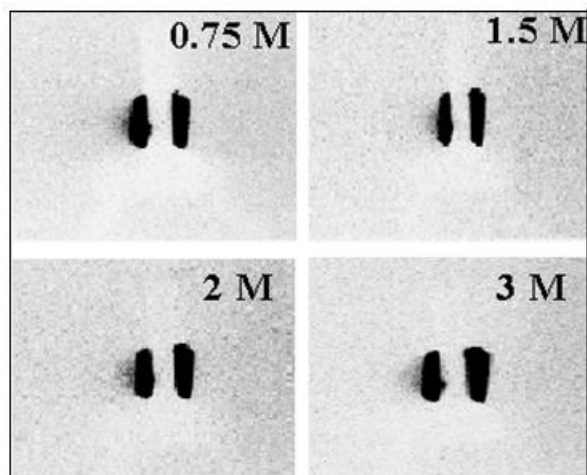


Figura 3.10: Analisi tramite ImageJ dei campioni di folato + CaCl_2 analizzati.

Per il cloruro di magnesio, si è scelto di analizzare i precipitati dei campioni in tabella 3.9, poiché rappresentano le molarità di sale in cui si registrano le concentrazioni minori di folato in soluzione.

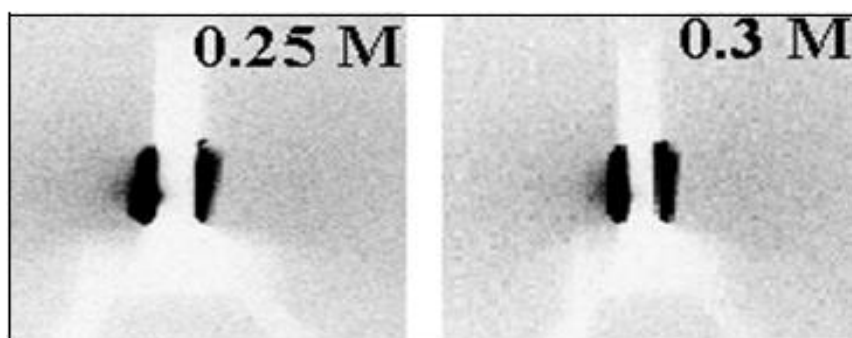


Figura 3.11: Analisi tramite ImageJ dei campioni di folato + MgCl_2 analizzati.

Anche in questo caso precipitano degli amorfi.

Infine, nel caso del cloruro di manganese si sono scelte le molarità in tabella 3.9 perché rappresentano i campioni con la minor concentrazione di folato in soluzione.

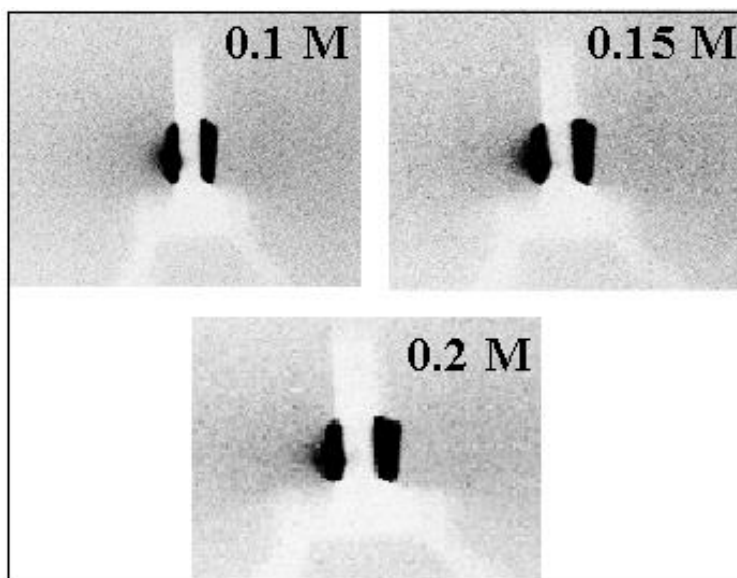


Figura 3.12: Analisi tramite ImageJ dei campioni di folato + MnCl₂ analizzati.

3.2.3 Diffrazione a raggi X dei campioni con folato e poliammine

In figura 2.30 si può osservare chiaramente il pellet formatosi in seguito alla centrifugazione. Di tutti i campioni analizzati in diffrazione a raggi X, il precipitato contenuto nei campioni folato + poliammine era quello più solido e compatto. Per le analisi dei campioni con spermidina, sono state scelte le molarità in tabella 3.9 poiché comprendenti le condizioni in cui il folato è in

minima (0.035 M e 0.045 M) e in massima (0.004 M e 0.5 M) concentrazione in soluzione.

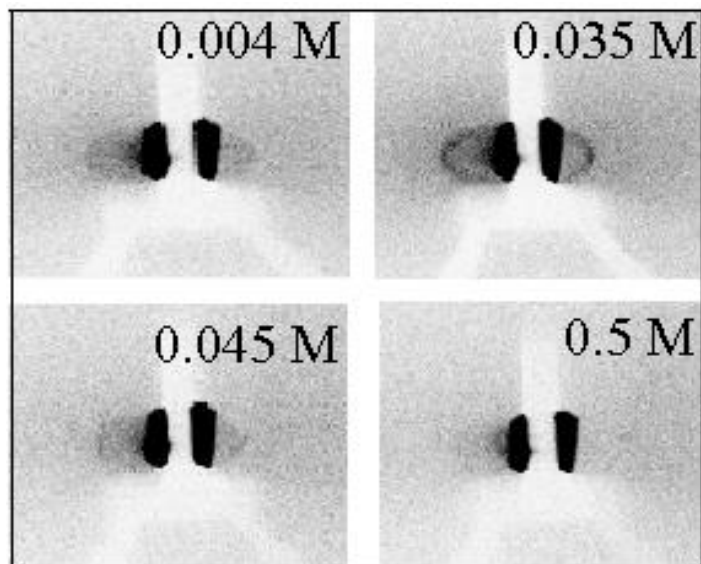


Figura 3.13: Analisi tramite ImageJ dei campioni folato + spermidina analizzati.

Questa volta si sono ottenuti dei precipitati con struttura ordinata. Dunque, si è scelto di analizzare ulteriormente i risultati ottenuti rappresentandoli graficamente e caratterizzandoli con l'uso del software Igor.

La legenda indica la molarità delle soluzioni di spermidina utilizzate.

I grafici su Igor (Fig. 3.14; 3.16) riportano i valori dell'intensità di scattering di Q in funzione dell'angolo di scattering, espresso dal valore Q .

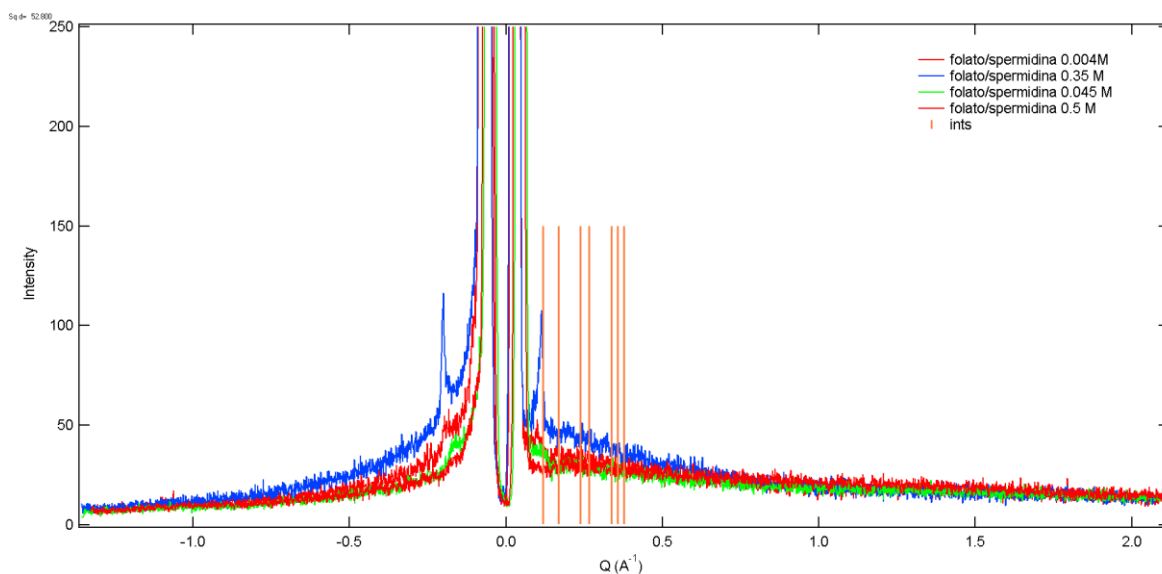


Figura 3.14: Spettri di diffrazione ottenuti dai campioni di folato con spermidina.

