

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI
ROMA "TOR VERGATA"**

**DOTTORATO DI RICERCA IN
"BIOCHIMICA E BIOLOGIA MOLECOLARE"
XIX CICLO**

*Applicazione della tecnologia sol-gel.
Sintesi di un materiale ibrido biocompatibile e studio delle proprietà
spettroscopiche ed elettrochimiche del citocromo c incapsulato
in un bio sol-gel*

Dott.ssa Deriu Daniela

Docente Guida
Prof. Nicola Rosato

Coordinatore
Prof. Alessandro Finazzi-Agrò

**DIPARTIMENTO DI MEDICINA SPERIMENTALE E SCIENZE BIOCHIMICHE
VIA MONTPELLIER, 1 00133 ROMA**

**Alla piccola Sofia,
al mio amore
e alla mia famiglia**

Abstract

Aim of the study is the structural characterization of a new hybrid silica biomaterial and the spectroscopic and electrochemical behaviour of cyt *c* encapsulated in a bio sol-gel.

In the first part of the project we investigated a new silica biomaterial synthesized through the sol-gel method. The inorganic/organic hybrids were synthesized combining an acid chitosan solution with an inorganic phase (TMOS), previously modified by the addition of calcium and phosphate ions.

The structural test of the hybrids, containing a different chitosan -to silica ratios (BK1, BK2, BK3) were performed by employing Fourier-transform infrared spectroscopy. Hybrids spectra were compared with the bioactive sol-gel.

In vivo, material bioactivity is associated to the ability to form an hydroxycarbonate apatite layer on its surface. To investigate the effect of chitosan amount on sol-gel biocompatibility, bioactivity essays were performed in vitro soaking the samples with static immersion for different time intervals (30 min, 6h e 24h) in a 0.01 M di Tris- HCl solution (pH 7.0). Ions release (Ca^{2+} e PO_4^{3-}) was determined using couple induced emission spectroscopy (ICP). On BK3 surface, after sample immersion in a 0.01 M Tris-HCl for 48h, confocal microscopy has underlined the formation of crystalline aggregates. Although we can not state unequivocally that they are unequivocally composed by hydroxycarbonate apatite, we observed that the amounts of crystals increases with chitosan amount.

Matrix structural changes, induced by chitosan, were investigated by swelling and permeability measurements.

Swelling process was investigated to analyze hybrids stability in water environment.

Permeability study, tense to clarify chitosan effect on solvent diffusion across the silica matrix, was performed using a fluorescent probe, named RubPy.

Swelling measurements, demonstrate that samples weight increase, due to solvent diffusion across the matrix, is strongly correlated with chitosan concentration. Samples with high chitosan amount need longer times to reach an equilibrium state. More structural information are obtained comparing infrared spectrum of the bioactive gel with that of the hybrid material. An interesting result is the absorption band observed around 1400

cm^{-1} , that can be ascribed to the organic modification of the silica matrix and, in particular, to the formation of Si-C bond.

The ternary system, CaO- SiO₂-P₂O₅, even if shows interesting properties, cannot be used as support for protein encapsulation; the major impediment is represented by the low pH (< 2.5); we synthesized a binary CaO-SiO₂ bioactive system (bio sol-gel) which, although missing the phosphates, contains calcium, an element considered fundamental for biocompatibility.

In the present work, we used the horse heart cytochrome *c* as a protein model. Structural properties of bio sol-gel encapsulated cyt *c* were investigated comparing the electronic absorption spectra and dicrioic spectra with those of the protein in solution (pH 7; 25° C) .We also investigated i) the acid-induced protein denaturation, (ii) the protein stability and (iii) the electrochemical behaviour of the embedded protein. Our data demonstrate that immobilization process do not alter protein functionality. System protein/ modified electrode show a quasi- reversible voltammetric behaviour in the Fe(III)/Fe(II) redox process, for all the scan rates investigated. The experimentally formal potential, $E_{1/2} = 0.244$ V vs NHE, is very close to the formal redox potential determined for soluble cyt *c* at the same pH ($E_{1/2} = 0.255$ V). To investigate system stability cyclic voltammogram of the samples was run for one week; surprisingly the protein preserves its redox activity.

The electronic absorption and CD spectra demonstrate that bio sol-gel encapsulated protein do not present structural changes.

The acid - induced denaturation process, achieved adding an HCl solution, was investigated by following the shift of the Soret absorption band from 408nm (native state) to 395nm (denaturated protein) as a function of time.

Biogel entrapped cyt *c* clearly requires longer time to unfold than the soluble protein. The protein undergoes denaturation more promptly when entrapped in the salt-doped sol gel (i.e., in the presence of calcium nitrate) with respect to the case it is in pure (i.e., salt missing) sol-gel. Probably, this may be ascribed to the salt that prevent a correct sol gel reticulation and induces formation of larger pores. Also, different samples unfolding kinetics can be correlated with the a different solvent diffusion

The refolding process, proved that unfolding-refolding process of cyt *c* entrapped in the bio sol-gel is fully reversible, under the conditions investigated.

RIASSUNTO

Nella prima fase del progetto si è voluto studiare un nuovo biomateriale di natura silicea sintetizzato mediante il metodo sol-gel. Gli ibridi inorganici/organici sono stati prodotti mediante la combinazione di una soluzione acida di chitosano con una soluzione di tetrametilortosilicato, opportunamente modificata aggiungendo ioni Ca^{2+} e PO_4^{3-} .

Una caratterizzazione preliminare degli ibridi, contenenti ciascuno un diverso rapporto chitosano/sol-gel bioattivo (BK1, BK2, BK3) è stata effettuata utilizzando la spettroscopia infrarossa in trasformata di Fourier. Gli spettri sono stati confrontati con il campione di sol-gel bioattivo (B).

La biocompatibilità di un materiale, in vivo, è associata con la formazione di uno strato di idrossicarbonato di apatite (HCA) sulla sua superficie. Per valutare come varia la biocompatibilità del sol-gel bioattivo in relazione alla quantità di chitosano, si sono eseguiti dei saggi di bioattività in vitro, immergendo per tempi prestabiliti (30 min, 6h e 24h) i campioni in una soluzione 0.01 M di Tris- HCl a pH 7. Gli ioni Ca^{2+} e PO_4^{3-} rilasciati dalle matrici nelle soluzioni d'immersione sono stati determinati mediante spettroscopia di emissione al plasma (ICP). I dati ottenuti dimostrano che il biopolimero previene la perdita degli ioni dalla matrice dei sol-gel bioattivi e che la sua presenza non influenza il tasso di riadsorbimento se non nel caso del solo campione BK3.

Sulla superficie dello stesso campione BK3, previa immersione in una soluzione di Tris- HCl 0.01 M per 48h, la microscopia confocale ha evidenziato la formazione di aggregati cristallini. Sebbene non siamo in grado di affermare inequivocabilmente che questi aggregati siano costituiti da idrossicarbonato di apatite, possiamo osservare che la loro presenza aumenta in concomitanza con l'incremento del rapporto chitosano/sol-gel bioattivo.

I cambiamenti strutturali della matrice, indotti dalla presenza del chitosano, sono stati evidenziati da misure di "swelling" e di permeabilità. Tale proprietà è stata studiata per analizzare la stabilità degli ibridi in ambiente acquoso. Lo studio di permeabilità, teso a chiarire come varia l'accesso di un solvente acquoso alla matrice in presenza del chitosano, è stato effettuato mediante l'uso di una sonda fluorescente il RubPy. I risultati appaiono estremamente interessanti.

Le prove di swelling dimostrano, che il processo di rigonfiamento dovuto alla frazione di solvente che penetra nella matrice, è fortemente condizionato dalla concentrazione di chitosano. In particolare si osserva che

i campioni contenenti concentrazioni maggiori del biopolimero richiedono tempi più lunghi per raggiungere uno stato di equilibrio per il processo di swelling.

Maggiori informazioni strutturali si sono ottenute comparando lo spettro IR del sol-gel bioattivo con quello dei diversi ibridi. L'informazione più interessante deriva dalla comparsa di un picco centrato a 1400 cm^{-1} imputabile alla formazione del legame Si-C tra la silice del sol-gel ed il carbonio del polimero.

Il sistema ternario, $\text{CaO-SiO}_2\text{-P}_2\text{O}_5$, pur presentando caratteristiche interessanti, a causa dell'acidità del sistema ($2 < \text{pH} < 3$) non può essere utilizzato come matrice di supporto per l'immobilizzazione delle proteine; si è quindi proceduto alla sintesi di un gel binario CaO-SiO_2 (bio sol-gel).

Nel processo d'immobilizzazione abbiamo utilizzato come proteina modello il *cyt c* estratto dal cuore di cavallo. Le proprietà strutturali del *cyt c* nel bio sol-gel sono state studiate confrontando i relativi spettri di assorbimento ottico e dicroismo circolare (CD) con quelli della proteina in soluzione a pH 7 ed alla temperatura di 25°C . Sono state altresì investigati i) il processo di denaturazione della proteina indotto da una soluzione acida ii) la stabilità della proteina iii) le proprietà elettrochimiche della proteina incapsulata. I risultati dimostrano che il processo di intrappolamento non altera la funzionalità della proteina. I voltammogrammi relativi al sistema proteina/ elettrodo modificato mostrano un segnale ben definito e di tipo quasi-reversibile per tutte le velocità di scansione esplorate. Il potenziale di ossidoriduzione calcolato sperimentalmente, $E_{1/2} = 0.244\text{ V vs NHE}$, è molto vicino al valore del potenziale redox del *cyt c* in soluzione a pH = 7 ed alla temperatura di 25°C ($E_{1/2} = 0.255\text{ V}$). Per studiare la stabilità del sistema le misure di voltammetria sono state effettuate ogni 24 ore per una settimana; sorprendentemente la proteina conserva la sua attività redox.

Gli spettri di assorbimento e CD dimostrano che nella proteina incapsulata nel bio sol-gel non avvengono cambiamenti della struttura secondaria e terziaria.

La denaturazione acido-indotta, tramite l'aggiunta di HCl, è stata seguita misurando lo spostamento del picco Soret tra 408 nm (proteina nativa) e 395 nm (proteina denaturata) in funzione del tempo.

La proteina incapsulata, chiaramente, richiede rispetto alla proteina in soluzione tempi più lunghi per denaturarsi.

La cinetica di denaturazione del *cyt c* incapsulato nel bio sol-gel è molto più rapida rispetto a quella del *cyt c* nel solo sol-gel (sintetizzato senza l'aggiunta del $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$). Tale risultato molto probabilmente è da imputare

alla presenza del $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, che impedendo una corretta reticolazione del sistema genera una matrice con pori di maggiori dimensioni.

Si ipotizza che la diversa velocità di denaturazione dei campioni sia correlato con una differente accessibilità al solvente. Lo studio di refolding della proteina incapsulata nel bio sol-gel dimostra che il processo di unfolding-refolding è completamente reversibile.

Indice

| | |
|---|----------|
| INTRODUZIONE | 1 |
| | |
| Cap. 1 IL PROCESSO SOL-GEL | |
| 1.1 La chimica del processo sol-gel | 4 |
| 1.2 Microstruttura di un materiale sol-gel | 7 |
| 1.3 Applicazioni del metodo sol-gel | 9 |
| 1.4 Immobilizzazione di biomolecole mediante processo sol-gel | 12 |
| 1.5 Ibridi inorganici/organici di origine sol-gel | 13 |
| 1.6 Biocompatibilità dei biovetri e dei materiali silicei | 15 |
| | |
| Cap. 2 I POLIMERI | |
| 2.1 Caratteristiche generali dei polimeri | 17 |
| 2.2 La diffusione nei gel | 19 |
| 2.3 Interazioni tra polimeri | 19 |
| 2.4 Le caratteristiche dei gel | 23 |
| 2.5 Tipologie dei gel | 24 |
| 2.6 Il chitosano | 25 |
| | |
| Cap. 3 IL CITOCROMO c | |
| 3.1 La struttura | 28 |
| 3.2 Analisi delle sequenze e omologia dei citocromi di tipo c | 33 |
| 3.3 Funzione | 34 |
| | |
| Cap. 4 IL PROCESSO DI FOLDING DELLE PROTEINE | |
| 4.1 Cenni generali | 36 |
| 4.2 Caratteristiche degli stadi intermedi: il molten globule | 39 |
| 4.3 Il molten globule del citocromo c: lo stato A | 42 |
| 4.4 Processo di unfolding | 43 |
| | |
| Cap. 5 TECNICHE UTILIZZATE | |
| 5.1 Spettroscopia infrarossa in trasformata di Fourier | 47 |
| 5.2 Spettroscopia di emissione al plasma | 49 |
| 5.3 Analisi elementare | 51 |
| 5.4 Dicroismo circolare | 51 |

| | | |
|---|---|------------|
| 5.5 | Fluorescenza statica | 53 |
| 5.6 | Misure di assorbimento | 54 |
| 5.7 | Voltammetria ciclica | 55 |
| 5.8 | Microscopia confocale | 57 |
| | | |
| Cap. 6 LE METODOLOGIE SPERIMENTALI IMPIEGATE | | |
| 6.1 | Sintesi degli ibridi | 59 |
| 6.2 | Prove di swelling | 61 |
| 6.3 | Cinetiche di rilascio degli ioni calcio e fosfato | 62 |
| 6.4 | Prove di permeabilità | 63 |
| 6.5 | Preparazione dei campioni per FTIR ed analisi elementare | 63 |
| 6.6 | Sintesi della matrice sol-gel e del bio sol-gel | 64 |
| 6.7 | Immobilizzazione del citocromo c | 64 |
| 6.8 | Preparazione dell' elettrodo di lavoro | 65 |
| | | |
| Cap. 7 CARATTERIZZAZIONE STRUTTURALE DI UN GEL IBRIDO BIOATTIVO CONTENENTE CHITOSANO | | |
| 7.1 | Caratterizzazione strutturale degli ibridi mediante FTIR | 66 |
| 7.2 | Rilascio degli ioni | 72 |
| 7.3 | Prove di swelling | 80 |
| 7.4 | Permeabilità | 83 |
| 7.5 | Analisi delle immagini ottenute mediante microscopia confocale | 86 |
| | | |
| Cap. 8 IL CITOCROMO C INCAPSULATO NEL BIO SOL-GEL | | |
| 8.1 | Caratterizzazione delle matrici sol-gel | 89 |
| 8.2 | Il citocromo c in soluzione | 92 |
| 8.3 | Il citocromo c incapsulato nel bio sol-gel | 101 |
| 8.4 | Voltammetria ciclica | 114 |
| | | |
| CONCLUSIONI | | 117 |
| | | |
| BIBLIOGRAFIA | | 120 |

Ringraziamenti

Desidero ringraziare il Prof. Rosato per avermi offerto l'opportunità di avere un'importante esperienza scientifica.

Ringrazio il Prof. Mei, la Dott.ssa Di Venere e la Dott.ssa Nicolai per i preziosi consigli professionali e per la loro disponibilità.

Un grazie di cuore alle Dott.sse Caroppi Paola, Pagnotta Sara e Sinibaldi Federica, con le quali ho condiviso momenti di amicizia e di complicità unici...e che mi hanno aiutato a raggiungere questo traguardo.

Un ringraziamento speciale al Prof. Santucci, per la sua disponibilità professionale ed umana.

Introduzione

Negli ultimi anni, si è osservato un crescente interesse per il metodo sol-gel.

Questa tecnologia, estremamente versatile, rappresenta un elemento di congiunzione tra il mondo della chimica inorganica e quello della biochimica. Questo processo consente, a partire da un opportuno precursore (generalmente un alcossido di silicio, quale il tetrametilortosilicato, TMOS o il trietilortosilicato, TEOS) la sintesi, a basse temperature, di un'ampia varietà di matrici silicee. Il controllo dei parametri sperimentali permette di sintetizzare materiali a diversa porosità e con specifiche caratteristiche chimico-fisiche.

In base al precursore utilizzato ed alla presenza di additivi, si possono sintetizzare diverse matrici sol-gel. I più diffusi attualmente sono i sol-gel inorganici, ottenuti dalla combinazione del precursore siliceo con gli ossidi di metalli, quali alluminio, vanadio, titanio e molibdeno e gli ibridi inorganici/organici.

I primi caratterizzati da una elevata trasparenza presentano tuttavia una notevole fragilità. Gli ibridi, che possono essere preparati in forma di dischi, monoliti o film e che possiedono proprietà chimico-fisiche diverse da quelle dei loro precursori, mostrano un' elevata compatibilità con i sistemi biologici. Per queste ragioni trovano importanti applicazioni nel settore biomedico, farmacologico e biosensoristico.

La combinazione polimero/soluzione sol-gel consente di generare matrici flessibili e biocompatibili; recentemente numerosi lavori descrivono i vantaggi dovuti all' utilizzazione del chitosano, quale polimero d' incorporazione nello sviluppo di un biosensore (Miao and Tan, 2001).

Ibridi silicei contenenti chitosano sono stati, per già sintetizzati.

La biocompatibilità di una matrice sol-gel può essere incrementata mediante l' aggiunta di ioni calcio e fosfato e/o l' incorporazione di un polimero naturale.

Nella prima fase del presente studio sono stati studiati una nuova classe di ibridi bioattivi, prodotti dalla combinazione di una soluzione acida di chitosano con una soluzione di tetrametilortosilicato, opportunamente modificata aggiungendo ioni Ca^{2+} e PO_4^{3-} .

Scopo dello studio è stabilire quali sono gli effetti indotti dalla presenza del chitosano sulle proprietà chimico-fisiche dei gel biotivi (contenenti ioni calcio e fosfato).

Le differenze strutturali tra il gel bioattivo (B) e gli ibridi a diverso contenuto di chitosano (B, BK1, BK2, BK3) sono state investigate mediante spettroscopia infrarossa in Trasformata di Fourier, spettroscopia di emissione al plasma, spettroscopia di fluorescenza e microscopia confocale.

Il processo sol-gel consente anche di incapsulare in maniera semplice, generica e stabile un' ampia varietà di macromolecole.

Storicamente le forze dominanti del folding molecolare sono state studiate utilizzando proteine dissolte in soluzione. L' ambiente cellulare, densamente popolato, è per lo più abitato da proteine ed acidi nucleici, che occupano gran parte del volume cellulare, circa il 40% del citoplasma d E.Coli (Zimmerman and Trach, 1991). In quest' ottica è facile comprendere come lo studio delle proteine in soluzione, sebbene ampiamente diffuso, non consenta di riprodurre in vitro lo stesso "environment" in cui ha luogo in vivo il folding proteico. Recentemente la metodologia sol-gel è utilizzata per studiare quali sono gli effetti indotti dal crowding molecolare sulla funzionalità e la stabilità di una proteina. Queste considerazioni illustrano pertanto quali sono le potenzialità dovute all' immobilizzazione delle proteine all' interno delle matrici sol-gel nel comprendere qual sono i meccanismi reali del folding proteico.

I vantaggi della metodologia sol-gel sono molteplici. In primo luogo, il processo di intrappolamento generalmente non altera le proprietà strutturali e funzionali delle proteine (Brennan, 1999; Dave et al, 1994; Gill and Ballesteros, 2000); le proteine incapsulate possono essere studiate con le tecniche spettroscopiche classiche utilizzate per monitorare i cambiamenti strutturali delle proteine in soluzione; il controllo della porosità del sistema permette da un lato di trattenere le grandi molecole e dall' altro offre alle piccole molecole di diffondere facilmente attraverso la matrice; il processo d' immobilizzazione permette lavorare con uno intermedio conformazionale, impossibile da avere quando si lavora con le proteine in soluzione.

La proteina modello utilizzata nel nostro studio è il citocromo c estratto dal cuore di cavallo.

Questa proteina redox, costituita da 104 residui aminoacidici, possiede un gruppo eme legato covalentemente a due residui cisteinici (Cys 14 e Cys 17). In condizioni fisiologiche i ligandi assiali del ferro-eme sono l' Istidina 18 e la Metionina 80. Quest' ultima sembra avere un ruolo cruciale per la funzionalità della proteina, essendo responsabile del potenziale redox relativamente alto del citocromo c.

Numerosi lavori hanno dimostrato quali sono gli effetti indotti dai denaturanti chimici (guanidina e urea) sul citocromo c immobilizzato in una matrice sol-gel. Studi conformazionali hanno evidenziato che tendenzialmente le proteine incapsulate conservano il loro stato nativo durante il processo di incapsulamento e che il processo (Fiandanca et al, 2004), incrementa la stabilità funzionale della proteina.

Nel presente studio è stato elaborato un nuovo protocollo che prevede l'aggiunta del nitrato di calcio alla fase inorganica. In questo modo è stato sintetizzato un sistema binario bioattivo (bio sol-gel), che sebbene privo di fosfati, contiene ioni calcio, considerati essenziali per la biocompatibilità del sistema. Il sistema binario (CaO-SiO_2) presenta una serie di vantaggi rispetto al gel bioattivo ternario ($\text{CaO-SiO}_2\text{-P}_2\text{O}_5$); l'aspetto più rilevante è dato dal pH del sistema; il bio sol-gel, contrariamente al gel bioattivo ternario, possiede un pH neutro.

In questo modo è stato possibile effettuare la stabilità e la funzionalità della proteina modello incapsulata. Nella seconda fase della ricerca abbiamo confrontato le proprietà strutturali del citocromo c incapsulato in matrici prive (matrici sol-gel) o contenenti nitrato di calcio (matrici bio sol-gel).

L'insieme dei dati ottenuti dimostra ulteriormente la grande versatilità della procedura sol-gel e la capacità di produrre materiali dalle caratteristiche più varie. Le proprietà variano in relazione ai diversi parametri di sintesi. La scelta del precursore, del pH, delle condizioni termiche e dei sali, contribuiscono a modificare il reticolo siliceo. Si genera pertanto un'infinità di materiali, che trovano le più svariate applicazioni. Se da un lato un sistema ternario si rende idoneo per il settore biomedico, d'altra parte il sistema binario, consentendo l'immobilizzazione di una proteina, trova il suo naturale sfogo nella biosensoristica. Questo infatti elimina una serie di importanti inconvenienti quali l'unfolding proteico, ma anche (come nel caso della perossidasi e della mioglobina) il rilascio del gruppo prostetico dalla proteina durante la sintesi. Pertanto la procedura di immobilizzazione nel biogel è versatile e sicura.

Capitolo 1

Il processo sol-gel

1.1 La chimica del processo sol-gel

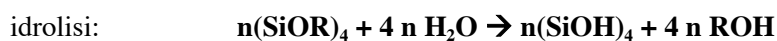
Negli ultimi anni si è andato sempre più diffondendo l'interesse per lo sviluppo di nuovi biomateriali soprattutto in virtù della loro vasta applicazione nei settori ambientali, biomedici e biotecnologici. La sintesi di questi nuovi biomateriali prevede l'utilizzazione di una metodologia semplice e versatile quale il processo sol-gel, inizialmente elaborata per la sintesi di materiali ceramici e vetrosi a basse temperature (<100° C).

La tecnologia sol-gel consente di sintetizzare un'ampia varietà di network inorganici aventi specifiche caratteristiche di composizione, durezza e porosità mediante una serie di reazioni di polimerizzazione inorganica che portano alla formazione di oligomeri e polimeri di ossidi metallici (silicio, alluminio, titanio, zirconio, ecc.). In ogni caso, sebbene le matrici prodotte possiedano caratteristiche uniche, la metodologia prevede una sequenza di step obbligatori quali:

- ✓ sintesi iniziale della soluzione;
- ✓ formazione di una sospensione di particelle colloidali (sol);
- ✓ conversione del sol in un reticolo rigido interconnesso in seguito all'accrescimento e all'unione delle strutture polimeriche. Questa fase rappresenta la transizione da sol a gel.
- ✓ invecchiamento ed essiccamento del gel umido in un gel secco, lo xerogel.

Le reazioni coinvolte nella transizione sol-gel, sono quelle di idrolisi e di condensazione. L'idrolisi parziale o totale (acida o basica) di un opportuno precursore monomero, quale un alcossido di silicio (generalmente tetrametilortosilicato, TMOS e tetraetilortosilicato, TEOS) porta alla formazione del sol, che con il tempo verrà convertito in gel, network poroso e tridimensionale, mediante una reazione di condensazione.

Le reazioni complessive che portano alla formazione di un gel di silice a partire dal un generico precursore sono:



dove R rappresenta il gruppo alchilico dell' alcossido metallico.

