



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

Corso di Laurea Magistrale in Biologia Molecolare e Applicata

**PROPRIETÀ DI AUTO-AGGREGAZIONE DELL'ACIDO FOLICO:
PRODUZIONE DI IDROGEL**

**SELF-AGGREGATION PROPERTIES OF FOLIC ACID:
PRODUCTION OF HYDROGELS**

Tesi di Laurea Magistrale di:

Stefano Nerozzi

Relatore:

Prof. Paolo Mariani

Sessione autunnale

Anno accademico 2019-2020

INDICE

<i>Scopo della tesi</i>	2
1. INTRODUZIONE	6
1.1: Acido folico e folati	6
1.2: Guanosina 5' monofosfato	9
1.3: Hydrogels	14
1.4: PEG (polietilen-glicole)	16
1.5: Solventi chimici organici	18
1.5.1 <i>Metanolo (MeOH)</i>	18
1.5.2 <i>Dimetilsolfossido (DMSO)</i>	19
2. METODI E MATERIALI	22
2.1: Diffrazione dei raggi x	22
2.1.1: <i>Il diffrattometro a raggi X</i>	24
2.1.2: <i>La legge di Bragg</i>	27
2.1.3: <i>Calibrazione dello strumento con il tricosano</i>	31
2.1.4: <i>Allestimento per l'analisi in diffrazione e analisi dei dati</i>	34
2.2: Spettroscopia UV-visibile	38
2.2.1 <i>Legge dell'assorbimento (legge di Lambert-Beer)</i>	40
2.2.2 <i>Determinare la concentrazione della sostanza esaminata</i>	41
2.2.3 <i>Struttura generica di uno spettrofotometro UV-visibile</i>	44
2.3: Microscopia a Forza Atomica (AFM)	48
2.3.1: <i>Strumentazione AFM</i>	49
2.4: Preparazione dei campioni	52
2.4.1 <i>Titolazione acido-base e preparazione del folato di potassio</i>	53
2.4.2: <i>Preparazione delle soluzioni di polietilen-glicole (PEG)</i>	56
2.4.3 <i>Scelta delle percentuali di PEG da utilizzare</i>	59

2.4.4: Allestimento di una curva di titolazione	61
2.4.5: Scelta e preparazione dei buffers a pH noto	64
2.4.6: Preparazione dei sistemi folato di potassio/PEG/buffers	65
2.4.7: Preparazione di hydrogels acido folico/metanolo	67
2.4.8: Preparazione di hydrogels acido folico/DMSO	69
2.4.9: Campioni analizzati	71
3. RISULTATI E DISCUSSIONE	74
3.1: Analisi dei dati ottenuti mediante diffrazione a raggi X.....	74
3.2: Analisi degli effetti prodotti da variazione di pH sul folato	82
3.3: Analisi qualitative di <i>hydrogels</i> di acido folico.....	88
3.3.1: Sistemi acido folico/MeOH.....	88
3.3.2: Sistemi acido folico/DMSO	90
3.4: Analisi spettrofotometriche dei sistemi acido folico/DMSO.....	92
3.5: Analisi di immagini e dati ottenuti da AFM	96
4. CONCLUSIONI.....	100
BIBLIOGRAFIA.....	103
RINGRAZIAMENTI.....	106

Scopo della tesi

La mia tesi si inserisce in un ambito di ricerca decisamente vasto, riguardante la caratterizzazione di materiali nanostrutturati ottenuti da biomolecole in grado di auto assemblarsi in acqua (*self-assembling*).

Un prototipo ormai piuttosto noto di queste molecole è la guanina, una delle quattro basi azotate costituenti DNA e RNA. Mentre negli acidi nucleici lega in modo complementare la citosina secondo lo schema di Watson e Crick, la guanina è capace di formare legami idrogeno complementari con altre tre guanine secondo una caratteristica geometria detta di Hoogsteen. Il risultato ottenuto è la costituzione di tetrameri planari (detti G-quartet o G-tetramer), a loro volta in grado di formare aggregati sopramolecolari piuttosto stabili, che formano una struttura elicoidale (G-quadruplex). Questo particolare comportamento della guanina è stato osservato in specifiche aree del DNA ricche di G, come ad esempio nelle regioni telomeriche o in alcuni promotori oncogeni, ma si verifica anche nel caso del singolo nucleotide fosfato (guanosina monofosfato, GMP) quando viene disciolto in acqua.

Il comportamento della GMP in acqua è in particolar modo interessante. La formazione dei tetrameri precedentemente citati si può infatti immediatamente osservare in condizioni diluite, ma a causa delle loro caratteristiche anfifiliche, già a basse concentrazioni i quartetti tendono ad impilarsi gli uni sugli altri, al fine di generare lunghe strutture cilindriche. Inoltre, in presenza di ioni metallici di modeste dimensioni come Na^+ e K^+ , i legami di stacking sono integrati dalla formazione di complessi tra gli ioni metallici con gli ossigeni delle guanine, esposti nella cavità centrale della struttura tetramerica. Questo fenomeno rende i cilindri altamente stabili. Si noti che questi tetrameri non sono impilati "in registro", ma risultano ruotati in maniera regolare di circa 30° l'uno rispetto all'altro, a causa delle cariche negative presenti sui fosfati che si affacciano sulla superficie esterna del quartetto (e di conseguenza del cilindro). La presenza delle cariche sulla superficie del cilindro ha altri due effetti: il primo è quello di rendere i cilindri decisamente rigidi; il secondo è la generazione di forze repulsive di tipo idrostatico tra quadruplessi differenti, determinando la formazione di fasi caratteristiche note come liquido cristalline di tipo liotropico. Se la concentrazione di GMP aumenta, è possibile osservare fasi colonnari di tipo colesterico ed esagonale. Di recente è stato dimostrato che la riduzione delle forze elettrostatiche repulsive tra i quadruplessi (ad esempio mediante la sostituzione di alcune molecole di GMP con molecole di guanosina

G, che non hanno carica) non altera le capacità di self-assembling e di conseguenza neanche la formazione di tetrameri e di quadruplessi, ma questi ultimi risultano essere più flessibili e capaci di associarsi tra loro in determinati punti (nodi), determinando la formazione di gel fisici in grado di assorbire notevoli quantità di acqua (fino a circa il 98% in peso). Le caratteristiche di questi singolari gel (ormai noti come *hydrogels*), quali ad esempio auto-assemblaggio, biocompatibilità, totale trasparenza, alta viscosità, elevata stabilità, reversibilità termica e adattamento a modifiche dell'ambiente (pH, temperatura, attività enzimatica, ...), li rendono particolarmente idonei per varie 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 ed è stato dimostrato da vari studi che i folati alcalini in acqua sono in grado di formare dei quadruplessi, seguendo lo stesso schema di auto-assemblaggio della GMP: i monomeri del folato si associano tra loro a formare tetrameri che si sovrappongono uno sull'altro, formando strutture elicoidali. Come già osservato per la guanosina 5' monofosfato, l'associazione in quadruplessi è immediatamente seguita dalla formazione di fasi liotropiche di tipo liquido cristallino. Lo studio delle caratteristiche strutturali e dell'effetto dei controioni sui polimorfismi

dell'acido folico non è ancora completo, e potrebbe rivelare degli aspetti particolarmente rilevanti.

In questo ambito, il lavoro presentato in questa tesi riguarda la possibile formazione di *gels* da parte dell'acido folico e del folato di potassio. A questo scopo, dopo una verifica positiva della formazione di quadruplessi in differenti condizioni di composizione, è stato considerato come variazioni di forza ionica e di pH potessero determinare una riduzione delle forze elettrostatiche repulsive tra i quadruplessi e favorire l'eventuale formazione di *gels*. I risultati negativi hanno fatto pensare che fosse necessario modificare le proprietà del solvente, e utilizzando inizialmente metanolo ed in seguito anche DMSO (dimetilsolfossido) è stata finalmente osservata la formazione di un gel stabile e dotato di reversibilità termica e di capacità di auto-riparazione (*self-healing*). Le tecniche biofisiche utilizzate per la caratterizzazione e lo studio del gel sono state la diffrazione a raggi X, la microscopia a forza atomica (AFM) e la spettroscopia UV-visibile. I risultati di questo lavoro sono stati duplici: da una parte sono state definite le condizioni di stabilità del gel, dall'altra sono state tentativamente analizzate le proprietà fisiche dei quadruplessi in presenza di differenti solventi, condizioni di pressione osmotica e variazioni di pH.

1. INTRODUZIONE

1.1: Acido folico e folati

L'acido folico ed i folati (Fig. 1.1) sono vitamine idrosolubili, sensibili al calore, alla luce, all'aria e all'acidità solitamente note come vitamina B9.

Frequentemente considerati sinonimi, i due termini vanno distinti: per folato s'intende la vitamina nella sua forma naturale presente negli alimenti; l'acido folico (acido monopteroilglutammico o pteroilmonoglutammico) è la forma ossidata della vitamina, e identifica la molecola sintetica presente nei formulati vitaminici e aggiunta negli alimenti definiti "fortificati".



Fig. 1.1: Aspetto di folati ed acido folico in polvere.

Alimenti naturalmente ricchi di folati sono ad esempio le verdure a foglia verde (spinaci, broccoli, asparagi), i legumi, la frutta (kiwi, fragole e arance) e la frutta secca (come mandorle e noci). Per quanto riguarda i cibi di origine animale, il fegato, alcuni formaggi e le uova hanno contenuti piuttosto elevati di folati.

La molecola in esame è composta da blocchi costitutivi di pterina, acido p-amminobenzoico ed acido glutammico ed è essenziale per la sintesi del DNA, delle proteine e per la formazione dell'emoglobina; svolge un ruolo particolarmente importante per i tessuti che vanno incontro a processi di proliferazione e differenziazione, ad esempio i tessuti embrionali.

Non si esclude la possibilità che possa intervenire anche nella prevenzione di malformazioni congenite e alcuni difetti cardiaci.

L'acido folico è anche in grado di contribuire alla prevenzione di altre situazioni di rischio per la salute: la sua presenza diminuisce i livelli dell'amminoacido omocisteina, associato al rischio di malattie cardiovascolari ed infarti.

L'acido folico ha grande importanza specialmente per le donne, poiché nelle prime fasi della gravidanza una sua carenza aumenta in modo rilevante il rischio di malformazioni del feto, in particolare di difetti del tubo neurale come la spina bifida o l'anencefalia. La carenza di folati inoltre, potrebbe essere

associata ad altri esiti avversi della gravidanza (ritardo di crescita intrauterina, parto prematuro). Altre conseguenze della carenza di acido folico potrebbero consistere in varianti multiple di anemia, oltre che una mancata produzione delle purine e della timina necessarie per la sintesi del DNA, come precedentemente accennato (A. Tyagi, A. Penzkofer 2009). L'acido folico è inoltre un potenziale agente impiegabile nell'ambito della prevenzione del cancro, grazie alla sua attività antiossidante e tramite attività di *scavenging* dei radicali liberi (A. Tyagi, A. Penzkofer 2009).

L'anello eterociclico pterinico della molecola dell'acido folico ha un comportamento analogo alla guanina, ormai nota e studiata in più occasioni: mostra infatti lo stesso schema multiplo di gruppi donatori e accettori per la formazione di legami idrogeno (Fig 1.2).

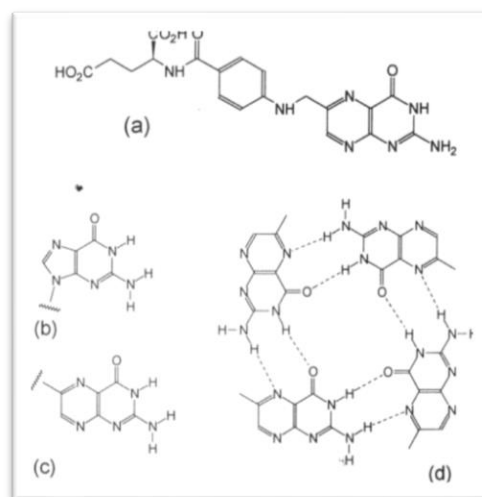


Fig. 1.2: (a) Struttura dell'acido folico; somiglianza tra guanina (b) e pterina (c); (d) *self-recognition* tra pterine e formazione di tetradi tramite legami H di tipo Hoogsteen (F. Ciuchi et al. 1994).

È inoltre stato dimostrato che i folati alcalini in acqua sono in grado di formare dei quadruplessi, seguendo lo stesso schema di auto-assemblaggio della guanosina 5' monofosfato (GMP): i monomeri del folato si associano tra loro a formare tetrameri che si sovrappongono uno sull'altro, formando strutture elicoidali. Alla fine di questo processo, l'associazione in quadruplessi è seguita dalla formazione di fasi liotropiche di tipo liquido cristallino.

1.2: Guanosina 5' monofosfato

La Guanosina (Fig. 1.3) è un derivato della Guanina (Fig. 1.4), una base purinica che consiste in un anello fuso ad un anello imidazolico, insolubile in acqua a causa delle sue proprietà aromatiche. È presente nel DNA e nell'RNA appaiata con la citosina, secondo le interazioni di Watson-Crick, attraverso tre legami idrogeno. La Guanosina è molto più solubile della Guanina in acqua.

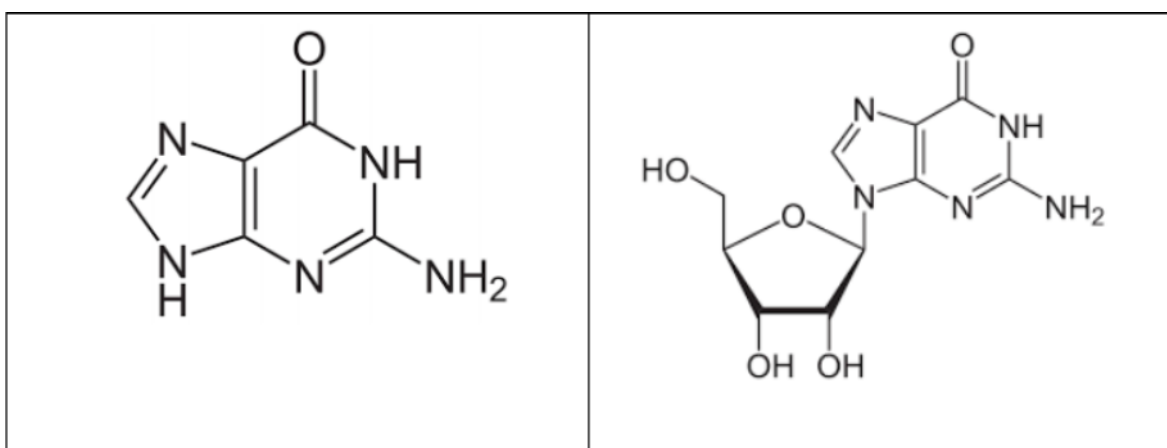


Fig. 1.3: Guanosina.

Fig. 1.4: Guanina.

La guanosina 5' monofosfato (GMP) (Fig. 1.5) è un nucleotide derivato della guanina, base azotata che costituisce gli acidi nucleici, e delle sue capacità di auto assemblamento, in grado di formare strutture più complesse.

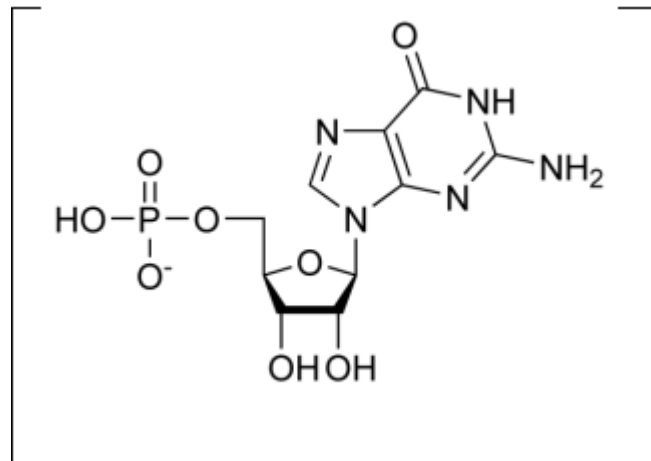


Fig. 1.5: Guanosina 5' monofosfato.

Precedenti studi condotti su queste molecole hanno portato alla luce la natura e le capacità auto-aggreganti della GMP, che la distinguono dalle altre basi azotate per la capacità di generare quartetti. Si tratta di agglomerati costituiti da quattro unità singole che si legano tra loro grazie a due legami idrogeno detti di Hoogsteen, a formare tetrameri che a loro volta si impilano su loro stessi al fine di formare strutture cilindriche ed elicoidali (*Mariani et al 2009*) (Fig. 1.6).

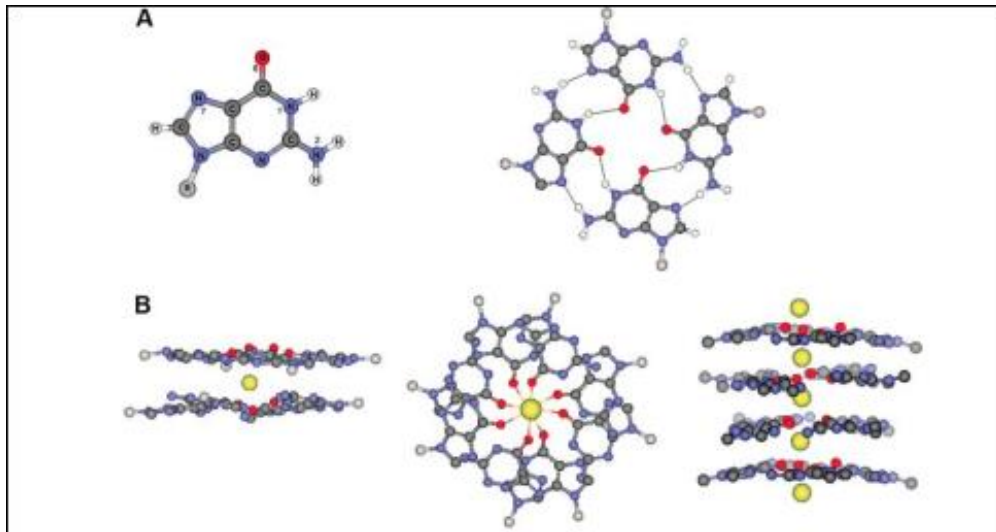


Fig. 1.6: Rappresentazione schematica del procedimento grazie al quale la GMP riesce ad auto-assemblarsi in acqua: (A) monomero e tetramero; (B) inizio dell'impilamento dei quartetti e formazione dei quadruplessi (*Mariani et al 2009*).

Questo processo di formazione di quadruplessi è termodinamicamente favorito, infatti ad alte concentrazioni (>100 mM) non esistono molecole di GMP in forma monomerica. Da qui l'idea di approfondire lo studio di queste strutture, specialmente ciò che riguarda la loro capacità di auto aggregazione all'interno di un ambiente costituito da sola acqua.

La GMP (guanosina 5' monofosfato) in presenza di ioni metallici positivi (Na^+ o K^+) stabilizza i diversi quartetti che costruiscono la struttura, tramite complessazione dello ione metallico con gli ossigeni della guanosina esposti all'interno della cavità centrale della struttura tetramerica: questo fenomeno determina la formazione di lunghi cilindri all'aumentare del numero di tetrameri (*Carducci et al. 2018*).

Queste pile elicoidali sono strutture composte da tetrameri impilati gli uni sugli altri tramite interazioni di π - π stacking e ruotati di circa 30° l'uno rispetto all'altro a causa delle repulsioni delle cariche negative presenti sulla superficie esterna del cilindro, cioè dei gruppi fosfato (*Carducci et al. 2018*) (Fig. 1.7).

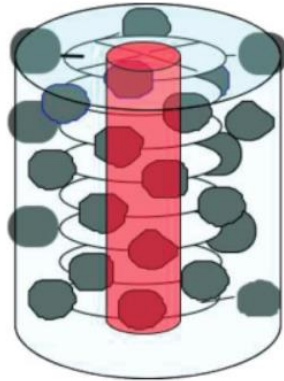


Fig. 1.7: Aspetto cilindrico assunto dalle strutture GMP.

In più, i quadruplessi di guanosina mostrano in acqua proprietà liquido cristalline (LC), poiché sono in grado di creare strutture con diverso grado di ordine a seconda della concentrazione di guanosina monofosfato impiegata. A basse concentrazioni di GMP si osserva la formazione di fasi colesteriche, mentre a concentrazioni maggiori si osservano fasi esagonali (Fig. 1.8). Questa particolare predisposizione di GMP in acqua ha portato allo studio di queste strutture derivanti e a verificarne la loro stabilità e le loro caratteristiche fisiche al variare di alcuni fattori.

Analizzando approfonditamente un *G-quadruplex* in cui ogni *G-quartet* sia costituito unicamente da GMP, è possibile notare che la superficie esterna è

totalmente formata da fosfati, che creano un'intensa carica negativa in grado di produrre forze repulsive tra i differenti quadruplessi.

Tuttavia, mescolando GMP con G nella preparazione dei quadruplessi, è possibile ottenere un'alternanza di molecole di GMP e G in ciascun quartetto: i vari "dischi" avranno una maggiore tendenza ad impilarsi a causa della mancanza di repulsione tra i fosfati carichi negativamente, la quantità di carica sulla superficie dei quadruplessi risulterà diminuita e le forze di repulsione tra di essi fortemente ridotta. Si renderà quindi possibile la formazione di legami di tipo Van der Waals tra regioni ricche di G tra quadruplessi differenti. Complessivamente, i passaggi citati portano alla formazione di particolari gels noti come *hydrogels*, la cui matrice è dovuta ad un peculiare auto-assemblaggio di singoli monomeri, alla formazione di quadruplessi ed alla stabilizzazione del reticolo tridimensionale tramite l'interposizione di legami attrattivi non polari. Dunque, l'*hydrogel* nel sistema G/GMP è un gel di tipo fisico, e questo argomento verrà approfondito nella seguente sezione.

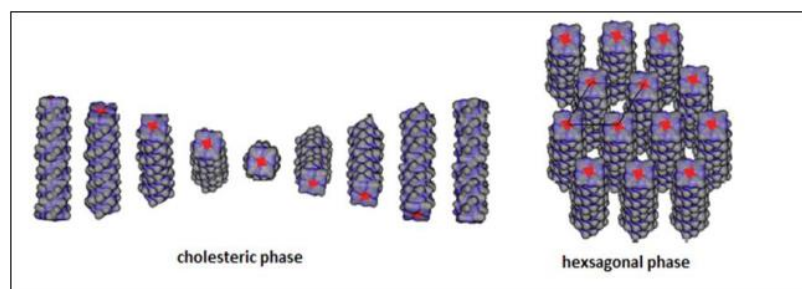


Fig. 1.8: Quadruplessi in fase colesterica ed esagonale (*Mariani et al. 2009*).