Dalla posizione dei picchi di diffrazione sono stati calcolati i parametri di cella che caratterizzano i precipitati (fasi quadrate):

$$sq d = 54.2$$

Allo stesso modo, sono state effettuate analisi in diffrazione a raggi X dei campioni di folato + spermina. Le molarità scelte (Tabella 3.9) comprendono il picco massimo di condensazione degli aggregati di folato (0.015 M), i punti adiacenti ad esso (0.01 M e 0.02 M) e il picco massimo di folato disciolto in soluzione senza la formazione di aggregati (0.005 M). Tutto ciò, per analizzare come cambia la struttura dei quadruplessi quando il folato di potassio, legandosi con la spermina, forma aggregati che precipitano.

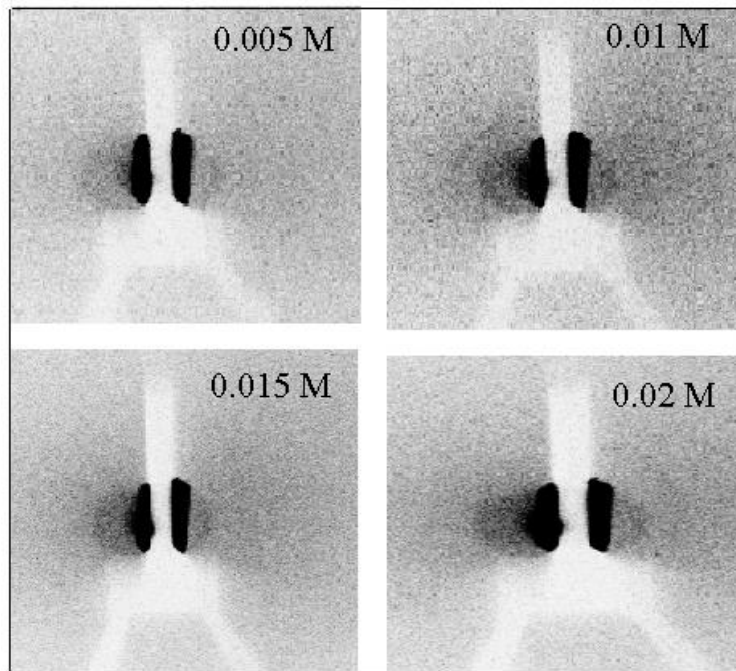


Figura 3.15: Analisi tramite ImageJ dei campioni folato + spermina analizzati.

Anche in questo caso l'analisi ha dato esiti positivi, mostrando precipitati ordinati e non amorfi. Dunque, si è scelto di analizzare ulteriormente i risultati ottenuti rappresentandoli graficamente e caratterizzandoli con l'uso del software Igor. La legenda indica la molarità delle soluzioni di spermina utilizzate (Fig. 3.16).

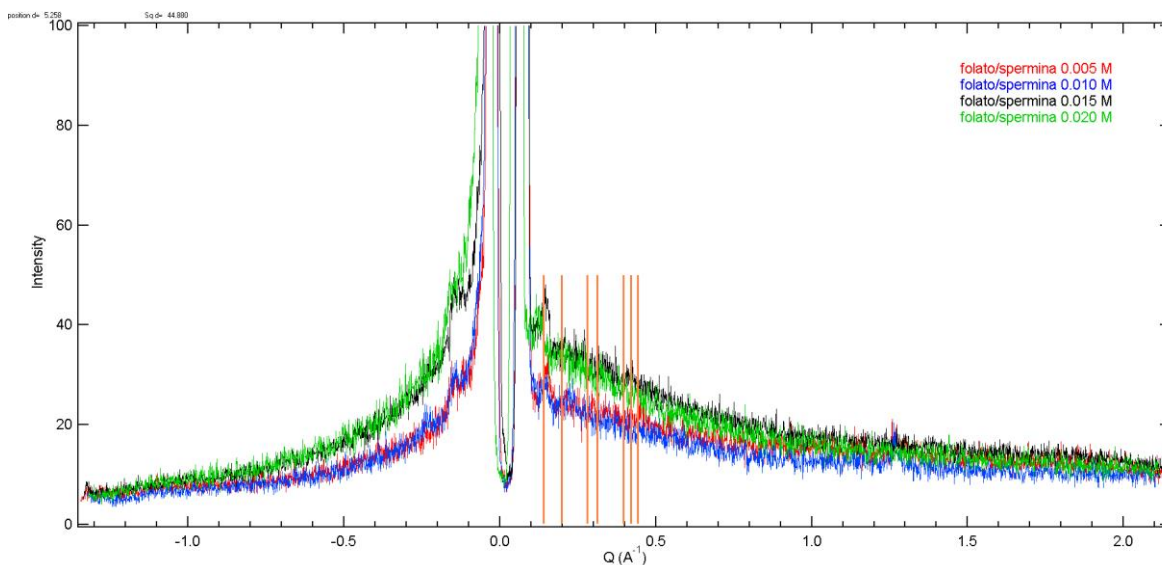


Figura 3.15: Spettri di diffrazione ottenuti dai campioni di folato con spermina.

Dalla posizione dei picchi di diffrazione sono stati calcolati i parametri di cella che caratterizzano i precipitati (con simmetria quadrata):

$$sq\ d = 44.9$$

3.3 Analisi qualitativa mediante il Transilluminatore-UV

Mediante l'utilizzo del Transilluminatore-UV è stato possibile ottenere il risultato qualitativo delle varie soluzioni folato + sale.

Per i campioni con KCl si è osservata fluorescenza (Fig. 3.16):

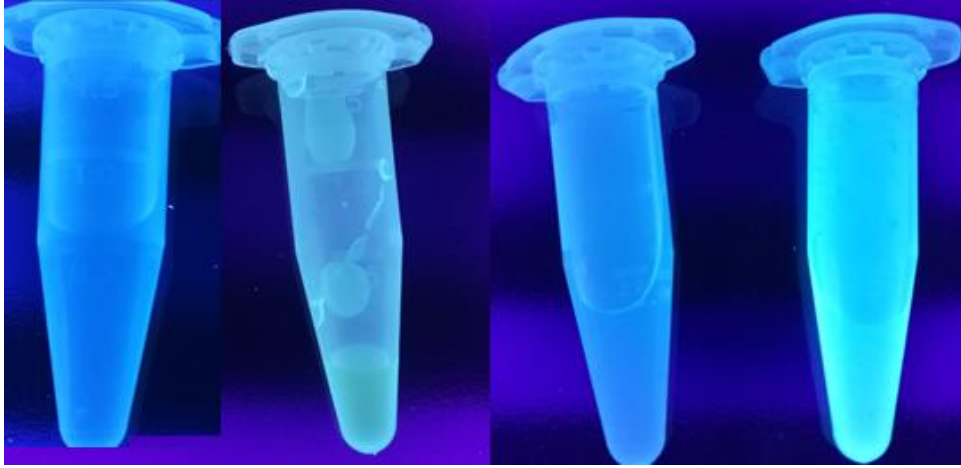


Figura 3.16: Fluorescenza del campione di folato + KCl. Da sinistra verso destra si hanno rispettivamente: acqua, soluzione di folato di potassio, soluzione di KCl 0.5 M e soluzione di folato di potassio+ KCl 0.5M.