Gli alcossidi di silicio possono essere idrolizzati sia in ambiente acido che in ambiente basico. In entrambe i casi l'idrolisi, che porta alla formazione di gruppi silanolo Si-OH, avviene per attacco nucleofilo dell'acqua all'atomo di silicio secondo il seguente schema di reazione:



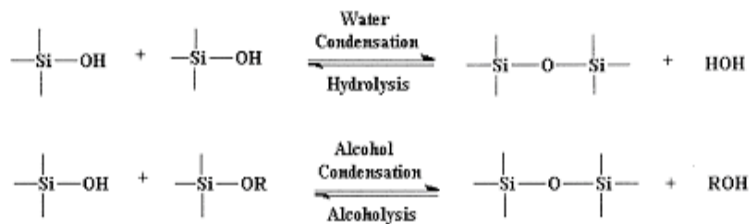
Sebbene possa svolgersi anche in ambiente neutro, la cinetica di reazione è piuttosto lenta, e quindi appare poco conveniente lavorare a tali condizioni di pH. Tale parametro è sicuramente fondamentale nel controllare la cinetica d' idrolisi e quindi nel definire le proprietà microstrutturali della matrice sol-gel; a parità di concentrazione del catalizzatore, l' ambiente acido, incrementa la velocità della reazione di idrolisi.

Contrariamente, in presenza del catalizzatore acido i tempi di gelazione, associati alla reazione di policondensazione, appaiono molto più brevi.

I gruppi silanolo, intermedi reattivi del processo sol gel reagiscono ulteriormente, mediante reazione di condensazione, per formare i polimeri di silossano (legami Si-O-Si.).

La reazione di condensazione, avviene principalmente secondo due meccanismi:

- ✓ attacco di un gruppo silanolo su un atomo di silicio con successiva espulsione di una molecola di acqua;
- ✓ attacco di un gruppo silanolo su un atomo di silicio con successiva eliminazione di una molecola di alcol, nel caso in cui il monomero sia parzialmente idrolizzato:



Nonostante l'evoluzione degli alcossidi verso networks inorganici sia un processo spontaneo nelle condizioni previste dal metodo sol-gel, di solito si utilizza un catalizzatore per accelerare la reazione o per favorire la formazione della struttura desiderata. La velocità minima di condensazione si ottiene lavorando ad un pH prossimo a 2, che corrisponde al punto isoelettrico del sistema. Per valori minori o maggiori di questo valore minimo, i gruppi silanolo del network sono rispettivamente protonati o deprotonati.

La catalisi basica ha una più lenta cinetica di idrolisi, che invece aumenta via via che i gruppi silanolo vengono sostituiti da gruppi -OH. L'idrolisi è però completa ed irreversibile. Viceversa la condensazione in catalisi basica è più veloce e procede per addizione di un monomero ai gruppi Si-O- del cluster in crescita, portando alla formazione di particelle sferiche e di un network fortemente reticolato.

Sebbene la reazione di idrolisi proceda più velocemente in presenza di un catalizzatore acido, contemporaneamente è favorita la reazione inversa di riesterificazione. La cinetica di condensazione rallenta con l'avanzare del grado di sostituzione. La condensazione procede principalmente per reazione di specie neutre con i gruppi Si-OH protonati, portando alla formazione di una struttura poco ramificata in cui i pori sono di piccole dimensioni (< 2mm).

L'ultima fase della tecnologia, che porta alla formazione di un network tridimensionale, è rappresentata dalle seguenti reazioni di polimerizzazione; i) polimerizzazione dei monomeri in strutture polimeriche, ii) condensazione dei polimeri e formazione di cristalli primari, iii) crescita o agglomerazione dei cristalli primari in particelle, iv) legame tra le particelle e sintesi del reticolo tridimensionale.

Le reazioni che portano alla fase di gel, in genere non si fermano al punto di gel, poiché potrebbero essere ancora presenti oligomeri liberi di diffondere e di reagire. Nella fase di invecchiamento (aging) si verificano processi di riorganizzazione strutturale, di irrigidimento del network, dovuto ad ulteriori cross-links, con conseguente variazione del diametro dei pori. Nella fase iniziale di essiccamento, le molecole di acqua e di alcool, originatesi durante le reazioni di idrolisi e di condensazione, evaporano dalla superficie del gel umido. Il raggio del menisco liquido-vapore sulla superficie è molto più grande rispetto al diametro dei pori, per cui la pressione capillare nella struttura è minima.

Il gel “umido”, contenente dapprima un’ elevata quantità di acqua (50-80%) e pori di grandi dimensioni (diametro superiore ai 200 nm), subisce una riduzione del volume iniziale proporzionale alla quantità di liquido evaporato. Nella seconda fase dell’ essiccamento, che rappresenta peraltro una fase critica a causa delle possibili fratture che si possono sviluppare nel reticolo siliceo per la massima tensione capillare, il raggio del menisco è uguale al raggio dei pori.

Il gel “essiccato” presenta un restringimento della matrice pari all’ 80 % del suo volume iniziale e possiede pori le cui dimensioni variano tra i 5- 20 nm in relazione al tempo e alla temperatura di essiccamento.

Le particolari caratteristiche chimico-fisiche delle matrici sol-gel le rendono idonee ad una loro utilizzazione per lo sviluppo di nuovi materiali nell’ambito delle applicazioni biomediche, della biosensoristica e della biochimica.

Uno degli aspetti più importanti nell’ elaborazione di questi dispositivi è data dall’ immobilizzazione di molecole specifiche. Al fine di garantire la migliore prestazione del biosensore il processo di immobilizzazione deve essere semplice, veloce e aspecifico. Quest’ ultimo può avvenire mediante:

1. un processo di adsorbimento su di un substrato solido. Tale metodo, tuttavia, sebbene sia di semplice esecuzione, non garantisce performance costanti nel tempo. La sensibile diminuzione della risposta del dispositivo è correlata con il graduale rilascio delle molecole adsorbite sul supporto stesso;

2. la formazione di una struttura covalente che implica la formazione di legami chimici permanenti tra la “molecole” ed il substrato, generalmente di natura silicea, in quanto i gruppi ossidrilici presenti sulla superficie del vetro costituiscono dei siti di attacco per le molecole organiche. Se da un lato questi sensori hanno un tempo di vita superiore a quelli prodotti per adsorbimento, d’ altro canto le reazioni chimiche coinvolte possono essere estremamente complesse;

3. incapsulamento delle molecole all’ interno di una matrice sol-gel

1.2 Microstruttura di un materiale sol-gel

La microstruttura del materiale sol-gel può essere controllata modificando il rapporto molare acqua/alossido, il precursore scelto, la natura dei sostituenti legati al silicio (poiché sostituenti più ingombranti

ritardano l'idrolisi dell'alcolossido), la natura e la concentrazione del catalizzatore, il tempo e la temperatura della fase di preparazione e di invecchiamento del sistema (Brinker C. J. et al 1990). Le caratteristiche strutturali degli xerogel sono strettamente correlate al rapporto molare $H_2O/alcolossido$ (r).

Per valori di $r < 4$, si osserva un incremento del tempo di gelazione, con formazione di xerogel aventi una struttura fine e microporosa. Al contrario, l'incremento del rapporto molare determina una struttura più grossolana del sistema. (Ro and Chung, 1991).

Numerosi studi hanno dimostrato l'importanza del pH nel determinare la struttura finale dello xerogel; in particolare, le variazioni del pH agiscono sul processo di idrolisi e di condensazione, sulla cinetica e sul meccanismo di crescita del reticolo, inducendo una differente complessità del sistema.

La dimensione delle particelle può variare dai 2-4 nm ai 100 nm in relazione al pH della soluzione. In ambiente acido (in prossimità del punto isoelettrico) le forze di repulsione tra le particelle sono estremamente ridotte per cui dalla loro interazione si genera un network lineare tipico dei gel. Un incremento di pH, al contrario, determina un aumento delle forze di repulsione tra le particelle cariche negativamente con conseguente formazione di "grandi aggregati".

La morfologia finale dello xerogel è determinata inoltre dal tasso di idrolisi e di condensazione. Al punto isoelettrico della silice (IEP compreso tra valori di pH 1-3), in cui la mobilità elettroforetica del sistema è nulla, il tasso di condensazione appare piuttosto basso (Brinker and Scherer, 1990).

La deprotonazione dei gruppi silanolo (SiO^-), tipica delle soluzioni debolmente basiche o moderatamente acide, determina un incremento del tasso di condensazione, con conseguente formazione di specie silicee altamente ramificate. Al termine del processo di gelazione vengono a formarsi regioni mesoporose con pori di dimensioni comprese tra i 2 ed i 50 nm.

Gli xerogel prodotti a partire da soluzioni estremamente acide (pH inferiore all'IEP), sono ancor di più delle strutture mesoporose (Curran and Stiegman, 1999), questo perché i gruppi ($SiOH^{2+}$), ottenuti dalla deprotonazione dei silanoli, rappresentano un buon gruppo uscente nella reazione di condensazione (Brinker and Scherer, 1990).

1.3 Applicazioni del metodo sol-gel

La forza della tecnologia sol-gel risiede soprattutto nella sua grande versatilità e nella varietà di prodotti che se ne possono ricavare (**figura 1.1**).

Gli addetti ai lavori ben conoscono le potenzialità offerte dagli xerogel, dagli aerogel, dagli ibridi organici- inorganici o dalla deposizione di film sottili.

Gli xerogel, ottenuti dall'essiccazione del gel, presentano ancora un'elevata concentrazione di gruppi -OH sulla superficie dei pori.

La porosità degli xerogel può essere modificata mediante un successivo trattamento termico; temperature comprese tra i 500 e gli 800°C consentono di ottenere una densificazione dei pori, mentre per ottenere la loro completa eliminazione bisogna raggiungere valori molto più elevati (800- 1200°C). Un vetro di SiO₂ prodotto dalla densificazione di un gel di silice (polimerico) è del tutto equivalente in struttura e densità ad un vetro ottenuto per fusione e sinterizzazione di polveri. Il successo della tecnica sol-gel non risiede tanto nella possibilità di produrre i vetri massivi (infatti essa non si è mai sostituita al processo tradizionale di ottenimento del vetro nella produzione di vetro cavo o piano e di fibre di vetro, a causa dei lunghi tempi di essiccazione e del processo) quanto nella possibilità di ottenere rivestimenti più o meno spessi, polveri ed aerogel.

I gel, inoltre, possono essere essiccati in condizioni supercritiche in autoclave con conseguente produzione degli aerogel; al di sopra dei valori critici di temperatura e di pressione del liquido, ogni interfaccia liquido-vapore viene eliminata in quanto non vi è più nessuna distinzione tra fase liquida e quella di vapore.

La deposizione di film sottili, semplice e poco costosa costituisce l'aspetto tecnologicamente più importante della tecnologia sol-gel, che vede l'applicazione in diversi campi come rivestimenti con proprietà ottiche non-lineari, antiriflesso, passivanti, resistenti all'abrasione, conduttori o semiconduttori, porosi come supporto per catalizzatori.

Tra le possibilità più interessanti offerte dal metodo sol-gel vi è la sintesi di materiali ibridi organico-inorganici, in cui, grazie a tale metodologia, è possibile combinare a livello nanometrico componenti inorganiche (tipiche dei vetri tradizionali) e organiche (ad esempio pigmenti colorati di tipo organico, molecole bio-attive, polimeri). I materiali ibridi organico-inorganici sono una classe di materiali con proprietà intermedie tra i vetri ed i polimeri organici. Essi trovano applicazione in un'ampia gamma di sistemi e dispositivi allo stato solido di nuova generazione con caratteristiche

funzionali nanostrutturate, ma anche come rivestimenti protettivi su materie plastiche e, in generale, come rivestimenti funzionali spessi (spessori di parecchie decine di mm, non ottenibili con rivestimenti sol-gel inorganici). In particolare le proprietà funzionali possono essere ottenute modificando le caratteristiche della componente organica o variando la composizione anche del reticolo inorganico.

L'interesse scientifico e tecnologico per questi processi di sintesi è attualmente altissimo per le potenzialità che essi sembrano offrire nella preparazione di materiali funzionali, e richiede una conoscenza di base adeguata per il controllo dei prodotti e delle loro proprietà.

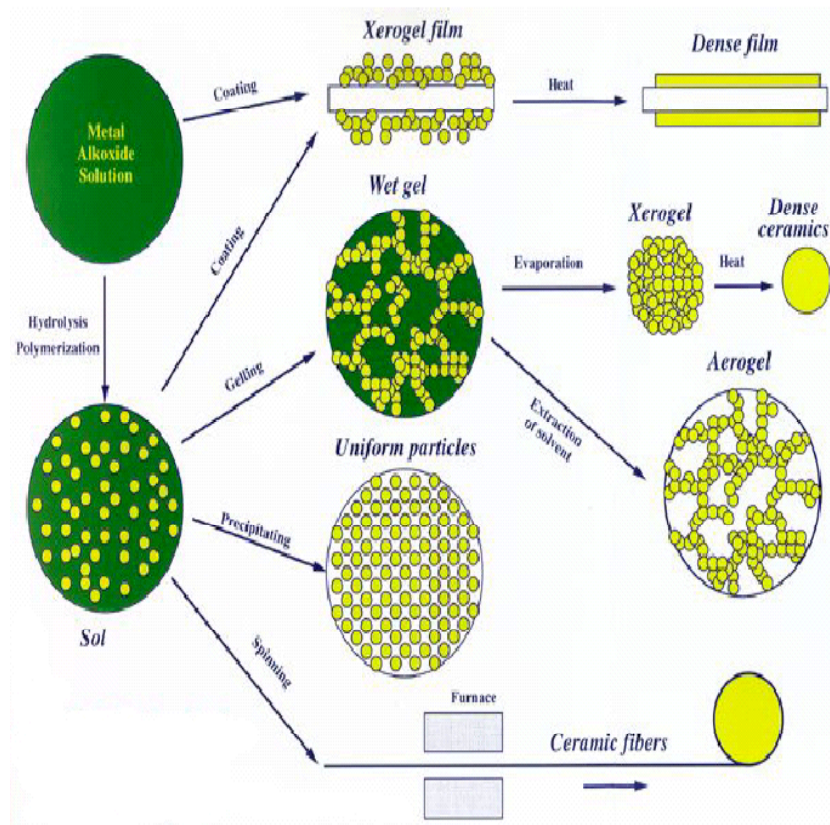


Figura 1.1 Descrizione del processo sol-gel ed dei prodotti ottenuti.

1.4 Immobilizzazione di biomolecole mediante processo sol-gel

L'importanza del processo di bioimmobilizzazione è facilmente intuibile dal momento che diversi processi commerciali come ad esempio la produzione di gliceridi, fosfolipidi, peptidi, aminoacidi, antibiotici e numerosi prodotti farmaceutici, sono correlati all'incapsulamento di molecole catalitiche. Allo stesso modo molti biosensori industriali, clinici ed ambientali, utilizzati per il monitoraggio di zuccheri, steroli, aminoacidi, pesticidi, tossine alimentari e patogeni, si basano sull'immobilizzazione di specifiche biomolecole.

I metodi convenzionali utilizzati sino ad ora per intrappolare le biomolecole all'interno di matrici inorganiche, organiche e polimeriche si sono basati sull'adsorbimento fisico (Vanderberg, et al, 1983), sulla formazione di legami covalenti con la superficie del sistema, sull'intrappolamento all'interno di membrane semipermeabili e la microincapsulazione in microsferi polimeriche ed hydrogel.

Tuttavia, le problematiche associate alle suddette metodiche sono numerose e di non facile risoluzione; i problemi più comuni sono dovuti a fenomeni di rilascio delle molecole, alla loro denaturazione e alla difficoltà nel controllarne l'orientamento.

Il metodo sol-gel, contrariamente alle precedenti tecniche tradizionali, consente di incapsulare in maniera semplice, generica e stabile un'ampia varietà di macromolecole all'interno delle matrici inorganica di natura silicea.

L'incapsulamento di biomolecole all'interno di matrici sol-gel offre numerosi vantaggi (Avnir et al, 1994) tra i quali vanno ricordati quelli legati alla possibilità di:

- ✓ controllare la dimensione e la distribuzione dei pori in modo da favorire la diffusione di ioni e/o di piccole molecole attraverso la matrice e di intrappolare nei pori le molecole dalle grandi dimensioni;
- ✓ ottenere dei vetri otticamente trasparenti, rendendoli così particolarmente idonei per lo sviluppo di sensori chimici e biochimici;
- ✓ non essere fotodegradabili;
- ✓ essere termicamente stabili oltre valori di temperatura che sono critici per le molecole organiche;
- ✓ permettere il controllo della conduttività attraverso la scelta del metallo o dell'alcossido metallico;

- ✓ modificare chimicamente il sistema mediante (1) la scelta di opportuni metalli e semimetalli, (2) l' inclusione di numerosi additivi polimerici e (3) di silicati organicamente modificati (Ormosils);
 - ✓ incrementare la stabilità delle molecole intrappolate in relazione ad una maggiore rigidità del reticolo;
 - ✓ prevenire il rilascio delle proteine;
- ottenere supporti dalle svariate forme quali, monoliti, films, fibre, polveri, etc...;

Recentemente, l' immobilizzazione delle proteine in matrice sol-gel rappresenta un modo interessante per studiare quale è l' effetto dovuto al "crowding molecolare" sulla struttura di una proteina.

1.5 Ibridi inorganici/organici di origine sol-gel

Nell' ultimo decennio, la chimica dei materiali ha rivolto gran parte del suo interesse nello sviluppo degli ibridi organico-inorganici. I materiali ibridi organico-inorganici possono essere considerati una nuova classe di materiali con proprietà intermedie tra quelle dei polimeri organici e degli ossidi vetrosi. Essi hanno cominciato ad essere studiati agli inizi degli anni ottanta, ma solo negli anni più recenti sono apparse sul mercato le prime applicazioni quali: rivestimenti protettivi di materiali plastici, rivestimenti antiappannamento, barriere alla diffusione di gas, materiali per lenti a contatto, ecc.; è soprattutto nel campo dei dispositivi fotonici come guida d'onda che si è osservato un enorme sviluppo di studi.

Il processo di ibridizzazione consiste nell' unione tra un materiale inorganico ed uno organico, in cui la dispersione tra i due avviene a livello molecolare. Oggigiorno la via più semplice per la sintesi di tali ibridi è rappresentata dal metodo sol-gel (Wen and Wilkes, 1996; Schubert et al, 1995) che consente un' efficace combinazione tra gli ossidi inorganici ed i polimeri organici, che possono essere sia di origine naturale che sintetica (Martinez et al, 2004; Gill, 2001). Gli ibridi, preparati sotto forma di monoliti, dischi o film e che generalmente mostrano delle proprietà chimico-fisiche diverse da quelle dei loro precursori, sembrano essere più facilmente tollerati dai sistemi biologici. Per questa ragione gli ibridi trovano un' importante applicazione nell'area biomedica, farmacologica e biosensoristica.

In base alla forza e al livello d' interazione tra la fase inorganica ed organica (Gao et al, 2001), gli ibridi vengono suddivisi in due differenti

classi. In particolare gli ibridi di classe I presentano una debole interazione di fase tra le due componenti che quindi saranno “legate” debolmente mediante i legami idrogeno o le forze di Van der Waals, mentre negli ibridi di classe II l’interazione tra la fase organica ed inorganica avviene attraverso la formazione di un legame chimico più forte, come il legame covalente. A tal proposito è bene ricordare che se da un lato il grado di separazione tra le due fasi influenza la possibilità di produrre degli ibridi con caratteristiche di trasparenza d’altro canto l’omogeneità ed il comportamento di fase del sistema stesso sono conseguenti all’interazioni esistenti all’interfaccia componente organico-inorganica (Chan et al, 2001).

Tuttavia, il metodo che generalmente viene utilizzato nel processo d’ibridizzazione prevede la formazione di legami idrogeno tra i gruppi polari del polimero ed i gruppi silanolo della silice. Recentemente, le interazioni ioniche tra le fasi organica ed inorganica sono state alla base della costruzione di ibridi nanometrici (Tamaki and Chujo, 1999); poiché le interazioni ioniche sono più forti dei legami idrogeno, queste determinano una maggiore omogeneità del sistema e quindi una struttura più ordinata dell’ibrido finale.

Le caratteristiche reticolari di un ibrido dipendono da diversi parametri come il grado di dispersione tra le due fasi, il contenuto relativo di materiale organico ed inorganico, la natura del catalizzatore, il rapporto acqua/ silice, il tempo di reazione, la temperatura di lavoro, la forza ionica del sol e il peso molecolare del polimero. Le proprietà più interessanti di questi materiali, in particolare laddove essi vengono utilizzati come catalizzatori, materiali di supporto o adsorbenti, è l’elevata area di superficie e il controllo della dimensione dei pori.

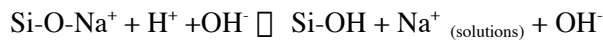
1.6 Biocompatibilità dei biovetri e dei materiali silicei

La principale caratteristica di un biovetro, illustrata per la prima volta da Hench nel 1971, risiede nella capacità di formare dei legami con i tessuti viventi. Questi legami sono conseguenti alla sintesi sulla loro superficie di un layer di apatite, aventi caratteristiche molto simili alla componente minerale dell'osso. La comparsa di questo strato di apatite è osservabile non solo in vivo ma anche in vitro quando i biovetri sono immersi in opportuni soluzioni quali una soluzione che simula il plasma umano, il buffer di Tris/HCl oppure una soluzione SBF (simulated body fluid).

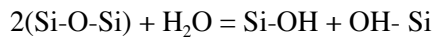
Gli studi in vitro permettono di prevedere quali sono gli effetti dovuti all'applicazione di un biomateriale all'interno di un sistema vivente, considerando le analogie esistenti tra la formazione del layer di HCA in vitro e la capacità di generare un tessuto osseo in vivo.

Questo strato, pertanto, può essere considerato come il risultato finale delle reazioni che hanno luogo quando un materiale bioattivo viene messo a contatto con un tessuto o quando viene immerso in una soluzione acquosa avente una composizione ionica simile a quella di un fluido fisiologico (Hench et al 1971; Kokubo et al, 1990; Zhong et al, 2000). Le reazioni che portano alla sintesi della del layer di HCA sulla superficie dei vetri biotivi, sono così riassunte:

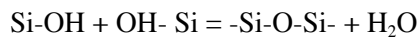
Stadio 1: Rapido scambio tra i cationi alcalini (Na^+ o Ca^{2+}) della matrice vetrosa e gli ioni H_3O^+ della soluzione considerata.



Stadio 2: La rottura del network siliceo (legami Si- O- Si) ed il rilascio nella soluzione dei silicati solubili, sotto forma di $\text{Si}(\text{OH})_4$, determina la formazione dei gruppi Si-OH all' interfaccia superficie vetrosa -soluzione.



Stadio 3: La reazione di polimerizzazione dei silanoli comporta la formazione sulla superficie vetrosa di un layer idratato, ricco in SiO_2 .



Questo layer ricco in silice ha la capacità di attrarre molto facilmente le molecole di natura organica, quali proteine, mucopolisaccaridi e collagene, che a loro volta facilitano la sintesi dello strato di HCA.

Stadio 4: Migrazione degli ioni calcio e fosfato sulla superficie vetrosa attraverso lo strato di SiO_2 con conseguente formazione di un film ricco di CaO - P_2O_5 - sul top di silice SiO_2 , seguito dalla crescita di uno strato amorfo di CaP.

Stadio 5: Cristallizzazione dello strato amorfo (CaP) ed incorporazione degli anioni OH^- e CO_3^{2-} che migrando dalla soluzione contribuiscono alla formazione dello strato di HCA.

Il meccanismo che regola il processo di nucleazione e la crescita di questa formazione calcica non è ancora stato del tutto chiarito, sebbene siano state proposte diverse ipotesi. L' induzione dello strato di HCA potrebbe essere correlato i) alla contemporanea presenza sulla superficie del gel bioattivo di ioni idrossilici e di cariche negative oppure ii) all' elevata concentrazione di gruppi silanolo (Si-OH) sulla superficie silicea, la cui disposizione consentirebbe di ottenere le distanze atomiche richieste per la sintesi della struttura cristallina del HCA.

La letteratura scientifica è ricca di lavori che definiscono quali sono i metodi da utilizzare per valutare la bioattività di un biovetro in vitro. Generalmente lo studio di bioattività di un sistema prevede l' utilizzo di alcune soluzioni, nonché l' utilizzo di saggi differenziali statici o dinamici (Ramila and Vallet-Regi, 2001). Gran parte di questi test utilizza come marker qualitativo della bioattività il tasso di formazione del layer di HCA, il quale è strettamente correlato con la composizione chimica del materiale stesso.

Diversi studi dimostrano che la bioattività del sistema è incrementata dall' incorporazione nel network siliceo di alcune molecole inorganiche (quali ad esempio l' ossido di sodio e di calcio) (Ogino et al, 1980; Wallace et al, 1999), sebbene la formazione dello strato di idrossicarbonato di apatite sia stata osservata anche sulla superficie delle sole matrici silicee quando vengono immerse in determinate soluzioni elettrolitiche (Peltola et al, 1999; Cho et al, 1996; Li et al, 1992).