1.3: *Hydrogels*

Le basi teoriche e pratiche sulle quali si fonda questa tesi consistono nella preparazione tramite diversi metodi e nel conseguente studio dei precedentemente citati *hydrogels*: si tratta di *gels* formati da reti tridimensionali costituite da catene polimeriche idrofiliche, collegate tra loro da legami incrociati, in grado di assorbire acqua in grande quantità (~ 95% in peso). Eseguendo una semplice analisi macroscopica, questi *gels* possono essere facilmente classificati come soluzioni liquido-viscose. Dal 1894 e nel corso del tempo si è studiata ed approfondita la capacità degli *hydrogels* di rispondere a un gran numero di stimoli, quali pH, temperatura, forza ionica e altri; attualmente gli studi più rilevanti si concentrano su quelli che vengono definiti *smart hydrogels*, dotati di particolari proprietà quali auto-assemblaggio, legami incrociati di debole intensità, grande capacità di rigonfiare sotto idratazione, biocompatibilità (Fig. 1.9).

Tra le caratteristiche in comune tra i vari tipi di *hydrogels* è possibile citare:

- Proprietà meccaniche o fisiche.
- Natura dei gruppi laterali polimerici (ionici o non ionici).
- Tipo di *cross-link* da cui sono formati (fisico o chimico).
- Origine (naturale, sintetica o ibrida).

Per quanto riguarda la loro origine, gli *hydrogels* possono essere preparati a partire da polimeri sintetici quali PEG (*polyetilen glycole*), PVA (*polyvinyl alcol*) ed altri, oppure utilizzando macromolecole di origine naturale (agarosio, cellulosa, alginato, acido ialuronico, acidi grassi, acidi nucleici, zuccheri, peptidi, nucleosidi, etc...).

La differenza tra le due tipologie risiede nel fatto che i primi possono essere modificati per ottenere le proprietà desiderate, mentre i secondi, essendo naturali, hanno il vantaggio di essere biocompatibili: ciò permette di ridurre notevolmente il rischio di infiammazioni o altri effetti collaterali in applicazioni *in vivo* (*drug delivery*, ingegneria tissutale, medicina rigenerativa).

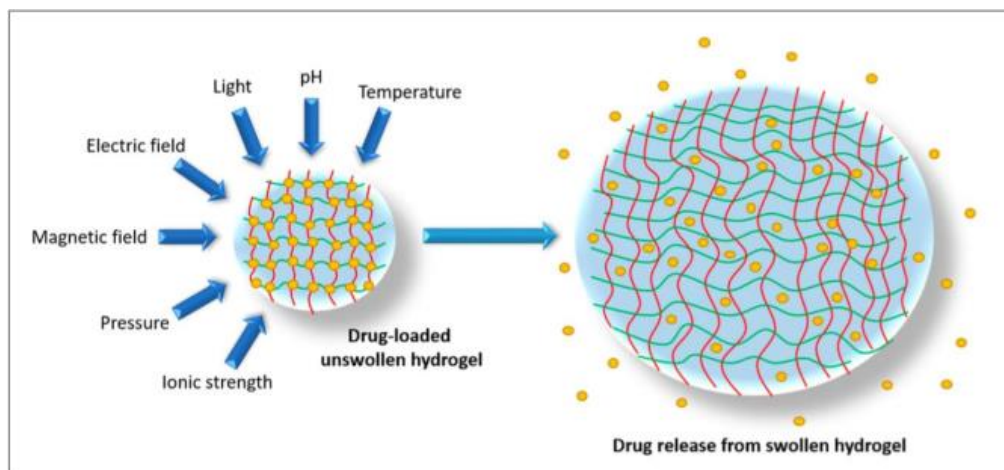


Fig. 1.9: Esempio di *hydrogel* e rilascio di farmaci intrappolati, in risposta a vari stimoli chimici e fisici. Le linee rosse e gialle indicano la struttura a matrice intrecciata dell'*hydrogel*, i punti gialli rappresentano le molecole del farmaco.

In questa tesi vengono presentate le tecniche di indagine impiegate per preparare ed analizzare *gels* generati con predeterminate quantità di acido folico: diffrazione a raggi X, microscopia a forza atomica (AFM) e la spettroscopia UV-visibile.

1.4: PEG (polietilen-glicole)

Il polietilen-glicole (Fig. 1.10) è un polimero formato per polimerizzazione dell'ossido di etilene e ha un peso molecolare di 20000 g/mol.

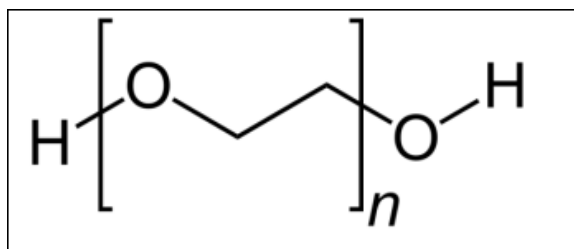


Fig. 1.10: Molecola di PEG.

In questo lavoro è stato scelto per la preparazione di soluzioni a concentrazioni diverse da impiegare come sistema permeabile nella preparazione dei campioni. Basandosi sul principio della pressione osmotica, il PEG è stato qui utilizzato come barriera semipermeabile per controllare il volume di acqua contenuto all'interno del sistema generato dal folato, al fine di studiare le variazioni di esso a livello di disposizione e organizzazione delle strutture formate in fase esagonale. Così facendo è stato possibile variare il quantitativo

di acqua presente a seconda della percentuale di PEG utilizzata nella soluzione, e verificare che effettivamente un sistema più acquoso può non garantire un'organizzazione particolarmente ordinata. Il PEG ed il folato sono quindi i costituenti principali dei campioni che sono stati analizzati, e ad essi va aggiunta anche l'acqua. Il folato di potassio è stato ottenuto tramite titolazione acido-base a partire da acido folico con una soluzione di KOH (idrossido di potassio) ed essiccato. Nella preparazione dei campioni lo scopo è stato quello di verificare la formazione della fase esagonale data dai quadruplessi di folato in ambiente acquoso. La presenza di acqua è stata regolata all'interno del sistema grazie ad un volume di soluzione di PEG tale da controllare la formazione della fase esagonale. In questo modo si è cercato di variare la concentrazione di folato presente (variando il volume di acqua), al fine di permettere una vicinanza maggiore dei quadruplessi formati e favorire la generazione di strutture polimeriche più allungate. Le tecniche di indagine utilizzate hanno permesso di rilevare la presenza di fasi esagonali all'interno dei sistemi di folato per mezzo della diffrazione ai raggi X. I campioni per la diffrazione sono stati preparati con le stesse concentrazioni di folato di potassio ma variando la percentuale delle soluzioni di polietilen-glicole impiegate, al fine di avere dei risultati in funzione della variazione della quantità di acqua presente all'interno del sistema analizzato.

1.5: Solventi chimici organici

Parte del lavoro su cui è costruita questa tesi è incentrata sull'impiego di alcuni solventi organici, quali metanolo e dimetilsolfossido (DMSO), con proprietà particolari presentate in questa sezione.

La loro utilità è testimoniata in letteratura da vari studi più o meno recenti, i quali attestano risultati positivi riguardanti la formazione di *gels*: disciogliendo infatti acido folico in percentuali ben precise nei solventi organici precedentemente citati, è stato possibile produrre dei *gels* molto o poco stabili e con peculiari proprietà, che verranno analizzati a fondo in seguito.

1.5.1 Metanolo (MeOH)

Il metanolo (CH_3OH , Fig 1.11) è il più semplice degli alcoli, molto volatile ed infiammabile.



Fig. 1.11: Metanolo.

A temperatura ambiente si presenta come un liquido incolore, ed è completamente solubile in acqua, come sarà approfondito in seguito.

Trova largo utilizzo come solvente e reagente in processi chimici industriali, tuttavia essendo tossico, se ingerito potrebbe causare problemi quali depressione del sistema nervoso centrale, mentre i suoi metaboliti (formaldeide e acido formico) sono responsabili di danni al nervo ottico e alla retina.

In questo lavoro è impiegato a diverse percentuali ed eventualmente miscelato con acqua distillata al fine di disciogliere l'acido folico e generare gel stabili o meno stabili (*Lye Lin Lock et al. 2013*).

1.5.2 Dimetilsolfossido (DMSO)

Il dimetilsolfossido (Fig. 1.12) è un composto organico appartenente alla categoria dei solfossidi.

A temperatura ambiente si presenta come un liquido incolore, inodore e particolarmente igroscopico. Il DMSO è un solvente aprotico, miscibile con una vasta gamma di solventi, fra cui alcoli, eteri, chetoni ed aromatici. È inoltre miscibile in tutte le proporzioni con l'acqua, come verificato anche in questo lavoro.

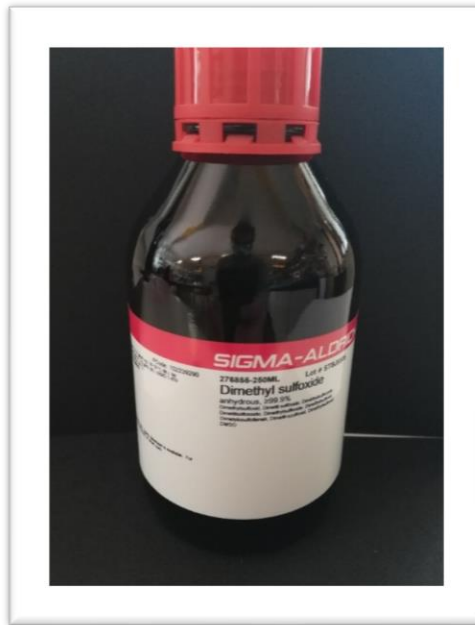


Fig. 1.12: DMSO.

Il DMSO è un comune solvente utilizzato nelle analisi NMR (*nuclear magnetic resonance*), grazie alla sua capacità di dissolvere un gran numero di sostanze e alla bassa interferenza dei suoi segnali.

Il DMSO è anche un agente crioprotettivo, essendo componente principale delle miscele di vitrificazione con cui si conservano organi e tessuti a temperature idonee. Anche per lo stoccaggio a lungo termine di cellule umane o animali, non trasformate o tumorali e delle cellule staminali embrionali, si ricorre al congelamento utilizzando un mezzo di coltura addizionato con DMSO.

Il ricorso in campo medico al DMSO risale al 1963, quando una squadra di ricercatori della "Scuola di Medicina dell'Università dell'Oregon" scoprì che tale sostanza era in grado di penetrare in profondità sotto la pelle e altre membrane senza danneggiarle, trasportando altre molecole all'interno del sistema biologico. Il dimetilsolfossido viene quindi impiegato anche per l'applicazione topica di prodotti farmaceutici.

Il dimetilsolfossido è un composto irritante, specialmente in caso di ingestione o contatto con occhi, pelle e tratto respiratorio. Un'esposizione prolungata può causare dermatite e probabilmente danni a livello del fegato o dei reni.

Nello specifico, in questo lavoro è stato impiegato per disciogliere predeterminate percentuali di acido folico, ed il tutto in seguito miscelato con acqua distillata a diverse proporzioni. In questa tesi si è inizialmente tentato di generare un gel di folato ed acqua tramite variazioni più o meno marcate di pH, ma visti i risultati non ottimali si è pensato appunto, consultando la letteratura, di disciogliere la molecola in esame nei solventi organici precedentemente citati. Verranno dunque presentati di seguito alcuni cenni teorici alla base delle tecniche utilizzate e successivamente i risultati relativi con le conseguenti conclusioni.

2. METODI E MATERIALI

2.1: Diffrazione dei raggi x

La diffrazione a raggi X è una delle tecniche più impiegate per studiare le strutture molecolari che si vogliono analizzare. È una tecnica di indagine indiretta non distruttiva che permette di caratterizzare la struttura del campione in esame.

Sfrutta la potenza dei raggi X, radiazioni elettromagnetiche ad alta energia con una lunghezza d'onda compresa tra 0.01 e 10 nm (10^{-10} m) (Fig. 2.1), confrontabili con le distanze interatomiche dei cristalli e delle molecole.

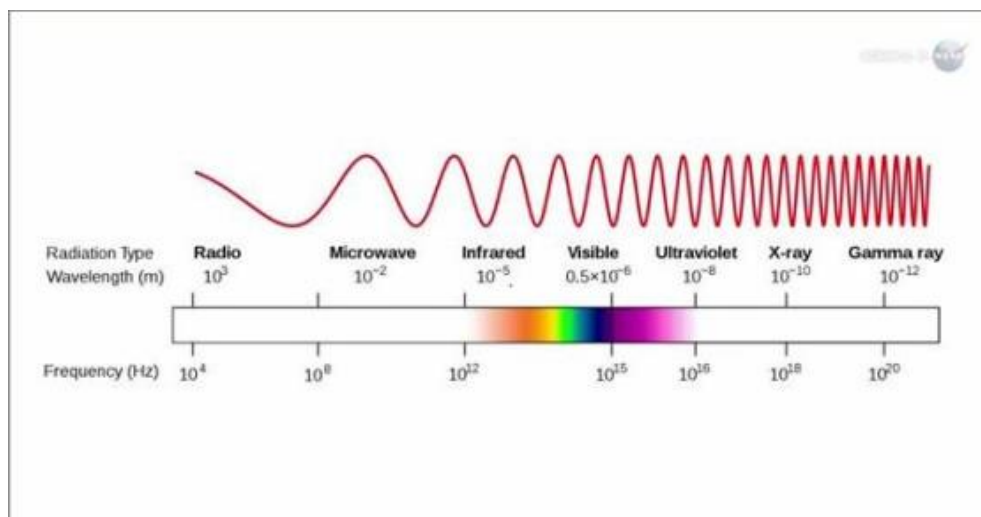


Fig. 2.1: Spettro della radiazione elettromagnetica, dalla banda radio alla banda gamma (fonte Science@NASA).

Tramite cristallografia a raggi X si è in grado di determinare la struttura terziaria di proteine o di acidi nucleici con una risoluzione minore di 3 Å. Per sistemi meno ordinati, come fibre o aggregati lipidici, la diffrazione dei raggi X fornisce utili informazioni strutturali. Per macromolecole biologiche in soluzione, la diffusione a piccolo angolo dei raggi X permette di ottenere informazioni sulla forma e le dimensioni delle particelle. Il fenomeno della diffrazione si verifica ogni volta che un'onda incontra un "ostacolo", infatti i raggi X vengono fortemente adsorbiti dalla materia e interagiscono con gli elettroni del materiale, tramite un'interazione proporzionale al numero atomico dell'elemento. Nell'ambito della diffrazione 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.

2.1.1: Il diffrattometro a raggi X

Lo strumento citato è il diffrattometro a raggi X (Fig. 2.2), costituito da un generatore di raggi X (un tubo all'interno del quale sono presenti un anodo e un catodo).

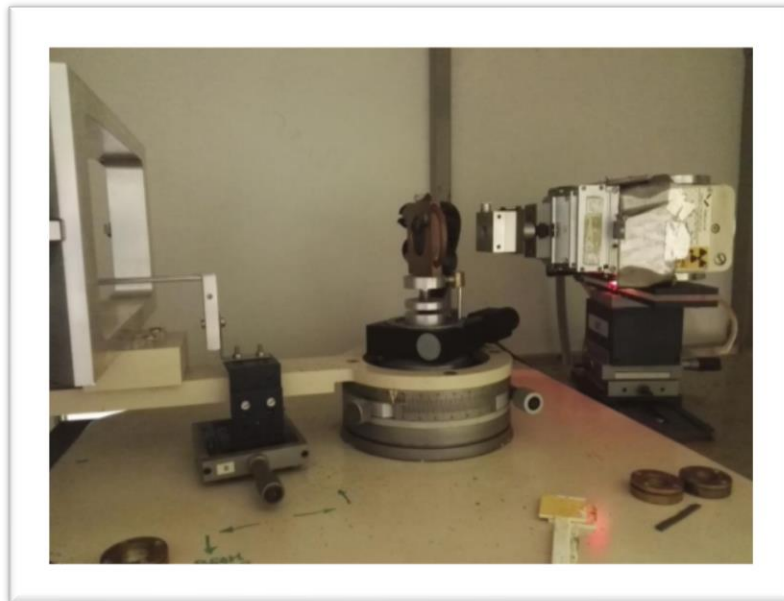


Fig. 2.2: Diffrattometro situato nel laboratorio di biofisica (DiSVA).

Il primo, ovvero l'elettrodo positivo, è costituito da un filamento di tungsteno, caratterizzato da un'elevata temperatura di fusione; il catodo invece è negativo ed è costituito da rame. Collegando il catodo ad un alimentatore, viene portato ad incandescenza e la produzione di elettroni avviene per effetto termoionico. Gli elettroni essendo carichi negativamente si dirigono verso l'anodo subendo deviazioni delle loro traiettorie con perdita di una parte della loro energia, che

viene emessa sotto forma dei raggi X. Talvolta potrebbe verificarsi che un elettrone che si è generato urti un elettrone delle orbite più interne provocandone l'espulsione dell'atomo, di conseguenza un elettrone di un'orbita a maggiore energia andrà ad occupare il posto nell'orbita interna. La conseguenza di questo spostamento è l'emissione di un fotone X di energia pari a quella persa dall'elettrone nel passaggio di posizione; un processo definito radiazione caratteristica.

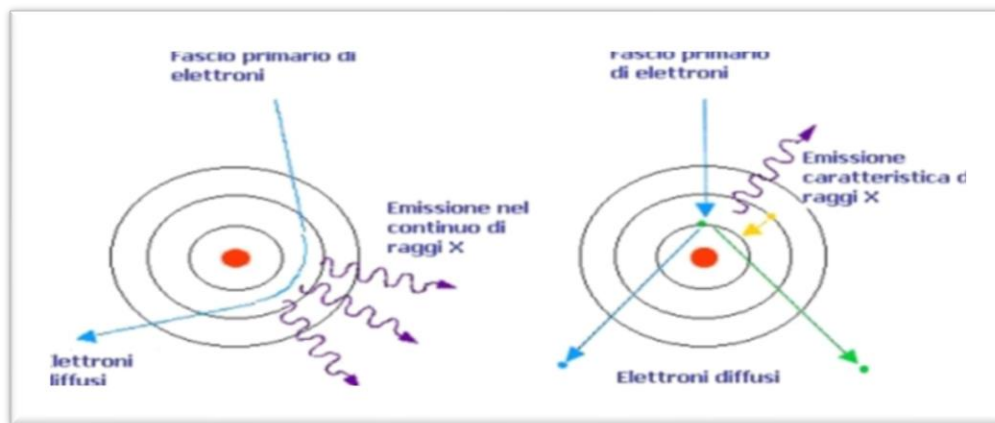


Fig. 2.3: Processo di formazione dei raggi X.

Oltre che dal generatore lo strumento è composto anche da un sistema di monocromatizzazione, formato da cristalli monocromatori di quarzo in grado di selezionare l'onda magnetica prescelta di $\lambda = 1.54 \text{ nm}$, da un sistema di collimazione del fascio incidente per definire forma e grandezza del fascio, da un porta-campione e da un sistema di rilevazione del fascio diffratto, cioè il detector costituito da una lastra fotografica in cui sarà possibile rilevare il

profilo di diffrazione, cioè l'intensità della radiazione in funzione dell'angolo di diffrazione. Per proteggere il rivelatore si impiega un beamstop, elemento in piombo collocato in corrispondenza del fascio che impedisce il raggiungimento dei componenti del fascio diretto, ombreggiando quindi la minima regione angolare possibile, così da evitare che il detector si oscuri per l'elevata intensità del fascio trasmesso. Il campione da analizzare al diffrattometro viene inserito all'interno di una slot di ottone (Fig. 2.4), composta da due parti che immobilizzano il campione all'interno di un disco di teflon forato al centro. Esso ha uno spessore di 1 mm e viene racchiuso tra due foglietti di *mylar*, attraverso i quali passano le radiazioni, e due dischetti di alluminio sempre forati. Le due componenti in ottone vengono chiuse e sigillate da quattro viti per evitare la disidratazione del campione.



Fig. 2.4: Composizione della slot: singole componenti (sopra) ed assemblata (sotto).

La slot viene dunque inserita all'interno di una fessura in cui il campione viene raggiunto ed colpito dai raggi X, e a seconda della propria geometria sarà in grado di diffrangere i raggi X nelle varie direzioni.

2.1.2: La legge di Bragg

Quando gli elettroni della materia assorbono i raggi X iniziano ad oscillare e diventano a loro volta sorgente di raggi X, irradiando così in tutte le direzioni. I raggi X di tutti gli atomi che compongono il campione devono sommarsi per generare un'intensità misurabile. Questa condizione viene espressa dalla legge di Bragg (Fig. 2.5), in cui i cristalli vengono considerati come dei piani paralleli reticolari. 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. Nel primo caso, le radiazioni sono in fase e si sommano; se invece le radiazioni hanno fasi differenti si definiscono distruttive. Si verifica il fenomeno della diffrazione quando viene soddisfatta la condizione di Von Laue, che indica la relazione tra l'interferenza costruttiva e la distanza degli atomi all'interno di un cristallo. Questo postulato è descritto dalla legge di Bragg:

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

in cui la lunghezza d'onda della radiazione incidente risulta essere proporzionale alla distanza tra i piani del reticolo atomico (d) e al seno dell'angolo formato tra il fascio incidente ed i piani.

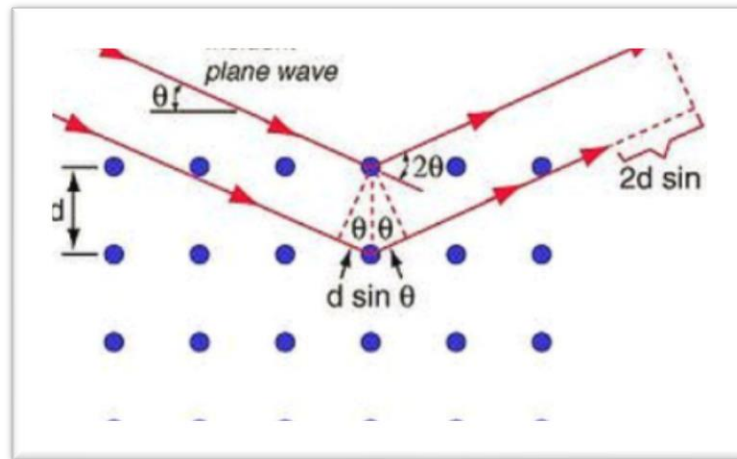


Fig. 2.5: Rappresentazione della legge di Bragg.