Per i campioni con NaCl si è osservata fluorescenza (3.17):

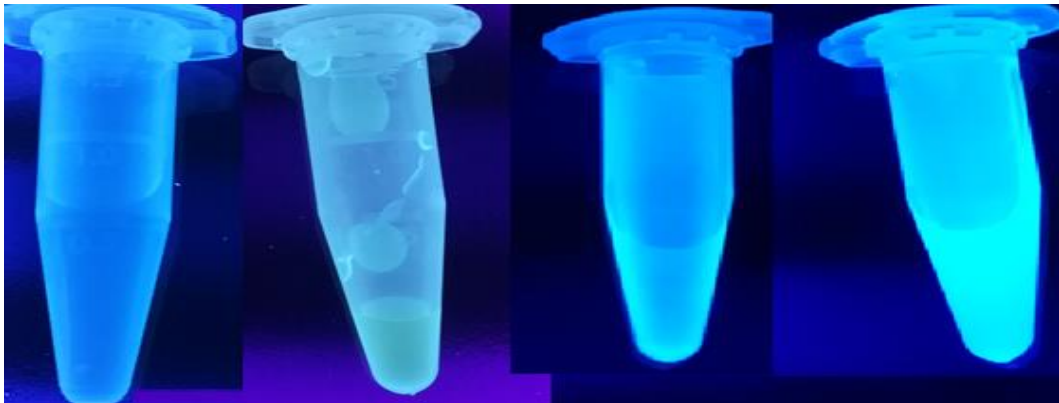


Figura 3.17: Fluorescenza del campione di folato + NaCl. Da sinistra verso destra si hanno rispettivamente: acqua, soluzione di folato di potassio, soluzione di NaCl 0.005M e soluzione di folato di potassio + NaCl 0.005 M.

Per quanto riguarda i sali divalenti, anche con loro si osserva fluorescenza (Fig. 3.18; 3.19; 3.20):



Figura 3.18: Fluorescenza del campione di folato + CaCl_2 . Da sinistra verso destra si hanno rispettivamente: acqua, soluzione di folato di potassio, soluzione di CaCl_2 2 M e soluzione di folato di potassio + CaCl_2 2 M.

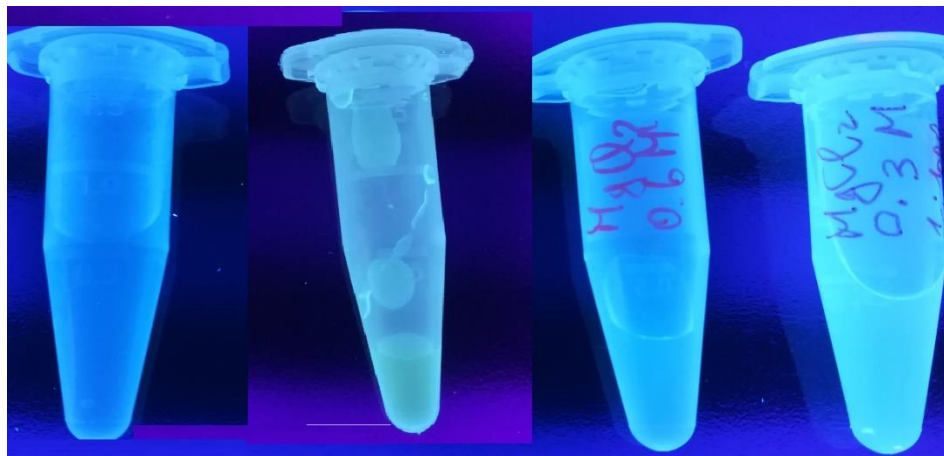


Figura 3.19: Fluorescenza del campione di folato + MgCl_2 . Da sinistra verso destra si hanno rispettivamente: acqua, soluzione di folato di potassio, soluzione di MgCl_2 0.6 M e soluzione di folato di potassio + MgCl_2 0.3 M.

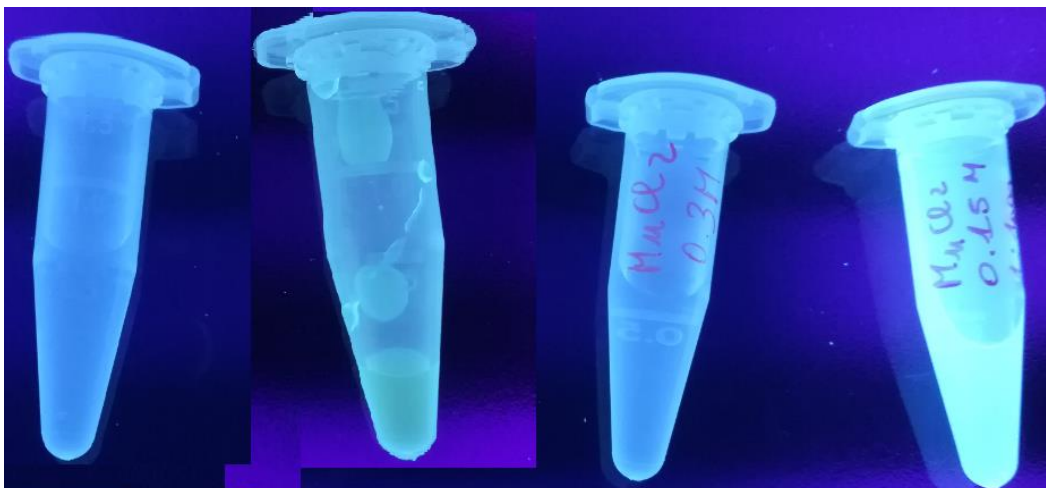


Figura 3.20: Fluorescenza del campione di folato + $MnCl_2$. Da sinistra verso destra si hanno rispettivamente: acqua, soluzione di folato di potassio, soluzione di $MnCl_2$ 0.3 M e soluzione di folato di potassio + $MnCl_2$.15 M.

Infine, per quanto riguarda le poliammine, non si è osservata alcuna fluorescenza (Fig. 3.21):

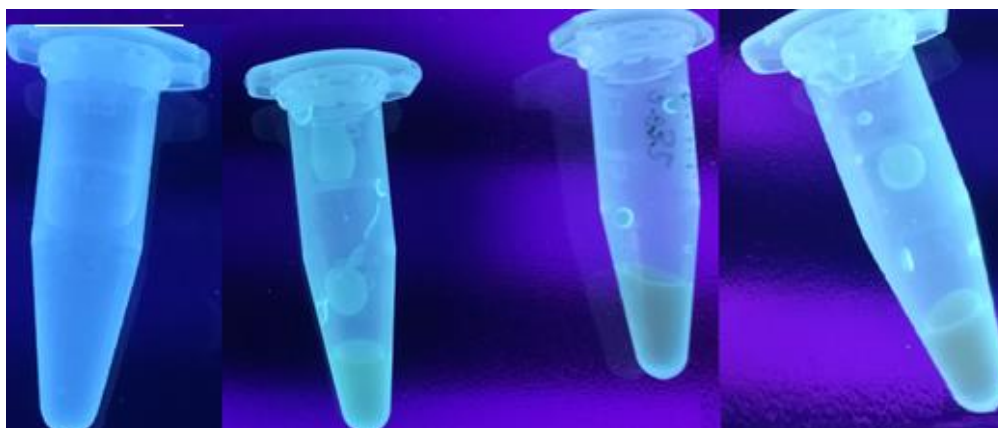


Figura 3.21: Fluorescenza dei campioni di folato + spermidina/spermina. Da sinistra verso destra si hanno rispettivamente: acqua, soluzione di folato di potassio, soluzione di folato di potassio + spermidina 0.035 M e soluzione di di potassio + spermina 0.015 M.

3.4 Analisi con tecniche di Microscopia a Forza Atomica

Per le prove in AFM sono stati utilizzati i seguenti campioni (Tabella 3.10):

Campione utilizzato	Concentrazione poliammina (M)
Folato di potassio + spermidina	0.004 M
	0.035M
Folato di potassio + spermina	0.005 M
	0.015 M

Tabella 3.10: Campioni analizzati in Microscopia a Forza Atomica.

La scelta dei campioni è stata veicolata dalla volontà di osservare le strutture che si sono venute a creare con il folato di potassio in soluzione (0.004 M e 0.005 M) e precipitato in aggregati (0.035 M e 0.015M). I campioni sono stati diluiti 1:10.

Iniziando dal campione 0.004 M di spermidina, vengono riportate di seguito immagini su differenti scale.