Capitolo 2

I polimeri

2.1 Caratteristiche generali dei polimeri

Un *polimero* (dal greco molte parti) è una macromolecola, ovvero una molecola dall'elevato peso molecolare, costituita da un gran numero di piccole molecole (i monomeri) uguali o diverse (copolimeri) unite a catena mediante la ripetizione dello stesso tipo di legame. Le proprietà fisiche e reologiche del polimero, nonché le sue possibili applicazioni dipendono dal grado di polimerizzazione. Questo indica il numero di monomeri che costituiscono il polimero e può essere:

- basso (al di sotto di 100 monomeri)
- medio (tra 100 e 1000 monomeri)
- alto (oltre i 1000 monomeri)

I polimeri sono delle macromolecole con caratteristiche del tutto particolari, non esclusivamente correlate alle dimensioni bensì al concorrere di tre proprietà uniche che sono attribuite solo alle molecole giganti.

- ✓ *reticolazione*: la maggior parte dei polimeri sono polimeri lineari, cioè molecole in cui gli atomi sono uniti in una lunga catena. Generalmente questa catena non è rigida e dritta, ma è flessibile. Le catene ruotano e si piegano, torcendosi e avvolgendosi una intorno all'altra, in modo che tutte le molecole di polimero formino una enorme massa aggrovigliata. Quando un polimero viene fuso, le catene assomigliano ad un piatto di spaghetti aggrovigliati; se si cerca di prenderne uno, viene via senza problemi, ma la rimozione di una singola catena risulta estremamente difficile quando i polimeri si trovano a temperatura ambiente. Questa è la ragione che rende particolarmente resistenti alcune plastiche, vernice, elastomeri, e compositi.
- ✓ *somma delle forze intermolecolari*: tutte le molecole, sia quelle piccole che i polimeri, interagiscono una con l'altra, attraendosi grazie a forze elettrostatiche. Alcune molecole vengono attratte più di altre. Le molecole polari si uniscono insieme meglio di quelle non polari. Ad esempio, l'acido solfidrico ha una struttura simile a quella dell'acqua ed ha un peso molecolare maggiore dell'acqua (32 contro 16), eppure l'acido

solfidrico è un gas e l'acqua è liquida. Questo perché l'acqua è molto polare, tanto da formare legami idrogeno intermolecolari che permettono alle molecole di rimanere in fase liquida; al contrario, l'acido solfidrico non è sufficientemente polare da permettere alle sue molecole di attrarsi reciprocamente.

Le forze intermolecolari influenzano i polimeri proprio come le piccole molecole. Nei polimeri queste forze sono altamente combinate. Più è grande la molecola più è facile che si presentino forze intermolecolari. Anche le deboli forze di Van der Waals, possono contribuire a legare molto saldamente le diverse catene polimeriche; questa è un'altra ragione per cui i polimeri possono essere materiali molto resistenti. Il polietilene, ad esempio, è altamente non polare, ha solo le forze di Van der Waals ma è talmente resistente che viene utilizzato anche per produrre giubbotti antiproiettile.

- ✓ *micromoto browniano*: i polimeri si muovono molto più lentamente di quanto si muovano le piccole molecole. Un gruppo di piccole molecole si può muovere avanti e indietro molto più velocemente e in modo molto più disordinato quando le molecole non sono legate una all'altra; viceversa, quando le molecole sono unite in una enorme molecola, rallenteranno il loro movimento. Questa bassa velocità di movimento, detta micromoto browniano, fa sì che le loro soluzioni siano molto più viscosi del solvente puro. La misurazione di questo cambio di viscosità viene utilizzata per stimare il peso molecolare del polimero.

Il micromoto-Browniano (o vibrazione termica), si presenta a determinati intervalli di temperatura e permette alle molecole che compongono un polimero di formare fessure (micropori). Per esempio, in un indumento polimerico, queste fessure sono attivate con l'aumentare della temperatura esterna o, a basse temperature, quando la temperatura dell'indumento aumenta dopo un esercizio faticoso. Le molecole del vapore acqueo attraversano le intercapedini e sono espulse alla parte esterna.

2.2 La diffusione nei gel

I gel possono essere considerati come strutture disordinate riempite da una componente liquida. Le sostanze solubili nel componente liquido si distribuiscono nel gel per diffusione attraverso i micropori. La velocità di diffusione attraverso il gel sarà determinata oltre che dai fattori che determinano la diffusione nelle soluzioni semplici, anche dai fattori legati alla presenza del reticolo.

La velocità di diffusione è data dalla legge di Fick:

$$\frac{dm}{dt} = -DA \frac{dc}{dx}$$

dove:

D = coefficiente di diffusione, dipende dalla natura dei partecipanti al processo e dalla temperatura

A = area della sezione interessata al processo diffusivo.

Un fenomeno interessante è il cosiddetto "effetto setaccio": gli ioni e le molecole di piccole dimensioni diffondono attraverso i gel con velocità praticamente uguale a quella che hanno nelle soluzioni. D'altra parte, all'aumentare delle dimensioni molecolari, queste si avvicinano alla dimensione delle maglie che formano l'intelaiatura reticolare e così la diffusione, legata al micromoto browniano, viene ostacolata e cessa del tutto quando le molecole hanno dimensioni superiori a quella delle maglie. Questo fenomeno viene utilizzato per separare composti a diversa dimensione molecolare.

2.3 Interazioni tra polimeri

Quando sciogliamo un polimero in un solvente il loro moto molto lento rende l'intera soluzione molto più viscosa, infatti i polimeri ostacolano lo scorrere delle molecole di solvente. Tutta la soluzione quindi si muove lentamente e diventa più viscosa. In realtà, le molecole di polimero fanno qualcosa di più che ostacolare il movimento delle piccole molecole: le rallentano anche attraverso le forze intermolecolari. Se si verificano significative interazioni secondarie tra il polimero e le molecole del solvente,

le piccole molecole di solvente possono rimanere legate al polimero. In questo caso, esse si muovono più o meno insieme al polimero e, naturalmente, alla sua stessa bassa velocità.

A seconda la quantità di polimero disciolto, la soluzione può essere diluita o concentrata.

Le **figure 2.1 e 2.2** mostrano le variazioni legate all'aumento di concentrazione.

La **figura 2.1** evidenzia l'assenza di interazioni tra catene ramificate sciolte in soluzioni diluite. Persino quando la soluzione è altamente viscosa, le catene ramificate si comportano come delle uniche entità che si muovono liberamente attraverso le molecole di solvente, senza esercitare forze di ogni tipo l'una sull'altra. Conseguentemente, nessun legame può essere stabilito tra di loro in quanto le interazioni sono praticamente inesistenti.

Nelle soluzioni concentrate, come schematizzato dalla **figura. 2.2** la situazione è differente. All'aumentare della concentrazione, le molecole sono costrette ad avvicinarsi e l'interazione tra di loro inizia a notarsi. La somma delle forze intermolecolari diventa un fattore chiave. La viscosità aumenta drasticamente e la soluzione inizia a mostrare una transizione da soluzione concentrata a gel; le catene ramificate, in alcuni punti, creano dei legami generando un'unico grande gomito (*coil*) reticolato, chiamato gel macroscopico.

Le catene ramificate si legano in due modi: attraverso interazioni secondarie (valenza secondaria del gel, *secondary valence gels*) e attraverso legami covalenti (gel covalente, *covalent gels*).

Nei gel di valenza secondaria le interazioni secondarie sono reversibili. Queste possono svilupparsi tra catene ramificate differenti (legami intermolecolari) oppure all'interno di una singola catena (forze intramolecolari) (**figura 2.3 e figura 2.4**)



Figura 2.1 Mancano le interazioni e le molecole sono separate tra loro



Figura 2.2 Le interazioni tra le molecole fanno sì che si formi un insieme unico

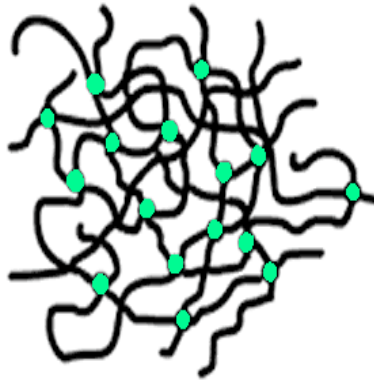


Figura 2.3 é illustrata una catena ramificata in cui sono presenti i soli legami intramolecolari.

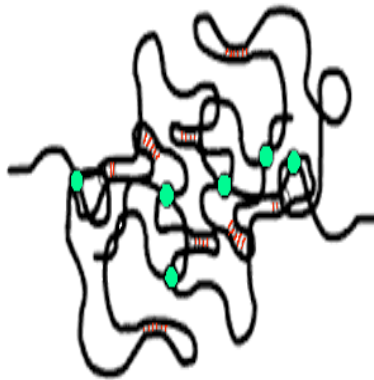


Figura 2.4 sono illustrate le forze intra ed intermolecolari tra due catene. Le forze intermolecolari sono rappresentate come cerchi ben definiti.

Normalmente la formazione di un gel di valenza secondaria dipende da due fattori: l'intensità delle forze intermolecolari, che misura la tendenza del polimero a stabilire legami non covalenti, e la qualità del solvente.

I polimeri naturali che formano gel attraverso legami secondari sono ad esempio la pectina, l'agar, e l'amido. Questa è la ragione per cui vengono usati nell'industria come addensanti. Il PVC, pur non essendo un polimero naturale può in, presenza di un solvente "adatto", formare un gel di valenza secondaria. Dalla combinazione del PVC con i liquidi detti plastificanti (come ad esempio gli ftalati) si genera un gel termo-reversibile, chiamato comunemente "PVC elasticizzato".

Il *gel covalente*: il gel di valenza secondaria può essere rotto senza difficoltà, ma non esiste nessun solvente così energico da causare la rottura dei legami covalenti. La loro resistenza al calore (termoindurenti reticolati), ultimamente ha generato un crescente interesse nello sviluppo degli elastomer plastici.

Il gel covalente può essere ottenuto semplicemente facendo aumentare di volume un polimero precedentemente reticolato, scegliendo un solvente appropriato.

2.4 Le caratteristiche dei gel

Le differenti proprietà mostrate dal gel, dipendono dal loro grado di reticolazione e questo porta alla necessità di misurare tale proprietà. Come con i solidi polimerici, le proprietà meccaniche di un gel possono essere valutate in base al tipo di reticolazione. Se i gel non fossero abbastanza elastici, essi si romperebbero prima di riuscire a misurare alcuni parametri come la resistenza alla trazione, l'allungamento e il modulo di elasticità, o mostrebbero una deformazione permanente che renderebbe difficile la valutazione quantitativa delle proprietà meccaniche.

Un altro parametro caratteristico dei gel è la loro capacità di aumentare il volume. In senso fisico, la capacità di aumentare il volume dà un'indicazione della quantità di solvente trattenuta dal gel. Matematicamente è una relazione tra il peso (o il volume) occupato dal gel rigonfiato, $W(s)$, e il peso (o volume) occupato dal corrispondente gel asciutto, $W(d)$.

Se si considerano i pesi, il rapporto di rigonfiamento all'equilibrio, q_w , è dato da:

$$q_w = \frac{W_s}{W_d}$$

Se vengono considerati i volumi, il rapporto di rigonfiamento all'equilibrio, q_v , è dato da:

$$q_v = \frac{V_s}{V_d}$$

La percentuale di rigonfiamento, %SD, è data da:

$$\%SD = \frac{W_s - W_d}{W_d} \cdot 100$$

La capacità di aumentare il proprio volume dipende essenzialmente dalla natura del solvente e della catena del polimero, e nei polielettroliti (come i poliacrilici acidi) dipende anche dal grado di dissociazione. Tuttavia, non è detto che un gel morbido abbia un' elevata capacità di aumentare il proprio volume. Molte volte, proprio le catene polimeriche a basso peso molecolare mostrano una scarsa capacità ad aumentare il proprio volume.

2.5 Tipologie di gel

I gel che presentano un'ottima capacità nell' assorbire acqua o i solventi acquosi (tipicamente fino al 20% del loro peso), vengono chiamati idrogel.

Esistono molti tipi di idrogel: ci sono quelli porosi e non porosi. Gli idrogel macro-porosi, che si seccano e si rigonfiano senza subire significativi cambiamenti nella loro struttura macroscopica, sono conosciuti come aerogel. D'altro canto, gli idrogel secchi non porosi aventi la capacità di assorbire acqua rigonfiandosi sono chiamati xerogel.

Mentre i gel in generale sono ampiamente usati per un numero di diverse applicazioni, è comprensibile che l'interesse per gli idrogel stia crescendo costantemente, in relazione ad un loro utilizzo come biomateriali.

Dalle lenti a contatto ai sistemi transdermici per il rilascio controllato di farmaci, le aree di applicazioni sono sempre più vaste, specialmente grazie alla disponibilità dei gel “intelligenti”. Intelligenti perché il loro aumento di volume può essere collegato a cambiamenti legati a fattori ambientali come temperatura, pH, solventi, forza ionica, intensità della luce, pressione, onde ultrasoniche e campi elettrici e magnetici. Variando la temperatura di solo 1°C, è possibile provocare un aumento di volume del gel di centinaia di volte il suo peso, o al contrario lo si può far collassare.

Sin dalla loro scoperta nel 1975, i gel intelligenti sono stati testati in un numero di prodotti differenti. Le suole delle scarpe in gel sono così comode perché sono usati gel viscoelastici che sono morbidi alla temperatura ambiente, ma diventano duri quando entrano in contatto con il corpo umano, reagendo al variare della temperatura.

Gli idrogel possiedono la capacità di cambiare le loro proprietà e l'aderenza al tessuto biologico. Questa caratteristica li rende particolarmente utili nella preparazione di prodotti farmaceutici, come gocce per gli occhi o per il naso e creme per il sole. Le creme solari convenzionali, generalmente untuose, possiedono una scarsa efficacia in quanto vengono immediatamente assorbite dalla pelle. Gli idrogel, “caricati” con gli agenti bioattivi, grazie alla loro natura acquosa aderiscono sulla pelle molto più a lungo.

Gli idrogel giocano un ruolo chiave nelle nuove scoperte biotecnologiche.

Il gel chimico non è circoscritto alle sole molecole organiche; esistono, infatti molti gel inorganici, derivanti da polimeri inorganici, quali il silicone e i polisilani. Un altro importante ramo del gel chimico è il sol-gel chimico..

2.6 Il chitosano

Il chitosano è un polisaccaride lineare ottenuto dalla deacetilazione alcalina della chitina. Quest'ultima, che dopo la cellulosa, è il biopolimero più abbondante in natura (Muzzarelli,1973), sebbene sia presente nella parete cellulare di funghi e di alcuni batteri, viene ricavata principalmente dall' esoscheletro dei crostacei (in particolare di gamberi e granchi).

Il chitosano, da un punto di vista chimico non è altro che un omopolimero lineare costituito da unità di β -(1,4) 2-ammino-2-deossi-D glucosio (D - glucosammina), avente configurazione tridimensionale ad α - elica e stabilizzata da legami idrogeno intramolecolari (**figura 2.5**).

Attualmente, questo polimero cationico, trova una vasta applicazione nell'industria farmaceutica, cosmetica, alimentare, in relazione ad alcune sue proprietà intrinseche, quali la non tossicità, la biodegradabilità, la biocompatibilità e la bioattività. Queste sue diverse caratteristiche lo rendono idoneo nel campo delle applicazioni biomediche (Berger et al., 2004) quale biomateriale, (Francio and Matthew, 2000), materiale di supporto per l'immobilizzazione di enzimi e cellule, per la sintesi di alcuni dispositivi oculari (Felt et al, 1999), materiali di impianto e di iniezione (Patashnik et al., 1997; Song et al., 2001). Nell'ambito dell'industria farmaceutiche è per lo più utilizzato come elemento veicolante nella preparazione delle compresse, come agente granulante o come carrier nella sintesi di sistemi per il rilascio controllato di farmaci, quali antibiotici, chemioterapici, vaccini e proteine (Shi X. et al., 2002; Kristl et al., 1993; Chandy et al., 2000).

Ultimamente, questo polimero cationico viene studiato come materiale per la sintesi di membrane per l'ultrafiltrazione, osmosi in fase inversa, e come selettore chinale nella cromatografia liquida (Chanachai et al., 2000; Rashidova et al., 2004).

I principali parametri che influenzano le caratteristiche del chitosano sono il peso molecolare (MW) ed il grado di deacetilazione (DD) il quale indica il contenuto percentuale di gruppi amminici primari presenti nel glucosamminoglicano dopo il processo di N- deacetilazione della chitina. Al termine del processo di deacetilazione della chitina, il chitosano si presenta come una poliammina lineare, in cui i gruppi amminici sono predisposti a reazioni chimiche, in particolare con solventi acidi, organici ed inorganici. Alcune proprietà importanti del chitosano quali la reattività, la solubilità in ambiente acido, e la capacità di chelazione nei confronti degli ioni metallici aumentano in presenza di un elevato grado di deacetilazione (Wang et al, 2004).

Sebbene il chitosano possieda un grado di deacetilazione variabile, in genere le unità deacetilate del prodotto reperibile in commercio rappresentano circa il 70 - 80 % del totale. Questo biopolimero idrofilico, insolubile a pH neutro/ alcalino ed in alcuni solventi organici, può essere disciolto in soluzioni acide diluite. Il parametro che facilmente spiega questo effetto è il valore di pK_a relativo ai gruppi amminici del chitosano, al quale è correlato il grado di protonazione del chitosano stesso (Beppu and Santana 2002). Poiché il pK_a del gruppo amminico oscilla tra 6.3-7.0, a pH acidi si ha la protonazione dei gruppi amminici del polimero ed il polisaccaride, carico positivamente, si salifica con l'acido utilizzato,(per lo più si utilizzano

i seguenti acidi: a. glutammico, a. cloridrico, a. lattico o a. acetico). I sali ottenuti, pur essendo tutti solubili in acqua, presentano un diverso grado di solubilizzazione, in relazione al grado di deacetilazione e al pH della soluzione stessa. Il chitosano con un basso grado di deacetilazione, ossia intorno al 40%, è solubile a valori di pH inferiori a 9, mentre laddove si è in presenza di un grado di deacetilazione più elevato, intorno all'85%, la solubilizzazione avviene a pH inferiori a 6.0.

Il grado di deacetilazione può influenzare anche la viscosità di una soluzione di chitosano, in quanto ne determina la conformazione: un elevato grado di deacetilazione, in cui le molecole sono estremamente cariche, conferisce al polimero una conformazione allungata e quindi molto flessibile, con conseguente incremento della viscosità; un minore grado di deacetilazione, determina una diminuzione della viscosità, poiché le molecole, che sono meno cariche, assumono una conformazione a "bastone" o attorcigliata

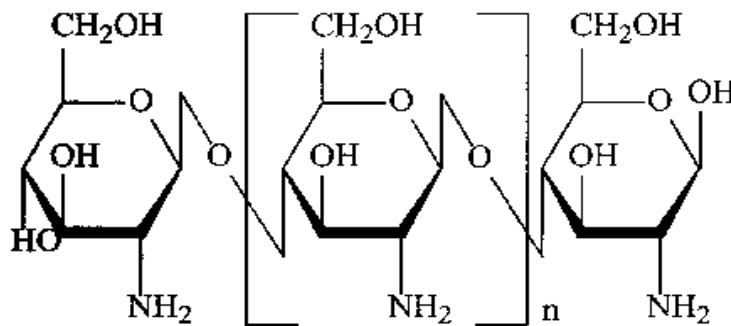


Figura 2.5 Struttura del chitosano

Capitolo 3

Il citocromo c

3.1 La struttura

I citocromi, caratterizzati per la prima volta dal biochimico inglese David Keilin, rappresentano un' importante gruppo di proteine redox di colore rosso-bruno, coinvolte nel processo di respirazione cellulare. Nella catena respiratoria il citocromo c è situato nella membrana interna dei mitocondri, centrali energetiche di tutte le cellule eucariotiche. Il citocromo c mitocondriale eucariotico può essere separato dalla membrana interna dei mitocondri mediante un blando trattamento; l' elevata idrofilicità e stabilità ne hanno permesso sia la purificazione sia la cristallizzazione.

Il citocromo c estratto dal cuore di cavallo è una piccola proteina emica a singola dominio, costituita da 104 residui aminoacidici e con un P.M. di circa 12500 Da (Margoliash and Shejter, 1966). Gran parte della catena principale del citocromo c presenta un livello di organizzazione strutturale ad α -elica. In particolare si possono riconoscere cinque elementi elicoidali (tratti 6-14, 49-54, 60-69, 70-75, 87-102) (Bushnell G.W. et al., 1990), in cui i maggiori sono i segmenti N-terminale, C-terminale, e l'elica 60 s; non è presente un apprezzabile struttura β .

La sua struttura tridimensionale, ormai ben definita, mostra una catena decisamente aggrovigliata intorno all'eme (**figura 3.1**). L' avvolgimento della catena polipeptidica è così schematizzabile: i residui dall' 1 al 47 sono disposti sul lato dell' eme legato all' His-18; i residui dal 48 al 91 sono sul lato opposto dove esiste il legame tra ferro-eme e Met-80; i residui dal 92 al 104 sono invece disposti dietro al gruppo eme.

La molecola è sferica, con un diametro di circa 3.4 nm (Takano and Dicherson, 1981).

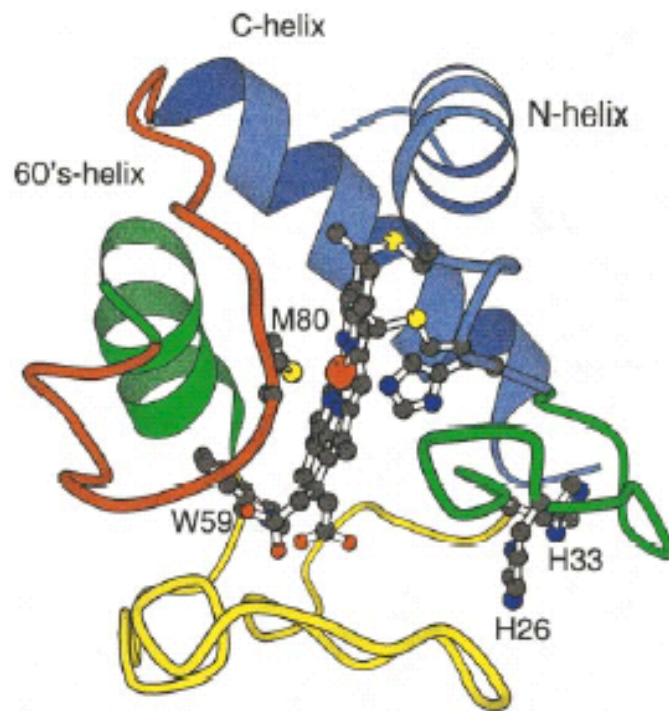


Figura 3.1 Struttura del citocromo c del cuore di cavallo

Nella sequenza amminoacidica dei citocromi *c* provenienti da vari organismi sono presenti in prevalenza residui amminoacidici basici, per cui la proteina ha un punto isoelettrico basico (p.I.>10).

Il sito attivo della proteina, comune a tutte le molecole di citocromo *c* e ad altre molecole proteiche, è il gruppo eme, o gruppo prostetico, costituito da un anello porfirinico, (la protoporfirina IX) a cui è coordinato un atomo di ferro. Le porfirine sono gruppi organici tetrapirrolici ciclici costituiti da quattro anelli pirrolici uniti tra loro da ponti metinici (=CH-). La protoporfirina IX è una porfirina sostituita nelle posizioni 1, 3, 5 e 8 con gruppi metilici (-CH₃), nelle posizioni 2 e 4 con gruppi vinilici (-CH=CH₂) e nelle posizioni 6 e 7 con gruppi proponici (-CH₂-CH₂-COOH). Quando è legata ad un atomo di ferro (inserito al centro della molecola) viene chiamata ferroprotoporfirina IX o gruppo eme (**figura 3.2**).

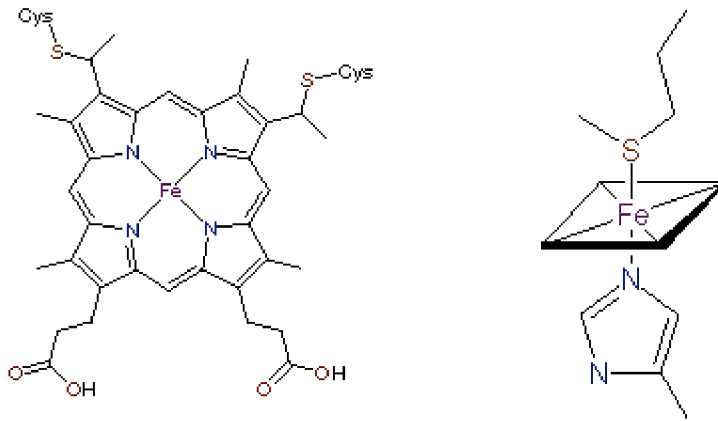


Figura 3.2 Struttura dell'eme ed i suoi legami con la catena proteica del citocromo *c* del cuore di cavallo.