Se il campione viene successivamente posto in un detector, si otterrà un segnale in una posizione legata all'angolo 2θ 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 anche riscritta nella seguente maniera:

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

Volendo usare la grandezza Q , si può riscrivere l'equazione come:

$$Q = 2\pi * s = 2\pi * \frac{1}{d} = 2\pi * \frac{2 * \sin \theta}{\lambda} = \frac{4\pi \sin \theta}{\lambda},$$

dove Q è proporzionale all'angolo di scattering, ossia la lunghezza del vettore di scambio tra la radiazione elettromagnetica non deviata e quella deviata.

L'immagine ottenuta alla fine dell'esperimento, generata dall'interazione tra i raggi X e il campione, è un'immagine di interferenza tra di essi: questo segnale ci viene mostrato attraverso dei picchi di diffrazione su un diagramma.

L'analisi del profilo di diffrazione ci permette di individuare la posizione e l'intensità dei picchi: quest'ultima è un indice della densità elettronica del campione e quindi della sua composizione a livello atomico. La posizione invece indica la simmetria del campione, tramite cui è possibile calcolare la dimensione della cella unitaria. In uno spettro di diffrazione si individuano due regioni principali: la regione del basso angolo, quella riscontrabile in prossimità del beamstop, con valori che descrivono la macrostruttura del cristallo, e la regione dell'alto angolo che ci dà informazioni sulla microstruttura. Ad esempio, è ormai noto che analizzando campioni di GMP (guanosina 5'-monofosfato), la presenza di una banda a basso angolo allargata in prossimità del beamstop indica la presenza di una fase di tipo

colesterica. Al contrario, la presenza di picchi alti e stretti in corrispondenza del beamstop ci indica che siamo di fronte ad una organizzazione esagonale in cui la cella unitaria a corrisponde alla distanza media tra il centro di un cilindro e il successivo. Ottenere un buon segnale a basso angolo relativo all'organizzazione strutturale della GMP nel campione è essenziale per calcolare il parametro di cella unitaria "a" (Fig. 2.6).

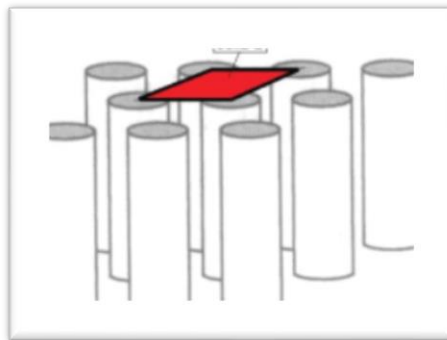


Fig. 2.6: Cella unitaria (quadrato rosso).

Per cella unitaria s'intende la componente più piccola all'interno di una struttura cristallina, che se ripetuta tramite traslazione attraverso lo spazio origina l'intera struttura cristallina. Il reticolo reciproco (Fig. 2.7) è lo spazio in cui tutti i piani del reticolo diretto sono rappresentati da un unico punto. Così facendo si evidenziano le interazioni tra i piani, la legge di Bragg e la geometria del campione.

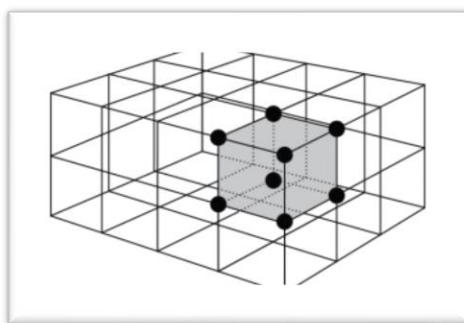


Fig. 2.7: Reticolo reciproco.

2.1.3: Calibrazione dello strumento con il tricosano

Prima di misurare un campione con il diffrattometro a raggi X, occorre eseguire un processo di calibrazione dello strumento tramite il tricosano, un composto organico con una struttura talmente ordinata e ripetuta che è in grado di generare uno spettro costituito da linee concentriche ad intervalli regolari.

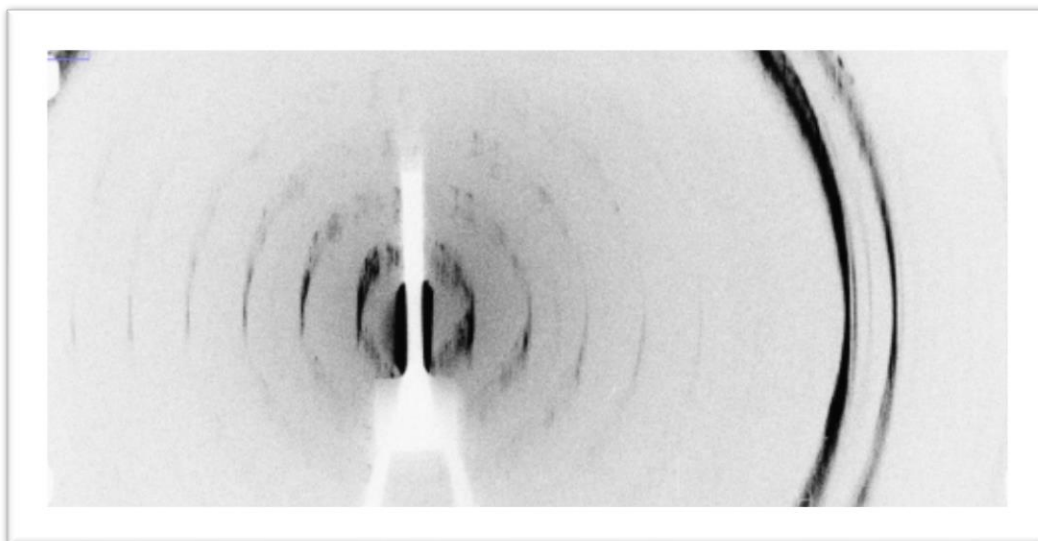


Fig. 2.8: Immagine del tricosano (ImageJ).

L'area centrale bianca che si rileva dall'immagine precedente (Fig. 2.8) è dovuta al beamstop, ossia la porzione metallica che blocca il fascio di raggi X diretto, mentre i cerchi concentrici sono il risultato della diffrazione simmetrica del composto. Tramite il programma "ImageJ", è possibile visualizzare ed analizzare questa immagine, calcolando la media relativa a tutti i punti ed in seguito ottenendo il corrispettivo grafico monodimensionale (Fig. 2.9), qui di seguito riportato.

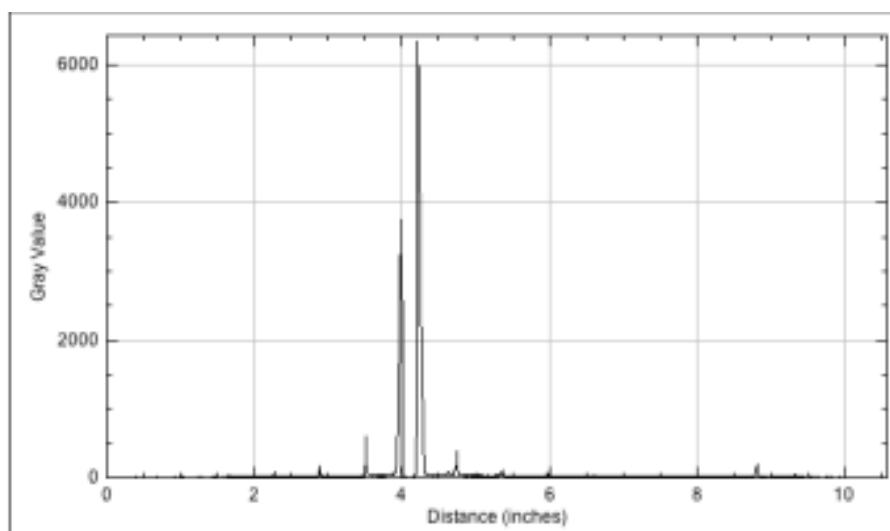


Fig. 2.9: Grafico monodimensionale del tricosano ottenuto con ImageJ.

Bisogna salvare il suddetto grafico in formato testo (.txt) al fine di caricarlo sul programma "IgorPro", dove è fondamentale identificare "il punto 0" del grafico (Fig 2.10). Esso consiste nel punto attraverso cui passa la linea di simmetria.

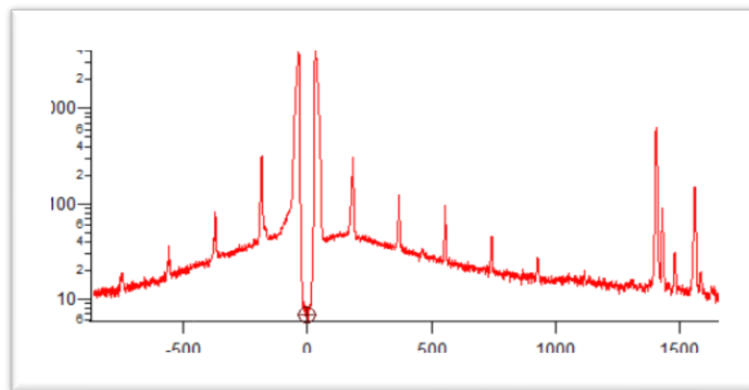


Fig. 2.10: Grafico del tricosano importato sul programma IgorPro.

Per l'identificazione del punto messo in evidenza nell'immagine precedente, si posizionano i due cursori all'apice dei due picchi e si identifica la loro posizione sull'asse x. Se si sottrae ai pixel (x) la media dei valori, o il valore, ottenuti, si ottiene il grafico centrato. Riportando in un grafico dove vengono posti 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 2.11). Ciò che compare è una retta $y = a + bx$ dove b è il coefficiente angolare, importante per la normalizzazione dei dati sperimentali di diffrazione dei campioni analizzati in seguito.

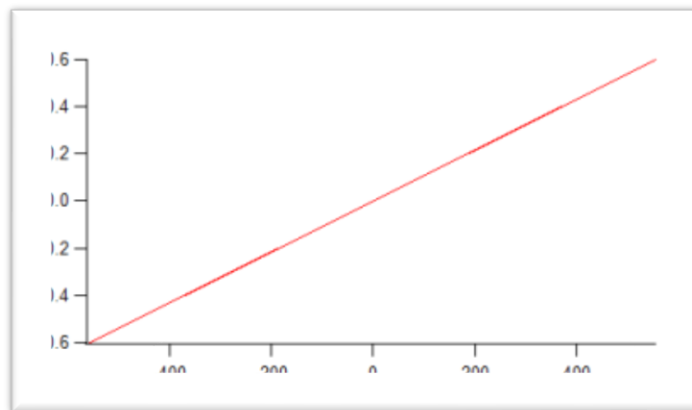


Fig. 2.11: Retta di calibrazione ottenuta dal tricosano.

Essendo una retta passante per l'origine non prendiamo in considerazione "a". Il valore "b" ottenuto, cioè il coefficiente angolare della retta, verrà impiegato nella normalizzazione dei dati dei campioni che saranno successivamente analizzati.

Tutti i passaggi finora riportati, effettuati per il tricosano escluso l'ultimo punto in cui i valori dei picchi vengono posti in funzione dei valori noti 2θ , vengono ripetuti anche per l'analisi del campione.

2.1.4: Allestimento per l'analisi in diffrazione e analisi dei dati

I sistemi di folati in esame sono strutture ordinate e periodiche che si prestano ottimamente ad uno studio mediante diffrazione, per verificare in questo caso l'effettiva disposizione dei cilindri di cui questi sistemi sono costituiti. I campioni analizzati in diffrazione sono costituiti da folato di potassio a contatto

con una soluzione di PEG disciolto in acqua distillata o in *buffers* specifici, oppure da acido folico disciolto in acqua e metanolo/DMSO. Per quanto riguarda il primo caso, una volta aspirato il più possibile il PEG dalle Eppendorf contenenti il campione da analizzare, si procede con l'allestimento della slot. Questa deve essere opportunamente pulita con etanolo e disposta correttamente nel suo montaggio. Dopo aver apposto il disco di teflon con del silicone per sigillare il tutto, il campione può essere inserito nel foro tramite una spatola. Completato il montaggio e dunque la chiusura della slot, il campione verrà posizionato nel porta-campioni all'interno dello strumento e dopo circa trenta minuti sarà possibile ottenere il risultato. Si parte sempre dalla visualizzazione dell'immagine ottenuta dalla diffrazione con ImageJ. Si effettua la sezione radiale nella porzione centrale dell'immagine (Fig. 2.12).

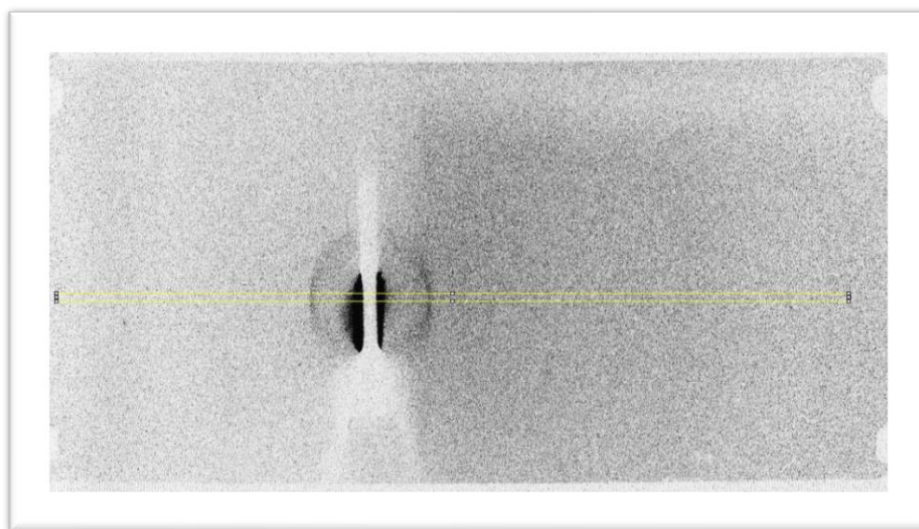


Fig. 2.12: Sezione radiale di un campione ottenuta con ImageJ.

Si ricava il grafico dei pixel, cioè la distanza, in funzione dell'intensità e si arriva al “punto 0” di simmetria.

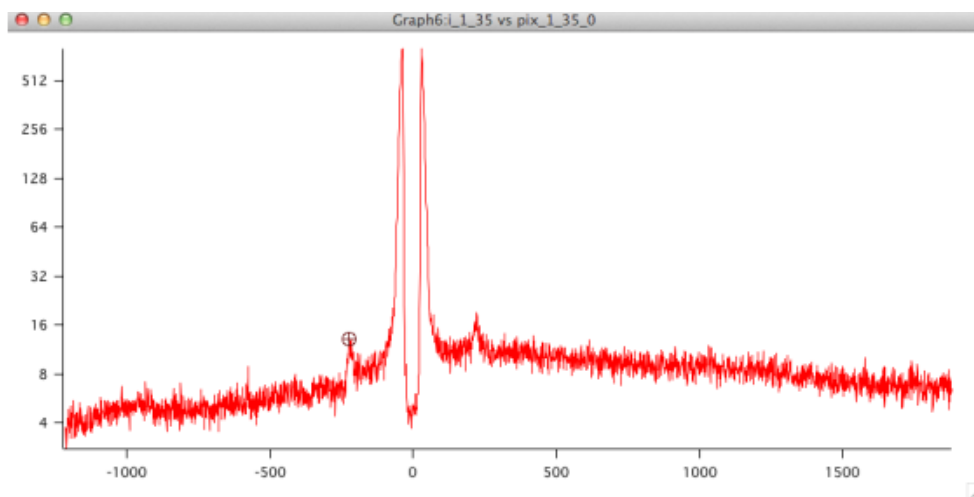


Fig. 2.13: Grafico monodimensionale del campione importato su IgorPro.

Il valore del “punto 0”, viene poi utilizzato per ottenere il valore di 2θ e moltiplicato per il coefficiente angolare della retta di taratura (b). A sua volta il valore 2θ permette il calcolo del parametro Q, il modulo del cosiddetto valore di scattering:

$$Q = 4\pi \sin\theta / 1.54$$

dove θ rappresenta la metà dell'angolo di diffrazione misurato in radianti; Q è misurato in \AA^{-1} ; e 1.54 è la lunghezza d'onda dei raggi X (λ) in \AA . In questo modo si può riportare il profilo di diffrazione del nostro campione in funzione del parametro Q. L'ultimo passaggio consiste nell'inserire le linee

verticali che ricadono su ogni picco, in modo da avere il valore della d (parametro di cella) della molecola che stiamo studiando, cioè la distanza che separa il centro di un cilindro da un altro.

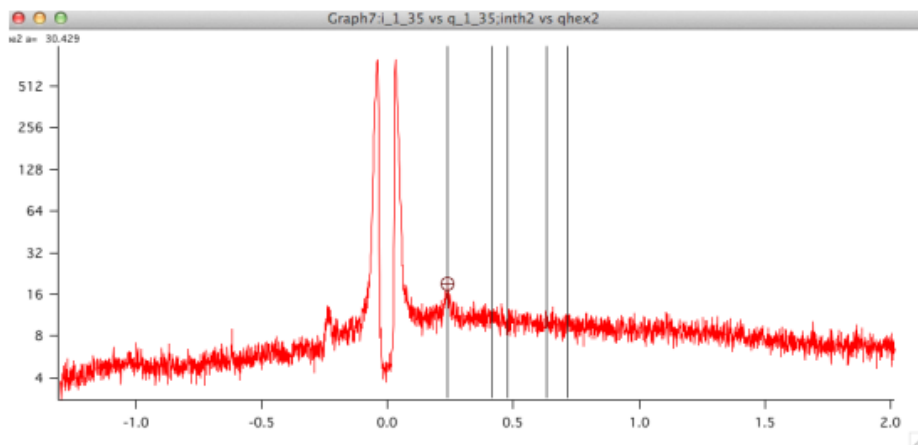


Fig. 2.14: Individuazione della fase esagonale.

I folati dopo la formazione dei quadruplessi possono assumere varie tipologie di organizzazione colonnari liotropiche, sia esagonali che colesteriche. Per essere certi che si tratti di fase esagonale, si posiziona il cursore sull'apice del primo picco e la posizione ottenuta viene usata come valore di riferimento per l'inserimento delle barre corrispondenti alla posizione dei picchi nella geometria di fase di tipo esagonale. La presenza dei picchi di diffrazione in corrispondenza delle linee di simmetria ci conferma la presenza di tale fase.

2.2: Spettroscopia UV-visibile

La spettroscopia UV-visibile è una tecnica basata sullo scambio d'energia che si verifica fra l'energia radiante e la materia. Nello specifico, 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 (200-350 nm) (Fig. 2.15).

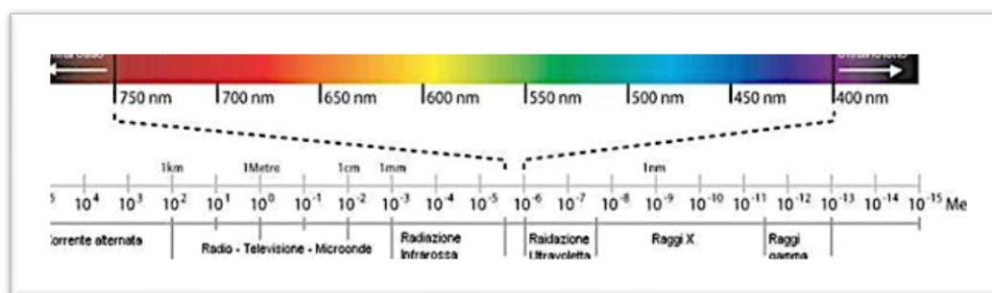


Fig. 2.15: Regione dello spettro elettromagnetico.

L'assorbimento di questi tipi di radiazioni da parte delle molecole è in grado di generare delle transizioni energetiche di elettroni esterni alle molecole stesse, sia impegnati che non impegnati in un legame. Gli elettroni citati possono essere di tipo sigma (σ), costituiti da una nube elettronica concentrata lungo l'asse di unione degli atomi formanti il legame singolo, oppure di tipo pi-greco (π), costituiti da coppie di elettroni la cui densità elettronica si trova al di fuori dell'asse che unisce i nuclei (legame doppi e tripli). Gli spettri nel visibile sono

quindi dovuti agli elettroni di legame π più o meno delocalizzati. Molto spesso questa delocalizzazione è estesa a tutta la molecola, generando uno spettro d'assorbimento unico. Per effettuare analisi qualitative si impiegano raggi policromatici a spettro continuo, in seguito separati tramite monocromatori nelle varie radiazioni monocromatiche. Queste ultime attraversano ognuna il campione in esame, che assorbirà con diversa intensità le varie radiazioni. Riportando quindi i valori registrati in un grafico che rapporta lunghezza d'onda e assorbimento, si può ottenere lo spettro di assorbimento della sostanza analizzata. Poiché ogni sostanza ha un suo spettro d'assorbimento, studiando tali spettri per confronto diretto con campioni noti o tramite banche dati, si è in grado di identificare una determinata sostanza. Per effettuare analisi quantitative si impiegano raggi monocromatici costituiti da radiazioni di un'unica frequenza. Le determinazioni quantitative sono basate sul seguente principio: quando una radiazione attraversa una soluzione, viene assorbita più o meno intensamente a seconda della concentrazione (l'assorbimento dipende strettamente dalla concentrazione). In particolare, nella spettroscopia d'assorbimento si utilizzano due grandezze: trasmittanza (T) ed assorbanza (A); esistono inoltre appositi rivelatori in grado di misurare le intensità di flusso luminoso all'ingresso della cella con il campione (I_0) e quella all'uscita della cella con il campione (I).

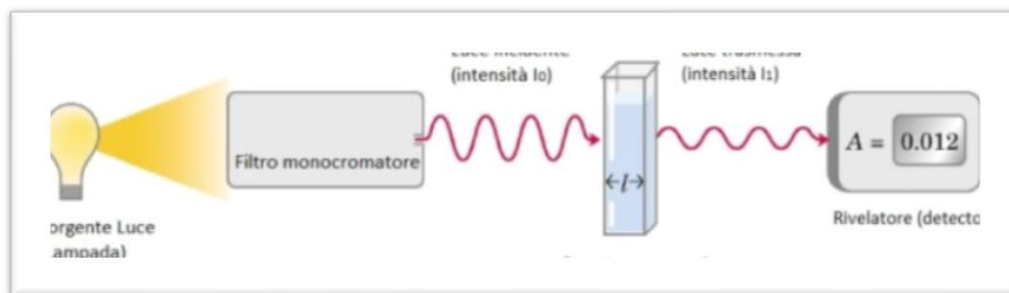


Fig. 2.16: Funzionamento di uno spettrofotometro.