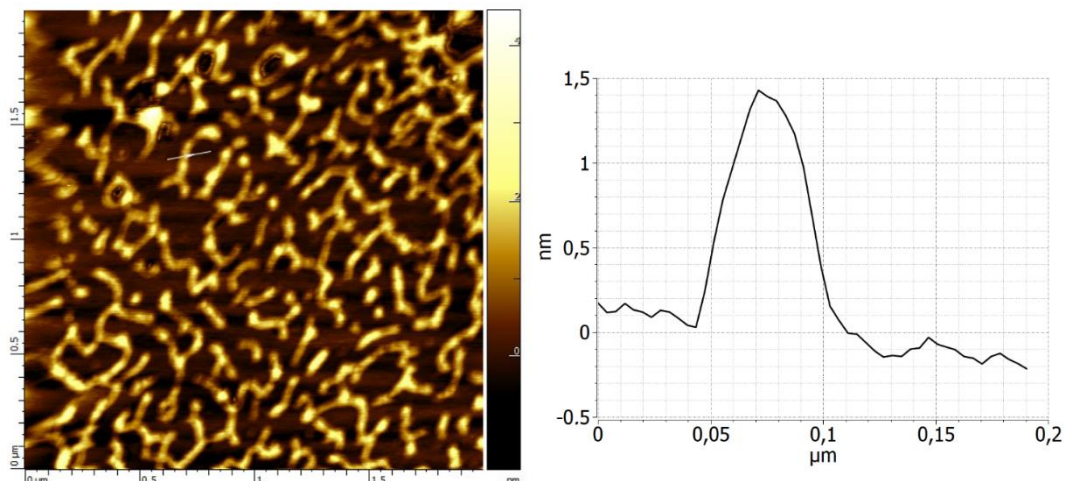


Figura 3.22: Immagine di una sezione di 2 μm in funzione delle altezze (sinistra) e grafico relativo alle dimensioni delle strutture presenti (destra).

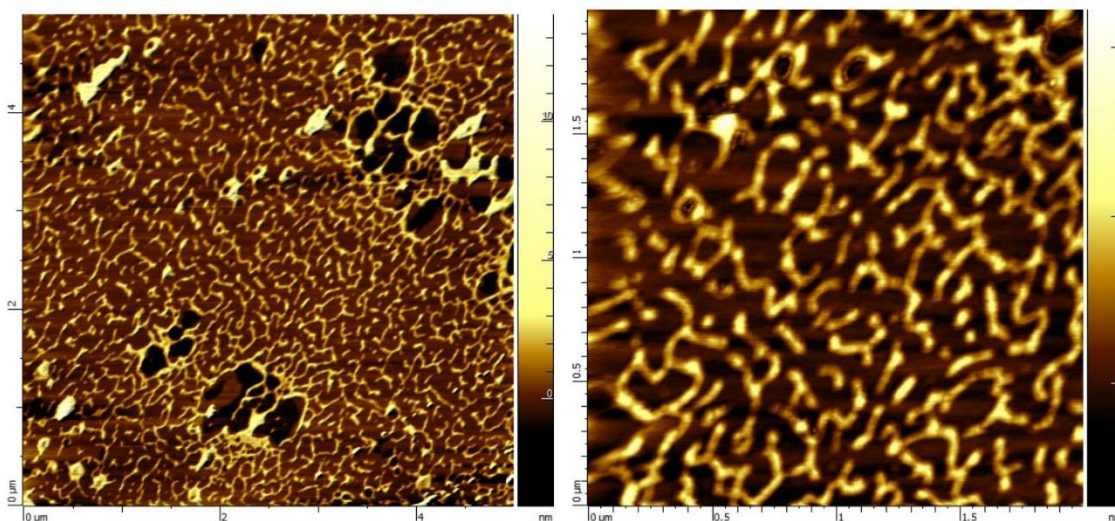


Figura 3.23: Immagine di una sezione di 6 μm (sinistra) e di 2 μm (destra) in funzione delle altezze a confronto.

Per il campione 0.035 M di spermidina si è ottenuta la seguente immagine:

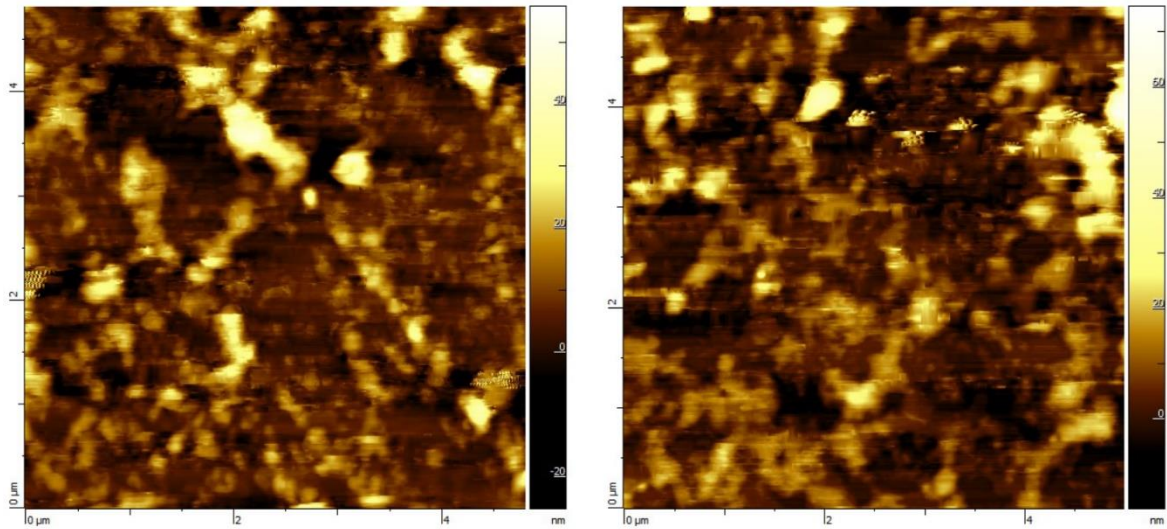


Figura 3.24: Sezioni di 6 μm in funzione delle altezze.

L'analisi del campione 0.005 M di spemina ha ottenuto le seguenti immagini:

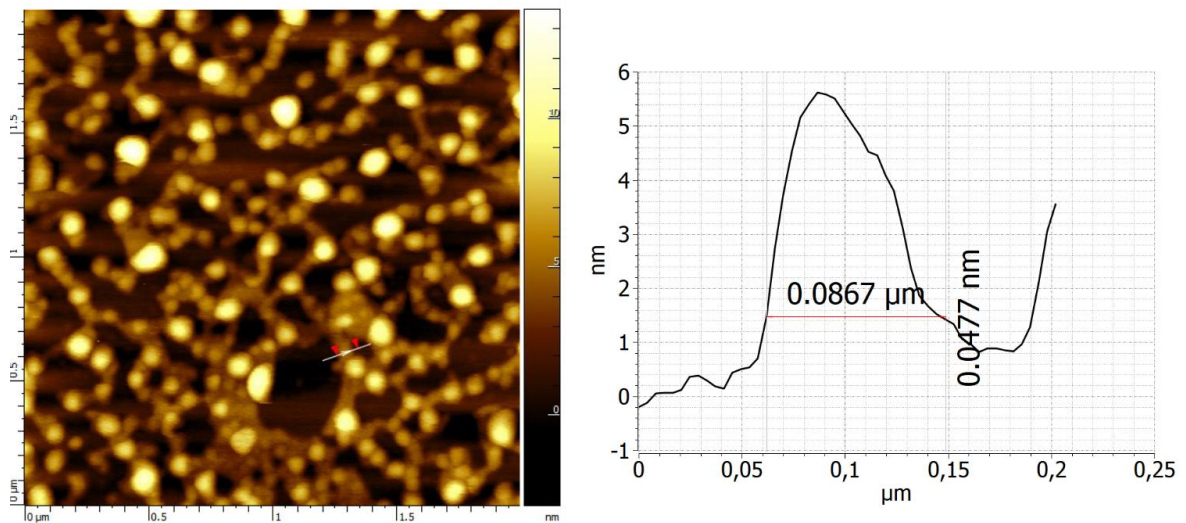


Figura 3.25: Immagine si una sezione di 2 μm in funzione delle altezze (sinistra) e grafico relativo alle dimensioni delle strutture presenti (destra).