Gli elettroni esterni all'anello porfirinico sono delocalizzati e quindi liberi di vagare da un centro atomico ad un altro; lo stesso atomo di ferro è parte di questo sistema ad elettroni delocalizzati. All'interno della proteina, la porfirina non è planare perché gli anelli pirrolici sono piegati ed inclinati rispetto al piano della porfirina stessa, in modo da far assumere a questa un aspetto simile ad una sella (Margoliash and Scheijter, 1966; Hobbs and Shelmett, 1995). Nella forma ossidata la struttura appare però più distesa (in particolare, il terzo anello, legato covalentemente alla Cys-17, risulta meno inclinato).

L'eme, posto in un solco della molecola perpendicolare alla superficie, è avvolto dalla catena polipeptidica e rigidamente vincolato all'interno della matrice proteica da diversi tipi di legami in modo da non poter entrare in contatto con il mezzo acquoso, generalmente si assume che la superficie dell'eme esposta al solvente sia inferiore al 7% (Stellwagen, 1968; Bushnell et al., 1990).

Il gruppo prostetico della protoporfirina IX è legato covalentemente alla componente proteica mediante i legami tioetere tra due delle catene viniliche laterali dell'eme e i residui di cisteina Cys 14 e Cys 17, e da due legami di coordinazione tra l'atomo di ferro e un atomo di azoto di un residuo istidinico (His-18) ed uno di zolfo di un residuo metioninico (Met-80). La configurazione dell'atomo di ferro è quindi ottaedrica (figura 3.2).

Il gruppo eme è situato in una tasca risultante dal ripiegamento della globina ed ha un solo bordo, molto ristretto, a contatto con l'esterno, lungo il quale avviene, molto probabilmente, il trasferimento di elettroni. Questa ipotesi è supportata dal fatto che l'eme del citocromo c, al contrario di quello dell'emoglobina, è ruotato di 90°, per cui un gruppo propionico si trova proprio sotto la superficie della molecola mentre l'altro è immerso in profondità. Tuttavia per includere un gruppo polare nell'ambiente interno idrofobico, la molecola paga un prezzo in energia, attraverso la formazione di un legame idrogeno tra il gruppo propionico e le catene laterali di due residui, la Tyr-48 ed il Trp-59. Questa situazione, scomoda ed energeticamente costosa, probabilmente risulta necessaria per ottenere un flusso di elettroni adeguato sia all'interno che all'esterno della superficie esposta all'eme. Infatti, se i due gruppi propionici sporgessero dalla superficie potrebbero impedire, o comunque ostacolare, il contatto tra il citocromo c e le macromolecole con cui esso interagisce. I tredici residui che contribuiscono alla formazione della tasca dell'eme presentano gruppi idrofobici; di questi, sei sono invarianti nei citocromi c della diverse specie. Questi gruppi idrofobici contribuiscono alla stabilizzazione della

macromolecola e controllano il potenziale di ossidoriduzione. Un ulteriore fattore di stabilizzazione della macromolecola è da attribuirsi ai numerosi legami idrogeno. L'eme, dunque, si dispone in modo tale da esporre solo una parte molto piccola della sua superficie, costituita da gruppi non polari.

Sulla superficie della molecola del citocromo c sono presenti 19 lisine, raggruppate in due regioni che risultano cariche positivamente a pH fisiologico (Bushnell et al., 1990) e separate tra loro da una regione carica negativamente. La disposizione delle cariche sulla superficie molecolare ha un ruolo fondamentale nel processo di riconoscimento che avviene tra macromolecole biologiche (Staudenmayer et al., 1977; Ferguson-Miller et al., 1978; Pettigrew, 1978; Speck et al., 1979; König et al., 1980). Nel citocromo c la separazione di carica permette l'interazione tra la macromolecola e i complessi molto voluminosi con i quali reagisce: la citocromo c-riduttasi e la citocromo c-ossidasi.

Sulla superficie della proteina è localizzata la maggior parte dei gruppi carichi, in particolare i residui di lisina sono raggruppati principalmente intorno al bordo esposto dell'eme, dove svolgono un ruolo fondamentale nel processo di riconoscimento con le proteine partner (Dickerson et al., 1971; Salemme et al., 1973; Koppenol and Margoliash, 1982). Tuttavia, circa il 55% della superficie molecolare è formata da residui idrofobici. Per esempio, la parte anteriore della molecola contiene il margine dell'eme e le catene laterali dei residui Val11, Val28, Tyr46, Ile81, e Phe82 (Stellwagen, 1978).

L'interazione del citocromo c con il complesso enzimatico della citocromo c ossidasi è essenzialmente di natura elettrostatica ed interessa gruppi superficiali, carichi positivamente nel citocromo c e negativamente nella ossidasi. L'importanza delle lisine presenti sulla superficie del citocromo c, praticamente tutte coinvolte nel legame con la citocromo c-ossidasi, è sottolineata dalla osservazione che è sufficiente bloccare la sola Lys-13 perché si dimezzi la reattività del citocromo c. Bloccare chimicamente tale residuo equivale a bloccare fisicamente la parte superiore della fessura dell'eme, che insieme al canale destro, costituisce la superficie che si lega alla ossidasi. La zona carica positivamente, situata invece sul lato sinistro, rappresenta il sito di legame con la reduttasi, un'altra molecola partner nello scambio elettronico.

Il gruppo prostetico è essenziale per la funzione biologica del citocromo c. Infatti è grazie al cambiamento dello stato di ossidazione dell'atomo di ferro legato all'eme che può avvenire il trasferimento di elettroni con la citocromo c reduttasi e la citocromo c ossidasi. L'eme è situato in una tasca

idrofobica ed ha un solo margine a contatto con il mezzo esterno: è attraverso questa piccola superficie che avviene il trasferimento di elettroni. Per favorire questo flusso, entrambi i gruppi propionici sono inseriti all'interno della proteina, anche se ciò determina una situazione energeticamente sfavorevole: si ha, infatti, la formazione di un legame idrogeno fra il gruppo propionico in posizione 7 e le catene laterali dei residui Tyr48 e Trp59.

3.2 Analisi delle sequenze e omologia dei citocromi di tipo c

Dall'analisi delle sequenze di sette sotto-famiglie di citocromi di tipo c (in tutto 164 sequenze di citocromi c e c₁ mitocondriali, di citocromi c₆ e c_f di cloroplasti e di citocromi batterici c₂, c₅₅₀, c₅₅₁), si è osservato che solo 7 sono le posizioni conservate (Ptitsyn, 1998):

- ✓ la posizione 6 è occupata da una glicina in 142 sequenze delle 164 analizzate, cioè nell'88% delle sequenze; è presente in tutte le famiglie tranne che nel citocromo c_f;
- ✓ la posizione 10 è occupata da un residuo di fenilalanina in sei famiglie (tutte tranne il citocromo c₁, dove è sostituita da un residuo di tirosina). I due residui insieme occupano in totale questa posizione in 155 sequenze su 164, cioè nel 95% dei casi;
- ✓ la posizione 14 è occupata da una cisteina in 159 sequenze (il 97% dei casi);
- ✓ la posizione 17 è occupata da una cisteina in tutte le 164 sequenze;
- ✓ la posizione 18 è occupata da una istidina in tutte le 164 sequenze
- ✓ la posizione 94 è occupata da una leucina in tre famiglie, da una valina in altre tre famiglie e da una fenilalanina nella restante famiglia. Questi tre residui occupano la posizione 94 nel 91% delle sequenze analizzate;
- ✓ la posizione 97 è occupata principalmente da una tirosina in quattro famiglie, da un triptofano in due famiglie e da una fenilalanina nell'ultima famiglia. In totale questi tre residui aromatici occupano la posizione 97 in tutte le sequenze analizzate.

Tre di queste posizioni (Cys14, Cys17 e His18) legano l'eme mediante legami covalenti (i due residui cisteinici) o di coordinazione (l'istidina); di conseguenza la loro conservazione ha un'origine di tipo funzionale. Gli altri quattro residui invariati non legano l'eme ed appartengono alle due eliche N- e C-terminali posizionate perpendicolarmente l'una all'altra. Questi

residui si trovano nell'interfaccia tra esse. In questo modo si forma una rete di contatti che collegano il tratto di residui 6-10 dell' α elica N-terminale con il tratto di residui 94-97 dell'elica C-terminale (Ptitsyn, 1998).

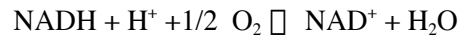
I citocromi sono soggetti agli stessi eventi di maturazione co-traduzionali a cui vanno incontro tutte le proteine sintetizzate nel citosol, incluso il taglio della metionina N-terminale e l'acetilazione del residuo N-terminale. Questi meccanismi co-traduzionali dipendono dalle sequenze primarie N-terminali dei citocromi e sono conservati nelle diverse specie come dimostra il fatto che nel lievito i citocromi espressi dei vertebrati sono (parzialmente) acetilati, anche se quelli nativi del lievito non lo sono.

3.3 Funzione

La fosforilazione ossidativa è l'ultimo stadio del catabolismo cellulare. Durante il processo, viene rilasciata la maggior parte dell'energia metabolica, molecole di NADH e FADH₂ trasferiscono gli elettroni, ricevuti dall'ossidazione di molecole nutritive) all'ossigeno molecolare con formazione di H₂O. Formalmente, la reazione è equivalente alla combustione di idrogeno all'aria in cui, insieme alla formazione di acqua, viene rilasciata una grande quantità di energia chimica. Parte di questa energia viene usata per produrre la maggior parte dell'ATP della cellula, mentre la rimanente viene liberata sotto forma di calore. Gli elettroni passano dal NADH e dal FADH₂ lungo una catena di trasporto di elettroni. Nelle cellule eucariotiche questa serie di trasferimenti elettronici avviene sulla membrana interna dei mitocondri, in cui sono immerse tutte le molecole trasportatrici di elettroni. Tali trasferimenti di carica negativa, inducono il passaggio di protoni attraverso la membrana, dal compartimento interno dei mitocondri a quello esterno. Si genera così un gradiente elettrochimico di protoni attraverso la membrana mitocondriale interna. Questo gradiente spinge a sua volta un flusso di protoni nel senso opposto per mezzo di uno speciale complesso enzimatico presente nella stessa membrana, facendo sì che l'enzima ATP sintasi generi un ATP all'interno del mitocondrio (**figura 3.3**). L'ATP di nuova formazione viene poi trasferito dai mitocondri al resto della cellula.

L'ossidazione di NADH o FADH₂ avviene attraverso tre complessi transmembrana (NADH-Q reduttasi, citocromo reduttasi e citocromo c ossidasi) che, modulando il trasferimento di protoni al di fuori della matrice, generano un potenziale di membrana. Il citocromo funziona da navetta (shuttle) nel ciclo terminale delle catene respiratoria. L'ubichinone trasporta

inizialmente gli elettroni dalla NADH-Q reduttasi alla citocromo c reduttasi; il citocromo c riceve gli elettroni da questo complesso trasferendoli a sua volta al complesso enzimatico citocromo c-ossidasi, che li utilizzerà (insieme ai protoni ricevuti dalla soluzione) per la riduzione dell'ossigeno ad acqua. Nel complesso citocromo c-riduttasi gli elettroni si muovono dal citocromo c1, mentre nella citocromo c-ossidasi dal citocromo a al citocromo a₃. In questa catena respiratoria si riversa il potere riducente del NADH, prodotto dal processo della glicolisi o attraverso il ciclo dell'acido citrico. La reazione complessiva della catena respiratoria è la seguente:



In questa reazione si liberano circa 53 K cal/mol, una parte delle quali viene immagazzinata sintetizzando molecole di ATP a partire dall'ADP e dal fosfato inorganico. L'accumulo di ATP è il fine della catena respiratoria.

Recenti studi hanno evidenziato un'altra importante funzione del citocromo c: la sua implicazione nel complesso meccanismo che conduce alla morte cellulare programmata, noto come apoptosi. Si pensa che esso faccia parte di un complesso che attiva le caspasi, una classe di proteasi presenti nel citoplasma; la loro attivazione provoca la rottura di una grande varietà di substrati cellulari determinando l'inizio dello smantellamento della cellula stessa.

La presenza e l'idrolisi di ATP è un requisito necessario per la formazione dell'apoptosoma, generato dal complesso derivante dall'interazione della caspasi-9 con la proteina Apaf-1, rendendo tale nucleotide un mediatore fondamentale nel processo apoptotico stesso (Tuominen et al, 2001).

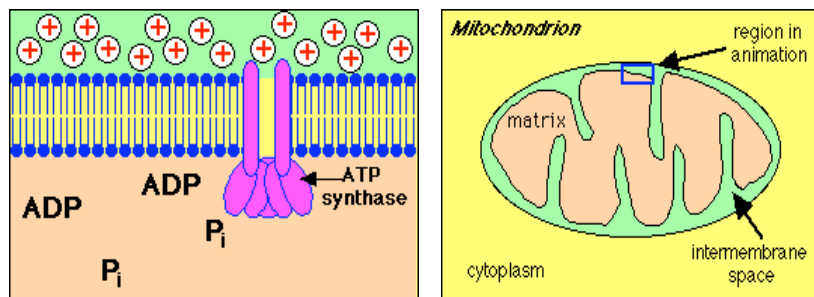


Figura 3.3 Funzione del citocromo c nei mitocondri

Capitolo 4

Il processo di folding delle proteine

4.1 Cenni generali

Recentemente la grande sfida della biofisica e della biochimica è rappresentata dalla comprensione del ripiegamento (folding) proteico, ossia del processo attraverso il quale una catena polipeptidica non strutturata si organizza in uno specifico stato conformazionale, per formare una proteina biologicamente funzionale.

Il folding proteico, che ha luogo in un'ambiente complesso e chimicamente ricco, sembra essere favorito da un gruppo di proteine ausiliarie (Gething and Sambrook, 1992; Ellis and Hartl, 1999). Tra queste molecole ricordiamo le chaperonine, la cui funzione principale sembra quella di proteggere la catena polipeptidica parzialmente foldata da interazioni di tipo non produttivo e che quindi possono dar luogo a fenomeni di aggregazione.

Numerosi esperimenti in vitro, tuttavia, dimostrano, che le proteine possono “organizzarsi” correttamente anche in assenza di fattori ausiliari, confermando l'ipotesi che il codice per il folding è contenuto nella sequenza aminoacidica della proteina stessa. Se da un lato la sequenza di aminoacidi determina la struttura di una proteina (Anfinsen, 1973) d'altro canto la struttura stessa ne regola la funzione biologica. In sintesi la funzionalità di una proteina deriva dalla sua abilità di foldarsi rapidamente e correttamente nel suo stato nativo.

La grande sfida per la biologia strutturale è data quindi dalla capacità di svelare in che modo la sequenza possa guidare il folding e quali siano le dinamiche del processo stesso. Risolvere il problema del folding proteico pertanto significa trovare “l'anello mancante” tra il flusso d'informazioni tra la sequenza genica che codifica la sintesi di una proteina e la sua struttura tridimensionale.

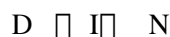
Il modello più semplice in grado di descrivere il processo di ripiegamento proteico è il modello a due stati:

stato D ↔ stato N

(p. in forma denaturata) (p. in forma nativa)

Tuttavia, questo semplice processo in natura è poco rappresentato.

Studi sperimentali hanno dimostrato che il ripiegamento proteico della maggior parte delle proteine non avviene mediante un unico evento cooperativo ma prevede l'esistenza di intermedi strutturali di unfolding, secondo il modello:



Sebbene il ripiegamento in vivo differisca da quello in vitro (in vivo il processo inizia con la sintesi della catena polipeptidica, mentre in vitro la proteina strutturata deve essere unfoldata attraverso dei denaturanti chimici o termici), in entrambe i casi il folding inizia solo quando la struttura della catena polipeptidica è altamente disorganizzata. Nonostante l'intensa ricerca degli ultimi anni, attraverso una vasta varietà di approcci e tecniche, il meccanismo del folding delle proteine non è ancora adeguatamente compreso.

E' stato evidenziato che il processo è multi-stadio e prevede la formazione di intermedi (stati parzialmente strutturati e compatti che mancano tuttavia della precisa stereochimica e dell'impaccamento specifico delle catene laterali degli amminoacidi, tipici dello stato nativo). Ciò indica che il processo di ripiegamento proteico è altamente cooperativo. La conoscenza delle proprietà molecolari di questi intermedi, denominati molten globules (MG), potrà portare alla comprensione del meccanismo di folding e delle correlazioni tra sequenza amminoacidica, struttura e funzione.

Le proteine, per arrivare alla conformazione a più bassa energia (nativa), non si ripiegano in maniera casuale, ma seguono tappe ben precise attraverso la temporanea formazione di stati transienti. All'interno della loro struttura, le proteine contengono domini strutturali o, in alcuni casi, subunità. I singoli domini, che possono essere evidenziati per via proteolitica, risultano essere strutture relativamente stabili e vengono quindi considerati delle vere proprie unità indipendenti di struttura nella proteina intatta. Durante il ripiegamento, sono in grado di avvolgersi e svolgersi indipendentemente l'uno dall'altro. Esistono diversi gradi di interazione tra i domini della stessa molecola; in alcuni casi i domini sono così interdipendenti da comportarsi come una singola unità cooperativa. Il processo di avvolgimento può risultare rallentato se le interazioni tra i domini di una stessa catena polipeptidica risultano "difficili"; è proprio il processo di associazione tra catene avvolte, a rallentare il processo di folding. Quando l'associazione dei

domini è relativamente lenta, si ha l'accumulo di stati intermedi. E' stato osservato che anche i ligandi possono influenzare la velocità di avvolgimento di una proteina. Una molecola proteica, per di più, deve essere in grado, di individuare, tra le molteplici alternative possibili, il percorso che le consentirà di raggiungere la sua conformazione nativa.

Molte proteine in soluzione hanno la capacità di ripiegarsi spontaneamente nel loro stato nativo. Questo processo deve soddisfare due condizioni essenziali: una di natura termodinamica ed una di tipo cinetico. Il che significa che la proteina assumerà un' unica conformazione stabile, completamente foldata in un intervallo di tempo ben definito.

Che il folding proteico segua una via specifica, nella quale vengono considerati "cineticamente" solo alcuni stati conformazionali (Levinthal, 1968) è dimostrato dal fatto che in natura una proteina costituita da 100 residui aminoacidici possa ripiegarsi spontaneamente in un intervallo di tempo compreso tra i millesecodi ed il secondo.

Alcuni calcoli suggeriscono che se il processo avvenisse attraverso una ricerca casuale di tutte le conformazioni possibili, la stessa proteina impiegherebbe un tempo estremamente più lungo per ripiegarsi nella sua conformazione nativa. Recentemente, questo paradosso apparente viene spiegato attraverso l'esistenza di "superfici energetiche" (Dobson and Hore, 1998; Dinner et al., 2000), nel senso che il folding proteico rappresenta il raggiungimento di un "landscape", in cui sono possibili stati conformazionali energeticamente simili.

La stabilità di una proteina dipende dallo scambio di energia libera tra il suo stato nativo ed il suo stato denaturato. Questa viene espressa dalla relazione:

$$-RT \ln K = \Delta G = \Delta H - T \Delta S$$

dove R rappresenta il numero di Avogadro, K la costante di equilibrio, G l'energia libera scambiata tra lo stato foldato ed unfoldato, H la variazione di entalpia ed S la variazione di entropia associata al sistema. Le interazioni elettrostatiche, le forze di van der Waals ed i legami idrogeno sono espressi in termini di variazione di entalpia, mentre le interazioni idrofobiche sono descritte dalla variazione di entropia. Un incremento del valore negativo di G, dovuto ad un aumento dell'energia libera della proteina unfoldata (G_U) rispetto all' energia libera della proteina nativa o foldata (G_N) è associato ad una maggiore stabilità della proteina. In altre parole, una proteina è tanto più

stabile quanto più aumenta l'energia dei legami e quanto più diminuisce la differenza di entropia tra lo stato G_U e G_N .

Una delle proteine modello più ampiamente utilizzate nello studio del folding è il citocromo c estratto dal cuore di cavallo di cui ben si conosce la struttura tridimensionale. La comprensione del meccanismo del processo di folding del citocromo, mediante studi di cinetica, è favorito dalla presenza del legame covalente tra l'eme e la catena polipeptidica, che viene utilizzato come marker ottico in relazione ai cambiamenti dello stato di coordinazione del Fe

Questi studi hanno dimostrato che la via del folding del citocromo c a partire dalla catena polipeptidica unfoldata procede attraverso un intermedio compatto (in cui i ligandi assiali sono una molecola di acqua e il residuo di Hys 18), seguito da uno stato nativo caratterizzato da uno stato di coordinazione tipica Hys(18)-Fe-Met (80).

4.2 Caratteristiche degli stadi intermedi: il molten globule

L'interesse mostrato verso stati parzialmente strutturati delle proteine, dei quali il più importante è certamente il molten globule, deriva dal fatto che essi rappresentano dei buoni modelli per descrivere le proprietà di intermedi transienti nel processo di folding delle proteine. Il molten globule può essere ottenuto in condizioni di blanda denaturazione delle proteine; in alcuni casi le sue proprietà sono assai simili a quelle di intermedi cinetici di folding. L'interesse verso gli stati parzialmente strutturati delle proteine deriva anche dal fatto che tali stati vengono adottati dalle macromolecole per svolgere alcune funzioni a livello cellulare (come il legame con ligandi, o la traslocazione di proteine). Sembra anche che, il molten globule sia implicato nel misfolding e nell'aggregazione delle proteine. L'aggregazione proteica rappresenta un notevole problema, sia nell'area biotecnologica, (basti pensare, ad esempio alla conservazione e somministrazione di farmaci proteici), che nell'area clinica, in gravi malattie denominate amiloidosi (Alzheimer, malattie prioniche). Recenti studi hanno infatti dimostrato che il molten globule è implicato nel meccanismo dell'associazione/aggregazione di proteine. L'aggregazione viene probabilmente determinata da interazioni intermolecolari fra zone idrofobiche degli intermedi di folding delle proteine, interazioni che sono invece intramolecolari nella più rigida struttura della proteina nativa. Gli intermedi aggregano molto più facilmente anche dello stato completamente denaturato, poiché in essi le catene idrofobiche laterali non sono distribuite in modo random (casuale) lungo la

catena polipeptidica, ma i gruppi idrofobici sono compattati in ampie zone che interagendo, favoriscono il processo di aggregazione. □ Lo studio della struttura e dei meccanismi che portano alla formazione del molten globule ricopre importanza nell'ambito della ricerca sulle proteine, con prevedibili ricadute nella ricerca di base (folding e funzione di proteine), nelle biotecnologie (corpi di inclusione), nell'industria farmaceutica (formulazione di farmaci proteici) e in campo clinico (amiloidosi). Purtroppo, lo studio strutturale delle specie intermedie nel processo di folding è complicato dalla natura transiente che richiede l'uso di tecniche di cinetica rapida (stop-flow); tali difficoltà hanno favorito lo studio del molten globule in condizioni di equilibrio. È stato osservato sperimentalmente che le caratteristiche degli intermedi di equilibrio sono abbastanza correlabili a quelle degli intermedi cinetici; il molten globule, quindi, è stato ampiamente utilizzato come sistema modello per lo studio del folding e dell'aggregazione di proteine. D'altra parte, la specifica struttura tridimensionale del molten globule, non è nota dal momento che non può essere determinata mediante studi di cristallografia. Le tecniche più usate per l'analisi conformazionale del molten globule sono il dicroismo circolare, la fluorescenza di emissione, la spettroscopia Raman, lo scattering di raggi X in soluzione, la microcalorimetria, e in particolare, l'NMR bidimensionale accoppiato a misure di scambio di idrogeno. Una recente tecnica utilizzata per l'analisi strutturale del molten globule è la proteolisi limitata, un approccio che ha suscitato negli ultimi anni un evidente interesse nell'ambito delle ricerche sulle proteine perché semplice, affidabile e in grado di trarre vantaggio dai recenti e spettacolari sviluppi della spettrometria di massa (MS) nell'analisi di frammenti proteici. Tale tecnica si basa sul concetto che la proteolisi avviene a livello dei siti flessibili di una proteina e pertanto può essere utilizzata per l'analisi della struttura e della dinamica di sistemi proteici. Questa tecnica richiede minime quantità di sostanza (anche pochi microgrammi) e permette di superare molte difficoltà che non sono invece risolvibili con le tecniche di uso più comune (spettroscopia o cristallografia).