Il rapporto tra intensità del raggio uscente e quella del raggio entrante si definisce trasmittanza ($T = \frac{I}{I_0}$): essa esprime quale frazione della luce incidente ha attraversato il campione senza essere assorbita e può assumere valori compresi tra 0 e 1. Per quanto riguarda l'assorbanza o densità ottica (OD), si calcola tramite il logaritmo inverso della trasmittanza ($A = -\log T$).

2.2.1 Legge dell'assorbimento (legge di Lambert-Beer)

Considerando la specifica cella (cuvetta) contenente la sostanza da esaminare in soluzione, attraversata da un raggio di luce monocromatica, si afferma che

$$A = \varepsilon * b * C$$

dove:

A = assorbanza del campione (adimensionale).

ε = coefficiente di assorbimento molare, caratteristico della sostanza ($\text{mol}^{-1} * \text{L} * \text{cm}^{-1}$).

b = cammino ottico (cm), spessore della cella contenente il campione.

C = concentrazione molare della sostanza (mol/L).

La legge di Lambert-Beer descrive i fenomeni di assorbimento di radiazioni elettromagnetiche ed è valida per radiazioni monocromatiche e soluzioni diluite. Al crescere della concentrazione del soluto si verificano notevoli deviazioni, con conseguente scarsa attendibilità del risultato ottenuto dall'analisi del campione: probabilmente questi fenomeni avvengono perché all'aumentare della concentrazione, aumentano anche il numero di particelle in soluzione ed il numero di urti fra esse. In tal modo le forze interioniche e/o intermolecolari crescono e possono generarsi molecole o aggregati di particelle più complesse, e ciò potrebbe causare uno spostamento del massimo d'assorbimento.

Le più attuali condizioni di lavoro richiedono che le soluzioni analizzate siano sempre diluite, in modo da ottenere valori di assorbanza accettabili ($A < 2$).

2.2.2 Determinare la concentrazione della sostanza esaminata

Parte della componente luminosa potrebbe essere bloccata o dispersa dalla cuvetta vuota o dal solvente utilizzato, pertanto lo strumento viene in genere tarato a zero di assorbanza (questo procedimento è chiamato “fare il bianco”) mediante un apposito pulsante, lasciando all'interno dello strumento la cuvetta

vuota o con il solo solvente (acqua). In seguito si procede all'analisi vera e propria, ricavando il valore di assorbanza della soluzione in esame. A questo punto, per risalire alla concentrazione del campione, esistono essenzialmente due tecniche:

- Il metodo diretto, che consiste nell'impiegare la formula inversa dell'assorbanza (da $A = \varepsilon * b * C$ si ricava $C = A / \varepsilon * b$). Essendo noto il cammino ottico (b) della cuvetta, si deve disporre del valore di ε relativo alla sostanza in esame: qualora non sia noto, è possibile ottenerlo da alcuni siti appositi, ad esempio *ExPASy.org*, *ProtParam Tool*. A questo punto è possibile eseguire le analisi desiderate su campioni a concentrazione incognita, la quale verrà calcolata tramite la formula precedentemente riportata.
- Il metodo della curva (o retta) di taratura, applicabile nel caso in cui non si è certi delle condizioni di proporzionalità diretta tra A e C . Si preparano quindi alcune soluzioni a diverse concentrazioni note contenenti la sostanza da analizzare e se ne misura l'assorbanza. A questo punto avendo ottenuto una serie di valori di assorbanza (asse delle ordinate), associandoli ai rispettivi valori di concentrazioni note (asse delle ascisse, mg/ml) è possibile riportarli in un grafico cartesiano, ottenendo la curva o retta di taratura (Fig. 2.17).

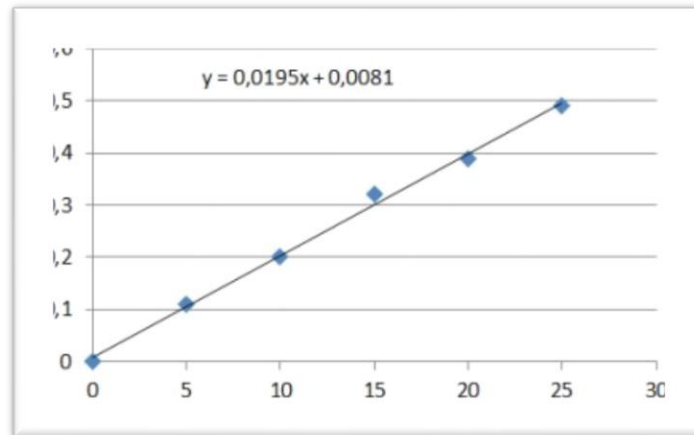


Fig. 2.17: esempio di una curva o retta di taratura.

A questo punto per determinare la concentrazione incognita del campione in analisi basterà prepararne una diluizione nello stesso solvente, determinare il valore di assorbanza e, grazie alla retta creata con gli standard noti, ricavare il relativo valore di concentrazione (considerando eventuali fattori di diluizione usati).

2.2.3 Struttura generica di uno spettrofotometro UV-visibile



Fig. 2.18: Spettrofotometro situato nel laboratorio di biofisica (DiSVA).

Uno spettrofotometro moderno è composto dai seguenti materiali:

- **SORGENTE DI RADIAZIONE**

Componente dello strumento da cui si origina la radiazione policromatica diretta sul campione. Negli apparecchi che misurano la luce ultravioletta e visibile sono presenti due lampade diverse, in modo che la sorgente sia in grado di coprire l'intervallo tra 190 e 800 nm: per quanto riguarda la regione del visibile si impiegano lampade a incandescenza (a filamento di tungsteno, lampade quarzo-iodio o tungsteno-alogeno); per la regione UV si utilizzano

lampade a scarica in un gas (solitamente deuterio o idrogeno). Queste due lampade interne allo spettrofotometro sono opportunamente intercambiate dal meccanismo interno. Successivamente alla sorgente è posta la “fenditura d’ingresso”, utile a rendere paralleli i raggi ed evitare la diffusione della luce all’interno del macchinario.

- **MONOCROMATORE**

Il monocromatore serve a selezionare la lunghezza d’onda desiderata per l’analisi, è un sistema ottico utile a disperdere la luce policromatica in bande monocromatiche, dirette in seguito al campione. Esistono principalmente due tipi di monocromatori: basati su filtri ottico o interferenziali, che assorbono parte della luce lasciando passare esclusivamente la lunghezza d’onda desiderata; basati su un elemento disperdente (prisma o reticolo), che separa le varie componenti della radiazione luminosa e ne permette la selezione della banda desiderata.

Il prisma è in grado di disperdere le radiazioni luminose con diversa lunghezza d’onda grazie al fenomeno della rifrazione: quando un raggio di luce attraversa un mezzo, subisce una deviazione di un angolo inversamente proporzionale alla lunghezza d’onda della radiazione. I reticoli svolgono lo stesso compito del prisma, tuttavia sono basati sul fenomeno della riflessione.

- **CELLA**

Componente predisposta a contenere il campione da esaminare. Esso è generalmente sciolto in una soluzione (molto spesso in acqua distillata) e viene introdotto all'interno di particolari contenitori chiamati cuvette. Oltre ad essere trasparenti alla radiazione luminosa impiegata per l'analisi, esse devono avere un noto "cammino ottico" (lo spessore della soluzione contenuta nella cuvetta e attraversato dalla luce, misurato in cm). Per la spettroscopia UV si utilizzano cuvette in quarzo (SiO_2), nell'ambito della radiazione visibile si impiegano cuvette in quarzo, vetro o plastica.

- **RIVELATORE**

Dispositivo in grado di produrre un segnale elettrico dipendente dall'energia delle radiazioni luminose che lo investono. Tale segnale (proporzionale all'intensità luminosa) viene trasferito in seguito ad un indicatore analogico o viene elaborato per via elettronica. Costituendo la componente dello strumento che esegue la misura vera e propria, fondamentali sono i parametri di sensibilità e di accuratezza della misura data dallo spettrofotometro.

Nell'ambito dell'UV-visibile si possono utilizzare:

- celle fotovoltaiche e fotoconduttive, basate su semiconduttori che generano ai loro capi una differenza di potenziale direttamente

proporzionale all'intensità della radiazione incidente. Sono tuttavia poco sensibili e non coprono tutta la fascia dell'UV-visibile, ma sono resistenti e si acquistano a prezzi contenuti.

- Fototubi e fotomoltiplicatori, basati sull'effetto fotoelettrico. Questo fenomeno consiste nell'emissione di elettroni da parte di un materiale quando esso è colpito da radiazioni luminose. Il numero di elettroni emessi è direttamente proporzionale all'intensità della radiazione incidente.
- Fotodiodi, microscopici circuiti su chip di silicio che variano la loro differenza di potenziale se investiti da radiazioni luminose. Nonostante abbiano una sensibilità inferiore ai fotomoltiplicatori, presentano il vantaggio di poter essere inseriti in gran numero su un unico chip di silicio.

- SISTEMA DI ELABORAZIONE E PRESENTAZIONE DEI DATI

Il segnale proveniente dal rivelatore viene opportunamente amplificato ed un amperometro ne rileva l'intensità. Così il lettore è in grado di convertire il segnale elettrico in un valore numerico (da 0 a 100) proporzionale all'intensità del segnale.

2.3: Microscopia a Forza Atomica (AFM)

Grazie alle notevoli prestazioni che il Microscopio a Forza Atomica è in grado di fornire, è stato possibile risalire al reale profilo tridimensionale dei campioni analizzati.

Le misure sono state realizzate servendoci del Microscopio AFM-Raman (Horiba Scientific) di cui il DiSVA è dotato (Fig. 2.19). L'AFM è in grado di fornire immagini di qualsiasi materiale in un range compreso tra 150 μm fino ad arrivare a pochissimi nm.



Fig. 2.19: Microscopio a Forza Atomica.

Per la preparazione dei campioni di *hydrogel* sono state necessarie differenti diluizioni, come sarà illustrato in seguito. Il supporto impiegato è un piccolo dischetto (Fig. 2.20) dal diametro di 1 cm, la cui superficie viene ricoperta con

della mica. In seguito si procede con la disposizione di circa 5 μl di campione, il quale prima di essere misurato deve asciugarsi all'aria. Questo supporto viene adagiato delicatamente su uno stage guidato da un tubo piezoelettrico che permette lo spostamento del campione lungo i tre assi (x, y, z) con risoluzione micrometrica.



Fig. 2.20: Allestimento del campione sul dischetto ricoperto da mica.

2.3.1: Strumentazione AFM

Il microscopio a forza atomica, a differenza dei microscopi convenzionali, non utilizza lenti per formare l'immagine ma si avvale di una sottilissima punta metallica di silicio posizionata all'estremità di una leva flessibile (*cantilever*), eseguendo così una scansione sulla superficie del campione. Durante la scansione si stabiliscono deboli forze di interazione tra punta e campione che determinano una flessione della leva ed una successiva rivelazione della

topografia del campione stesso. Il sistema ottico è invece costituito da un laser e da un fotodiodo: il laser viene riflesso dal retro del *cantilever* verso il fotomoltiplicatore che converte l'energia luminosa in energia elettrica e amplifica il segnale in entrata.

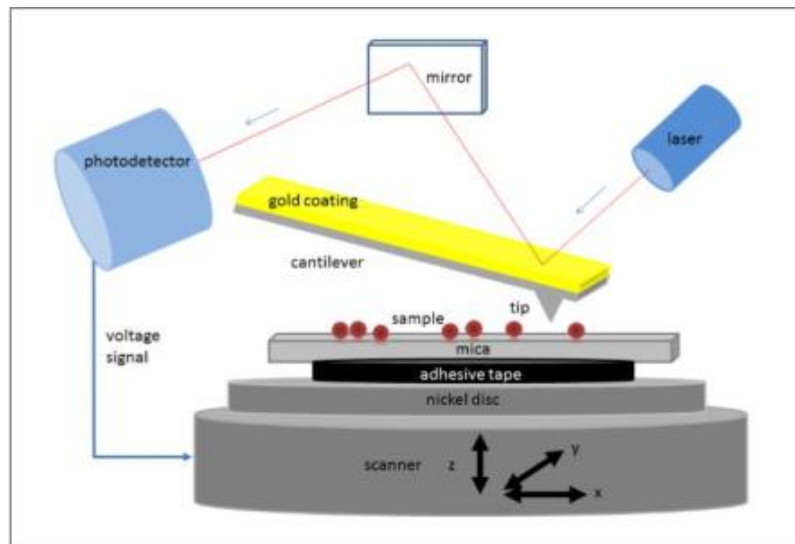


Fig. 2.21: Principio di funzionamento di AFM.

Esistono varie modalità con cui può funzionare lo strumento. Le più importanti sono note come *non contact mode*, *contact mode* e *tapping mode* (Fig. 2.22). Nel primo caso la punta si trova in risonanza con la superficie del campione con il quale interagisce elettrostaticamente. Modulazioni nella superficie del campione produrranno cambiamenti nei legami stabiliti fra la punta e il campione, quindi la punta per mantenere la stessa risonanza sarà costretta a modificare la distanza dal campione. Questi spostamenti sono registrati ed impiegati per la ricostruzione dell'immagine della superficie del

campione. Nel secondo metodo la punta si trova in continuo contatto con la superficie del campione sulla quale si muove strisciando, mentre per quanto riguarda il terzo caso, la leva viene fatta oscillare ad una frequenza di qualche centinaio di kHz in modo da stabilire un contatto intermittente. Le immagini presenti in questa tesi sono state effettuate in *non contact mode*. La punta che è stata utilizzata per analizzare e produrre le immagini è una punta silicónica piramidale del raggio di ≈ 8 nm.

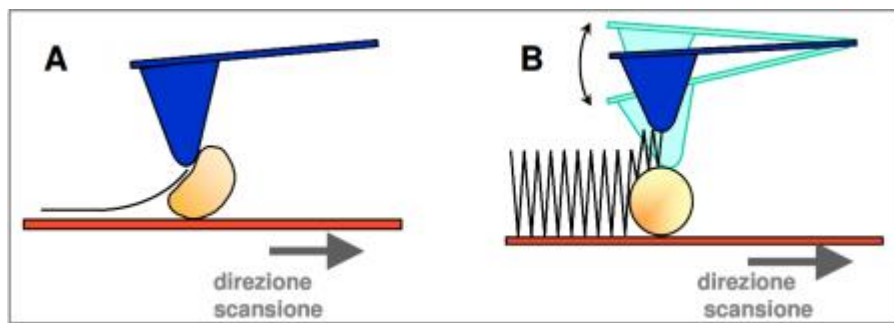


Fig. 2.22: Modalità di scansione AFM: *contact* (A) e *tapping mode* (B).

I risultati ottenuti da questo strumento si presentano sotto forma di immagini. Esse si mostrano generalmente in funzione della magnitudo registrata dallo strumento, dell'altezza relativa al campione, e in base ad altre caratteristiche. In questa tesi verranno mostrate immagini della morfologia del campione in funzione dell'intensità di segnale e delle altezze. Analizzando le immagini delle altezze è stato possibile verificare le dimensioni degli oggetti,

e monitorare le eventuali differenze fra i diversi campioni tramite grafici di altezza e istogrammi di frequenze delle altezze. Tramite i grafici di altezza è possibile scegliere una parte dell'immagine per poterne verificare la dimensione lungo l'asse y, mentre con gli istogrammi di frequenze delle altezze si vanno a calcolare tutte le altezze pixel per pixel registrate dallo strumento.

2.4: Preparazione dei campioni

La guanosina 5' monofosfato (GMP) si può trovare sia sotto forma di acido che di sale. La differenza è evidente quando producono i *quartets*: infatti l'atomo presente nella porzione centrale potrebbe essere un H^+ oppure un metallo (M^+). In entrambi i casi si tratta di cationi capaci di stabilire quattro legami con gli ossigeni posizionati sul lato interno della struttura. Ovviamente la condizione necessaria per poter far avvenire tale processo è strettamente correlata non solo con la carica portata dall'atomo centrale, ma anche con la dimensione dello stesso. La carica positiva è fondamentale per schermare le cariche negative degli ossigeni localizzati nella porzione centrale della struttura. Analogamente alla GMP, anche per i folati è possibile ottenere varie forme alcaline, ed i principali cationi capaci di determinare un differente grado di stabilizzazione sono: $K^+ > Na^+ > NH_4^+ > Li^+$ (indicati in ordine decrescente di stabilizzazione).

Per ottenere come prodotti finali vari gel, generati con metodologie e tecniche differenti, la maggior parte dei campioni utilizzati in questo lavoro sono stati ottenuti servendosi di una soluzione madre costituita da folato di potassio, la quale è stata prodotta a partire da acido folico in polvere: è stato perciò necessario effettuare una titolazione acido-base per poter scambiare la forma acida con quella alcalina. Di seguito sono riportate le metodiche dettagliate seguite durante la preparazione dei singoli componenti quali folato di potassio, PEG, *buffers* e dei sistemi DMSO/acqua/acido folico in grado di generare *gels*.

2.4.1 Titolazione acido-base e preparazione del folato di potassio

Per effettuare la titolazione acido-base dell'acido folico al fine di ottenere folato di potassio, occorrono:

1. 500 mg di acido folico disciolti in 15 ml di acqua distillata,
2. KOH 1M.



Fig. 2.23: Composti di partenza per la titolazione (acido folico a sinistra e KOH a destra).

Per la preparazione della soluzione madre da 10 ml di KOH 1M calcoliamo:

$$1 \text{ mol} : 1000 \text{ ml} = x \text{ mol} : 10 \text{ ml}$$

$$x = 0.01 \text{ mol}$$

$$m_{\text{KOH}} = n \cdot MW = 0.01 \text{ mol} \cdot 56.109 \frac{\text{g}}{\text{mol}} = 0.56 \text{ g}$$

Come primo passaggio è necessario servirsi di un becher per sciogliere 500 mg di acido folico in 15 ml di acqua distillata, agitando lentamente e costantemente per evitare che l'acido folico rimanga adeso sulle pareti e sul fondo del becher. Ultimato questo passaggio e servendoci di un apposito pHmetro, si procede con la titolazione. Dopo aver calibrato lo strumento, vedremo che la soluzione appena preparata avrà un $\text{pH} \approx 4$. Si procede dunque alla titolazione aggiungendo gradualmente alcune gocce di soluzione 1M di KOH, sotto continua monitoraggio del pHmetro. Una volta che il pH raggiunge valori intorno a 8.5, la soluzione dovrà essere suddivisa in due falcon (50 ml) aggiungendo un quantitativo di etanolo assoluto fino a raggiungere un volume di 35 ml per ognuna (acido folico/EtOH $\approx 1/3$). A questo punto la soluzione presenterà un aspetto opaco (Fig. 2.24).



Fig. 2.24: Aspetto dell'acido folico con EtOH, prima della centrifugazione e conseguente precipitazione.

Si procede quindi con una prima centrifugazione a 4200 rpm per 15 minuti, per permettere al folato di potassio di precipitare e di essere successivamente recuperato per il seguente lavoro. Verrà eseguita anche un'altra centrifugazione identica alla precedente prima di introdurre il prodotto ottenuto in un liofilizzatore e prima di farlo essiccare (Fig. 2.25).



Fig. 2.25: Liofilizzatore (a sinistra) e centrifuga da banco (a destra).

Per la liofilizzazione è necessario introdurre il folato di potassio raccolto nelle falcon (Fig. 2.26) all'interno del liofilizzatore, appoggiando le stesse, mantenute aperte, in un rack posizionato sotto la campana. Una volta fatto il vuoto saranno necessarie almeno quattro ore per permettere l'essiccazione del folato. A questo punto se esso non verrà utilizzato subito, dovrà essere stoccato a 4 °C per utilizzi successivi.

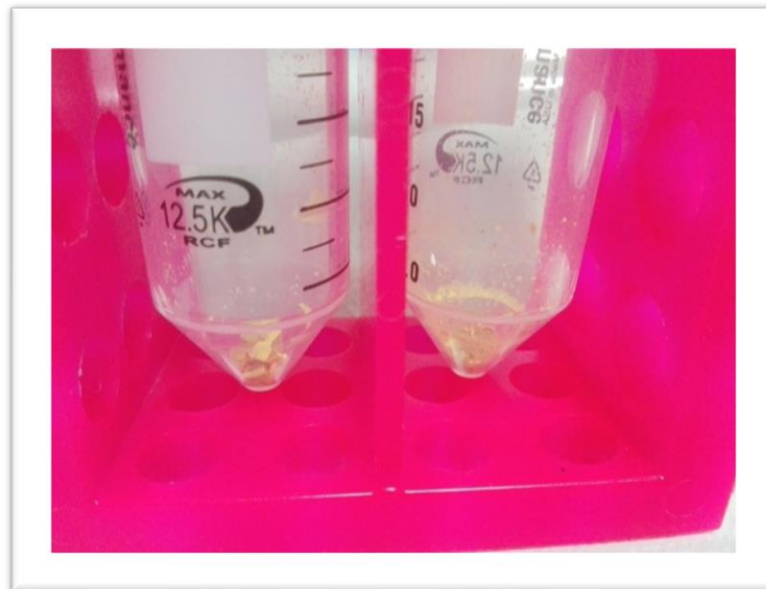


Fig. 2.26: Aspetto dell'acido folico titolato e liofilizzato.