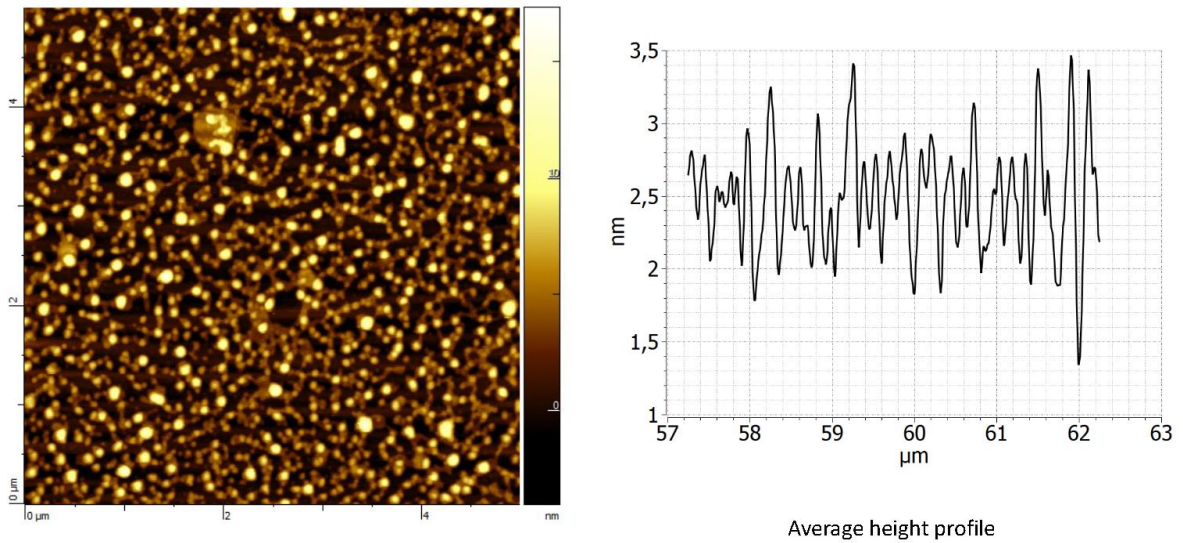


Figura 3.26: Immagine di una sezione di 6 μm in funzione delle altezze (sinistra) e grafico relativo alle dimensioni delle strutture presenti (destra).

Infine, per il campione 0.015 M di spermina si è ottenuto:

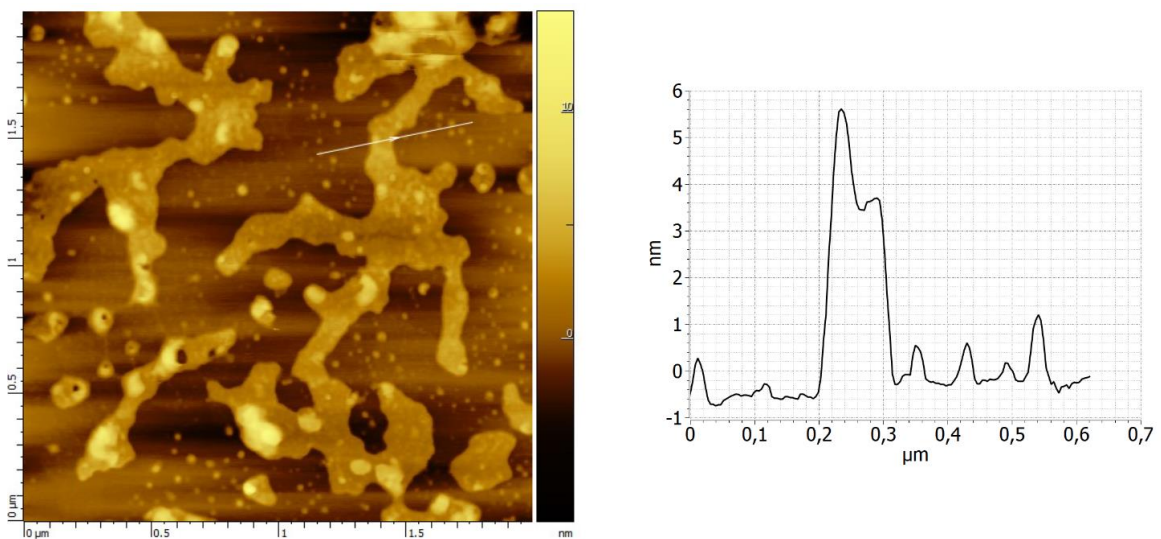


Figura 3.27: Immagine di una sezione di 2 μm in funzione delle altezze (sinistra) e grafico relativo alle dimensioni delle strutture presenti (destra).

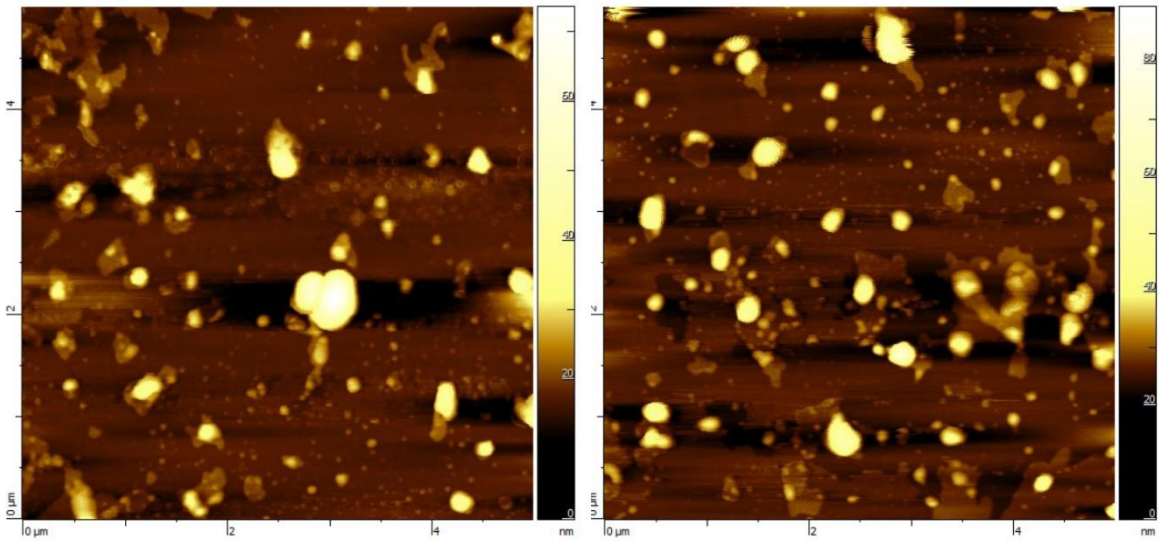


Figura 3.28: Sezioni di 6 μm in funzione delle altezze.

Sono in corso ulteriori analisi quantitative.

4. DISCUSSIONE DEI RISULTATI

4.1 Spettrofotometria

Analizzando le curve di precipitazione di quadruplessi di folato ottenute con l'aggiunta di sali monovalenti (Fig.3.2; Fig. 3.3), si osserva che ad una iniziale precipitazione, segue un raggiungimento di equilibrio di folato in soluzione.

Nel caso del cloruro di potassio (KCl): il folato di potassio in soluzione giunge al minimo di concentrazione (0.08 mg/ml) in seguito all'aggiunta di KCl 0.5 M. Successive aggiunte del sale non comportano un aumento considerevole della concentrazione di folato in soluzione. Infatti, pur raggiungendo una molarità di 1.5 M (ben tre volte superiore alla concentrazione di KCl determinante il picco minimo della curva), la concentrazione di folato di potassio in soluzione è di soli 0.9 mg/ml. Si osserva dunque un aumento irrisorio (0.01 mg/ml) di folato in soluzione a fronte di un aumento considerevole di sale. Si ha una situazione praticamente identica si ha con la curva di precipitazione ottenuta dall'aggiunta di cloruro di sodio (NaCl). In questo caso, la concentrazione 0.005 M di NaCl registra il picco minimo di folato di potassio in soluzione (0.08 mg/ml). L'aggiunta di sale 1.5 M (addirittura 300 volte maggiore di quella che registra il picco minimo della curva) porta ad avere in soluzione solamente 0.09 mg/ml di

folato di potassio. Aumento decisamente trascurabile (0.01 mg/ml) a fronte del considerevole aumento di sale aggiunto.