Oggetto specifico di studio sono stati gli intermedi di proteine modello quali l'apomioglobina (apoMb) e l'alfa-lattalbumina (LA). Lo stato di molten globule dell'alfa-lattalbumina più studiato (123-residui, quattro ponti disolfuro) è quello ottenuto in condizioni acide (pH 2), e denominato stato A. È stato dimostrato che la pepsina inizialmente idrolizza la LA in ambiente acido a livello del dominio beta (regione 35-57), evidenziando questa regione come flessibile e/o denaturata nelle condizioni studiate. Questi risultati sono in accordo con quelli ottenuti mediante misure NMR.

Lo stato di molten globule di LA può essere ottenuto anche a pH neutro, rimuovendo lo ione calcio della metallo-proteina mediante EDTA. Le caratteristiche conformazionali dell'apo-proteina sono state studiate mediante esperimenti di proteolisi con proteinasi K, che è attiva a pH neutro e ha una specificità di substrato molto ampia. Ulteriore scopo di questi studi è stato la purificazione di frammenti proteici di LA (e/o di specie proteiche nickel/troncate), caratterizzati attraverso tecniche spettroscopiche. Lo stato di molten globule dell'apomioglobina è un utile modello per studiare sia aspetti strutturali e dinamici di proteine, sia alcuni aspetti del processo di folding. La struttura tridimensionale dell' apoMb estratta dal cuore di cavallo (153-residui, nessun ponte disolfuro) è molto simile a quella della forma olo della proteina. Le differenze strutturali tra olo e apoMb sono localizzate principalmente a livello dell'elica F (residui 89-96), che è selettivamente attaccata da varie proteasi. Da studi NMR, è emerso che la apoMb è ben strutturata, sebbene l'elica F risulta mobile. Stati parzialmente strutturati di apoMb possono essere ottenuti esponendo la proteina a pH 2.0 o 4.0; inoltre, l'aggiunta di sali (ad esempio tricloroacetato) favorisce la formazione del molten globule. L'utilizzo dei frammenti nello studio di folding delle proteine è di grande interesse in quanto essi sono, se isolati, assai poco strutturati. La loro strutturazione può fornire informazioni sulle specifiche interazioni terziarie che si instaurano al momento del "binding" tra due diversi frammenti. Lo stato nativo di una proteina è uno stato compatto e relativamente rigido in cui la maggior parte degli atomi risultano più o meno bloccati da interazioni intramolecolari. Lo stato completamente denaturato rappresenta uno stato assai meno definito, in cui la proteina è priva di struttura secondaria e terziaria e può presentare un ampio numero di conformazioni a seconda del solvente usato o della temperatura. La denaturazione indotta o dalla temperatura o da agenti chimici come la Gdn-HCl o l'urea, rappresenta un passaggio da uno stato molto ordinato a uno disordinato, come dimostrato dall'aumento dell'entropia, entalpia e calore specifico che accompagna il processo.

Gli stati intermedi si differenziano sia dalla forma nativa, essendo caratterizzati dalla struttura terziaria più fluttuante, sia dallo stato denaturato, dal momento che posseggono regioni a struttura secondaria simile allo stato nativo. Una delle più importanti proprietà fisiche del molten globule è di essere compatto quasi quanto la proteina nativa (Kim and Baldwin, 1990; Dobson, 1992; Ptitsyn, 1992). Sebbene venga considerato uno stato fuso questo presenta numerosi elementi di struttura ordinata; molte delle strutture secondarie dello stato maturo sono infatti conservate (Finkelstein et al, 1991;

Baldwin, 1991), Durante il processo di folding le proteine vanno da uno stato ad alta energia (stato unfolded) ad uno a bassa energia (stato folded) ed il molten globule si colloca in una buca energetica compresa tra i due stati. Paradossalmente lo stato maturo può non essere estremamente vantaggioso dal punto di vista termodinamico, ma può esserlo dal punto di vista cinetico. Il volume del molten globule è circa il 50% rispetto a quello osservato nella forma nativa. Ciò suggerisce la possibilità che le molecole d'acqua possano penetrare all'interno della macromolecola, provocando così un forte indebolimento delle forze di attrazione di Van der Waals. La variazione del calore specifico della proteina che accompagna il processo di denaturazione, riflette principalmente l'esposizione al solvente acquoso delle regioni non polari della catena polipeptidica. L'incremento del calore specifico del molten globule rispetto alla forma nativa dimostra che alcuni gruppi non polari sono meno fortemente impacchettati e quindi maggiormente esposti al solvente. Queste considerazioni hanno portato a suggerire che il molten globule possa essere stabilizzato principalmente da interazioni idrofobiche dei gruppi non polari, che rifuggono il mezzo acquoso.

4.3 Il molten globule del citocromo c: lo stato A

Attualmente, il molten globule del citocromo c viene identificato con lo stato-A; questo stato globulare, compatto è caratterizzato da una struttura ad α -elica comparabile con quella dello stato nativo e da una struttura terziaria molto più fluttuante.

Il particolare questa natura "fluttuante", in cui si ha una maggiore esposizione dei residui idrofobici al solvente circostante sembra essere dovuta ad una diminuzione delle interazioni eme- catena polipeptidica ed alla perdita dei legami idrogeno tra il Trp 59 ed uno dei propinati dell'eme.

Il core idrofobico, costituito da due α -eliche principali e dal gruppo prostetico è stabilizzato da interazioni di tipo non covalente, mentre le regioni loop appaiono fluttuanti e parzialmente disordinate. Attualmente, lo stato A del citocromo c viene identificato con una forma stabilizzata a pH acido ed alta forza ionica (pH 2.2 +NaCl 0.5M). E' stato dimostrato che mentre a pH 2.2 ed a bassa forza ionica la proteina è completamente denaturata, l'aggiunta di sali o un'ulteriore acidificazione inducono il riavvolgimento della catena polipeptidica in uno stato compatto, caratterizzato da un contenuto α -elicoidale simile a quello della forma nativa, ma con struttura terziaria fluttuante: il *molten globule*. La transizione

dello stato denaturato allo stato di *molten globule* appare modulata dagli anioni; ad alta concentrazione, infatti, gli atomi schermano le repulsioni tra i gruppi carichi positivamente situati sulla superficie proteica e i protoni, stabilizzando così uno stato compatto della macromolecola (Goto et al, 1990).

Nello stato A, il legame di coordinazione tra il residuo His-18 e il ferro-eme viene mantenuto; al contrario, il legame tra il metallo e il ligando assiale, la Met-80, sembra venga rotto e il residuo sostituito da un altro ligando endogeno (una lisina od una istidina) o da una molecola d'acqua. Il legame tra His-18 e ferro è considerato un legame essenziale per la stabilità dello stato A, poiché nello stato denaturato né l'His-18 né la Met-80 risultano coordinate al metallo. L'architettura molecolare dello stato A risulta costituita da un nucleo idrofobico che coinvolge le due principali regioni elicoidali ed il gruppo eme, ed è così stabilizzata dalle interazioni tra le eliche e con l'eme (Jordan et al, 1995). Studi spettroscopici (di assorbenza ed EPR) hanno rivelato che lo stato A è composto da una popolazione eterogenea di molecole ad alto spin (quelle in cui al ferro è coordinata una molecola d'acqua) ed a basso spin (quelle in cui è invece coordinato un ligando endogeno). In ambiente acido, il processo di formazione dello stato A è di tipo off-pathway, ovvero si ottiene dallo stato denaturato e non può essere ricondotto allo stato nativo. Più recentemente è stato evidenziato uno stato simile al *molten globule* stabilizzato dal glicerolo.

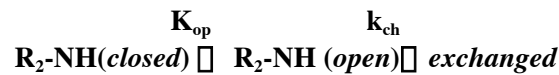
4.4 Processo di unfolding

Nel processo di *unfolding* del citocromo *c* il passaggio dalla forma nativa a quella denaturata avviene attraverso una sequenza di intermedi parzialmente denaturati che occupano livelli di energia superiori a quella dello stato nativo, fino ad un massimo, rappresentato dallo stato completamente denaturato. Questi intermedi sono instabili e il loro studio è reso possibile da tecniche di cinetica rapida (*stopped flow*).

In condizioni native, una piccola frazione delle molecole della proteina occupa tutti i più alti livelli di energia, inclusi gli stati parzialmente denaturati e quello completamente denaturato. Lo studio delle forme parzialmente denaturate (intermedi) può indicarci la natura fondamentale cooperativa del processo di organizzazione spaziale della proteina, e definire i percorsi di *foldings/unfoldings*. I livelli di energia di

questi stati conformazionalmente instabili possono essere alterati dalla temperatura o dall'uso di agenti denaturanti (es.:guanidina cloridrato, GdnCl). Studi effettuati mediante esperimenti di scambio di protoni hanno permesso di determinare (i) il numero di atomi di idrogeno dei gruppi NH esposti in ogni forma che popola livelli più alti di energia, (ii) la percentuale di scambio con il solvente, (iii) e la loro sensibilità ad agenti perturbanti. Da queste informazioni è possibile determinare la struttura, l'energia libera e l'esposizione superficiale di ogni forma della proteina (Bai et al., 1995).

La teoria dello scambio dei protoni si basa sul fatto che gli idrogeni dei gruppi NH impegnati nella formazione di legami idrogeno all'interno della struttura della proteina, possono scambiarsi con i protoni del solvente solo quando sono provvisoriamente esposti ad esso. Il processo può essere così rappresentato:



Dove: K_{op} = costante di equilibrio del processo

k_{ch} = costante cinetica, indice della percentuale di scambio dei protoni, ovvero della superficie proteica esposta (processo 2).

Gli esperimenti di scambio dei protoni vengono eseguiti in condizioni di equilibrio; quindi, per mantenere la concentrazione di ciascuna specie, la sequenza delle reazioni che porta il citocromo c dalla forma nativa (N) ai diversi intermedi ed infine allo stato completamente denaturato (*unfolded*, U), deve essere accompagnata da una sequenza di reazioni inverse che partono dallo stato U fino ad arrivare alla forma biologicamente attiva (Xu et al., 1998). Per stabilire la successione delle forme intermedie viene calcolata, di volta in volta, l'energia libera di denaturazione della forma intermedia che si sta analizzando e che dipende linearmente dalla concentrazione dell'agente denaturante:

$$\Delta G_u(den) = \Delta G_u(0) - m[den]$$

dove $\Delta G_u(den)$ = energia libera di denaturazione ad una determinata concentrazione di denaturante;

$\Delta G_u(0)$ = energia libera di denaturazione in assenza di denaturante;

m = coefficiente angolare della retta; è direttamente correlato alla superficie proteica che viene esposta al solvente nel corso delle reazioni di *unfolding*.

La determinazione della sua struttura nativa, risolta mediante tecnica X-Ray ad alta risoluzione, accompagnata dalla conoscenza delle sue proprietà in soluzione, nonché la concomitante possibilità di seguire le sue cinetiche di *unfolding* mediante numerose tecniche spettroscopiche contribuiscono a fare del citocromo c un ottimo modello.

Il suo studio, non solo ha contribuito a chiarire in che modo le catene laterali possano influenzare e moderare i processi di stabilizzazione strutturale e di regolazione funzionale di una proteina, ma ha permesso di “risolvere” alcuni degli innumerevoli misteri del *fold*ing proteico.

Il citocromo c, non a caso, viene spesso utilizzato quale modello nello studio di *fold*ing e di *unfolding* delle proteine.

Il ferro emico (Fe^{2+}) nello stato nativo, è legato assialmente con la Met 80 e l' His 18 per raggiungere uno stato esacoordinato a basso spin (6cLS). Il citocromo c, spesso, viene utilizzato come sistema modello negli studi di *fold*ing proteico; in primis la reversibilità del processo di *unfolding*-*refolding* non ne determina la sua degradazione.

Lo stato di coordinazione dello ione ferrico, in condizioni denaturanti è stato esplorato mediante numerose tecniche sperimentali, quali la spettroscopia UV- Vis (Thomas et al, 2000), il dicroismo circolare (Oellerich et al, 2002; Goto et al, 1990), la risonanza magnetica nucleare (Chevance et al, 2003) e la spettroscopia Raman (Indiani et al, 2000).

Numerosi studi hanno dimostrato che, se da un lato, il processo di *unfolding* è in grado di rompere il legame tra il Fe emico e la Met 80, d'altra parte la rottura del legame Fe- His 18 può avvenire solo in condizioni estreme (in soluzioni fortemente acide o in presenza di guanidina a pH 3.3).

Il citocromo c, in soluzione, può assumere diversi stati conformazionali, caratterizzati da un diverso stato di legazione dell' eme. Questi sono fortemente determinati da alcune proprietà chimiche della soluzione stessa, quali il pH e la forza ionica. Il pH acido della soluzione, provocando la rottura del legame Fe- Met 80, determina una diminuzione delle specie native 6cLS e la concomitante comparsa di specie non native a basso spin (6cLS). La protonazione dei ligandi contribuisce alla formazione di specie penta ed esa-coordinate ad alto spin (5cHS e 6cHS).

La configurazione esaccordinata è caratterizzata dalla presenza di un nuovo ligando, con formazione di specie emiche Hys- Fe- H₂O; ciò è dovuto alla sostituzione della Met 80 con una molecola di acqua, mentre il legame tra il residuo di Hys ed il Fe emico rimane invariato.

La successiva protonazione dell' Hys 18, raggiungibile solo quando il pH scende a valori molto bassi, induce l' insorgenza di specie 5cHS, in cui il ferro emico si lega esclusivamente ad una molecola di acqua.

La forza ionica, in condizioni acide, è in grado di alterare la struttura della tasca dell' eme. A pH= 2 l'eme potrà assumere una coordinazione di tipo 6cLS o 6cHS a seconda della forza ionica della soluzione; in particolare, mentre in condizioni di bassa forza ionica la specie predominante è quella di tipo 6cHS, soluzioni aventi valori elevati di forza ionica contribuiscono alla sostituzione delle specie 6cHS con quelle di tipo 6cLS. Recentemente è stato dimostrato che in condizioni di elevata forza ionica, la graduale acidificazione del citocromo c in soluzione, al di sotto di pH=2, induce l'unfolding reversibile dell' N-loop, con il conseguente passaggio allo stato di molten globule, in cui sono conservati i ligandi assiali della nativa. L' A-state è caratterizzato da una serie di equilibri tra specie ad alto e basso spin e tra due specie a basso spin.

Capitolo 5

Tecniche utilizzate

5.1 Spettroscopia infrarossa in trasformata di Fourier (FTIR)

E' noto che l'assorbimento di una radiazione determina una transizione tra due stati caratteristici di energia differente. L'energia assorbita è strettamente correlata alla lunghezza d'onda della radiazione assorbita, in base alla legge di Plank:

$$\Delta E = h\nu = h(c/\lambda)$$

dove ΔE è la variazione di energia, c è la velocità della luce mentre ν e λ rappresentano la frequenza e la lunghezza d'onda della luce incidente. Lo spettro elettromagnetico è stato arbitrariamente suddiviso in varie regioni a seconda dei processi molecolari indotti dall'assorbimento della radiazione. Le radiazioni infrarosse non hanno energia sufficiente per eccitare gli elettroni ai livelli energetici più alti, ma possono indurre transizioni tra livelli di energia vibrazionale e rotazionale.

Le vibrazioni molecolari possono essere di stretching e di bending. Le vibrazioni di stretching consistono in un movimento ritmico lungo l'asse del legame in modo da determinare una diminuzione od un incremento della distanza interatomica. La vibrazione di bending può esser dovuta ad una variazione dell'angolo di legame tra legami contigui oppure nel movimento di gruppi di atomi rispetto al resto della molecola.

Non tutte le vibrazioni molecolari avvengono con assorbimento di energia. Condizione necessaria affinché una molecola possa assorbire una radiazione IR è che il momento oscillante, dovuto ad una vibrazione molecolare, interagisca con il vettore elettrico oscillante del raggio di luce infrarosso. Quindi, nell'infrarosso, saranno osservabili solo quelle vibrazioni che producono una variazione del momento dipolare della molecola.

Gli spettri I.R che si presentano come una sequenza di bande di assorbimento, non risultano di facile interpretazione, soprattutto in relazione allo studio di molecole complesse. Con buona approssimazione, le vibrazioni molecolari si possono suddividere in vibrazioni che interessano l'intera molecola ed in vibrazioni che invece coinvolgono i singoli gruppi

funzionali. Grazie all'attribuzione di una frequenza caratteristica di vibrazione per ogni gruppo funzionale è possibile utilizzare uno spettro I. R, quale strumento semplice di indagine per l'individuazione della classe di appartenenza di una sostanza; infatti la presenza di certe bande di assorbimento sullo spettro è indice della presenza di gruppi funzionali ben precisi.

I parametri che servono a caratterizzare una banda di assorbimento IR sono:

- ✓ La posizione, che viene indicata con la sua λ_{\max} (espressa in μm) od in alternativa in numeri d'onda (cm^{-1}).
- ✓ La forma, rappresenta un parametro qualitativo utile a identificare una banda
- ✓ L'intensità, esprime la probabilità che si verifichi la transizione energetica dallo stato fondamentale allo stato eccitato da parte del gruppo funzionale d'interesse.

Nella fase iniziale di interpretazione di uno spettro I.R è opportuno suddividere lo spettro stesso in alcune zone caratteristiche. La regione al di sopra dei 1300 cm^{-1} , diagnostica per i gruppi funzionali, comprende le bande di assorbimento dovute sia agli stiramenti dei legami che alle deformazioni. La zona delle impronte digitali, che si estende tra i 1300 ed i 650 cm^{-1} le cui numerose bande derivano da moti vibrazionali accoppiati, relativi allo scheletro della molecola e pertanto sono altamente caratteristici del composto in esame.

Per la caratterizzazione strutturale dei materiali sintetizzati si è utilizzato lo strumento PU9800 della Philips che lavora in riflettanza diffusa in trasformata di Fourier; in questo modo è possibile ottenere un miglioramento del rapporto segnale-rumore ed una riduzione del tempo di acquisizione dello spettro (circa 1 sec.). Il campione è stato esaminato allo stato solido mediante l'utilizzo di KBr puro (sale invisibile alla luce infrarossa). L'analita ed il KBr sono stati dapprima pestati poi miscelati in un piccolo mortaio di agata (rapporto 1:100). La miscela così ottenuta è stata pressata in uno stampo generando una piccola pasticca.

Ogni spettro si ottiene effettuando 100 scansioni e viene presentato riportando in ascisse il n° di onda ed in ordinate la funzione Kubelka-Munk.

Gli spettri sono stati effettuati in un range compreso tra $4500\text{-}450 \text{ cm}^{-1}$ alla temperatura di 20°C .

5.2 Spettroscopia di emissione al plasma

La spettroscopia ottica di emissione atomica al plasma consente di determinare concentrazioni anche piuttosto basse di una analita, misurando l'intensità delle radiazioni elettroniche emesse dagli atomi/ioni eccitati delle specie presenti nel campione. Generalmente, viene utilizzata come sorgente di emissione argon di elevata purezza. Questo gas plasmogeno, viene immesso in un tubo di quarzo attorno al quale è avvolto un solenoide (la torcia) plasma e la sua ionizzazione è innescata da una scintilla prodotta da una bobina Tesla. Al filamento viene applicato un campo magnetico mediante un generatore di radiofrequenze che opera tra 5-75 MHz ed una potenza di 1-2 KW.

Gli ioni Ar^+ vengono immediatamente accelerati dal potente campo a radiofrequenza oscillante posto attorno alla bobina di carico con conseguente riscaldamento per effetto Joule dovuto alla resistenza del gas di sostegno. Una volta che il processo ha avuto inizio, gli ioni assorbono dal campo elettrico energia sufficiente per mantenere nella fiamma temperature di 6000- 10000 K. Si genera, pertanto, un plasma stabile, ossia una miscela gassosa conduttrice di elettricità, contenente concentrazioni significative di cationi ed elettroni, che permette di raggiungere temperature molto più elevate rispetto a quelle che si possono ottenere con le normali fiamme a combustione. Le elevate temperature e l'alto grado di stabilità eliminano molte delle interferenze e delle fonti di errore che invece si possono avere con le fiamme convenzionali.

Durante una misura analitica il campione e gli standard vengono opportunamente introdotti nella fiamma attraverso un nebulizzatore convenzionale e l'aerosol viene trasportato nel plasma.

A tal punto, in seguito a fenomeni di eccitazione, che coinvolgono gli elementi delle soluzioni di analisi e che sono indotti dalle alte temperature del plasma, avviene la produzione dello spettro di emissione composto dalle righe caratteristiche degli elementi presenti. Gli elementi eccitati inoltre emettono E radiante a determinate lunghezze d'onda in modo proporzionale alla concentrazione dell'elemento in soluzione.

Le righe dopo essere separate mediante un sistema di dispersione vengono inviate su di un rivelatore, solitamente un fotomoltiplicatore, il cui segnale elettrico, ha un'intensità proporzionale all'intensità delle righe di emissione.

La concentrazione dell'analita presente nel campione viene determinata per confronto con una soluzione di riferimento a concentrazione nota.

Il grande vantaggio dell' ICP è rappresentato dalla possibilità di effettuare misure in emissione multielemento per cui contrariamente all' assorbimento atomico (AAS) non è necessario cambiare lampada per ciascun elemento. I principali componenti di uno spettrometro ad emissione al plasma sono schematizzati nella **figura 5.1**.

Questa tecnica analitica è stata utilizzata per determinare la concentrazione degli ioni Ca^{2+} e PO_4^{3-} rilasciati dagli ibridi nelle prove di bioattività. In particolare è stato utilizzato il plasma ICP-OES della Varian, modello Vista MPX.

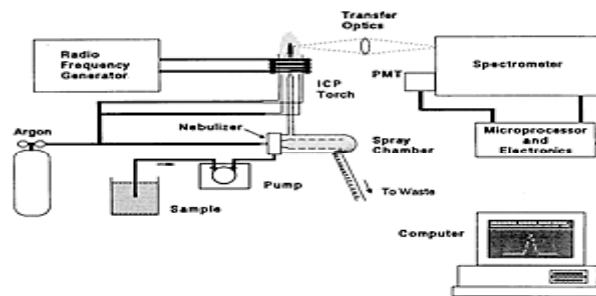


Figura 5.1 Spettrometro ad emissione al plasma

5.3 Analisi elementare

Il contenuto di C, N, H e S delle matrici prive (sol-gel) e contenenti nitrato di calcio (bio sol-gel) è stato determinato mediante l'analizzatore EA11110 CHNS-O della Carlo Erba. Il campione, pesato in un crogiolo di Sn viene posto nel campionatore e quindi tenuto in atmosfera di O₂ per essere purificato. Successivamente il campione giunge nella colonna di reazione, costituita da un tubo di quarzo riempito con Cu puro e con WO₃ separati da uno strato di lana di vetro.

I prodotti delle reazioni sono trasportati tramite He in una colonna cromatografia posta a 60° C, dove vengono separati ed analizzati.

5.4 Dicroismo circolare

La spettroscopia di assorbimento, oltre a rivelare le transizioni tra i diversi stati elettronici molecolari, può dare informazioni sui sistemi otticamente attivi.

Un'importante tecnica spettroscopica alquanto diffusa nel mondo della biochimica è quella del dicroismo circolare (CD), che consente di studiare in maniera relativamente semplice le proprietà strutturali delle proteine.

Il CD sfrutta l'interazione tra la radiazione incidente (polarizzata circolarmente) ed i momenti di dipolo elettrico e magnetico delle molecole chirali. La luce linearmente polarizzata può essere considerata essere composta da luce circolarmente polarizzata a destra sovrapposta a luce circolarmente polarizzata a sinistra, aventi entrambe la stessa intensità. La combinazione delle due componenti circolarmente polarizzate in direzione opposta produce una luce linearmente polarizzata oscillante in un piano perpendicolare alla direzione di propagazione. Quando questa luce incontra un campione otticamente attivo, con un diverso assorbimento per una delle due componenti di luce circolarmente polarizzata (a destra o a sinistra), l'intensità di una delle viene ridotta maggiormente rispetto all'altra. Il risultato derivante dalla combinazione di queste è una luce ellitticamente polarizzata.