2.4.2: Preparazione delle soluzioni di polietilen-glicole (PEG)

Il principio alla base dell'impiego del polietilen-glicole, per i sistemi di GMP così come per quelli di folato, si basa sull'osmosi. Questa riguarda la capacità di un solvente, in questo caso l'acqua, di diffondere attraverso una

membrana semipermeabile, senza lasciarsi attraversare dal soluto che presenta dimensioni maggiori. La membrana semipermeabile si comporta come un setaccio fatto di maglie strette molto piccole, ma grandi abbastanza da lasciar passare le molecole di solvente. Si tratta di un processo spontaneo in cui il movimento dell'acqua avviene contro il gradiente di concentrazione, cioè da una regione a minor concentrazione, ipotonica, ad un'altra a maggior concentrazione, ipertonica. Il passaggio avviene fin quando le due soluzioni non raggiungono la stessa concentrazione. Si tratta di un processo fisico spontaneo che porta alla diluizione di una soluzione più concentrata per ridurne appunto la concentrazione. Ogni soluzione possiede una sua pressione osmotica e questa è proporzionale alla sua molarità, secondo l'equazione di Van't Hoff:

$$\pi V = n R T$$

Si tratta perciò di un fenomeno fisico facilmente osservabile ed altrettanto facilmente riproducibile. In questo studio la tecnica dello stress osmotico fornisce uno strumento utile al controllo della fase liquido-cristallina assunta dalle molecole di GMP in soluzione acquosa (*Franz et al 1994*). Prima di sottoporre i campioni all'analisi di diffrazione, è necessario sottoporli ad una pressione osmotica tale da controllare l'aggregazione molecolare del folato e promuovere un'organizzazione stabile del campione, rilevabile poi dalla diffrazione. In questo specifico caso si tratta di raggiungere un equilibrio

osmotico tra la soluzione del polimero ad alto peso molecolare (il PEG), con valore di pressione osmotica nota, e la soluzione macromolecolare con valore di pressione osmotica non nota come la soluzione di folato (Fig. 2.27).

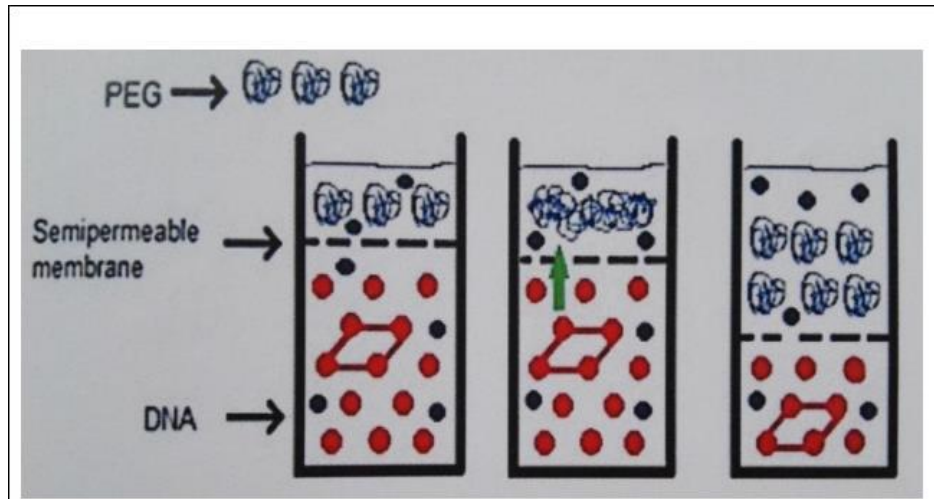


Fig. 2.27: Rappresentazione del sistema osmotico basato sull'azione del PEG.

In tal modo sarà possibile, utilizzando soluzioni a diverse concentrazioni di PEG, variare il quantitativo di acqua presente all'interno del sistema in analisi e studiarne gli effetti riguardanti l'organizzazione delle eventuali strutture cilindriche formatesi. La pressione osmotica sarà dunque generata dalla concentrazione di PEG impiegata, che agendo a livello del reticolo e comprimendolo, modificherà la distanza tra le molecole grazie alla rimozione controllata di molecole di acqua nel sistema.

2.4.3 Scelta delle percentuali di PEG da utilizzare

Come già accennato in precedenza, il sistema di polietilen-glicole (PEG) si è rivelato molto utile per creare un sistema osmotico in grado di controllare il quantitativo di acqua presente nei sistemi di folato analizzati in questo lavoro, favorendo in tal modo la formazione di una fase esagonale rispetto ad una fase colesterica o addirittura liquida a seconda della percentuale di polimero impiegata.

Sono stati effettuati alcuni tentativi per verificare quale fosse la percentuale migliore da utilizzare, partendo da soluzioni al 10% di PEG fino a soluzioni con una concentrazione del 40%. Queste soluzioni sono state utilizzate nella preparazione di campioni di folato di potassio, in seguito analizzati dopo 24 ore in diffrazione. Le analisi in diffrazioni ai raggi X hanno dimostrato che i campioni trattati con percentuali di PEG al di sotto del 25% non presentano una fase ordinata esagonale delle strutture, cioè dei quadruplessi che si formano, osservabili al contrario quando si impiegano percentuali più elevate di PEG. Ciò è riscontrabile direttamente dall'immagine acquisita sul detector dello strumento che mostra chiaramente la presenza di struttura nella regione del basso angolo per i campioni trattati con le percentuali superiori al 25%.

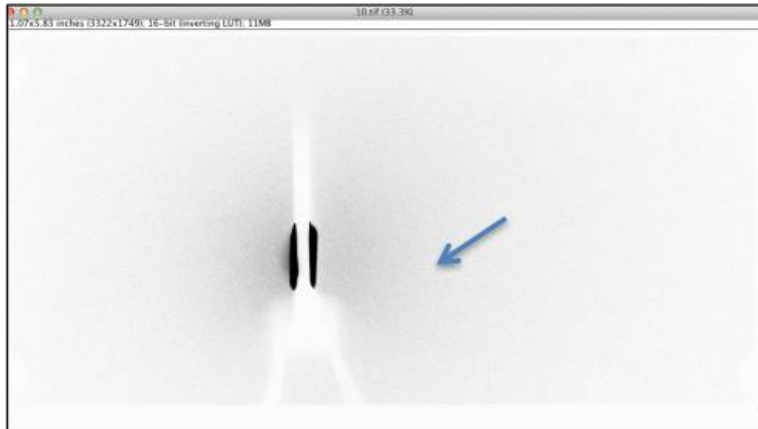


Fig. 2.28: Assenza di struttura con PEG sino al 20%.



Fig. 2.29: Comparsa di una fase esagonale con la soluzione al 25% di PEG.

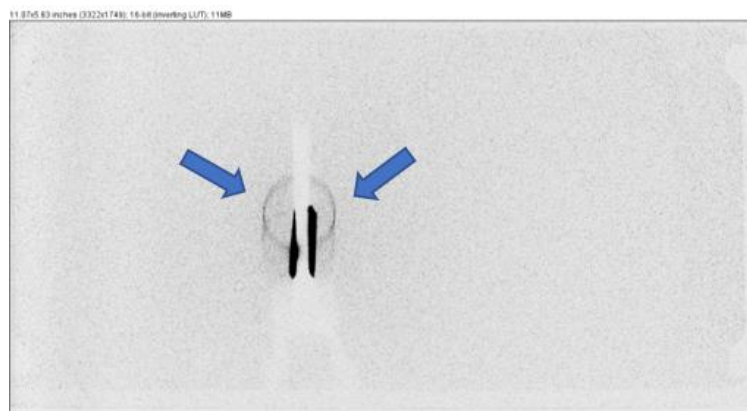


Fig. 2.30: Fase esagonale ancora presente con soluzione al 40% di PEG.

Questo ha permesso di allestire le analisi successive, il cui scopo era quello di favorire la formazione di un sistema concentrato. Nei campioni presentati successivamente sono state utilizzate le soluzioni al 25%, 30%, 35% e 40% di PEG, inizialmente disciolto in acqua distillata e poi disciolto anche in *buffers* a diverso pH, come sarà ampiamente discusso in seguito.

2.4.4: Allestimento di una curva di titolazione

La costruzione di una curva di titolazione si è resa necessaria per stabilire i valori ai quali il pH della soluzione madre di folato di potassio vira bruscamente, a causa dell'acquisizione o della perdita di protoni sulla superficie dei quadruplessi. Proprio a questi valori di pH dovrebbero annullarsi o diminuire le cariche negative presenti sulla superficie esterna dei cilindri di folato ed in tal modo potrebbe essere possibile formare un gel stabile con il quale lavorare. L'ipotesi iniziale è che annullando queste cariche negative esterne, diminuiscono le forze repulsive fra quadruplessi adiacenti, così da garantirne un avvicinamento.

È stata quindi preparata una soluzione madre di folato di potassio (20 mg/ml) disciolto in acqua distillata (20 ml) secondo le seguenti proporzioni:

$$0.020 \text{ g} : 1 \text{ ml} = X : 20 \text{ ml} \rightarrow X = 0.4 \text{ g (folato da pesare e disciogliere).}$$

La scelta dei titolanti da impiegare per costruire la curva di titolazione è ricaduta su NaOH (1M, MW = 40 g/mol) e HCl (1M, MW = 36.46 g/mol), utilizzati rispettivamente per basificare ed acidificare la soluzione di folato. Le soluzioni madre da 10 ml sono state preparate come segue:

$$\text{g NaOH} = 1 \frac{\text{mol}}{\text{L}} * 40 \frac{\text{g}}{\text{mol}} * 1 \text{ L} = 40 \text{ g}$$

$$40 \text{ g} : 1 \text{ L} = X : 0.01 \text{ L}$$

$$X = 0.4 \text{ g}$$

Si sono pesati 0.4 g di NaOH e disciolti in 10 ml di acqua distillata.

Allo stesso modo:

$$\text{g HCl} = 1 \frac{\text{mol}}{\text{L}} * 36.46 \frac{\text{g}}{\text{mol}} * 1 \text{ L} = 36.46 \text{ g}$$

$$36,46 \text{ g} : 1 \text{ L} = X : 0.01\text{L}$$

$$X = 0.36 \text{ g}$$

Si sono pesati 0.36 g di HCl e disciolti in 10 ml di acqua distillata. A questo punto si rende fondamentale l'utilizzo del pHmetro (Fig. 2.31), strumento composto da una sonda (generalmente un elettrodo a vetro) immersa nella soluzione in esame, collegata ad un dispositivo elettronico in grado di ricevere il segnale dalla sonda, di calcolare il valore corretto di pH e di rappresentarlo su un display. È stato necessario misurare il pH (8.52) della soluzione di

partenza di folato disciolto in acqua ed in seguito, tramite aggiunte progressive di 50 μl di NaOH, si è provveduto inizialmente a basificare il pH della soluzione e successivamente ad acidificarlo, aggiungendo la stessa quantità di HCl. In entrambi i casi si sono annotati tutti i valori comparsi sul display dello strumento, per la successiva costruzione della curva di titolazione.



Fig. 2.31: pHmetro e funzionamento.

Grazie a questa tecnica è stato possibile stabilire i valori ai quali il pH della soluzione di folato vira bruscamente (pH 3 e 5.4), e di conseguenza è stato possibile preparare due *buffers* in grado di mantenere questi valori costanti.

2.4.5: Scelta e preparazione dei buffers a pH noto

Stabiliti i valori di pH da mantenere costanti, tramite il sito www.aatbio.com è stato possibile scegliere i buffers da utilizzare ed eseguire i calcoli necessari a ricavare i dati per la loro preparazione.

- Soluzione madre (0.02 L) di *buffer* acetato (pH 5.4, 0.1M):

1. Versare 16 ml di acqua distillata in un becher.
2. Pesare 0.14 g di acetato di sodio ($C_2H_3NaO_2$, MW = 82.03 g/mol) e discioglierlo all'interno del becher contenente acqua.
3. Pesare 0.018 g di acido acetico (CH_3COOH , MW = 60.05 g/mol) e discioglierlo nel becher contenente acqua e acetato di sodio.
4. Aggiungere NaOH o HCl fino a portare a pH desiderato (5.4).
5. Aggiungere acqua distillata al fine di portare la soluzione al volume desiderato di 0.02 L.

- Soluzione madre (0.12 L) di *buffer* citrato (pH 3, 0.1M):

1. Versare 96 ml di acqua distillata in un becher.
2. Pesare 0.326 g di citrato di sodio ($Na_3C_6H_5O_7$, MW = 294.1 g/mol) e discioglierlo all'interno del becher contenente acqua.
3. Pesare 2.092 g di acido citrico (CH_3COOH , MW = 192.1 g/mol) e discioglierlo nel becher contenente acqua e citrato di sodio.

4. Aggiungere NaOH o HCl fino a portare a pH desiderato (3).
5. Aggiungere acqua distillata al fine di portare la soluzione al volume desiderato di 0.12 L.

Dopo aver eseguito questo procedimento, è stato possibile effettuare un'accurata preparazione dei campioni formati da folato alcalino e PEG in soluzione, svoltasi come spiegato nel paragrafo successivo.

2.4.6: Preparazione dei sistemi folato di potassio/PEG/buffers

Per evitare di ridurre ulteriormente la resa ottenuta in seguito ai passaggi utili a preparare i campioni di folato alcalino alla successiva analisi in diffrazione, invece di sciogliere il folato precedentemente scambiato in una soluzione madre, per ogni campione sono stati posti all'interno di ogni Eppendorf 20 mg di folato di potassio liofilizzato.

Dopo aver pesato i 20 mg, sono stati aggiunti in ogni Eppendorf 1 ml di PEG disciolto in acqua distillata, in *buffer* citrato (pH 3) ed in *buffer* acetato (pH 5.4). Una volta pronti, i campioni sono stati lasciati a temperatura ambiente per 24 ore ed in seguito analizzati in diffrazione.

Le soluzioni di PEG impiegate in questo lavoro presentano una concentrazione di 25%, 30%, 35% e 40%, quest'ultima si è rivelata la concentrazione maggiore in grado di essere disciolta.

A seconda della concentrazione, le quantità di PEG pesate sono:

- **25%** → $25 \text{ g} : 100 \text{ ml} = X \text{ g} : 10 \text{ ml} \rightarrow X = 2.5 \text{ g}$ disciolti in 7.5 ml di acqua, buffer citrato e buffer acetato.
- **30%** → $30 \text{ g} : 100 \text{ ml} = X \text{ g} : 10 \text{ ml} \rightarrow X = 3 \text{ g}$ disciolti in 7 ml di acqua, buffer citrato e buffer acetato.
- **35%** → $35 \text{ g} : 100 \text{ ml} = X \text{ g} : 10 \text{ ml} \rightarrow X = 3.5 \text{ g}$ disciolti in 6.5 ml di acqua, buffer citrato e buffer acetato.
- **40%** → $40 \text{ g} : 100 \text{ ml} = X \text{ g} : 10 \text{ ml} \rightarrow X = 4 \text{ g}$ disciolti in 6 ml di acqua, buffer citrato e buffer acetato.

Per ogni campione contenente 20 mg di folato di potassio (12 Eppendorf in totale) è stato aggiunto un volume di PEG, alla concentrazione voluta e precedentemente disciolto nelle tre soluzioni sopra citate, pari a 1 ml.

A questo punto, trascorse 24 ore, i campioni possono essere analizzati mediante diffrazione a raggi X.

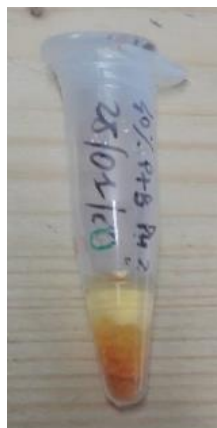


Fig. 2.32: Aspetto di un campione di folato di potassio, equilibrato con PEG al 40% disciolto in buffer citrato (pH 3).

2.4.7: Preparazione di hydrogels acido folico/metanolo

Dopo aver tentato di produrre *gels* stabili di folato alcalino disciolto nei *buffers* precedentemente citati, consultando alcuni studi in letteratura si è pensato di impiegare due solventi organici per lo stesso scopo: il metanolo (MeOH), solvente presentato in questo paragrafo e il dimetilsolfossido (DMSO), trattato successivamente.

È ormai noto che l'acido folico ha una bassa solubilità in acqua distillata, tuttavia è in grado di formare un gel giallastro dopo averlo disciolto in metanolo ad una concentrazione dell'1% (w/v) o superiore (*Lye Lin Lock et al. 2013*).

In questo lavoro l'acido folico è stato inizialmente aggiunto in metanolo puro all'interno di un becher, grazie all'ausilio di un agitatore magnetico: esso è stato utilizzato per mescolare le componenti sopra citate mediante aggiunta nel

contenitore di un'ancoretta magnetica, sulla quale agisce un campo magnetico che ne permette la rotazione. Alla fine di questo procedimento è stata aggiunta acqua distillata, così da raggiungere il rapporto di miscelazione desiderato tra i due solventi. Di seguito sono elencati i calcoli effettuati precedentemente alla preparazione delle soluzioni madre (10 ml) dei *gels*:

1. **Metanolo 100%** (v/v) \rightarrow 10 ml
2. **Metanolo 90%** (v/v) \rightarrow 90 ml : 100 ml = X : 10 ml \rightarrow X = 9 ml + 1 ml di acqua distillata.
3. **Metanolo 80%** (v/v) \rightarrow 80 ml : 100 ml = X : 10 ml \rightarrow X = 8 ml + 2 ml di acqua distillata.
4. **Metanolo 50%** (v/v) \rightarrow 50 ml : 100 ml = X : 10 ml \rightarrow X = 5 ml + 5 ml di acqua distillata.
5. **Metanolo 25%** (v/v) \rightarrow 25 ml : 100 ml = X : 10 ml \rightarrow X = 2.5 ml + 7.5 ml di acqua distillata.
- Acido folico 1% (w/v) presente nei 5 campioni \rightarrow 1 g : 100 ml = X : 10 ml \rightarrow X = 0.1 g.

Infine, dopo aver disciolto l'acido folico in metanolo e dopo aver portato a volume finale aggiungendo acqua distillata (tranne nel campione metanolo

100%), i campioni sono stati lasciati a temperatura ambiente, in attesa dell'eventuale formazione di *hydrogels*.

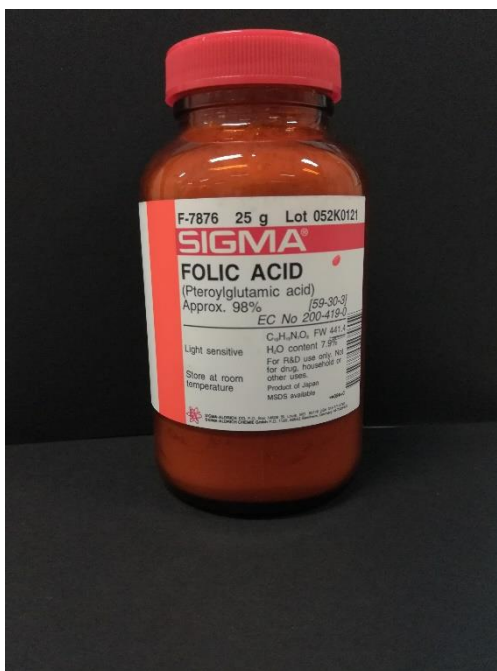


Fig. 2.33: Acido folico (Sigma) utilizzato in questo lavoro.

2.4.8: Preparazione di *hydrogels* acido folico/DMSO

Parallelamente ai *gels* acido folico/metanolo, è stata preparata un'altra tipologia di gel, in questo caso sciogliendo la vitamina in esame nel solvente organico DMSO ed in acqua distillata.

In questo specifico esperimento il DMSO è stato usato come buon solvente, mentre l'acqua come cattivo solvente (*ratio* 1:1). Il rapporto tra solventi buoni e cattivi influenza enormemente la stabilità e la dinamica delle architetture

sopramolecolari, come ad esempio il grado di aggregazione ed il tempo che serve al gel per riequilibrarsi (*Pengyao Xing et al. 2014, P. Chakraborty et al. 2012*). In questo caso gli strumenti impiegati e la metodologia seguita per preparare *gels* acido folico/DMSO sono gli stessi utilizzati per i sistemi acido folico/metanolo.

Si riportano di seguito i calcoli effettuati precedentemente alla preparazione delle soluzioni madre (7 ml) di tre diversi *gels*, sciogliendo rispettivamente nel solvente altrettante quantità prestabilite di acido folico (0.02 M, 0.03 M, 0.04 M):

$$V_f = 7 \text{ ml} \rightarrow 0.007 \text{ L}$$

DMSO : acqua = 1 : 1 \rightarrow 3.5 ml di DMSO e 3.5 ml di acqua distillata

1. $n_{\text{acido folico}} = M * V = 0.02 \frac{\text{mol}}{\text{L}} * 0.007 \text{ L} = 0.00014 \text{ moli}$

$$g_{\text{acido folico}} = n * MW = 0.00014 \text{ mol} * 441.4 \frac{\text{g}}{\text{mol}} = 0.062 \text{ g da pesare e}$$

sciogliere in DMSO.

2. $n_{\text{acido folico}} = M * V = 0.03 \frac{\text{mol}}{\text{L}} * 0.007 \text{ L} = 0.00021 \text{ moli}$

$g_{\text{acido folico}} = n * MW = 0.00021 \text{ mol} * 441.4 \frac{g}{mol} = 0.093 \text{ g}$ da pesare e sciogliere in DMSO.

3. $n_{\text{acido folico}} = M * V = 0.04 \frac{mol}{L} * 0.007 \text{ L} = 0.00028 \text{ moli}$

$g_{\text{acido folico}} = n * MW = 0.00028 \text{ mol} * 441.4 \frac{g}{mol} = 0.124 \text{ g}$ da pesare e sciogliere in DMSO.

Così come effettuato per i sistemi acido folico/metanolo, dopo aver disciolto il primo in DMSO e aver portato a volume finale aggiungendo acqua distillata, i campioni sono stati lasciati a temperatura ambiente, in attesa della formazione di *hydrogels*.

2.4.9: Campioni analizzati

In Tabella 2.1 sono esposti i campioni analizzati in diffrazione durante il mio periodo di tesi, preparati secondo calcoli e modalità finora citati.

In Tabella 2.2 sono invece elencati tutti i campioni di *hydrogels* studiati in questo lavoro, anch'essi preparati secondo calcoli e modalità finora descritti.

Tabella 2.1: Descrizione dei 12 campioni analizzati in diffrazione.

Campioni analizzati	Solventi utilizzati (1 ml)
K_25: folato di potassio+PEG 25%	Acqua distillata
	Buffer citrato (pH 3)
	Buffer acetato (pH 5.4)
K_30: folato di potassio+PEG 30%	Acqua distillata
	Buffer citrato (pH 3)
	Buffer acetato (pH 5.4)
K_35: folato di potassio+PEG 35%	Acqua distillata
	Buffer citrato (pH 3)
	Buffer acetato (pH 5.4)
K_40: folato di potassio+PEG 40%	Acqua distillata
	Buffer citrato (pH 3)
	Buffer acetato (pH 5.4)

Tabella 2.2: Descrizione dei campioni di *hydrogels* studiati.