Il comportamento di queste curve di precipitazione dovrebbe almeno teoricamente confermare l'ipotesi iniziale, ovvero che i sali monovalenti avrebbero un'azione stabilizzante sulla formazione dei quadruplessi di folato. A causa della loro natura infatti, sarebbero in grado di inserirsi all'interno dei cilindri, stabilizzando l'impilamento dei tetrameri ma non dovrebbero essere in grado di legarne due insieme formando aggregati (Fig. 1.9).

Le curve di precipitazione dei sali divalenti invece, hanno fornito risultati "strani" (Fig. 3.4; 3.5; 3.6). L'idea iniziale era che, data la natura dei sali divalenti, essi fossero in grado di legare più cilindri tra di loro (formando precipitati) e che all'aumentare della loro concentrazione oltre un certo valore soglia, si sarebbe osservata la ridissoluzione dei quadruplessi di folato (Fig. 1.9). Dei tre sali divalenti utilizzati, solamente il cloruro di calcio ha fornito risultati conformi a questa ipotesi. Infatti, si osserva il picco minimo (0.09 mg/ml di folato) all'aggiunta di CaCl_2 2 M a cui segue una graduale ma significativa risalita della curva (Fig. 3.4) con l'aumentare della concentrazione di sale. Tuttavia, questo comportamento si osserva solamente in questo caso poiché nelle curve di precipitazione di MgCl_2 e di MnCl_2 non si osserva una significativa risalita della curva in relazione all'aumento di concentrazione di

sale. Infatti, nel caso del cloruro di magnesio (Fig. 3.5) si osserva il picco minimo (0.09 mg/ml di folato) ad una concentrazione di sale di circa 0.2-0.3 M e, raggiungendo una concentrazione di sale pari a 0.5 M si osserva una concentrazione di folato in soluzione uguale a 0.1 mg/ml (aumento irrisorio di 0.01 mg/ml). Analogamente, nella curva di precipitazione di folato + MnCl_2 (Fig. 3-6), il picco minimo (0.13 mg/ml di folato in soluzione) si registra ad una concentrazione di sale pari a 0.15 M. Arrivando ad aggiungere 0.5 M di cloruro di magnesio, si arriva ad una concentrazione di folato in soluzione di soli 0.14 mg/ml (aumento di 0.01 mg/ml).

Questi risultati non confermano l'ipotesi formulata precedentemente (Fig. 1.9), ciò potrebbe essere dovuto ad un'eventuale azione destabilizzante dei sali divelnti sulla formazione di quadruplessi di folato. Questo spiegherebbe l'assenza di precipitazione e ridissoluzione dei cilindri. Sono necessarie ulteriori analisi per spiegare il fenomeno.

Nel caso delle poliammine invece, le curve di precipitazione (Fig. 3.7; 3.8) hanno mostrato dati interessanti: con l'aggiunta di spermidina 0.035 M (35 mM) si osserva la precipitazione dei quadruplessi con soli 0.06 mg/ml di folato in soluzione (Fig. 3.7). All'aumentare della concentrazione di sale, si osserva una ridissoluzione del folato (0.5 M di spermidina \rightarrow 0.13 mg/ml, aumento di 0.07 mg/ml di folato in soluzione). La spermidina ha fornito dati

analoghi con un picco della curva (Fig. 3.8) a 0.015 M (15 mM) con 0.17 mg/ml di folato in soluzione. Al picco segue una graduale ridissoluzione di quadruplessi di folato (0.05 M \rightarrow 0.22 mg/ml, aumento di 0.05 mg/ml di folato in soluzione).

Questi risultati sono molto simili a quelli ottenuti da studi passati che confermavano la presenza di fenomeni di precipitazione del DNA con l'aggiunta di spermidina 20-30 mM circa (0.02-0.03 M) e spermina 10 mM circa (0.01 M) (*E. Raspaud et al, 1998*). Ciò conferma l'ipotesi iniziale, ovvero che il comportamento del folato in questa circostanza dovesse essere simile a quello del DNA, viste le somiglianze biofisiche con la guanosina.

4.2 Diffrazione a raggi X

Le analisi dei precipitati ottenuti con sali monovalenti e divalenti non hanno mostrato nulla, suggerendo che il folato che precipita è amorfo. Questo si potrebbe spiegare attribuendo ai sali un'azione destabilizzante nella formazione di quadruplessi. Sarebbe opportuno svolgere ulteriori analisi per cercare di comprendere in che modo i sali monovalenti e divalenti agiscono nel processo di formazione di quadruplessi di folato.

Le analisi in diffrazione dei precipitati ottenuti con l'aggiunta di poliammine ha fornito i risultati desiderati (Fig. 3.15; 3.15). I precipitati hanno mostrato

una disposizione ordinata. Ulteriori analisi tramite l'ausilio del software Igor (Fig. 3.14; 3.15) hanno permesso di constatare che i quadruplessi di folato precipitato dispongono di una simmetria quadrata. Ciò ha portato alla postulazione di un modello teorico che spiegherebbe in che modo cilindri di folato sono disposti tra loro (Fig. 4.1):

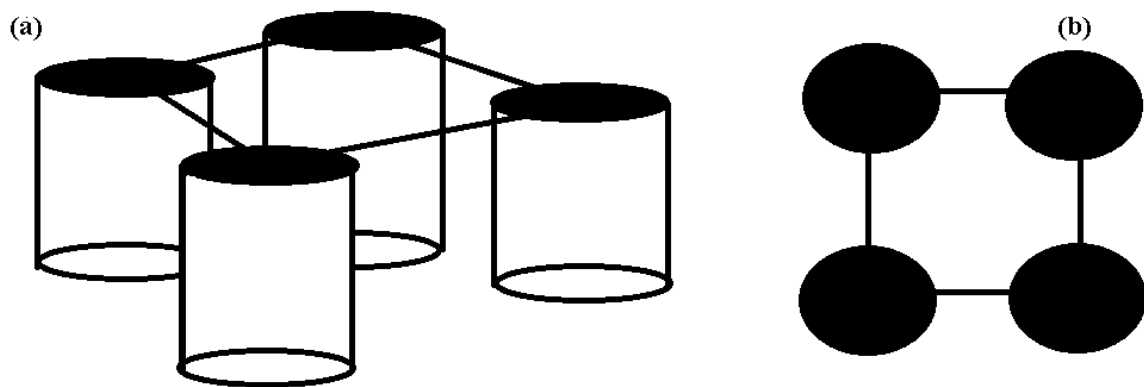


Figura 4.1: Modello della fase assunta dai quadruplessi di folato quando in seguito all'aggiunta di spermidina/spermina. Sezione trasversa (a) e vista dall'alto (b).

Tutto ciò è molto interessante, dal momento che studi passati hanno dimostrato che i sali di acido folico in acqua tendono ad auto-aggregarsi in quadruplessi che a loro volta si aggregano in fasi esagonali (*Federica Ciuchi et al, 1994*). La disposizione in fasi quadrate invece che esagonali potrebbe dipendere da un'eventuale azione aggregante di spermina e spermidina, con conseguente avvicinamento dei cilindri di folato. Inoltre si può osservare come il parametro di cella ottenuto dai precipitati di spermidina ($sq d = 54.2$) sia

maggiore di quello ottenuto dai precipitati di spermina ($sq d = 44.9$). Questo potrebbe dipendere dal fatto che la spermina forma quattro legami col folato, mentre la spermidina ne forma solamente tre. La presenza di quel quarto legame aggiuntivo potrebbe essere implicato nella stabilizzazione (e quindi nell'avvicinamento) dei quadruplessi di folato. Sarebbe interessante approfondire questi risultati per comprendere in dettaglio l'azione che queste poliammine svolgono nella formazione dei quadruplessi.