In particolare viene misurata la differenza tra i coefficienti di estinzione molare ϵ_L ed ϵ_R della luce polarizzata rispettivamente *levo* e *destrogiro*:

$$\epsilon_{LR} = \frac{0,0229 \cdot \lambda \cdot N \cdot f(\lambda)}{\hbar c} \cdot R_{LR}$$

dove λ è la lunghezza d'onda di eccitazione, N è il numero di Avogadro, $f(\lambda)$ è la probabilità di transizione tra il livello fondamentale e quello eccitato ed infine R è la forza di rotazione ed è uguale a:

$$R = \text{Im} (\underline{m}_{LR} \cdot \underline{m}_{LR})$$

con \underline{m} dipolo magnetico ed \underline{m} dipolo elettrico.

Il dicroismo circolare fornisce una serie di informazioni sulle proprietà strutturali delle proteine ed in associazione con altre tecniche strutturali permette di analizzare a fondo il processo di folding/unfolding delle proteine. L'analisi di due specifiche regioni spettrali aiuta a stimare la struttura secondaria di una proteina ed è pertanto in grado di fornire informazioni preziose sulle sue variazioni conformazionali.

L'assorbimento nella regione del lontano UV (250-180nm), dovuta al legame peptidico, permette di definire quantitativamente la struttura secondaria di una proteina ed è caratterizzata dall'attività ottica dovuta alla presenza di strutture secondarie quali i foglietti β e le β -eliche.

Mentre lo spettro dicroico di una proteina avente una conformazione ad α -elica è caratterizzato dalla presenza di due picchi negativi (222 e 208nm) e da una banda positiva centrata a 195nm, una struttura a foglietto β è segnalata da una banda positiva e da una banda negativa centrate rispettivamente a 195 e 218 nm (Greenfield, 1999).

La regione del vicino UV (250-290) di uno spettro CD è dovuto principalmente all'assorbimento delle molecole aromatiche (fenilalanina, tirosina e triptofano). Questi aminoacidi, essendo dotati di un piano di simmetria, non dovrebbero mostrare alcuna attività ottica; tuttavia il microambiente creato dalla stessa matrice proteica altera la simmetria della distribuzione della carica, permettendo così la formazione di un segnale CD. Questo effetto è di almeno un ordine di grandezza inferiore al segnale CD della regione peptidica ed è estremamente sensibile alle variazioni della struttura terziaria della proteina.

L'analisi della "regione Soret" (380-450 nm) fornisce informazioni rilevanti nello studio delle emoproteine. Le transizioni dell'eme in questa

regione sono influenzate dai residui che compongono la tasca idrofobia in cui esso è inserito e dalle specie legate all' atomo di Fe attraverso il legami di coordinazione.

Oltre a definire le variazioni strutturali di una proteina, fornendo in tal modo un valido supporto nello studio dei processi di folding e di unfolding , il dicroismo circolare permette quindi di studiare le interazioni ligando proteina (Kelly and Price, 1997).

Le misure di CD sono state eseguite utilizzando lo spettrofotometro della JASCO, modello j-700 (Ishikawa-CHO, Hachioji City, Tokio, Japan), dotato di una lampada allo xenon ed interfacciato con un PC.

Gli spettri dicroici, registrati nell'intervallo di lunghezza d' onda compresa tra 400-450nm (regione del Soret), ci permettono di ottenere informazioni relative al tasca dell' eme ed in particolare nell' intorno del legame assiale Met 80- (Fe III).

L'ellitticità molare $[\theta]$ ($\text{gradi}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{dmol}^{-1}$) è espressa sulla base della concentrazione molare dell'eme. La concentrazione del campione alla quale sono state effettuate tutte le misure è compresa tra 8-10 μM .

5.5 Fluorescenza statica

Dal punto di vista molecolare, l'emissione di luce di fluorescenza è un processo di emissione spontanea di fotoni durante il decadimento degli elettroni dallo stato di singoletto degli orbitali eccitati π^* dei fluorofori. La vita media di questi livelli è compresa generalmente nell'intervallo: (10^{-9} ÷ 10^{-12}) sec.

Perché la fluorescenza si verifichi, è necessario innanzi tutto che il fotone assorbito non dissoci la molecola. Inoltre occorre che i processi di decadimento non radiativo non prevalgano. Per questo la fluorescenza è più comunemente osservata in composti ciclici ed in particolare negli idrocarburi aromatici: gli elettroni che partecipano ai legami doppi delocalizzati possono essere eccitati senza che la molecola debba dissociarsi e la struttura rigida dell'anello aromatico rende più lenta la dispersione dell'energia attraverso vibrazioni. Se le condizioni appena esposte sono soddisfatte, all'eccitazione si susseguono una serie di processi non radiativi molto rapidi che portano gli elettroni allo stato ibrazionale più basso del livello eccitato. A causa di questi processi di rilassamento, i fotoni riemessi nel corso della transizione elettronica al livello fondamentale, avranno energie minori di quelli assorbiti.

Ogni molecola che assorbe la radiazione elettromagnetica nell'intervallo di lunghezze d'onda tra il vicino UV ed il visibile viene chiamata cromoforo.

La fluorescenza è stata utilizzata per studiare la permeabilità degli ibridi; la sonda fluorescente utilizzata è il RubPy (Tris 2,2' bipyridyl dichlororuthenium (II) hexahydrate), che assorbe la luce a 454 nm e la riemette fra i 570 ed i 700 nm.

5.6 Misure di assorbimento

Le misure di assorbimento sono state eseguite con uno spettrofotometro Perkin Elmer modello Lambda 18, ad alta sensibilità (quarta cifra decimale), guidato dal software UV win Lab.

La spettroscopia ottica permette di misurare il valore di assorbanza definita come:

$$A = \log I / I_0$$

dove I_0 è l'intensità della radiazione incidente ed I l'intensità della radiazione uscente.

La ragione per cui l'assorbanza è così importante è che tale grandezza è direttamente proporzionale alla concentrazione della specie che assorbe la luce nel campione.

L'equazione che sta alla base dell'applicazione della spettrofotometria alla chimica analitica è la legge di Lambert- Beer:

$$A = \epsilon bc$$

dove c è la concentrazione, b il cammino ottico della cuvetta utilizzata ed ϵ il coefficiente di estinzione molare, una costante caratteristica della specie in esame.

Sebbene la legge di Beer sia valida per soluzioni ben diluite ($C < 0.01$ M), con l'aumentare della concentrazione si osserva l'insorgenza di deviazioni dovute per lo più a variazioni della specie assorbente o delle proprietà della massa della soluzione stessa.

La spettroscopia ottica è stata utilizzata per:

- ✓ determinare la concentrazione della soluzione di citocromo c da incapsulare nei campioni sol-gel. La concentrazione della proteina nativa

è stata stimata utilizzando un $\epsilon = 106 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ a 408 nm e cuvette di quarzo da 1 cm.

- ✓ studiare come variano le proprietà strutturali del citocromo c in soluzione, nel sol-gel e nel bio sol-gel
- ✓ monitorare i cambiamenti relativi alla tasca dell'eme durante il processo di folding/unfolding del citocromo c incapsulato. E' ben noto che l'assorbimento elettronico dell'eme nella regione Soret fornisce informazioni sullo stato di coordinazione del Fe e che pertanto riflette un caratteristico stato conformazionale della proteina.

L'analisi spettrofotometrica è stata utilizzata per determinare la concentrazione del citocromo c. A questo scopo è stato utilizzato come coefficiente di estinzione molare, il valore:

$$\epsilon_{(408)} = 106000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

5.7 Voltammetria ciclica

L'elettrochimica dei sistemi biologici rappresenta un settore di grande interesse per la biochimica in quanto permette di studiare le loro proprietà redox, approfondendo gli aspetti meccanicistici che governano il trasferimento di elettroni tra macromolecole ed elettrodo. Lo studio elettrochimico delle metallo proteine e dei metallo enzimi non solo ci aiutano a determinare il loro potenziale redox, ma ci permettono di definire quali sono le migliori condizioni sperimentali per ottenere un rapido, reversibile e specifico trasferimento di elettroni tra macromolecole e superficie elettrodica.

Difficilmente queste classe di biomolecole mostrano un rapido elettron transfer in quanto il sito attivo delle metallo proteine è spesso nascosto in una cavità, circondata e mascherata dalla catena polipeptidica.

Poiché le proprietà redox delle proteine emiche variano in funzione del loro ruolo biologico, il potenziale redox e la velocità di trasferimento degli elettroni di queste molecole ci aiutano a comprendere in che modo l'environment proteico possa influenzare la funzione biochimica dell'eme nelle proteine stesse. Non a caso il potenziale di ossidoriduzione e la cinetica di trasferimento degli elettroni del citocromo c, coinvolto nella respirazione mitocondriale, è significativamente diverso da quello ottenuto per le

proteine deputate al trasporto dell'ossigeno quale la mioglobina e l'emoglobina.

Il citocromo c rappresenta la molecola ideale nell'ambito dello studio delle reazioni di elettrone transfer in virtù della sua documentata quanto ormai conosciuta struttura, della sua disponibilità commerciale e del costo contenuto.

Nello specifico per caratterizzare le proprietà redox del citocromo c si è utilizzato come metodo elettrochimico la voltammetria ciclica, con la quale si misura il passaggio di corrente del sistema in esame in seguito all'applicazione di una differenza potenziale all'elettrodo di lavoro.

La curva corrente-voltaggio registra l'intensità di corrente prodotta quando un potenziale variabile viene applicato ad una cella contenente la soluzione d'interesse, l'elettrodo di riferimento e l'elettrodo di lavoro.

In un processo elettronico reversibile, in cui la reazione redox è abbastanza veloce da mantenere all'elettrodo concentrazioni di equilibrio tra la specie ossidata e quella ridotta, la corrente di picco anodica e catodica hanno la stessa intensità; la differenza di potenziale tra i picchi è :

$$E_{pa} - E_{pc} = 2.22 RT / nF = 57,0/n \text{ (mV)}$$

dove E_{pa} e E_{pc} sono i potenziali ai quali si osservano le correnti di picco anodica e catodica ed n il numero di elettroni coinvolti nella semireazione. Il potenziale di semionda $E_{1/2}$, definito come il potenziale al quale la corrente raggiunge la metà del valore della corrente limite o del plateau, si colloca a metà strada tra i potenziali dei due picchi. Nella maggior parte dei casi, il potenziale di semionda è praticamente indipendente dalla concentrazione della proteina; esso caratterizza le proprietà ossido-riduttive delle biomolecole studiate e può essere utilizzato per un'identificazione qualitativa della specie elettroattiva presente.

Per le misure di voltammetria si è utilizzato il polarografo della Amel 433/W. Prima di eseguire le corse voltammetriche si è provveduto a far gorgogliare per 20 minuti un flusso di azoto puro attraverso la soluzione contenuta all'interno della cella elettrolitica, costituita da tampone fosfato 20mM a pH 7.0 e da NaClO_4 (100mM). Questo accorgimento risulta necessario per eliminare l'ossigeno disciolto dalla soluzione; la presenza dell'ossigeno, specie elettricamente riducibile, potrebbe alterare i risultati ottenuti mediante la produzione di elevate correnti di riduzione.

Nella cella elettrochimica sono immersi l'elettrodo di lavoro, l'elettrodo di riferimento ed il contro elettrodo, costituiti rispettivamente da un elettrodo

di grafite pirolitica (3 mm diameter; Amel) chimicamente modificato, dall' elettrodo a calomelano e da un filo di platino. Le misure di potenziale sono espresse in riferimento all' elettrodo ad idrogeno (NHE). L' intervallo di scansione è compreso tra -600 e +600 mV, rispetto all' elettrodo a calomelano. Sono state utilizzate velocità di scansione comprese tra 100 e 1500 mV/s.

5.8 Microscopia confocale

Il microscopio confocale utilizza la luce laser deflessa per scansionare un campione. Questo è costituito da diversi elementi; un microscopio tradizionale con obiettivo invertito, che permette di intervenire agevolmente sul campione; un modulo a scansione formato dalla testa confocale per la scansione del fascio luminoso sul campione; un modulo di eccitazione costituito da tre laser a diversa lunghezza d' onda (488nm, 543nm, 631nm), i quali vengono utilizzati per eccitare le molecole fluorescenti del campione. L' elemento più interessante della microscopia confocale è rappresentato dalla possibilità di osservare in successione i diversi strati del campione in esame (secondo i piani spaziali xy, xz, yz), effettuando il cosiddetto sezionamento ottico. La luce di un laser viene fatta convergere dalle lenti dell'obbiettivo in un punto estremamente piccolo del campione osservato. Il punto stesso, attraverso un sistema di specchi oscillanti, viene spostato attraverso tutto il campo visivo dell'obbiettivo così da effettuare una scansione completa di tutto il piano focale.

Il segnale luminoso emesso dal campione viene catturato dalle lenti dell' obiettivo e deviata da uno specchio dicroico su di un fotomoltiplicatore, che converte l' intensità luminosa in segnale elettrico. La presenza di un disco forato (pinhole) di apertura variabile, interposto tra lo specchio dicroico ed il fotomoltiplicatore riduce sensibilmente la raccolta della luce proveniente dalle zone fuori fuoco. In questo modo è possibile visualizzare ogni singolo strato eliminando la luce emessa dai piani sopra e sottostanti al piano focale. Dall' integrazione di tutte le sezioni ottiche (dello spessore dell' ordine dei decimi di μm) è pertanto possibile realizzare un' immagine tridimensionale nitida del campione in esame.

La microscopia confocale è stata utilizzata per ampliare le informazioni strutturali relative alla superficie degli ibridi. Nello specifico l' acquisizione delle immagini è stata effettuata utilizzando il microscopio confocale modello Nikon C1, eccitando il campione a 488nm con un laser ad ioni

argon. Le microfotografie sono state processate utilizzando il software EZ C1 della Nikon.

Capitolo 6

Materiali e metodi

6.1 Sintesi degli ibridi

Una soluzione di chitosano allo 0.1% (W/V) è stata preparata dissolvendo dei granuli di chitosano in una soluzione 0.1 M di acetato di sodio (pH= 5.5), per 5 h su di un agitatore termico.

I gel bioattivi sono stati sintetizzati utilizzando la procedura descritta da Palumbo et al. (1997). La soluzione sol-gel è stata preparata dissolvendo 1.68 g di $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ in 4.6 ml di una soluzione acquosa contenente rispettivamente 0.113 ml di H_3PO_4 e 1.15 ml di NaOH 0.1 M. La soluzione è stata aggiunta lentamente, sotto agitazione magnetica, a 3.56 ml di TMOS ($T=0^\circ\text{C}$). Terminata tale operazione la soluzione sol-gel bioattiva (contenente ioni calcio e fosfato) è stata messa a dibattere sull'agitatore per 50 min a temperatura ambiente. Successivamente è stata miscelata con tre diverse quantità di chitosano allo 0.1 %. Ad ogni singolo set di campioni è stato aggiunto del Tris- HCl 0.01M (pH=7.2) in modo tale che le soluzioni sol-gel bioattive (con e senza chitosano) ed il buffer siano presenti in proporzione costante 40:60 (v/v).

Gli ibridi sono stati preparati miscelando il chitosano con la soluzione sol-gel bioattiva in modo da rispettare i seguenti rapporti volumetrici 2:3, 1:1 ed 1:2. I campioni così ottenuti sono indicati rispettivamente come BK1, BK2 e BK3.

Il campione di controllo è rappresentato da un di biogel privo di chitosano (B) la cui composizione molare è descritta nella **tabella 6.1**.

Nello specifico i campioni sottoposti alle prove di swelling, di solubilità e alla caratterizzazione strutturale (mediante FTIR ed analisi elementare) sono stati preparati distribuendo 2ml di soluzione sol-gel bioattiva (con e senza chitosano) all'interno di singole piastre petri (35mm x 10mm). I campioni sono stati collocati all'interno di un dessicatore (contenente diversi beakers pieni di acqua, in modo da ottenere un ambiente molto umido) per una settimana. Trascorso tale tempo le piastre sono state tolte dal dessicatore e lasciate all'aria a T ambiente per tre giorni.

A questo punto i campioni sono pronti per poter essere analizzati.

| Oxide | mmol Initial | Contenuto % |
|-----------------------------------|-------------------------|------------------------|
| P₂O₅ | 0.83 | 2.1 |
| Na₂O | 0.57 | 1.5 |
| CaO | 7.11 | 18.1 |
| N₂O₅ | 7.11 | 18.1 |
| SiO₂ | 23.6 | 60.2 |

Tabella 6.1 Composizione molare del gel bioattivo (B)

6.2 Prove di swelling

Il termine swelling indica il processo di rigonfiamento a cui sono soggetti alcuni tipi di materiali, in particolare matrici polimeriche ed ibridi inorganici/organici quando questi sono immersi in opportune soluzioni per un determinato periodo di tempo.

Tale proprietà è stata studiata per analizzare la stabilità in ambiente acquoso degli ibridi contenenti chitosano.

L'effetto swelling, dovuto all'assorbimento di acqua, è stato determinato attraverso la percentuale di swelling wt(%) che è così definita:

$$wt(\%) = (1 - w_d/w_w) \times 100$$

dove W_d e W_w rappresentano rispettivamente il peso iniziale del campione (secco) ed il peso del medesimo campione dopo il processo di swelling (bagnato).

La metodologia sperimentale adottata per le prove di swelling si compone di una serie di passaggi, che prevedono in ordine:

1. Preparazione dei campioni B, BK1, BK2, BK3.
2. Pesata delle Piastre Petri (35 x 10mm) prima dell'aggiunta dei 2ml di soluzione di gel bioattivo con e senza chitosano.
3. Pesata dei campioni ad una settimana dalla loro preparazione.
4. Immersione dei campioni in 6ml di soluzione 0.01M Tris- HCl (pH 7.2)
5. Prelievo della soluzione d' immersione negli intervalli di tempo prestabiliti, ossia dopo 6h, 24h, 48h e 54h.
6. Pesata dei campioni, immediatamente dopo il prelievo della soluzione e previa rimozione, con carta assorbente, dell'acqua in eccesso presente sulla loro superficie.
7. Calcolo della percentuale di swelling.

Per ottenere un dato sperimentale attendibile, ogni campione è stato preparato in triplo. Il risultato finale rappresenta pertanto il valore medio delle tre misure.

6.3 Cinetiche di rilascio degli ioni calcio e fosfato

Il meccanismo di formazione del layer di HCA è piuttosto complesso; tuttavia, è ormai ben noto che questo include una fase iniziale caratterizzata dal rilascio di differenti ioni dalla superficie del gel ed seguita da una fase in cui si osserva il riadsorbimento degli ioni calcio e fosfato sulla superficie stessa.

Il processo di dissoluzione degli ibridi è stato studiato analiticamente mediante determinazione della concentrazione degli ioni calcio e fosfato in opportune soluzioni d' immersione.

Nel primo test di screening, i campioni di gel bioattivo (B), preparati in forma di disco, sono stati immersi per 30min in tre differenti soluzioni ($V_f = 6$ ml) costituite rispettivamente da una soluzione fisiologica contenente NaCl allo 0.9%, da un soluzione 0.01 M Tris- HCl (pH = 7.2) e da una soluzione di acqua deionizzata. Trascorso tale intervallo di tempo le soluzioni sono state prelevate e raccolte in opportuni contenitori di polietilene. La determinazione della concentrazione degli ioni calcio, fosfato e silicio delle soluzioni è stata effettuata mediante spettroscopia di emissione al plasma.

Al fine di valutare l'effetto del chitosano nel processo di mineralizzazione, i campioni B, BK1, BK2, BK3, sono stati sottoposti ad un test di rilascio per gli ioni calcio e fosfato. La metodologia sperimentale utilizzata in questo saggio prevede i seguenti step:

1. Sintesi dei campioni. Le soluzioni ($V_f=2$ ml) di sol-gel bioattivo (B) e di sol-gel bioattivo contenente chitosano (BK1, BK2, BK3) sono collocate all' interno di Piastre Petri (35 x 10mm).
2. Aggiunta di 6ml di una soluzione d' immersione costituita da una soluzione di Tris- HCl 0.01 M (pH = 7.2)
3. Prelievo e raccolta in contenitori di polietilene delle soluzioni d'immersione nei seguenti intervalli di tempo: 30 min., 6 h e 24 h.
4. Determinazione della concentrazione degli ioni calcio e fosfato nelle soluzioni raccolte mediante spettroscopia di emissione al plasma.

La concentrazione degli ioni è espressa in ppm.

6.4 Prove di permeabilità

La permeabilità dei campioni è stata studiata mediante l'utilizzo di un probe fluorescente, il RubPy.

In questa prova i campioni B, BK1, BK2 e BK3 sono stati preparati aggiungendo 0.5ml di soluzione finale in una Multipiastra Petri da 24 pozzetti. Ad ogni campione è stato aggiunto 1ml di soluzione $1,5 \times 10^{-5}$ M di RubPy, ottenuta disciogliendo la polvere fluorescente in una soluzione 0.01 M Tris- HCl (pH=7.2).

I campioni sono stati lasciati in immersione nella soluzione fluorescente per 30 min, 6h e 24 h.

Dopo aver rimosso dai singoli pozzetti la soluzione del probe negli intervalli di tempo prestabiliti (30 min, 5h e 24h) si è misurata la fluorescenza delle singole soluzioni.

Le misure di fluorescenza sono correlate con la permeabilità dei campioni. In particolare l' intensità di fluorescenza del probe varia in relazione alla quantità di probe che viene adsorbito nel tempo da ogni singolo campione.

6.5 Preparazione dei campioni per FTIR ed analisi elementare.

La caratterizzazione strutturale dei campioni, mediante FTIR ed analisi elementare, richiede la frantumazione dei campioni B, BK1, BK2 e BK3, preparati secondo la procedura indicata nel paragrafo 6.1. Pertanto i campioni, al fine di ottenere una polvere fine, sono stati pestati in un mortaio di ceramica.

6.6 Sintesi della matrice sol-gel e del bio sol-gel

Preparazione della soluzione *sol-gel*:

Una soluzione costituita da 3.34 ml di acqua bidistillata e da 0.200 ml di HCl 0.04 M viene aggiunta lentamente a 3.56 ml di TMOS (T= 0°C).

Terminata l'aggiunta, la stessa soluzione viene messa a dibattere a temperatura ambiente su di un agitatore magnetico sino a quando non si osserva la formazione della fase sol (circa 10 minuti).

Preparazione della soluzione *bio sol-gel*:

1.68 g di $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ sono solubilizzati in una soluzione costituita da 3.34ml di acqua bidistillata e da 0.200 ml di HCl 0.04 M. La soluzione contenente il sale viene aggiunta lentamente a 3.56 ml di TMOS contenuti in un becker, immerso in un bagno di ghiaccio. Terminata l'aggiunta, la stessa soluzione viene messa a dibattere a temperatura ambiente su di un agitatore magnetico sino a quando non si osserva la formazione della fase sol (circa 10 minuti).

6.7 Immobilizzazione del citocromo c

L' immobilizzazione della proteina all' interno delle matrici, prive (matrici sol-gel) o contenenti nitrato di calcio (matrici bio sol-gel) avviene immediatamente dopo la formazione della fase sol. In ogni singolo campione la soluzione proteica e la soluzione sol-gel (con e senza nitrato di calcio) sono presenti nel rapporto volumetrico 60:40.

Lo stock di proteina è stato preparato dissolvendo un' opportuna quantità di citocromo c in Tris-HCl 50mmM a pH 7.0.

I campioni sono stati preparati aggiungendo 1.8 ml di soluzione proteica a 1.2 ml di soluzione sol -gel o bio sol-gel contenuta all' interno di cuvette di polistirene del volume di 3ml, in modo tale la concentrazione finale del citocromo c incapsulato sia 8-10 μ M.

I campioni, rivestiti con del parafilm forato (al fine di favorire l' eliminazione delle sostanze alcoliche che si formano durante il processo di condensazione), sono conservati in tampone Tris- HCl 0.05 M a pH 7.2 alla temperatura di 4°C.

Il processo di unfolding acido- indotto del citocromo c incapsulato è stato studiato aggiungendo ad ogni singolo campione 2ml di HCl a pH 1.5 (previa rimozione della soluzione tampone).

Il refolding della proteina incapsulata è stato seguito sostituendo la soluzione di HCl con del Tris-HCl 0.05 mM a pH 7.2.

6.8 Preparazione dell' elettrodo di lavoro

5 μ l di citocromo c 50 μ M sono depositi su un elettrodo di grafite pirolitica (GP), precedentemente pulito (con carta vetrata a grana fine e con polvere di ossido di allumina) e sonicato per 20 s.

La proteina immediatamente dopo la deposizione sull' elettrodo di GP è stata ricoperta con 5 μ l di bio sol-gel. L' elettrodo modificato chimicamente è stato fatto asciugare all'aria a temperatura ambiente e quindi utilizzato per le misure di voltammetria ciclica.