Campioni analizzati	g di acido folico	Solventi utilizzati
Me_100%	1% (w/v) → 0.1 g	10 ml MeOH
Me_90%	1% (w/v) → 0.1 g	9 ml MeOH + 1 ml H ₂ O
Me_80%	1% (w/v) → 0.1 g	8 ml MeOH + 2 ml H ₂ O
Me_50%	1% (w/v) → 0.1 g	5 ml MeOH + 5 ml H ₂ O
Me_25%	1% (w/v) → 0.1 g	2.5 ml MeOH + 7.5 ml H ₂ O
DM_1	0.02 M → 0.062 g	3.5 ml DMSO + 3.5 ml H ₂ O
DM_2	0.03 M → 0.093 g	3.5 ml DMSO + 3.5 ml H ₂ O
DM_3	0.04 M → 0.124 g	3.5 ml DMSO + 3.5 ml H ₂ O

3. RISULTATI E DISCUSSIONE

3.1: Analisi dei dati ottenuti mediante diffrazione a raggi X

Le molteplici diffrazioni eseguite hanno permesso l'analisi dei campioni di folato di potassio/PEG, con quest'ultimo disciolto in tre differenti solventi. Questi esperimenti avevano un duplice scopo: in primis si è voluta verificare la presenza o l'assenza di una fase esagonale utile a capire l'organizzazione assunta dai quadruplessi che si formano; in secondo luogo, dopo aver ottenuto i valori dei parametri di cella di ogni campione analizzato, mediante un semplice confronto di questi sono state analizzate le eventuali variazioni dei quadruplessi di folato in presenza di pH differenti. I risultati generati dalla diffrazione riportano dati piuttosto interessanti e di seguito sono mostrati gli spettri ottenuti per ogni campione, raggruppati tra loro a seconda delle percentuali di PEG utilizzate durante la loro preparazione.

Il primo grafico (Fig 3.1) è relativo ai campioni di folato alcalino e PEG al 25%, precedentemente disciolto in acqua distillata, *buffer* citrato (pH 3) e *buffer* acetato (pH 5.4), seguono poi i campioni preparati disciogliendo nei suddetti solventi le altre tre percentuali di PEG precedentemente riportate. Le legende nei grafici indicano per i vari campioni la diversa tipologia di solvente in cui è stato disciolto il contenuto di PEG (percentuale costante in ogni grafico).

I grafici (Fig 3.1-3.4) riportano i valori dell'intensità di scattering di Q in funzione dell'angolo di scattering, espresso dal valore Q. Come riportato nel precedente capitolo, dalla posizione dei picchi di diffrazione sono stati calcolati i parametri delle fasi osservate (esagonali o colesteriche): i valori relativi alle dimensioni della cella ricavati in funzione della concentrazione di PEG disciolto nei tre diversi solventi vengono riassunti in una tabella (Tabella 3.1). I valori riportati sono in Å e l'errore sperimentale può essere considerato di circa 1 Å. Gli spettri presentano delle barre verticali, utili ad evidenziare i picchi di diffrazione che indicano la presenza di una fase esagonale (barra nera).

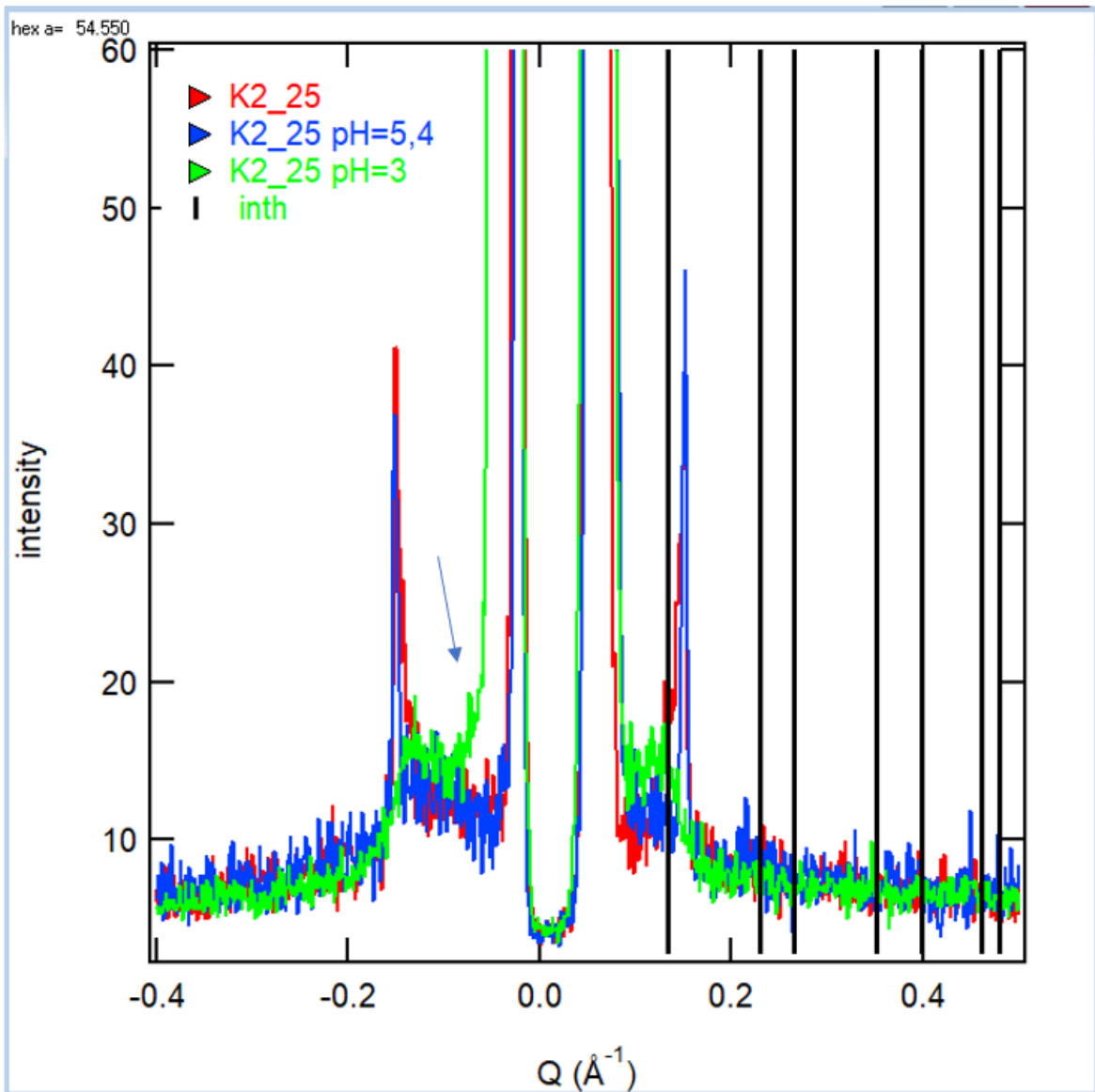


Fig. 3.1: Spettri di diffrazione ottenuti dai campioni di folato di potassio e PEG 25%, disciolto in acqua distillata (rosso), in *buffer* acetato (blu) ed in *buffer* citrato (verde), analizzati dopo 24 h.

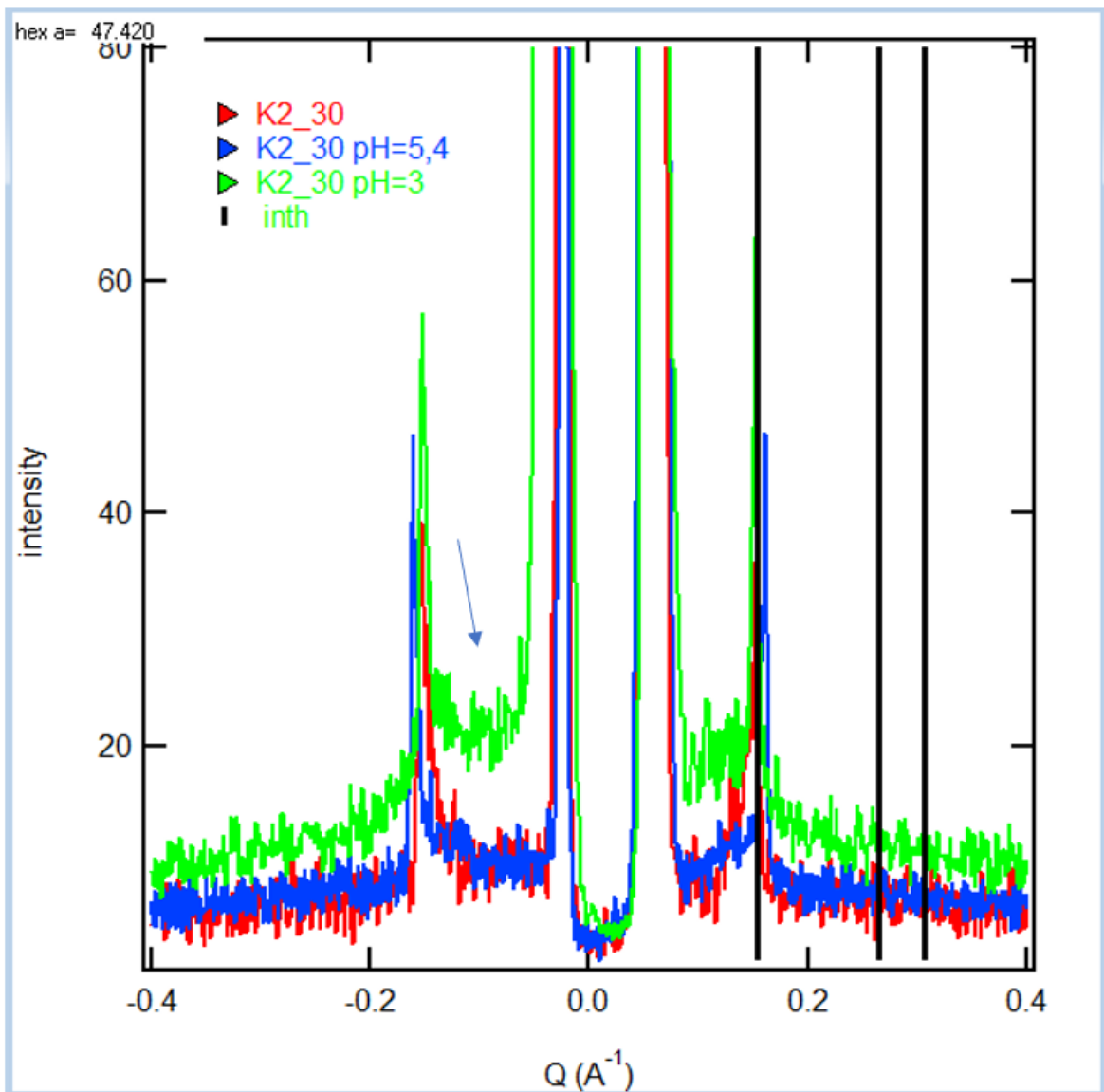


Fig. 3.2: Spettri di diffrazione ottenuti dai campioni di folato di potassio e PEG 30%, disciolto in acqua distillata (rosso), in *buffer* acetato (blu) ed in *buffer* citrato (verde), analizzati dopo 24 h dalla preparazione.

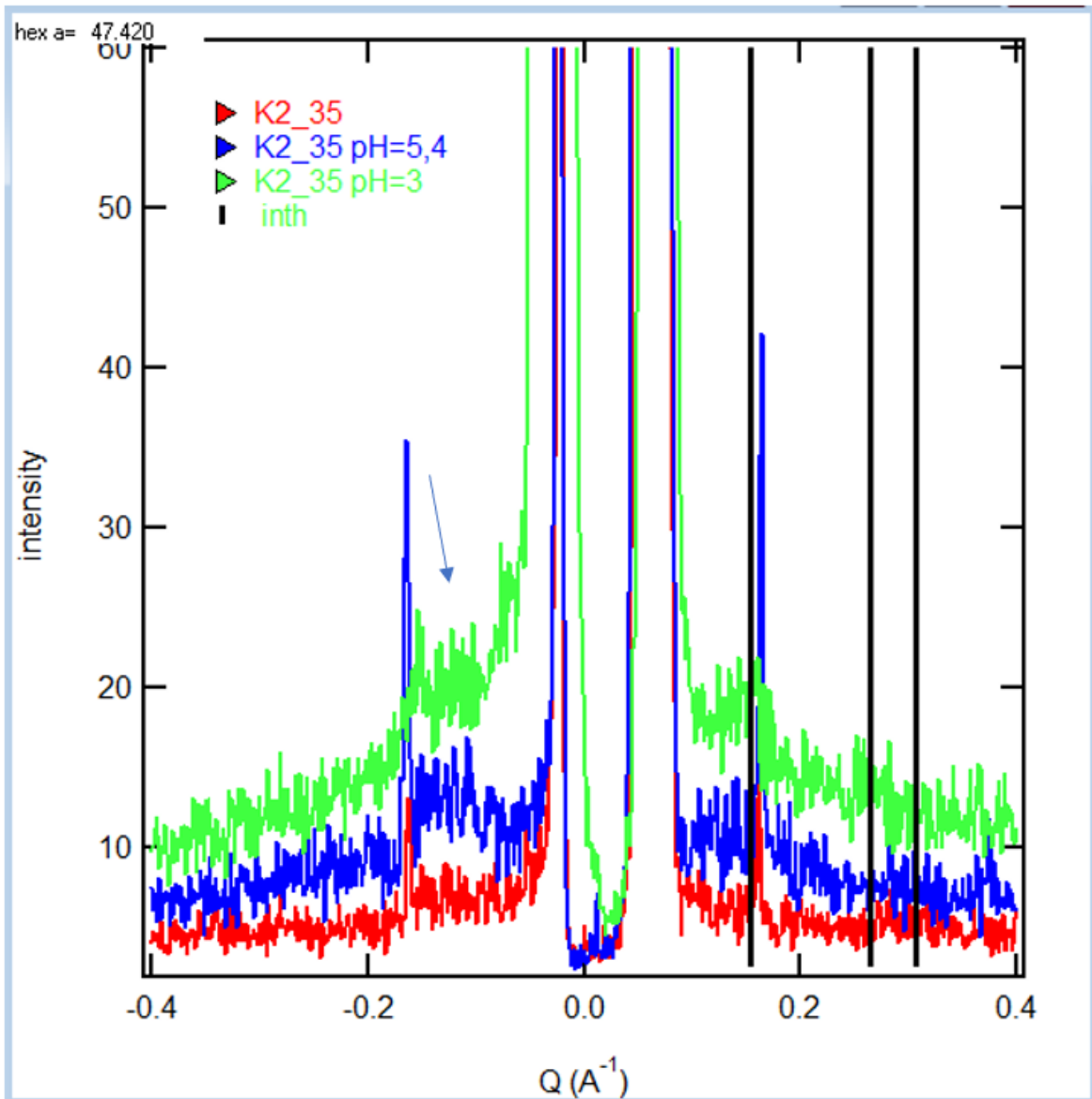


Fig. 3.3: Spettri di diffrazione ottenuti dai campioni di folato di potassio e PEG 35%, disciolto in acqua distillata (rosso), in *buffer* acetato (blu) ed in *buffer* citrato (verde), analizzati dopo 24 h dalla preparazione.

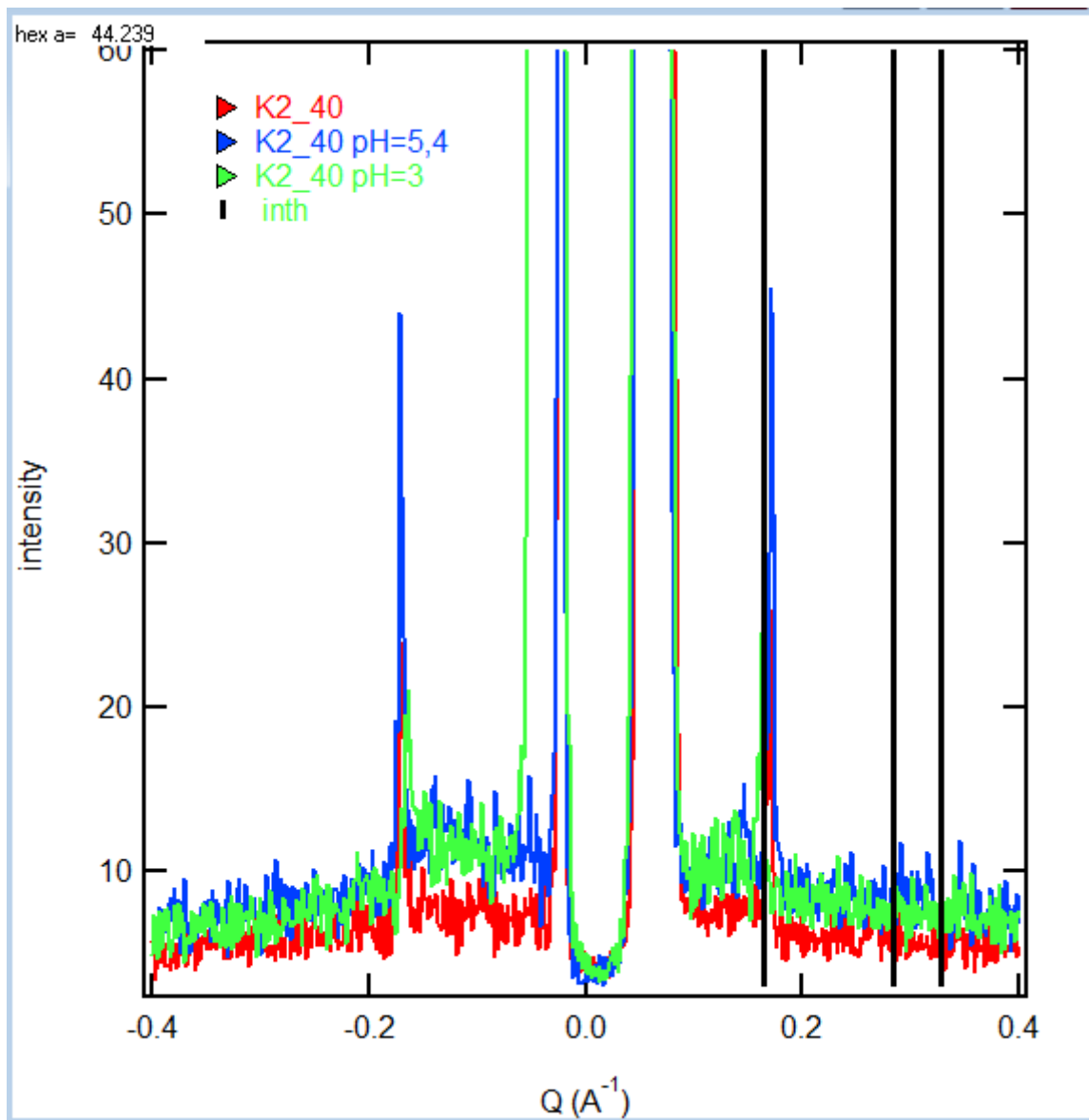


Fig. 3.4: Spettri di diffrazione ottenuti dai campioni di folato di potassio e PEG 40%, disciolto in acqua distillata (rosso), in *buffer* acetato (blu) ed in *buffer* citrato (verde), analizzati dopo 24 h dalla preparazione.

PEG (%)	Acqua distillata	<i>Buffer</i> pH 5.4	<i>Buffer</i> pH 3
25	48.3 (a)	48.3 (a)	54.5 (a)
30	46.8 (a)	45.3 (a)	47.4 (a)
35	44.5 (a)	43.9 (a)	47.4 (a)
40	42.6 (a)	42.1 (a)	44.2 (a)

Tabella 3.1: Valori di cella (a) di ogni campione analizzato, riportati in funzione del solvente in cui è disciolto il PEG.

Come si può notare dagli spettri, tutti i campioni analizzati in questo lavoro presentano fasi esagonali piuttosto evidenti. Considerando i campioni a diverse percentuali di PEG disciolto in acqua distillata o in *buffer* acetato (pH 3), è facile notare come i parametri di cella (a) presentino valori molto simili, se non addirittura coincidenti. Tuttavia, esclusivamente nel caso dei campioni in cui il PEG è stato disciolto in *buffer* citrato (pH 3), è possibile notare che i suddetti parametri sono maggiori rispetto ai precedenti: ciò denota un allontanamento tra quadruplessi adiacenti in ambiente molto acido (si ricorda che il parametro della cella esagonale corrisponde alla distanza interassiale tra i quadruplessi). Considerando nuovamente gli spettri di diffrazione dei sistemi folato di potassio/*buffer* pH 3/PEG nelle Fig. 3.1-3.3, si riporta la presenza di una seconda banda larga (freccia azzurra) a piccoli angoli, sovrapposta alla fase

esagonale: ciò è indice di una probabile transizione di fase da esagonale a colesterica, piuttosto evidente nei campioni in cui agisce il PEG 30-35%.

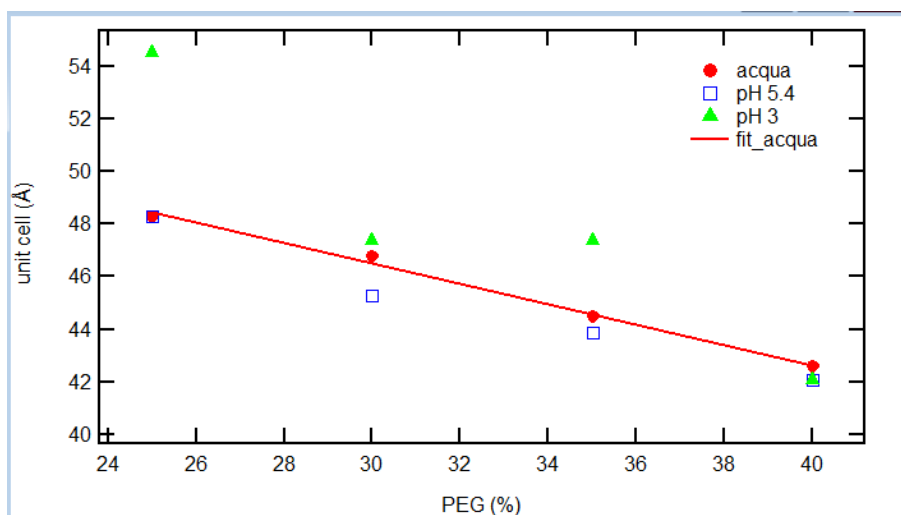


Fig. 3.5: Risultati degli esperimenti in diffrazione, riportati con i valori della cella unitaria in funzione della percentuale di PEG utilizzata.