4.3 Transilluminatore-UV

Studi passati hanno confermato che i tetrameri di acido folico possiedono la capacità di emettere fluorescenza (A. Tyagi, A. Penzkofer, 2010). Tuttavia, i tetrameri di acido folico si formano in soluzione acquosa solo quando presenti in elevate concentrazioni (Federica Ciuchi et al, 1994). Ciò spiega l'assenza di fluorescenza nella soluzione madre di folato di potassio analizzata (10 mg/ml).

I campioni di folato di potassio in cui sono stati aggiunti sali monovalenti e divalenti hanno mostrato presenza di fluorescenza. Ciò potrebbe essere dovuto ad un'eventuale azione stabilizzante di questi sali nella formazione di tetrameri di folato. Sarebbe interessante approfondire la causa che porta ad ottenere la fluorescenza in studi futuri.

I campioni di. Folato di potassio in cui sono state aggiunte spermidina e spermina non hanno mostrato alcuna fluorescenza. Dato i risultati ottenuti nelle analisi in spettrofotometria e in diffrazione con questi sali, è oramai noto che la presenza di queste poliammine stabilizza e porta ad un fenomeno di condensazione e ridissoluzione dei quadruplessi di folato. Dunque, la mancanza di fluorescenza non dovrebbe essere causata da un'azione destabilizzate di spermina e spermidina nella formazione dei tetrameri. Alla luce dei risultati ottenuti dunque, si ipotizza che la mancanza di fluorescenza potrebbe essere causata da un possibile fenomeno di quenching. Se fosse questa la causa, le poliammine utilizzate fungerebbero da smorzatori della fluorescenza assorbendo l'eventuale fluorescenza generata a causa della loro vicinanza col folato di potassio. Sarebbe opportuno effettuare altri studi per approfondire questa ipotesi.

È risaputo che il potassio favorisce di più la fluorescenza rispetto al sodio, quindi sarebbe interessante effettuare altri studi mettendo a confronto il folato di potassio con il folato di sodio e far reagire entrambi con altri composti per comparare l'eventuale presenza di fluorescenza. Inoltre, si potrebbero effettuare delle prove variando la temperatura della soluzione poiché è stato osservato che la solubilità del folato aumenta con l'aumentare della temperatura (A. Tyagi, A. Penzkofer, 2009) e poiché il fenomeno del

quenching, essendo causato dalla vicinanza dell'agente smorzante con la fonte di fluorescenza, viene favorito dalle alte temperature.

4.4 Microscopia a Forza Atomica

Le immagini ottenute dall'osservazione in microscopia a forza atomica (Fig. 3.22- 3-28) dei precipitati analizzati contenenti spermidina (4 mM, 35 mM) e spermina (5 mM, 15 mM) hanno fornito risultati interessanti.

In particolare, effettuando una comparazione con studi passati effettuati su catene di polyG si è osservata una certa somiglianza:

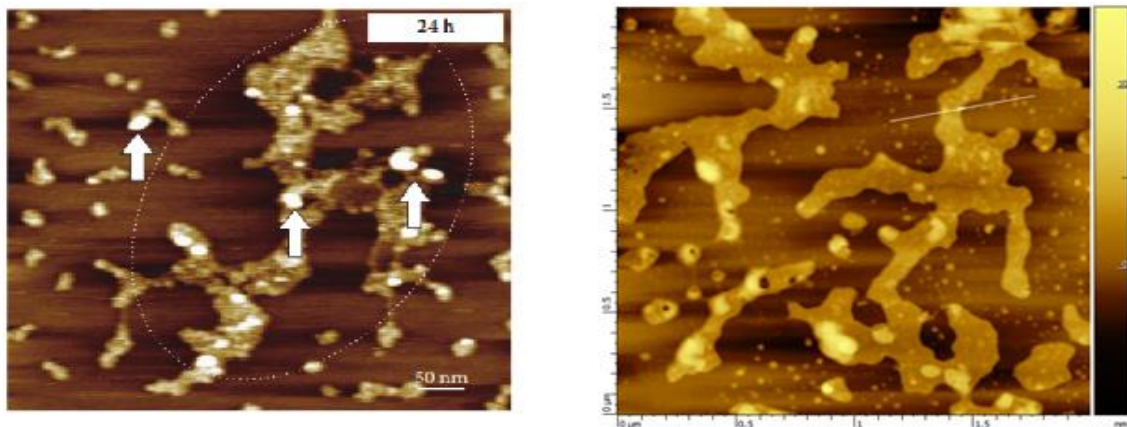


Figura 4.2: Immagine AFM di una sezione contenente catene oligonucleotidiche di guanosine ($5 \frac{\mu g}{mL}$) in presenza di ioni K^+ (sinistra) (Ana-Maria Chiorcea-Paquim et al, 2018) a confronto con una sezione ottenuta in AFM del campione folato + spermina 0.015 M (destra).

Anche l'immagine ottenuta per il campione di folato + spermina 5mM ha mostrato una certa somiglianza con risultati ottenuti dallo studio del comportamento di oligonucleotidi d(TG₄T) in presenza di ioni K⁺ in funzioni del tempo (7 giorni):

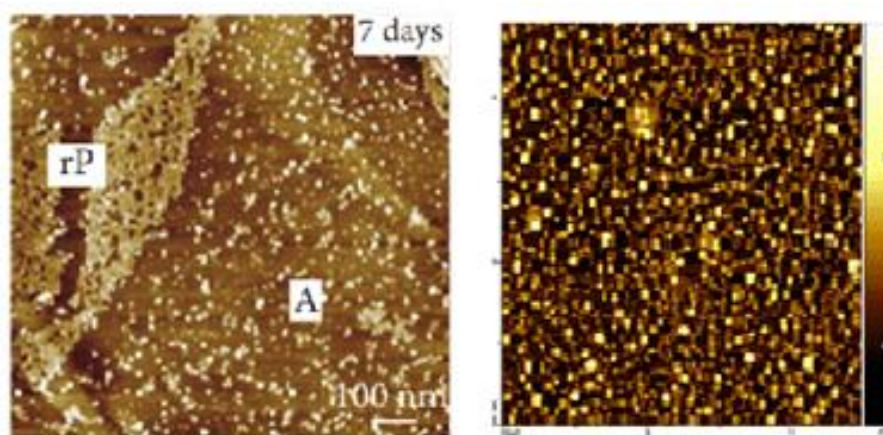


Figura 4.3: Immagine AFM di una sezione contenente catene d(TG₄T) in presenza di ioni K⁺ (sinistra) (*Ana-Maria Chiorcea-Paquim et al, 2018*) a confronto con una sezione ottenuta dall'analisi AFM del campione folato + spermina 5 mM.

È anche interessante notare il reticolo formatosi (presumibilmente) dalle interazioni dei vari quadruplessi di folato in soluzione, per il campione folato+ spermidina 4 mM (Fig. 3.22; 3.23). I reticoli in questione presentano delle altezze pari a 1.5 nm (Fig. 3-22, campione folato + spermidina 4 mM); 5.5 nm circa (Fig. 3.25, campione folato + spermina 5mM) e 5.5 nm circa

(Fig. 3.27, campione folato + spermina 0.015 M). Questi reticoli si presentano discontinui nel caso della spermidina (Fig. 3.23) e più compatti e continui nel caso della spermina (Fig. 3-25). Ciò potrebbe essere riconducibile alla diversa diponibilità a formare legami delle due poliammine: la spermidina forma tre legami con il folato (infatti il reticolo in figura 3.23 si presenta segmentato in tante piccole y) mentre la spermina ne forma quattro.

Sono in corso ulteriori analisi qualitative e quantitative.

5. CONCLUSIONI

Il lavoro presentato in questa tesi riguarda l'analisi delle proprietà strutturali e delle interazioni in quadrieliche modello, con la particolare intenzione di valutare quale influenza abbia la presenza di differenti controioni e poliammine nella formazione e nella stabilizzazione dei quadruplessi di folato.