Capitolo 7

Risultati e discussione: Caratterizzazione strutturale di un gel ibrido bioattivo contenente chitosano

7.1 Caratterizzazione strutturale degli ibridi

La caratterizzazione delle matrici sol-gel è stata effettuata mediante spettroscopia infrarossa in trasformata di Fourier. L'analisi degli spettri vibrazionali ha permesso di identificare i diversi gruppi funzionali dei campioni in esame e di analizzarne i cambiamenti in funzione della composizione degli ibridi. Questa tecnica spettroscopica è quindi utile per comprendere come il chitosano alteri la struttura della matrice bio sol-gel. La **figura 7.1** mostra lo spettro FTIR del sol-gel bioattivo (B) nell'intervallo di lunghezza d'onda compreso tra 400 ed 4000 nm

Le bande presenti sono da attribuirsi alle catene silicee, dominate dalle vibrazioni Si-O.

In particolare si evidenziano le seguenti bande:

- ✓ la banda posizionata tra 460-480 cm^{-1} , dovuta alle vibrazioni di 'bending' del legame Si-O-Si;
- ✓ la banda a 950 cm^{-1} , da attribuirsi alle vibrazioni di 'stretching' dei gruppi silanolo;
- ✓ la banda centrata a \approx 1100 cm^{-1} , associata alle vibrazioni di 'stretching' dei gruppi silossano (Si-O-Si). Questo segnale, dominante, maschera la banda tipica dei gruppi fosfato (960 cm^{-1} : P-O 'stretching' ν_1) e le vibrazioni del legame Si-O-Ca.
- ✓ la banda tra 3500-3200 cm^{-1} , caratteristica delle vibrazioni di 'stretching' dei gruppi alcolici liberi.

Le frequenze del sol-gel bioattivo risultano sovrapponibili a quelle delle matrici vetrose a composizione binaria e ternaria (Saravanapavan and Hench, 2003; Zhong and Greenspan, 2000; Davis and Tomozawa, 1996).

L'intensità della frequenza di assorbimento del legame Si-O-Ca varia in funzione delle condizioni in cui i gels vengono lasciati invecchiare. Tale variazione appare più evidente nei campioni invecchiati a temperatura ambiente; questo fenomeno viene attribuito ad una non omogenea distribuzione degli ioni calcio nella matrice silicea (Pereira et al, 1994).

La **figura 7.2** mostra gli spettri FTIR del sol-gel bioattivo e degli ibridi (BK1 e BK3) nell'intervallo di frequenza compreso tra 1800 cm^{-1} e 800 cm^{-1} . Lo spettro del chitosano puro, riportato nella figura per confronto, presenta un picco poco intenso a 1650 cm^{-1} (amide I), una banda piuttosto ampia a 1570 cm^{-1} (caratteristica della vibrazione di '*bending*' del legame -NH , amide II) ed una banda di assorbimento alla frequenza di 1080 cm^{-1} , attribuibile alla vibrazione di '*stretching*' del legame C-O della struttura saccaridica. Il picco a 1650 cm^{-1} viene spesso utilizzato per l'analisi quantitativa del grado di deacetilazione del chitosano.

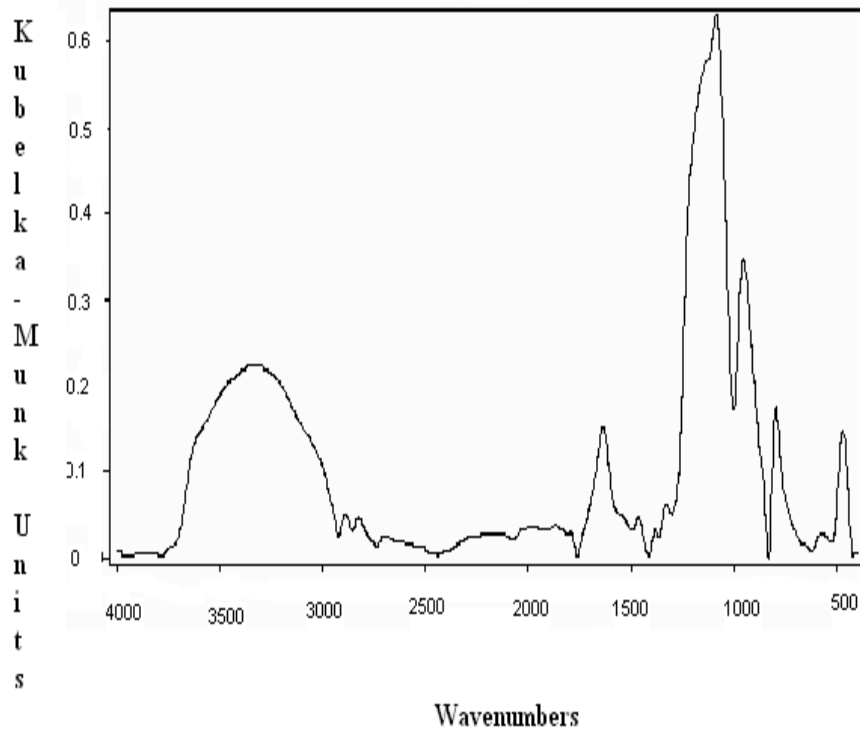


Figura 7.1 Spettro FTIR del sol-gel bioattivo (B)

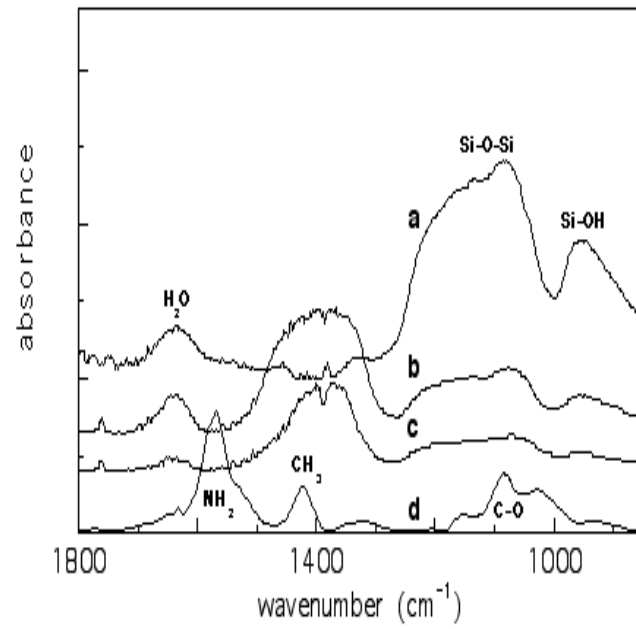


Figura 7.2 Spettri FTIR del campione B (linea a) e degli ibridi BK1 e BK2 (linee b e c). Lo spettro del chitosano (linea d) è riportato per confronto.

Come illustrato nella figura 7.2, gli spettri dei campioni BK1 e BK3 mostrano le bande caratteristiche di una matrice silicea. Analogamente al sol-gel bioattivo, gli ibridi presentano le tipiche bande relative a frequenze di stretching dei legami Si-O-Si ($\approx 1100 \text{ cm}^{-1}$) e Si-OH (950 cm^{-1}). Tuttavia, l'intensità delle bande varia in funzione del contenuto di chitosano. In particolare, l'intensità della frequenza di assorbimento relativa allo 'stretching' del legame Si-O-Si diminuisce all'aumentare del rapporto polimero/sol-gel. Il campione BK3, a basso contenuto di silice, presenta un'intensità di picco inferiore a quella del campione BK1.

I profili spettrali degli ibridi sono caratterizzati dalla presenza di un nuovo picco centrato ad una frequenza di circa 1400 cm^{-1} , caratteristico del legame Si-C (Rao and Kalesh, 2003), e dall'assenza della banda a 1570 cm^{-1} , attribuita alla vibrazione di 'bending' del legame N-H (ammide II). È stato dimostrato che nei gel silicei contenenti chitosano, il picco relativo alla vibrazione di 'bending' del gruppo N-H si sposta verso frequenze più basse e si riduce d'intensità (Retuert et al, 2003). Considerando che i sol-gel bioattivi non presentano bande di assorbimento nell'intervallo tra 1430 e 1390 cm^{-1} , è possibile affermare che la banda a 1400 cm^{-1} sia dovuta alla formazione del legame tra atomi di silicio della matrice sol-gel ed atomi di carbonio del polimero. I risultati ottenuti mostrano che gli ibridi sintetizzati presentano proprietà strutturali ben diverse da quelle dei precursori utilizzati per la loro sintesi. Risulta comunque estremamente difficile stabilire il tipo di interazioni che si instaurano tra le diverse componenti del sistema ibrido.

Dai dati pubblicati in un recente lavoro (Rashidova et al, 2004), si potrebbe tentare di ipotizzare il tipo di interazioni che si instaurano durante la formazione del materiale siliceo contenente chitosano, confrontando gli spettri FTIR del sol-gel bioattivo, del chitosano e degli ibridi. Le variazioni delle frequenze spettrali delle singole matrici, in particolare quelle relative alle bande 1650 cm^{-1} (ammide II del chitosano) e a 950 cm^{-1} (Si-OH del sol-gel bioattivo), permettono di ipotizzare la formazione di legami idrogeno tra i gruppi silanolo della matrice silicea ed i gruppi ossidrilici ed ammidici del chitosano. Analogamente, la formazione di legami covalenti può essere attribuita alla reazione di esterificazione tra gruppi ossidrilici del chitosano e gruppi silanolo del network siliceo.

Il modello strutturale degli ibridi ipotizzato sulla base delle interazioni tra la matrice silicea ed il chitosano è riportato nella **figura 7.3**

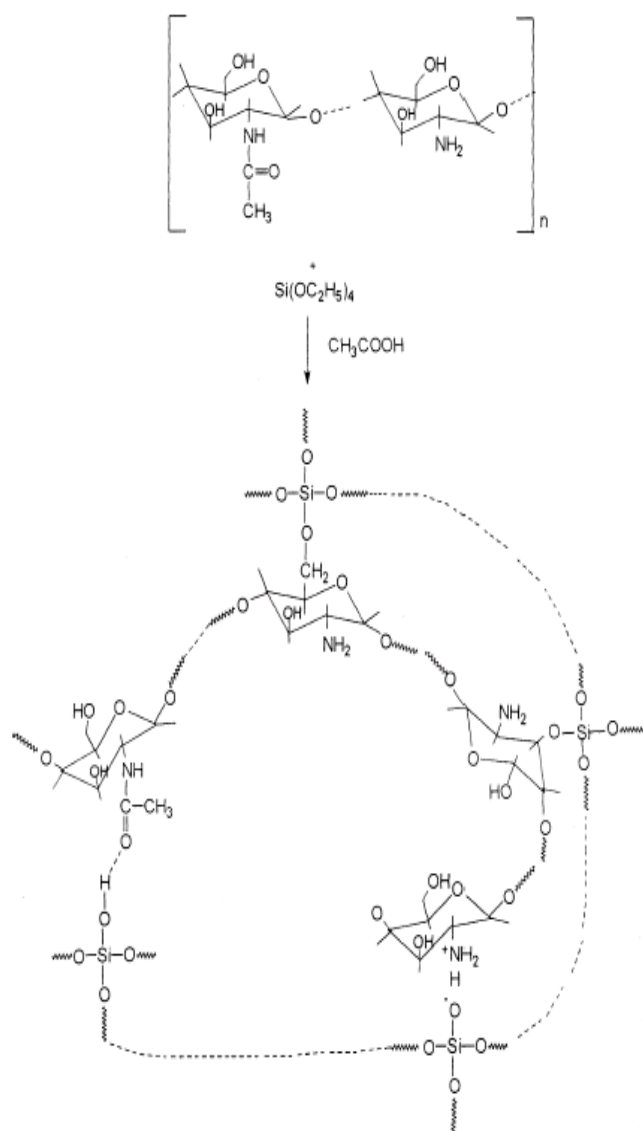


Figura 7.3 Modello ipotetico d' interazione tra la matrice silicea ed il chitosano (Journal of Chromatography B, 800 (2004) 49–53).

7.2 Rilascio di ioni

Numerose lavori hanno dimostrato che le matrici vetrose a composizione ternaria (CaO-SiO₂-P₂O₅) sono in grado di legarsi alle strutture ossee, favorendone la biorigenerazione. Questo processo sembra essere correlato allo sviluppo, sulla superficie del biomateriale, di uno strato di idrossi-carbonato di apatite (HCA) dalle caratteristiche simili alla componente minerale della matrice ossea [Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂] (Kokubo et al, 1990; Hench, 1998; Filgueiras et al, 1993).

La velocità di formazione dello strato di HCA dipende dalla composizione della matrice vetrosa; il processo è rapido in presenza dei sistemi ternari CaO-SiO₂-P₂O₅ (circa 6 ore), mentre è molto più lento (~ 3 giorni) con i sistemi binari CaO-SiO₂ (Filgueiras, 1993; Ohtsuki et al, 1992).

La bioattività di un materiale *in vivo* può essere studiata anche *in vitro*, immergendo il campione in appropriate soluzioni e determinando la concentrazione di ioni calcio e fosfato rilasciati. Nel nostro caso, le prove di bioattività *in vitro* sono state precedute da un test preliminare, teso a valutare la dissoluzione della matrice silicea in ambiente acquoso. Allo scopo di definire il comportamento del *network* inorganico in funzione del tipo di soluzione, i sol gel- bioattivi (B) sono stati immersi per 30 minuti in tre diversi campioni costituiti, rispettivamente, da: (i) una soluzione contenente NaCl allo 0.9%, (ii) H₂O deionizzata, e (iii) una soluzione tampone Tris-HCl 0.01M, pH 7.2.

Il **grafico 7.4** illustra la concentrazione degli ioni (Ca²⁺, PO₄³⁻, Si⁴⁺) rilasciata dal campione B nelle tre soluzioni esaminate.

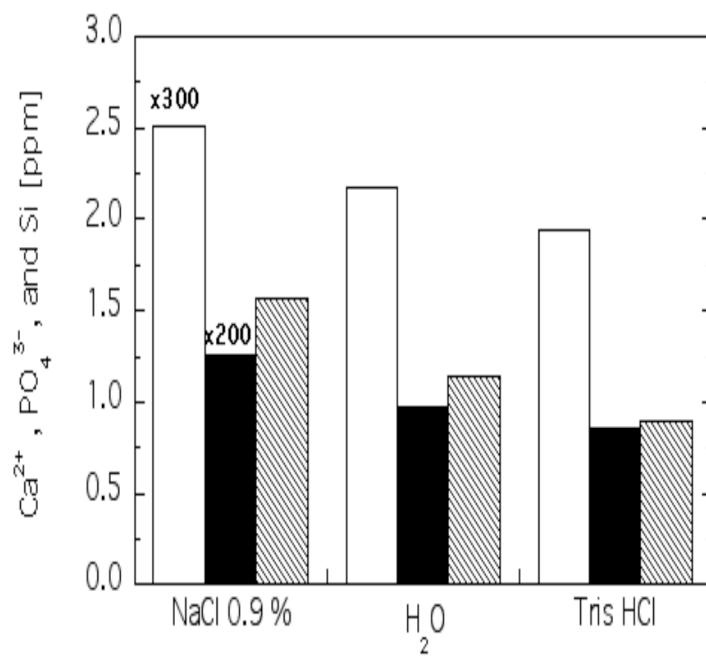


Grafico 7.4 Concentrazione ioni calcio (i. bianchi), fosfato (i. neri) e silicio (i. tratteggiati) rilasciati dal gel bioattivo (B) nelle soluzioni esaminate (NaCl allo 0.9%, acqua deionizzata e 0.01M Tris-HCl).

Dai valori determinati, emergono le seguenti considerazioni: l'elemento rilasciato in maggiore quantità (in tutte le soluzioni esaminate) è lo ione calcio, sebbene la sua concentrazione vari in funzione della composizione della soluzione esaminata. Anche lo ione fosfato è presente in relativa quantità; tuttavia, la sua concentrazione è sempre inferiore a quella dello ione calcio (valori medi: circa 660 ppm per lo ione calcio, circa 110 ppm per lo ione fosfato). Lo ione rilasciato in minore quantità è certamente il silicio (concentrazione media: circa 2 ppm). In pieno accordo con dati recentemente pubblicati (Barba et al, 2003), i nostri risultati mostrano che la concentrazione degli ioni rilasciati dal campione B è fortemente dipendente dalla composizione della soluzione esaminata.

In particolare, la soluzione di NaCl allo 0.9% si è rivelata come il sistema che maggiormente favorisce la solubilizzazione degli ioni, mentre la soluzione tampone Tris-HCl, pH 7.2 sembra essere il sistema che maggiormente rallenta il processo.

Dall'analisi della quantità di silice rilasciata, è possibile affermare che la matrice inorganica rimane praticamente intatta, quando immersa nella soluzione tampone.

L'integrità strutturale della matrice silicea è certamente una caratteristica fondamentale dei biomateriali. Si è perciò cercato di stabilire: (i) se il chitosano influenza la quantità di ioni rilasciati in soluzione; e (ii) l'effetto esercitato dalla soluzione di Tris-HCl sul processo di dissoluzione degli ibridi. Il **grafico 7.5** illustra la concentrazione degli ioni calcio e fosfato rilasciata dai campioni B, BK1, BK2 e BK3 nella soluzione di Tris-HCl 0.01M, pH 7.2 a 25° C, in funzione del tempo d'immersione. I dati per i singoli campioni (determinati, rispettivamente, a 30 min, 180 min. e 1440 min.) sono illustrati nei pannelli (a),(b) e (c) del grafico 7.5.

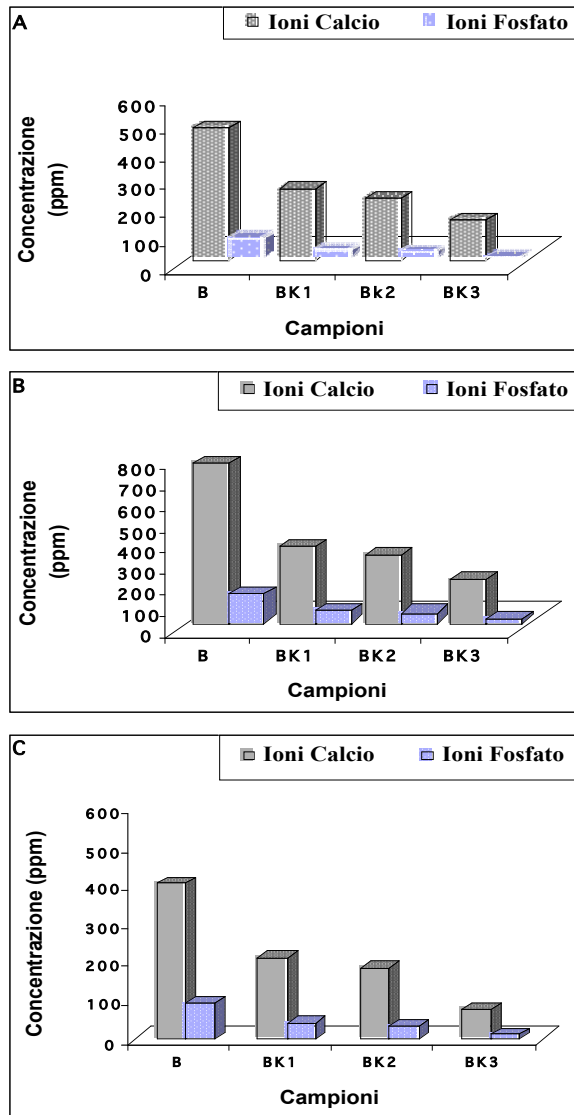


Grafico 7.5 Concentrazione ioni calcio e fosfato rilasciata dai campioni dopo 30 min (pannello A), 180 min (pannello B) e 1440 min (pannello C) d'immersione nella soluzione di Tris-HCl(pH7.2).

Il processo di dissoluzione dei campioni è stato analizzato ad intervalli di tempo, Δt_1 (30 min - 6 h), e Δt_2 (6 h - 24 h). Si osserva un progressivo rilascio degli ioni nella soluzione; la concentrazione massima viene raggiunta dopo circa 6 ore. La **tabella 7.6** riporta l'incremento della concentrazione degli ioni calcio e fosfato nei diversi campioni, nell'intervallo di tempo Δt_1 .

| Campione | Ioni (ppm) | |
|------------|------------------|-------------------------------|
| | Ca ²⁺ | PO ₄ ³⁻ |
| B | 290,75 | 64,24 |
| BK1 | 114,79 | 30,9 |
| BK2 | 103,48 | 21,73 |
| BK3 | 70,14 | 11,09 |

Tabella 7.6 Incremento concentrazione ioni calcio e fosfato rilasciati nella soluzione d'immersione (0.01M Tris-HCl) nell' intervallo Δt_1 .

Come illustrato nel **grafico 7.7**, l'incremento della concentrazione degli ioni calcio e fosfato ($\Delta[Ca]^{2+}$ e $\Delta[PO_4]^{3-}$) nell'intervallo di tempo Δt_1 , varia in funzione del contenuto in chitosano; in particolare, l'andamento del processo appare dipendere dal tipo di ione, risultando lineare per il calcio ed esponenziale per il fosfato.

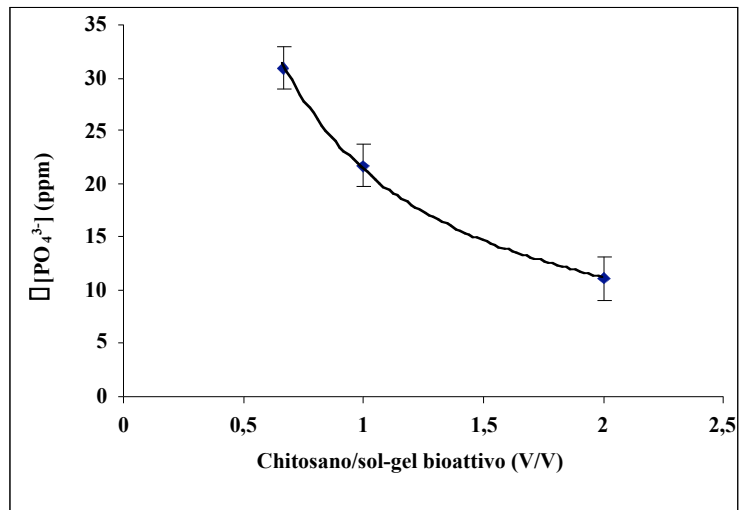
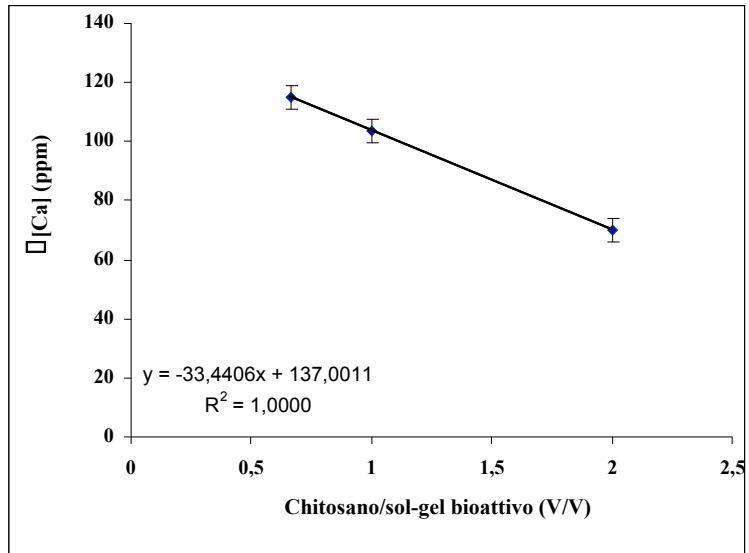


Grafico 7.7 Incremento concentrazione ioni calcio e fosfato, $[Ca]^{2+}$ e $[PO_4^{3-}]$, nella soluzione d' immersione (0.01M Tris-HCl) nell' intervallo di tempo t_1 (30 min-300 min.) in funzione del contenuto di chitosano.

La fase iniziale, caratterizzata da un aumento della concentrazione degli ioni calcio e fosfato nella soluzione d'immersione, è poi seguita da una loro marcata diminuzione. Come mostrato chiaramente nel grafico 7.5 dopo 24 h la concentrazione degli ioni disciolti è minore di quella misurata nell'intervallo di tempo Δt_1 . In accordo con dati già riportati per i vetri sol-gel (Ramila and Vallet-Regi, 2001), tale fenomeno può essere attribuito al progressivo ri-adsorbimento degli ioni sulla superficie dei campioni, con conseguente formazione di un strato di HCA. Studi hanno dimostrato che la composizione chimica degli xerogel agisce sulla velocità di sintesi dello strato di HCA; nei campioni privi di calcio e fosfato la precipitazione richiede un periodo di tempo compreso tra 4 e 10 giorni, mentre per gli xerogel bioattivi (che contengono gli ioni in esame) la formazione dello strato di apatite avviene in un intervallo di tempo compreso tra le 24 e le 48h (Radin et al, 2002; Padilla et al, 2005).