Da questo grafico (Fig. 3.5) è possibile dedurre che i campioni trattati con *buffer* citrato (pH 3) mostrano valori quasi sempre maggiori in termini di cella unitaria della fase esagonale, cioè distanze superiori tra i quadruplessi di folato di potassio, rispetto ai campioni trattati con acqua distillata. Questo risultato è discordante da quello atteso, in quanto in ambiente acido e quindi in presenza di un'elevata quantità di protoni (H^+), le cariche negative esposte sulla superficie dei quadruplessi di folato alcalino dovrebbero essere abbondantemente annullate dalle cariche positive dei protoni.

In tal modo dovrebbero ridursi le forze repulsive tra queste cariche situate sulla superficie di cilindri adiacenti, permettendone l'avvicinamento. Probabilmente in ambiente acido vengono a generarsi quadruplessi di lunghezze talmente ridotte da non essere sufficienti ad interagire con gli altri, determinando la comparsa della fase colesterica e non permettendo di conseguenza la formazione di un eventuale gel. Infine, all'aumentare della concentrazione di PEG i valori delle distanze tendono generalmente a diminuire, a causa della pressione osmotica creata.

3.2: Analisi degli effetti prodotti da variazione di pH sul folato

Parte del lavoro svolto durante il periodo di tesi è stata incentrata sulla possibilità che variazioni più o meno marcate di pH potessero determinare una riduzione delle forze elettrostatiche repulsive tra i quadruplessi di folato alcalino, favorendo l'eventuale formazione di un gel stabile. A questo scopo si è resa necessaria la costruzione di una curva di titolazione del folato di potassio in soluzione (vedi capitolo 2.4), tramite l'ausilio di un pHmetro. L'idea generale è identificare i valori ai quali il pH della soluzione madre di folato di potassio vira bruscamente (a causa di acquisizione o perdita di protoni): in tali casi ed in presenza di *buffers* in grado di mantenere costanti questi valori, potrebbe essere possibile annullare o ridurre significativamente le cariche

negative presenti sulla superficie esterna dei cilindri di folato, permettendone un avvicinamento.

Di seguito si può notare la curva di titolazione del folato di potassio in soluzione (titolando), realizzata impiegando NaOH e HCl come titolanti: si riporta l'aggiunta progressiva di 50 μl di titolante ad ogni misurazione effettuata.

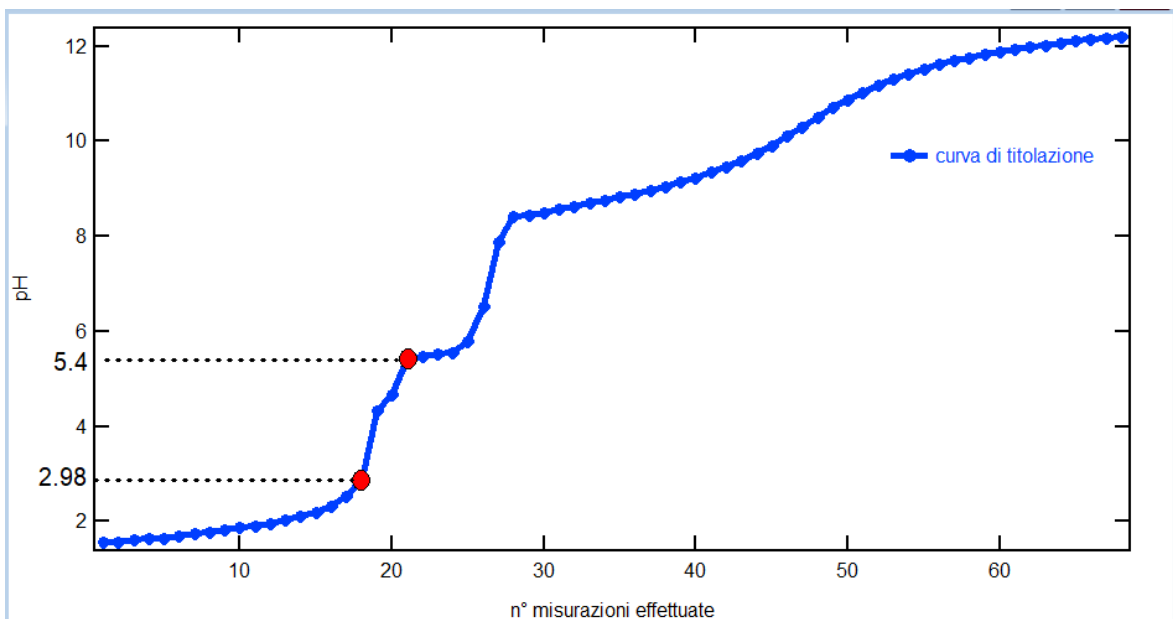


Fig. 3.6: Curva di titolazione del folato di potassio in soluzione.

I *markers* evidenziati in Fig. 3.6 corrispondono ai valori in cui il pH della soluzione di folato alcalino subisce delle variazioni nette: basandosi su questi risultati e considerando il pH di partenza (8.5) della soluzione madre folato di potassio/acqua distillata, utilizzando HCl 1M come titolante si è progressivamente tentato di acidificare la soluzione, per raggiungere i valori di

pH mostrati in figura. Lo scopo di questo esperimento è stimolare la formazione di un eventuale gel di folato alcalino.

Di seguito si riportano i risultati ottenuti (Fig. 3.7-3.10):

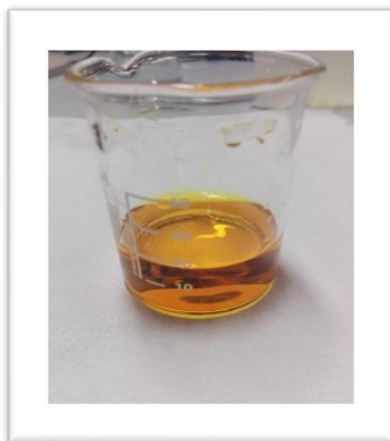


Fig. 3.7: Aspetto iniziale della soluzione madre, pH 8.5.

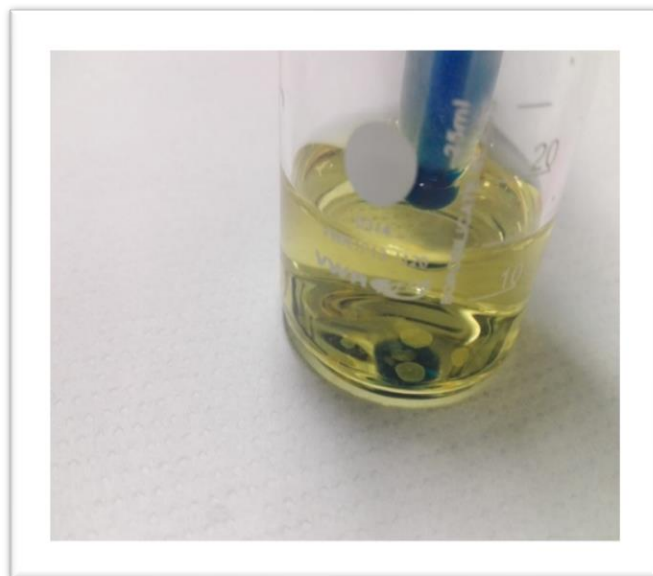


Fig. 3.8: Aspetto della soluzione dopo un'aggiunta di 0,1 ml di HCl, a pH \approx 6.



Fig. 3.9: Aspetto della soluzione dopo un'aggiunta di 3,5 ml di HCl, pH=5.41.

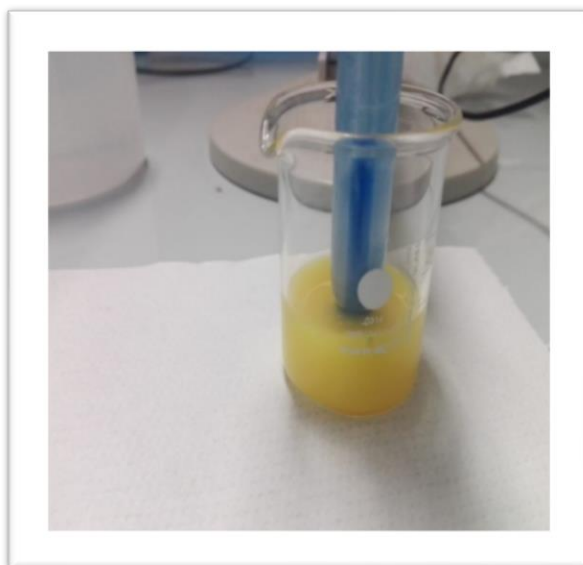


Fig. 3.10: Aspetto della soluzione dopo un'aggiunta di 5 ml di HCl, pH = 3.

Osservando attentamente le figure sopra riportate, è facilmente riscontrabile come a $\text{pH} \approx 6$ la soluzione diventi notevolmente più limpida confrontata con l'aspetto che essa aveva a $\text{pH} 8.5$ (Fig. 3.7). In più iniziano a formarsi in soluzione alcuni piccoli granuli dall'aspetto discoidale, quasi trasparente (Fig. 3.8): ciò potrebbe rappresentare l'eventuale fase iniziale di formazione di un gel. Raggiunto il valore di $\text{pH} 5.4$, la soluzione diventa più opaca e leggermente viscosa, con i granuli al suo interno ancora più evidenti (Fig. 3.9).

Infine a $\text{pH} 3$ la soluzione cambia completamente aspetto, sembrando molto più viscosa che liquida, tuttavia neanche a questo preciso valore si giunge alla formazione di un vero e proprio gel stabile.

Un campione di soluzione di folato alcalino a $\text{pH} 3$ è stato centrifugato ed in seguito tentativamente analizzato in diffrazione: il precipitato formatosi non era totalmente solido, bensì piuttosto idratato. Dopo averlo caricato nella slot e successivamente nel diffrattometro per la conseguente analisi, di seguito si riporta l'immagine generata dallo strumento ed analizzata mediante il programma "ImageJ".

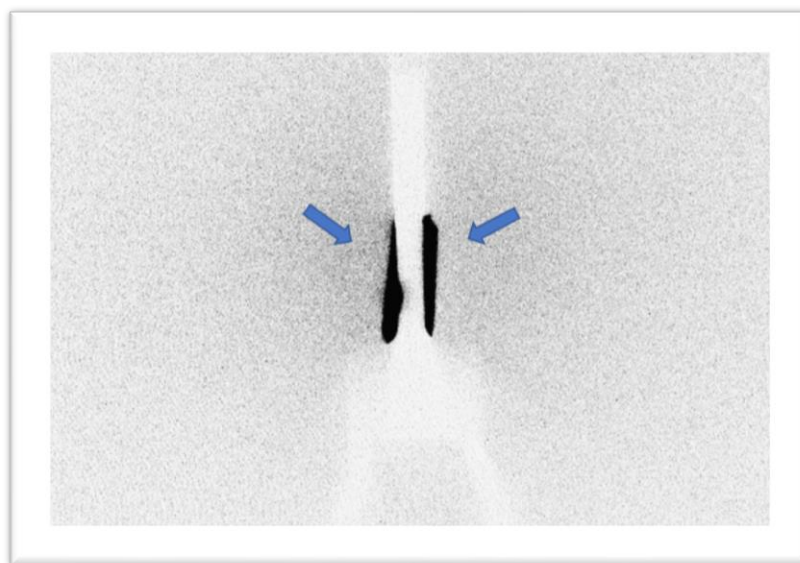


Fig. 3.11: Diffrazione del folato di potassio in soluzione a pH 3, nessun segnale a basso angolo (ImageJ).

A conclusione della presente sezione di risultati, grazie ai dati e alle prove ottenuti durante questo lavoro, è possibile affermare che il folato alcalino in una soluzione a pH 3 non riesce totalmente a produrre un gel stabile, ma si limita a generare una soluzione viscosa ed opaca al cui interno si formano granuli di piccole e medie dimensioni. Non è quindi stato possibile preparare un gel mediante variazioni più o meno marcate di pH, in grado di poter determinare una riduzione delle forze elettrostatiche repulsive tra i quadruplessi di folato alcalino.

3.3: Analisi qualitative di *hydrogels* di acido folico

I risultati negativi ottenuti dalla tentata produzione di gel mediante variazioni di pH hanno fatto pensare che fosse necessario modificare le proprietà del solvente. Consultando alcuni articoli in letteratura (*Lye Lin Lock et al. 2013*, *Pengyao Xing et al. 2014*, *P. Chakraborty et al. 2012*), si è deciso di impiegare metanolo e dimetilsolfossido come solventi organici in cui disciogliere acido folico ed ottenere *hydrogels* stabili con i quali lavorare.

3.3.1: Sistemi acido folico/MeOH

Disciogliendo acido folico 1% (w/v) in metanolo puro (MeOH 100%) è stato ottenuto un gel giallastro decisamente stabile (Fig. 3.12).



Fig. 3.12: *Hydrogel* acido folico/MeOH (100%).

Miscelando tuttavia la stessa quantità di acido folico con acqua distillata seguendo le precise proporzioni riportate nella sezione 2.4.7, non è stato possibile generare *gels* altrettanto stabili. Essi si presentano come campioni decisamente troppo liquidi e poco viscosi rispetto al precedente (Fig. 3.12), com'è possibile notare dalla seguente immagine:



Fig. 3.13: Da sinistra a destra, aliquote di gel acido folico/MeOH (100% stabile, mentre i sistemi al 90%-80%-50%-25% risultano instabili e liquidi).

Risultati notevoli sono stati ottenuti grazie al solvente DMSO, come discusso nella seguente sezione.

3.3.2: Sistemi acido folico/DMSO

Hydrogels decisamente stabili e di rapida formazione sono stati generati sciogliendo accuratamente tre diverse quantità di acido folico in dimetilsolfossido (DMSO) ed in seguito portando a volume con acqua distillata, come precisamente stabilito dalle proporzioni e dai calcoli riportate nella sezione 2.4.8.

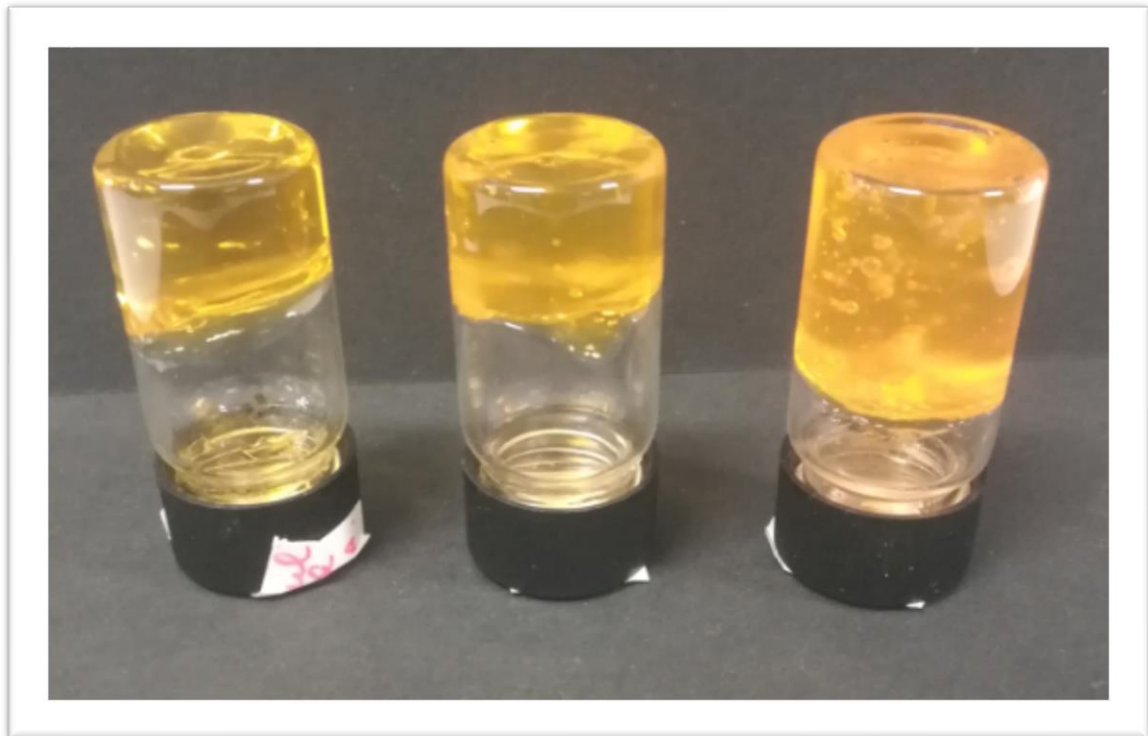


Fig. 3.14: *Gels* di acido folico (0.062 g-0.093 g-0.124 g)/DMSO/acqua distillata, ordinati da sinistra verso destra.

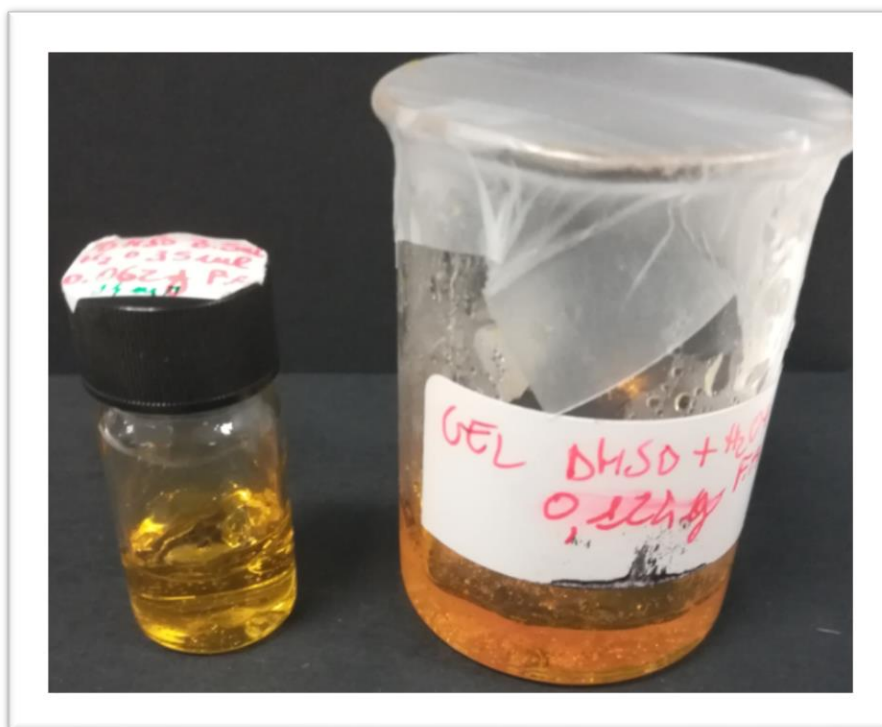


Fig. 3.15: Gel contenente la minor quantità di acido folico (a sinistra), confrontato col gel a maggior quantità di acido folico (a destra).

È interessante notare come quantità differenti di acido folico atte a generare i *gels* producano colorazioni differenti di questi (Fig. 3.15).

Come precedentemente annunciato, la differenza con gli *hydrogels* in metanolo è facilmente riscontrabile: i sistemi acido folico/DMSO sono notevolmente più stabili, altamente viscosi e presentanti capacità di auto-riparazione (*self-healing*) e reversibilità termica.

Seguono ulteriori risultati, ottenuti analizzando i sistemi attualmente trattati mediante spettrofotometria UV-visibile.

3.4: Analisi spettrofotometriche dei sistemi acido folico/DMSO

Risultati interessanti sono stati ottenuti tramite l'ausilio della spettrofotometria. Durante la preparazione dei sistemi acido folico/DMSO, possedendone più aliquote si è provato a scaldare una di queste per pochi minuti a 70 °C, lasciando l'altra a temperatura ambiente. Si è notato un fenomeno piuttosto interessante: l'aliquota a temperatura ambiente ha impiegato più tempo a gelificare rispetto all'altra, che ha formato un gel decisamente più viscoso appena esposta per breve tempo al calore (Fig. 3.16).

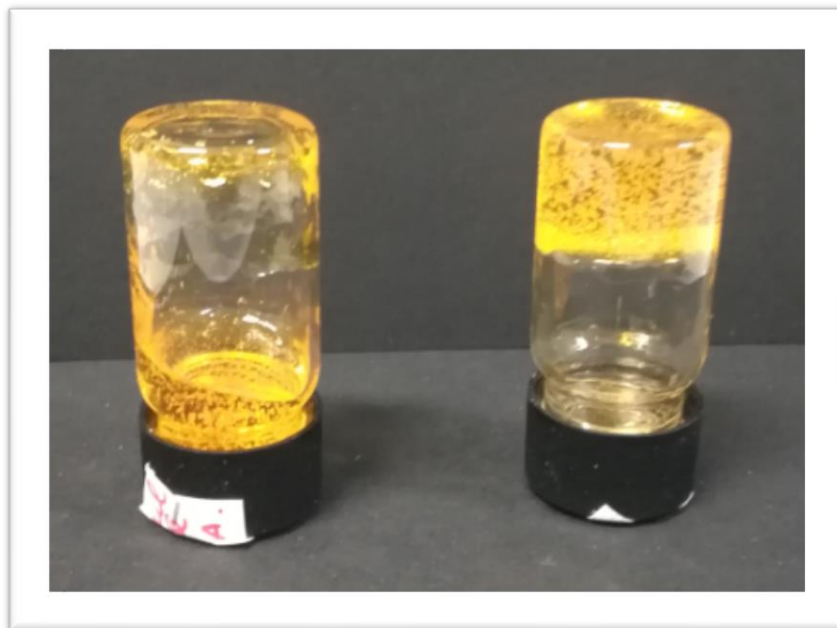


Fig. 3.16: Campione lasciato a T ambiente non gelificato (a sinistra) e campione esposto e gelificato a 70 °C (a destra).

L'idea alla base di questo esperimento di spettrofotometria è stabilire eventuali relazioni tra la temperatura e l'impilamento dei quadruplessi favorente la formazione del gel, il mantenimento del suo grado di stabilità e le sue capacità di auto-rigenerazione. A questo scopo sono state eseguite due prove: si è esposta inizialmente una determinata quantità di gel ad una temperatura costante (70 °C) ed ogni mezz'ora è stata eseguita una misura allo spettrofotometro (Fig. 3.17); in seguito si è esposta sempre la stessa quantità a temperature variabili per un periodo fisso di tempo, al termine del quale veniva eseguita una misura utilizzando lo stesso strumento (Fig. 3.18). Al fine di ottenere valori di assorbanza (Abs) < 2 e di conseguenza spettri affidabili, è stata eseguita una diluizione del gel 1:1000 (1 µl di gel + 999 µl di acqua distillata) in una Eppendorf: da esse sono stati prelevati 500 µl con una pipetta ed inseriti all'interno di una cuvetta (cammino ottico = 10 mm).