È stato osservato attraverso tecniche di spettrofotometria e mediante esperimenti di diffrazione dei raggi X, in funzione del tipo di catione e della concentrazione di sale in cui è stata solubilizzato il folato, come la precipitazione avviene a molarità e in quantità diverse e come varia la struttura delle fasi condensate e i parametri di cella che le caratterizzano. Tali analisi hanno permesso di chiarire il meccanismo generale con cui avviene l'aggregazione spontanea dei quadruplessi di folato in relazione alla variazione di ioni monovalenti (potassio e sodio), bivalenti (calcio, magnesio e manganese) poliammine organiche (spermidina e spermina). Sono state implementate anche analisi di fluorescenza svolte con un Transilluminatore-UV, per caratterizzare l'eventuale presenza di fluorescenza in relazione alla tipologia di sale aggiunto. Infine, sono state condotte analisi di Microscopia a Forza Atomica sui campioni ottenuti mediante l'aggiunta di poliammine.

Possiamo riassumere che il comportamento dei cationi monovalenti ha portato alla diminuzione della concentrazione di folato in soluzione. Questa diminuzione, contrariamente a quanto ipotizzato inizialmente, sembrerebbe non essere dovuta dalla precipitazione di aggregati di quadruplessi: il campione analizzato tramite diffrazione a raggi X non ha prodotto alcun precipitato e la soluzione analizzata non ha rivelato la presenza di alcuna struttura ordinata e ripetuta. Le analisi al Transilluminatore-UV suggerirebbero la presenza di un'azione stabilizzante nella formazione di tetrameri di folato. Sono necessarie ulteriori analisi per comprendere al meglio il comportamento dei cationi monovalenti in relazione alla formazione e alla stabilizzazione di quadruplessi di folato.

Le analisi condotte con i sali divalenti hanno fornito risultati a tratti ambigui. Si supponeva che la loro azione dovesse portare inizialmente ad una condensazione dei quadruplessi (data dalla formazione di ponti salini) seguita da una loro ridissoluzione (causata dalla presenza in eccesso di sale in soluzione). In realtà, questo comportamento si osserva solamente con il cloruro di calcio, mentre gli altri sali divalenti (cloruro di magnesio e manganese) presentano un comportamento molto più simile a quello osservato nei sali monovalenti. L'analisi del loro precipitato ha confermato la mancanza di strutture ordinate e ripetute, dunque non precipitano quadruplessi

di folato in loro presenza. Alla luce di ciò, si ipotizza che potrebbero avere un'azione antagonista nella formazione dei cilindri di folato. Analisi con il Transilluminatore-UV hanno rivelato la presenza di fluorescenza, probabilmente dovuta ad un'azione stabilizzante nella formazione dei tetrameri. Sono necessarie ulteriori analisi per comprendere al meglio il comportamento dei cationi divalenti in relazione alla formazione e alla stabilizzazione di quadruplessi di folato.

Infine, le poliammine hanno fornito i risultati più promettenti. Il loro comportamento con il folato si è dimostrato essere simile a quello già osservato in passato con il DNA. Analisi dei loro precipitati hanno confermato che ciò che precipita possiede una forma ordinata e ripetuta in fase quadrata. Non è stata rivelata presenza di fluorescenza, ciò potrebbe essere dovuto ad un eventuale fenomeno di quenching. Occorrerebbero altre analisi per confermare o confutare questa ipotesi. L'analisi AFM dei precipitati con poliammine ha fornito immagini in cui sono visibili dei reticoli, probabilmente risultanti dalle interazioni tra vari quadruplessi. Sono necessarie ulteriori analisi qualitative e quantitative per valutare le caratteristiche di questi reticoli in altri contesti.

BIBLIOGRAFIA

- Fraccia T. P.; Smith G. P.; Ancheta; Paraboschi; I. Abiotic ligation of DNA oligomers templated by their liquid crystal ordering, (2015) Nature communications 6:6424.
- Franz H.; Ciuchi F.; Di Nicola G.; De Morais M. M.; Mariani P. Unusual lyotropic polymorphism of deoxyguanosine-5'-monophosphate: X-Ray diffraction analysis of the correlation between self-assembling and phase behavior (1994) The American Physical Society, Volume 50, number 1.
- Lazcano A.; Prebiotic Evolution and Self-Assembly of Nucleic Acids. (2018) ACS Nano.
- Mariani P.; Spinozzi F.; Federiconi F.; Amenitsch H.; Spindler L.; Drevensek-Olenik I. Small Angle X-ray Scattering Analysis of Deoxyguanosine 5'-Monophosphate Self-Assembling in Solution: Nucleation and Growth of G-Quadruplexes. (2009) J. Phys. Chem. B, 113, 7934–7944.
- Mariani P.; Spinozzi F.; Federiconi F.; Ortore M. G.; Amenitsch H.; Spindler L.; Drevensek-Olenik I. Guanosine Quadruplexes in Solution: A Small-Angle X-Ray Scattering Analysis of Temperature

Effects on Self-Assembling of Deoxyguanosine Monophosphate (2010)
Journal of Nucleic Acids, Article ID 472478.

- 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. *J. Am. Chem. Soc.* 1994,116, 7064-7071.
- Monia Angelozzi. Proprietà Strutturali ed Interazionali in Eliche di Interesse Biologico: Precipitazione e Dissoluzione di Quadruplessi di Guanosina. Tesi di laurea magistrale. Università Politecnica delle Marche, Facoltà di Scienze. Anno accademico 2011-2012. Relatore Paolo Mariani.
- Xiaolan Qu; Chang Yang; Jing Zhang; Nan Ding; Yao Lu; Lei Huang and Guangya Xiang. *In vitro* evaluation of a Folate-bovine serum albumin-doxorubicin conjugate. *Journal of Drug Targeting*, 2010; 18(5): 351-361.
- A. Tayagi; A. Penzkofer. Fluorescence spectroscopic behaviour of folic acid. *Chemical Physics* 367 (2010) 83-92.
- Xiaoyang Li; Antoni Sánchez-Ferrer; Massimo Bagnani; Jozef AdamciK; Paride Azzari; Jingcheng Hao; Aixin Song; Hongguo Liu

and Raffaele Mezzenga. Metal ions confinement defines the architecture of G-quartet, G-quadruplex fibrils and their assembly into nematic tactoids. 2020, 9832-9839 PNAS.

- Ana-Maria Chiorcea-Paquim ; Ramon Eritja and Ana Maria Oliveira-Brett. Electrochemical and AFM Characterization of G-Quadruplex Electrochemical Biosensors and Applications. CIBER-BBN, Institute for Advanced Chemistry of Catalonia (IQAC), Spanish Council for Scientific Research (CSIC), Jordi Girona 18-26, 08034 Barcelona, Spain.

RINGRAZIAMENTI

Vorrei ringraziare tutti coloro che hanno contribuito allo sviluppo di questa tesi, a partire dal Professore e Relatore Paolo Mariani che mi ha permesso di avvicinarmi al mondo della biofisica a me prima sconosciuto. Una persona solare dall'ottimismo contagioso, che è stato in grado di supportarmi e guidarmi durante un periodo molto particolare della mia vita. Per me non è solo un professore, ma un modello da seguire.

Ringrazio tutti i professori, ricercatori, dottorandi e tesisti all'interno del laboratorio di Biofisica del Disva e del MASBIC con il quale ho avuto il piacere e l'onore di relazionarmi.

Ringrazio Mario Pergolini, il tecnico di laboratorio di Biofisica del Disva, che mi ha permesso di ottenere tutti i dati delle analisi in diffrazione a raggi X in questa tesi. Una persona squisita, da una gentilezza ed una disponibilità senza eguali che ho avuto la fortuna e l'onore di conoscere e che mi ha supportato in ogni momento.

Ringrazio Paolo Moretti a cui devo i risultati delle analisi in AFM e che mi ha aiutato più di una volta durante questo percorso.

Un ringraziamento speciale va a Stefano Nerozzi, mio caro amico e collega.

Una persona fantastica, senza la quale non sarebbe stato possibile per me portare a termine questo lavoro di tesi.

Ringrazio la mia famiglia e la mia ragazza che mi hanno accompagnato in questo fantastico percorso, condividendo tutte le gioie e i dolori, supportandomi in ogni momento. Senza di loro non ce l'avrei mai fatta.

Ringrazio tutti gli amici e amiche che nei periodi bui mi sono stati accanto ed hanno avuto la pazienza di sopportarmi.

Infine, ma non per ultimo, ringrazio Renato Galzio senza il quale non avrei avuto la possibilità di essere qui.