Di seguito si riportano i grafici ottenuti:

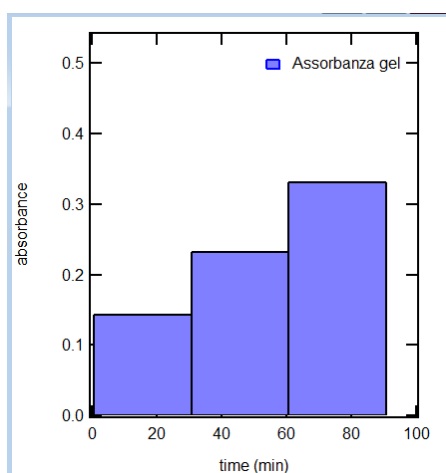


Fig. 3.17: Assorbanza del gel in funzione del tempo di esposizione a 70 °C.

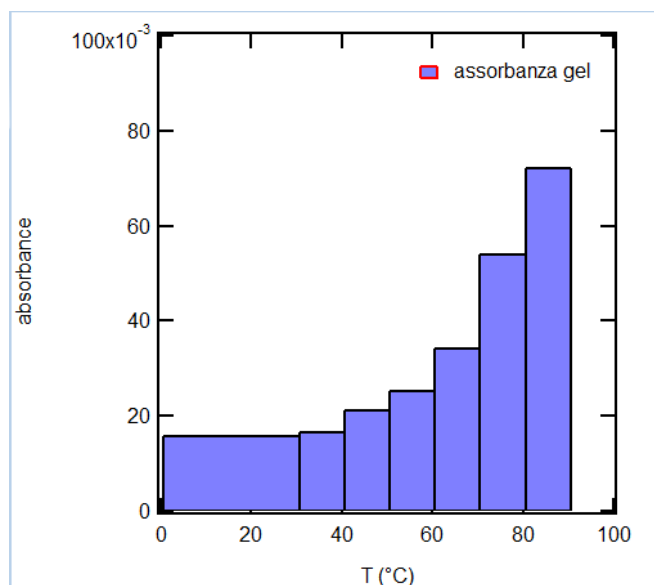


Fig. 3.18: Assorbanza del gel in funzione delle diverse temperature a cui è stato esposto per un tempo costante (10 min).

Osservando il primo grafico (Fig. 3.17), si può notare come l'assorbanza cresca in maniera proporzionale se si scalda il gel a 70° ogni 30 minuti; per quanto riguarda il secondo grafico (Fig. 3.18) si notano cambiamenti del gel pressoché nulli in termini di assorbanza, quando esso è scaldato sino a 40 °C. Aumentando ulteriormente la temperatura, l'assorbanza del campione inizia ad aumentare progressivamente sino a giungere al valore soglia di 70 °C: da questo valore sino a 90 °C si verifica un netto aumento dell'assorbanza del gel in relazione alle temperature di esposizione precedenti.

Queste considerazioni permettono di trarre alcune conclusioni: i dati ottenuti dalla spettrofotometria UV-visibile denotano l'effetto positivo di un aumento

di temperatura sulla formazione del gel. Scaldando infatti la soluzione viscosa ma non ancora gelificata ottenuta disciogliendo l'acido folico nel DMSO, la matrice formata dai quadruplessi nel solvente organico sembra stabilizzarsi e rafforzarsi, poiché il segnale ottenuto aumenta in funzione di temperatura e tempo di esposizione al calore.

Si può quindi affermare che la temperatura elevata ($T \geq 70 \text{ }^\circ\text{C}$) induce la formazione dell'*hydrogel* acido folico/DMSO.

3.5: Analisi di immagini e dati ottenuti da AFM

In questa sezione si riportano le immagini dei *gels* su differenti scale. Per ognuna viene mostrata l'immagine di una sezione in relazione alle altezze ed il grafico relativo alla dimensione dei vari quadruplessi presenti.

Gel Me_100 % diluito 1:12

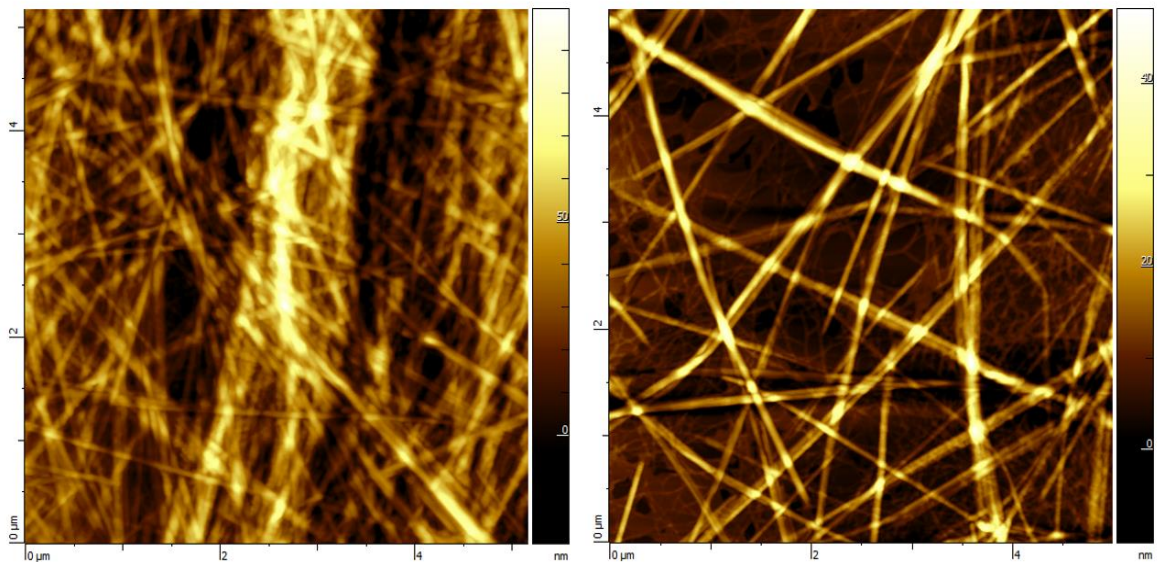


Fig. 3.19: Immagini 3D delle strutture presenti nel gel acido folico/MeOH (100%).

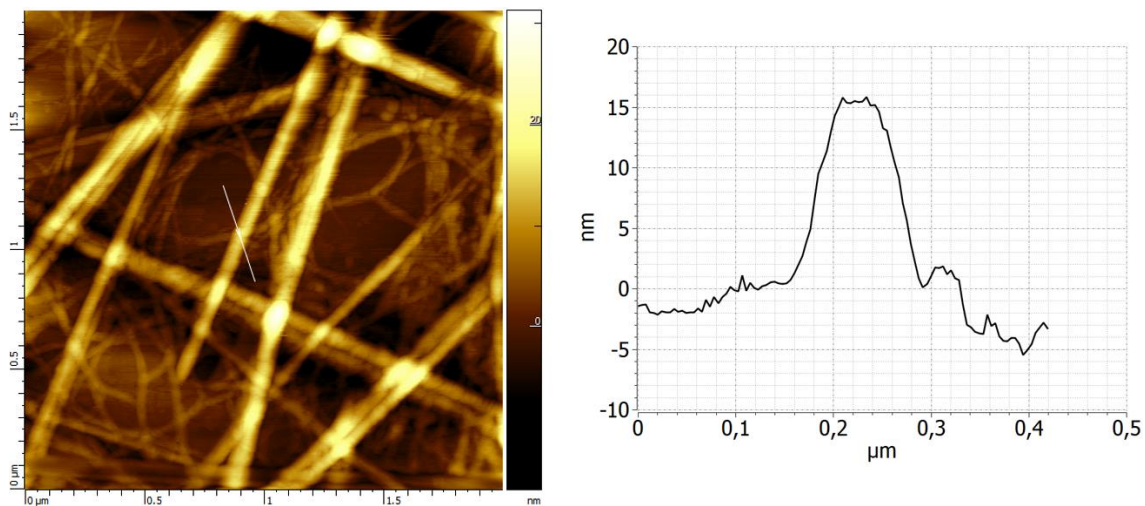


Fig. 3.20: Immagine di una sezione di 2 μm (sinistra) e grafico relativo alle dimensioni delle strutture presenti (destra) (gel acido folico/MeOH 100%).

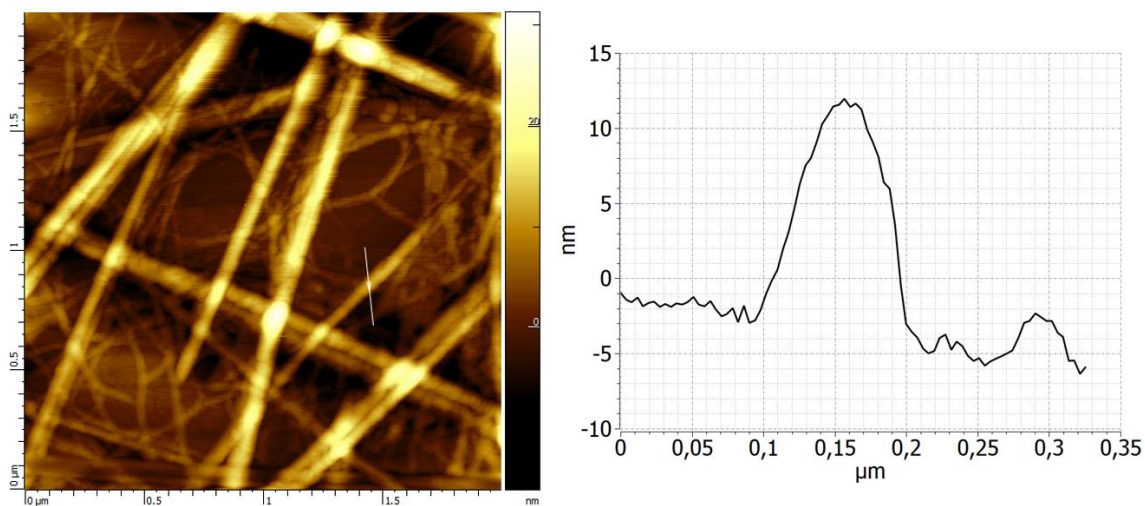


Fig. 3.21: Immagine di un'altra sezione di 2 μm (sinistra) e grafico relativo alle dimensioni delle strutture presenti (destra) (gel acido folico/MeOH 100%).

Gel DM_2 diluito 1:12

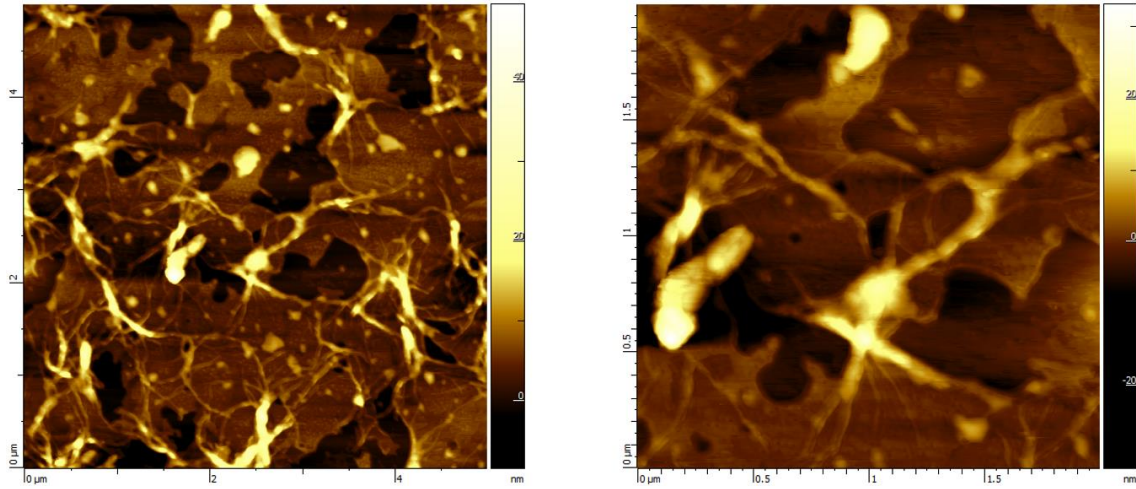


Fig. 3.22: Immagini 3D delle strutture presenti in due sezioni di 5 μm (sinistra) e 2 μm (destra), (gel acido folico/DMSO).

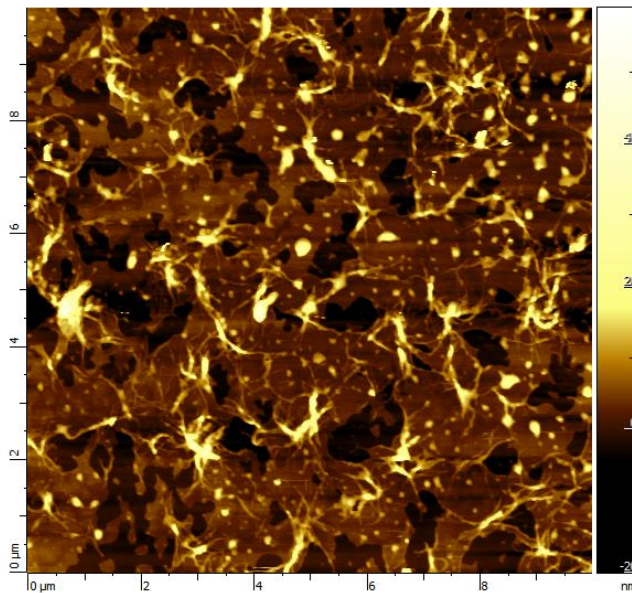


Fig. 3.23: Immagine 3D delle strutture presenti nel gel acido folico/DMSO.

Ponendo l'attenzione sui grafici ottenuti da un'analisi approfondita sul gel acido folico/metanolo (100%), è possibile risalire alle dimensioni delle strutture presenti. Si nota che le fibre che formano le maglie del gel, analizzate nelle sezioni sopra riportate, hanno una larghezza di circa $0.15\ \mu\text{m}$ e un'altezza compresa tra 10 e 15 nm.

Per quanto riguarda altri campioni riportati in Tabella 2.2, analisi dettagliate di tipo quantitativo e qualitativo sono ancora in corso.

4. CONCLUSIONI

Questa tesi è dedicata allo studio ed alla caratterizzazione di materiali nanostrutturati ottenuti da biomolecole in grado di auto assemblarsi in acqua (*self-assembly*). Prototipi piuttosto noti di queste molecole sono la guanina, una delle quattro basi azotate costituenti DNA e RNA, ed in particolar modo la GMP (Guanosina 5' monofosfato). Il comportamento di quest'ultima in acqua è molto interessante, poiché già a concentrazioni ridotte i quartetti formati tendono ad impilarsi gli uni sugli altri, al fine ultimo di formare lunghi quadruplessi cilindrici. Inoltre in presenza di ioni metallici quali ad esempio 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. È anche stato dimostrato che una riduzione delle forze elettrostatiche repulsive tra i quadruplessi permette alle capacità di self-assembly di restare inalterate, rendendo i cilindri ancor più flessibili e capaci di associarsi tra loro in alcuni punti (nodi). Grazie a queste condizioni è possibile determinare la formazione di gel fisici capaci di assorbire notevoli quantità di acqua (fino a circa il 98% in peso). Perciò considerando l'analogia tra la guanina e gli anelli eterociclici pterinici che compongono molecole quali acido folico e folati alcalini, anche questi ultimi possono essere in grado di formare quadruplessi in acqua,

seguendo lo stesso schema di auto-assemblaggio della guanosina 5' monofosfato.

Alla luce di queste premesse, in questo lavoro è stata ricercata la produzione di gel fisici mediante impiego del folato di potassio e di acido folico. A questo scopo, sono stati condotti esperimenti atti a verificare una positiva formazione di quadruplessi in differenti condizioni forza ionica e di pH, queste ultime in grado di determinare una riduzione delle forze elettrostatiche repulsive tra i quadruplessi e favorire la formazione di *gels*. I risultati ottenuti inizialmente dagli esperimenti in diffrazione, condotti su campioni contenenti folato di potassio a differenti percentuali di pressione osmotica, non sono stati quelli attesi. Infatti in ambiente acido (pH 3) e quindi in presenza di un'elevata quantità di protoni (H^+), le cariche negative esposte sulla superficie dei quadruplessi di folato alcalino avrebbero dovuto annullarsi a causa dell'effetto delle cariche positive dei protoni, riducendo le forze repulsive tra di esse e permettendo l'avvicinamento di cilindri adiacenti. Si può quindi affermare che i tentativi di simulare un ambiente acido col quale far interagire i cilindri di folato si sono dimostrati vani, poiché probabilmente in queste circostanze si sono generati quadruplessi di lunghezze talmente ridotte da non essere sufficienti ad interagire con gli altri, determinando la comparsa di una fase coeseterica e non permettendo la formazione di un gel.

Tuttavia, dopo aver valutato ed effettivamente impiegato solventi organici adeguati nei quali poter disciogliere la molecola di acido folico, è stato possibile generare *hydrogels* stabili, dotati di reversibilità termica e di capacità di autoriparazione (*self-healing*). Dai risultati derivati dalle analisi di tipo spettrofotometrico su questi *gels*, è stato possibile comprendere che la temperatura elevata è un parametro fondamentale per la loro formazione rapida ed il mantenimento della loro stabilità. Nonostante siano ancora in corso d'opera alcune analisi AFM su questi campioni, utili ad osservare a livello nanometrico e micrometrico i minimi particolari della formazione di queste interessanti matrici, la tipologia di gel ottenuta potrebbe fondare una base teorico-pratica sulla quale valutare l'applicabilità di sistemi di *drug delivery* ad attività propria per il trasporto di farmaci *in vivo*. Senza ombra di dubbio sono necessarie ulteriori analisi biofisiche utili a caratterizzare in maniera più specifica l'intero sistema.

BIBLIOGRAFIA

- Adhikari B.; Shah A.; Kraatz H-B. Self-assembly of guanosine and deoxy-guanosine into hydrogels: monocovalent cation guided modulation of gelation, morphology and self-healing properties (2014) The Royal Society of Chemistry, 2:4802-4810.
- Carducci F.; Yoneda J.S.; Itri R.; Mariani P. On the structural stability of guanosine-based supramolecular hydrogels (2018) The Royal Society of Chemistry.
- Dash J.; Patil A.J.; Das R. N.; Dowdall F. L.; Mann S. Supramolecular hydrogels derived from silver ion-mediated self-assembly of 5'-guanosine monophosphate (2011) The Royal Society of Chemistry, 7:8120-8126.
- Fraccia T. P.; Smith G. P.; Zanchetta G.; Paraboschi E.; Yi Y. 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.

- 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.
- Ciuchi F.; Di Nicola G.; Franz H.; Gottarelli G.; Mariani P.; Ponzi Bossi M.; Spada G. Self-Recognition and Self-Assembly of Folic Acid Salts: Columnar Liquid Crystalline Polymorphism and the Column Growth Process. (1994) *J. Am. Chem. Soc.* 1994, 116, 7064-7071.
- Tyagi A.; Penzkofer A. Fluorescence Spectroscopic Behaviour of Folic Acid. *Chemical Physics* 367 (2010) 83-92.
- L. L. Lock; M. Lacombe; K. Schwarz; A. G. Cheetham; Y.-A. Lin; P. Zhang; H. Cui. Self-Assembly of Natural and Synthetic Drug Amphiphiles into Discrete Supramolecular Nanostructures *Faraday Discuss.* (2013)

- Chakraborty P.; Roy B.; Bairi P.; Nandi A. K. Improved Mechanical and Photophysical Properties of Chitosan Incorporated Folic Acid Gel Possessing the Characteristics of Dye and Metal Ion Absorption (2012) *J. Mater. Chem.* 22, 20291.
- Xing P.; Chu X.; Ma M.; Li S.; Hao A. Supramolecular gel from folic acid with multiple responsiveness, rapid self-recovery and orthogonal self-assemblies. *Phys.Chem.Chem.Phys.*, 2014, 16, 8346.

RINGRAZIAMENTI

Giunto alla fine del mio percorso universitario, vorrei ringraziare le persone che hanno contribuito, direttamente o indirettamente, alla realizzazione di questa tesi.

In primis il Professore e Relatore Paolo Mariani, conosciuto già durante il mio precedente corso di laurea in Scienze Biologiche, che mi ha accolto nel laboratorio di biofisica per svolgere tirocini e progetti di tesi triennale e magistrale, avvicinandomi al mondo della biofisica e a quello degli *hydrogels*. Docente e persona speciale, in questo periodo è sempre riuscito a motivarmi, supportarmi, talvolta anche a sopportarmi e soprattutto a trasferirmi la sua grande passione per la materia e gli argomenti trattati. Nonostante i suoi impegni lavorativi, è sempre stato presente e disponibile ad ogni confronto.

Un ringraziamento speciale va a Mario Pergolini, il tecnico del laboratorio di Biofisica del DiSVA, per la sua gentilezza, la costante disponibilità nell'analizzare la maggior parte dei campioni studiati in questo lavoro, ed il suo contagioso buonumore; ringrazio anche tutti gli altri membri del laboratorio di Biofisica, a partire dai professori sino ai dottorandi e agli altri tesisti, per avermi fatto sentire immediatamente a mio agio all'interno di questo ambiente di lavoro, più unico che raro. È stata un'esperienza intensa dal punto di vista formativo, mi ha consentito di conoscere persone nuove e mi ha maturato

caratterialmente. Ringrazio inoltre la mia famiglia ed i miei amici che col passare degli anni mi hanno sempre sostenuto durante questo percorso universitario, specialmente nei periodi più intensi; ringrazio anche i miei compagni di corso e di studi, con i quali ho condiviso gioie e dolori, presentazioni e laboratori, che mi hanno aiutato ad affrontare ogni esame col giusto piglio e la miglior preparazione.

Infine, un ringraziamento speciale va a Francesco, conosciuto durante il secondo anno di triennale; con lui ho condiviso ansie, preoccupazioni, soddisfazioni, progetti di lavoro, studio di vari esami, nottate in bianco per elaborare la tesi e dunque per me è ormai più un fratello che un semplice amico o collega universitario. Grazie a tutti voi e a tutte le persone che ho incontrato in questo percorso, che seppur non citate, mi hanno permesso di raggiungere questo obiettivo per me molto importante che spero diventi più che un punto di arrivo, un punto di partenza per il mio futuro.

Grazie a tutti.

Stefano