Il meccanismo ipotizzato per la formazione dello strato di HCA sulla superficie dei sol-gel bioattivi è del tutto simile a quello elaborato per le matrici vetrose sintetizzate con i metodi convenzionali. Il gel di silice idratato potrebbe esercitare un effetto catalitico sul processo di nucleazione dello strato di apatite. In particolare, la sintesi dello strato di apatite rappresenta il risultato conclusivo di una serie di reazioni, quali (i) il rapido scambio tra gli ioni Ca^{2+} del bio-materiale e gli ioni H^+ della soluzione; ii) la perdita della frazione solubile della silice $Si(OH)_4$, seguita dalla formazione dei gruppi silanolo ($SiOH$) all'interfaccia matrice-soluzione; iii) sintesi, sulla superficie del sol-gel bioattivo, di uno strato ricco di SiO_2 ; iiiii) migrazione degli ioni calcio e fosfato dalla soluzione alla superficie di SiO_2 , con formazione di uno strato amorfo di fosfato di calcio; iiiiii) cristallizzazione dello strato amorfo in HCA.

La percentuale di ri-adsorbimento, I (%), degli ioni calcio e fosfato relativa ad ogni campione al termine dell'intervallo di tempo Δt_2 , è stata calcolata come segue: I (%) = $[I(6h) - I(24h)] / I(6h)$.

I valori riportati nella **tabella 7.8** forniscono un dato estremamente interessante: se da un lato il chitosano riduce drasticamente il rilascio ioni calcio e fosfato, dall'altro questo fenomeno non sembra influenzare il tasso di ri-adsorbimento e, quindi, la formazione dello strato di HCA. Fa eccezione solo il campione BK3.

| Campione | I (%) | |
|-----------------|------------------------|------------------------------------|
| | Ca²⁺ | PO₄³⁻ |
| B | 0.46 | 0.38 |
| BK1 | 0.43 | 0.40 |
| BK2 | 0.44 | 0.38 |
| BK3 | 0.62 | 0.60 |

Tabella 7.8 Percentuale di ri-adsorbimento degli ioni calcio e fosfato dopo 24 h d' immersione nella soluzione 0.01M Tris-HCl.

7.3 Prove di swelling

Il **grafico 7.9** riporta i risultati delle prove di rigonfiamento, che permettono di analizzare le proprietà di rigonfiamento degli ibridi.

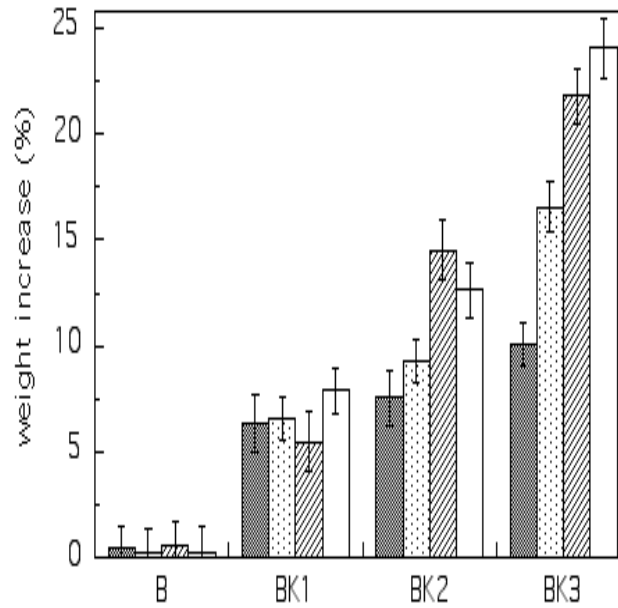


Grafico 7.9 Incremento percentuale in peso (W%) dei campioni dopo 6h (i.neri), 24h (i.punteggiati), 48h (i. tratteggiati) e 56h (i. bianchi) d' immersione nella soluzione tampone. Condizioni sperimentali: 0.01M Tris-HCl, pH 7.2 a 25° C.

I campioni sol-gel sono stati immersi, in presenza ed in assenza di chitosano, in una soluzione 0.01M di Tris-HCl, pH 7.2, e pesati ad intervalli di tempo prestabiliti (6h, 24h, 48h, 54h). La variazione percentuale di peso (W%), con riferimento al tempo iniziale, t_0 (i.e., prima dell'aggiunta del tampone), fornisce una misura della capacità di rigonfiamento dei campioni. I risultati ottenuti mostrano chiaramente che la variazione di peso varia in funzione della composizione del campione. Se confrontati con il campione B, gli ibridi presentano un notevole incremento in peso, che dipende significativamente dalla concentrazione del bio-polimero.

Per rapporti gel-bioattivo/chitosano > 1 (i.e., campione BK1), non si osservano variazioni di peso apprezzabili nell'arco delle 24h. Al contrario, per gli ibridi a maggiore contenuto di chitosano il processo richiede tempi più lunghi per raggiungere l'equilibrio (i dati sono stati registrati dopo 48h e 54 h, per i campioni BK2 and BK3). Il processo di rigonfiamento risulta essere influenzato dalla composizione del materiale; in particolare, i campioni con componente organica prevalente su quella inorganica mostrano maggiore capacità di rigonfiamento.

E' noto che le membrane di chitosano si rigonfiano in soluzione acida (Park et al, 2001), mentre si restringono in ambiente basico a causa della ionizzazione del gruppo amminico. Nel presente studio, la matrice silicea utilizzata per incorporare il polimero presenta un pH molto acido (pH 2-2.5). Dunque, sebbene mostri un pH iniziale vicino alla neutralità ($pH_i = 7.2$), la soluzione d'immersione subisce una diminuzione di pH quando entra in contatto con i campioni studiati (come chiaramente illustrato nel **grafico 7.10**, che mostra la variazione di pH misurata nella soluzione dopo 30 min., 360 min e 1440 min dall'immersione dei campioni). Il rigonfiamento degli ibridi può essere quindi attribuito alla protonazione del gruppo amminico del chitosano.

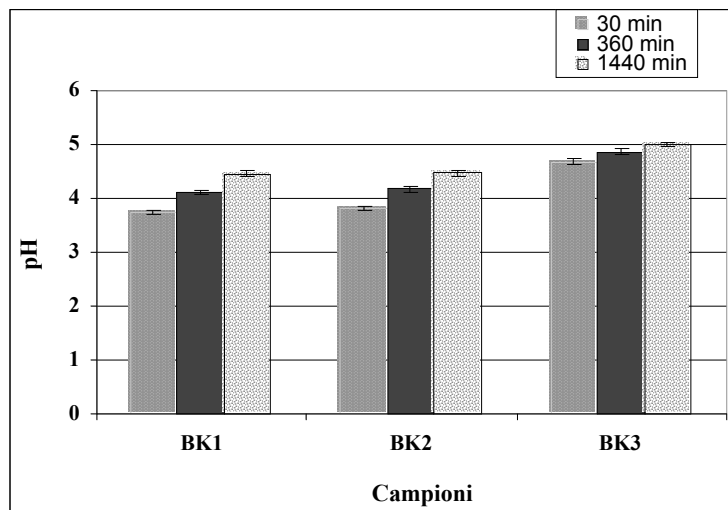


Grafico 7.10 Variazione pH della soluzione d' immersione (Tris-HCl pH 7.2) dopo 30min., 360 min. e 1440 min.

Nel processo di rigonfiamento, le interazioni elettrostatiche tra macromolecole giocano un ruolo primario. Come dimostrato da Ayers e Hunt (2001), il chitosano inibisce il restringimento della matrice silicea riducendo la reazione di condensazione superficiale tra particelle di silice adiacenti. Ci si aspetta quindi che i campioni a maggiore contenuto di chitosano riducano la compattezza della struttura del gel, permettendo così un maggiore assorbimento di acqua nei campioni immersi nella soluzione. Il volume del gel ionico dipende inoltre da altri due fattori: (i) la pressione osmotica, dovuta alla differenza di concentrazione tra gel e soluzione esterna, e (ii) la pressione di rigonfiamento del *'network'*, che tende a mantenere il volume del gel costante.

Data la natura chimica degli ibridi, il processo di ripiegamento risulta influenzato anche dalla componente inorganica del sistema, che esercita solitamente un effetto inibente (Martinez et al, 2004). Nel nostro studio, i campioni a maggiore contenuto di TMOS mostrano una minima capacità di rigonfiamento, attribuibile alla rigidità della struttura del *'network'*.

7.4 Permeabilità

La permeabilità dei bio-materiali è stata studiata misurando la diffusione di un 'probe' fluorescente attraverso la matrice. A tale scopo, i campioni B, BK1, BK2 e BK3 sono stati immersi per tempi diversi (30 min, 300min, 1440 min) in una soluzione 0.01M Tris-HCl, pH 7.2, contenente la sonda nota come RubPy. Siccome l'immersione dei campioni nella soluzione determina l'insorgere di un processo diffusivo all'interfaccia matrice-soluzione, è possibile seguire il processo diffusivo determinando, mediante spettroscopia di fluorescenza, la quantità residua di sonda fluorescente in soluzione. Il **grafico 7.11** mostra la variazione di intensità di fluorescenza nella soluzione, misurata ai tempi sopra citati.

Appare chiaro che nei tempi brevi (30 min) la fluorescenza residua della soluzione dipende dalla quantità di chitosano presente; successivamente, il processo di diffusione del probe all'interno della matrice rallenta solo per i biopolimeri con rapporto chitosano/sol-gel > 1. Tale effetto, tuttavia, si riduce significativamente nel tempo. Come dimostrato dalle misure di fluorescenza, a 24h dall'immersione tutti i campioni esaminati assorbono la stessa quantità di 'probe', indipendentemente dalla composizione del gel.

Dunque, il chitosano influenza il processo diffusivo solo nella prima fase; come evidenziato dai dati sperimentali, trascorse 5 h non si osservano più differenze nel processo. Sembra probabile il raggiungimento di un medesimo stato di equilibrio come risultato della completa diffusione del 'probe' all'interno delle stesse matrici. La diffusione del 'probe' fluorescente viene confermata dalla variazione di colore osservata nei campioni esaminati; inizialmente trasparenti, essi diventano gialli con il passare del tempo. Inoltre, l'intensità del colore varia proporzionalmente con il tempo d'immersione (come confermato dalle misure di fluorescenza). L'incremento del processo diffusivo dopo 24h può essere attribuita al rigonfiamento dei campioni ed ai cambiamenti nella reticolazione della matrice.

Alla luce dei dati ottenuti dalle prove di permeabilità e di rigonfiamento, è stato elaborato un modello relativo alla struttura degli ibridi, mostrato in **figura 7.12**.

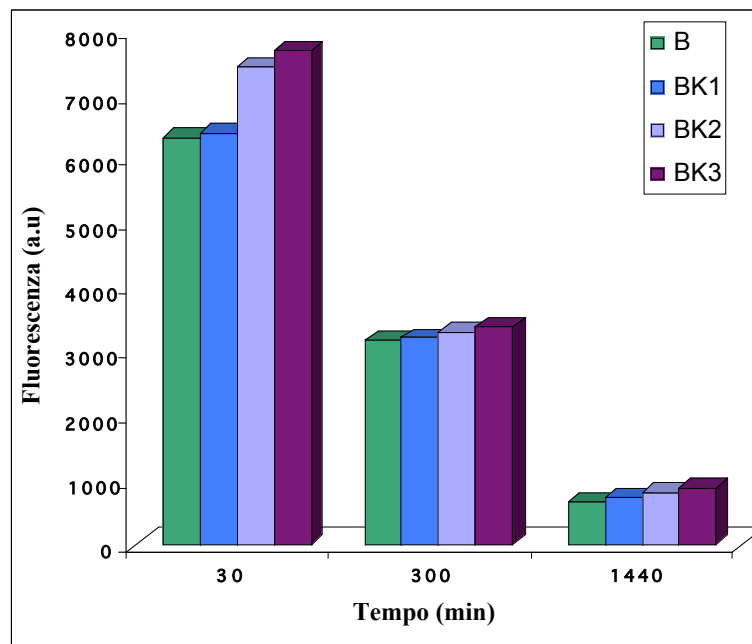


Grafico 7.11 Fluorescenza residua della soluzione di RubPy dopo immersione dei campioni per 30 min., 300 min. e 1440 min.

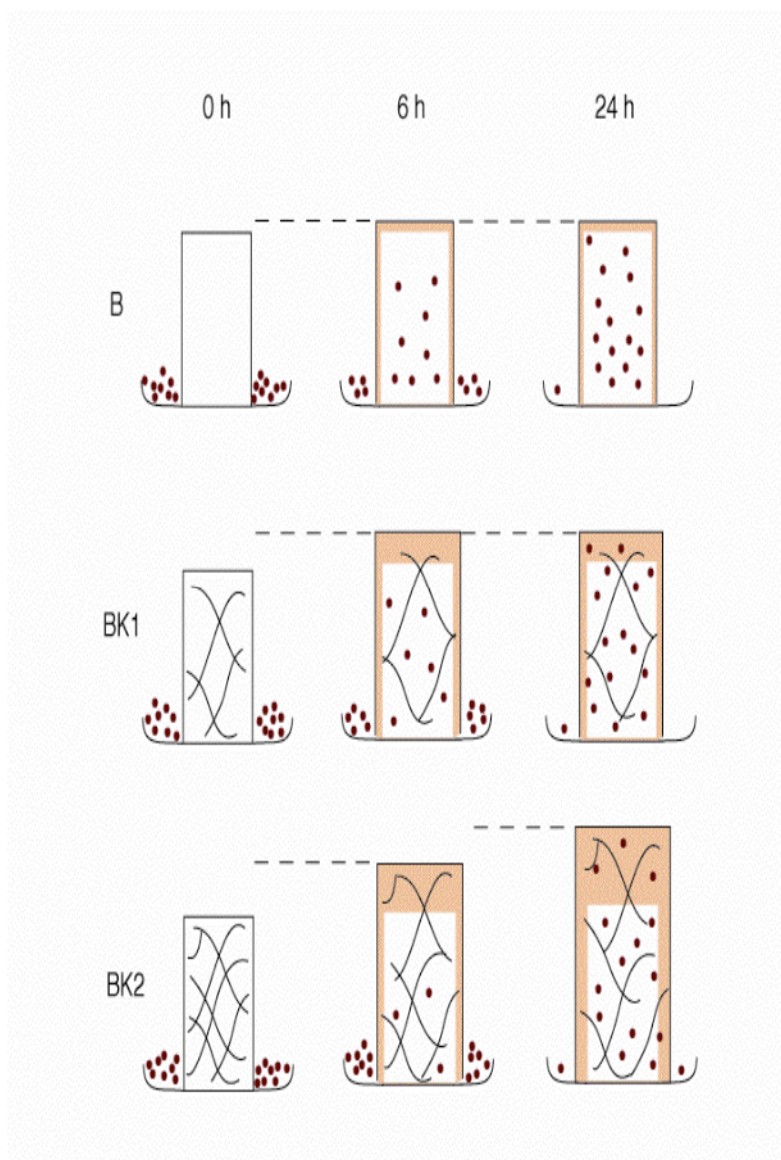


Figura 7.12 Modello elaborato per spiegare lo swelling e la permeabilità degli ibridi. Le linee nere rappresentano le molecole di chitosano, le palline rosse le molecole di RubPy e l'area colorata in arancione rappresenta l'incremento (%) del peso del campione.

7.5 Analisi delle immagini ottenute mediante microscopia confocale

Le immagini ottenute mediante microscopia confocale confermano alcuni precedenti dati sperimentali. Nella **figura 7.13**, è mostrato il confronto tra la superficie del sol-gel bioattivo (B) e quella dell ibrido BK1 dopo l'immersione dei campioni in una soluzione tampone Tris-HCl 0.01M, pH 7.2. Come precedentemente dimostrato dalla spettroscopia infrarossa in trasformata di Fourier, l'aggiunta di chitosano nella soluzione altera la struttura superficiale della matrice del sol-gel bioattivo

Nella **figura 7.14** è mostrato il confronto tra le superfici degli ibridi BK1 e BK2, dopo la loro immersione in soluzione per 48 h. Le microfotografie mostrano che il biopolimero modula il processo di ri-adsorbimento degli ioni calcio e fosfato, favorendo la formazione dei cristalli. I cristalli presenti sui campioni (per unità di superficie) sono correlati al contenuto in chitosano. Tuttavia, gli aggregati cristallini presenti sul campione BK2 sono più consistenti rispetto a quelli formati sulla superficie del campione BK1. Non è possibile affermare con certezza che si tratti di cristalli di idrossicarbonato di apatite (perchè non sottoposti a caratterizzazione strutturale); tuttavia, alla luce dei risultati precedenti, tale ipotesi sembra consistente.

Si è infine osservato (dati non mostrati) che, rispetto ai campioni BK1, BK2 e BK3, sulla superficie del sol-gel bioattivo sembra essere presente un più alto numero di popolazioni fungine, la cui quantità sembra dipendere significativamente dalla concentrazione di chitosano. Ciò confermerebbe un'azione antibatterica, antifungina ed antimicotica esercitata dal biopolimero (Roller and Covill, 1999; Liu X.F. et al, 2001; Qi L. et al, 2004; Shi Z. et al, 2006).

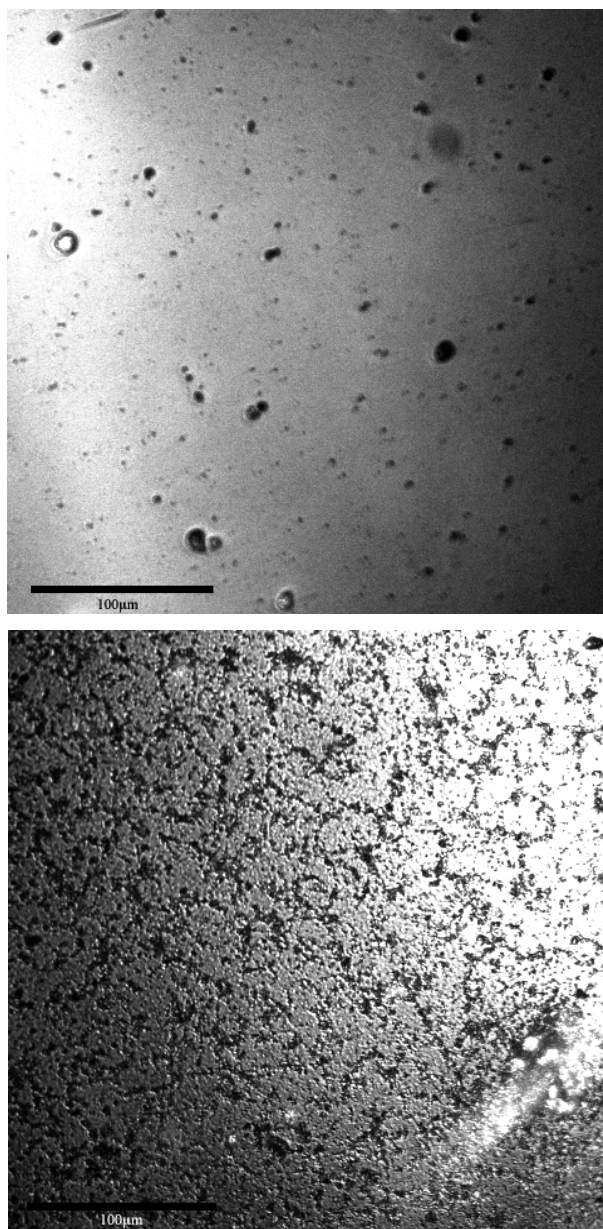


Figura 7.13 Microfotografie del sol-gel bioattivo (B) e dell' ibrido BK1 dopo 48h d' immersione nella soluzione 0.01M di Tris-HCl.

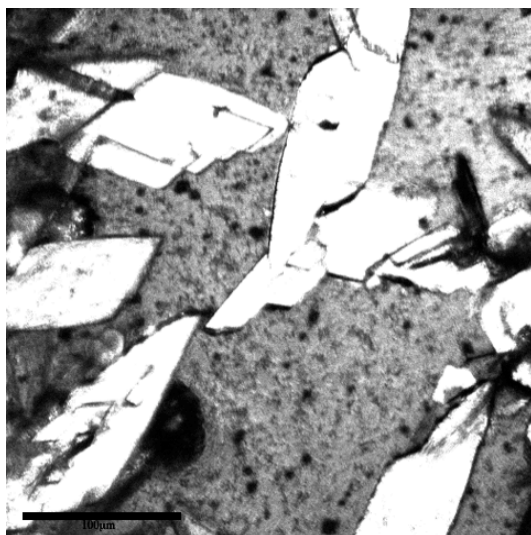
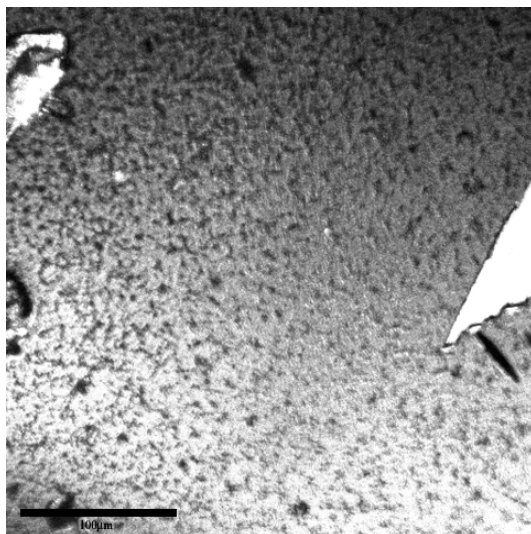


Figura 7.14 Microfotografie del campione BK1 e BK2 dopo 48h d' immersione nella soluzione 0.01M Tris-HCl.

Capitolo 8

Risultati e discussione: Citocromo c incapsulato nel bio sol-gel

8.1 Caratterizzazione delle matrici sol-gel

Le proprietà strutturali del citocromo c incapsulato nella matrice bio sol-gel sono state studiate confrontando gli spettri di assorbimento elettronico e CD ottenuti, con quelli della proteina in soluzione (condizioni sperimentali: tampone Tris-HCl, pH 7.0 e 25° C). Sono state anche investigati: il processo di denaturazione acida, la stabilità e le proprietà elettrochimiche della proteina incapsulata.

Prima di effettuare indagini sul citocromo c incapsulato sono state caratterizzate, mediante analisi elementare, le matrici, prive (matrici sol-gel) o contenenti nitrato di calcio (matrici bio sol-gel). I risultati dell'analisi elementare sono riportati nella **tabella 8.1**, mentre la composizione molare dei campioni è riportata nella **tabella 8.2**.

| | |
|---------------------------------------|--------------|
| Bio Sol-Gel | |
| (contenente nitrato di calcio) | |
| N | 3,6 % |
| C | 0,7 % |
| H | 1,6 % |
| S | 0 % |
| Sol-Gel | |
| (privo di nitrato di calcio) | |
| N | 0,3 % |
| C | 1,1 % |
| H | 1,4 % |
| S | 0 % |

Tabella 8.1 Risultati dell' analisi elementare sui campioni Bio Sol-Gel e Sol-gel

| Composizione molare del Bio Sol-Gel (contenente nitrato di calcio) | | |
|---|--------------------------|------------------------|
| <i>Ossidi</i> | <i>mmol Iniziali</i> | <i>Contenuto %</i> |
| CaO | 4.2 | 13.125 |
| N₂O₅ | 4.2 | 13.125 |
| SiO₂ | 23.6 | 73.75 |

| Composizione molare del Sol-Gel (privo di nitrato di calcio) | | |
|---|--------------------------|------------------------|
| <i>Ossidi</i> | <i>mmol Iniziali</i> | <i>Contenuto %</i> |
| SiO₂ | 23.6 | 73.75 |

Tabella 8.2: Composizione molare del bio sol-gel e del sol-gel.

8.2 Il Citocromo c in soluzione

Le proprietà spettrali del citocromo *c* a pH 7.0 sono ben note, mentre non si conoscono quelle in presenza di nitrato di calcio a concentrazione relativamente alta. Per cui, prima di studiare l'effetto del sale sulla struttura del citocromo *c* intrappolato in una matrice bio sol-gel, è stato effettuato uno studio preliminare sulla proteina in soluzione (condizioni sperimentali: 50 mM Tris-HCl, pH 7.0).

Come mostrato nella **figura 8.3**, a pH 7.0 gli spettri di assorbimento (UV-Vis) della proteina, registrati in assenza ed in presenza di $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, sono praticamente indistinguibili. Entrambi mostrano la banda Soret a 409 nm e le bande Q tra 560 e 530 nm. Anche lo spettro dicroico, registrato nella regione Soret (400-450 nm), rimane invariato (**figura 8.4**), mostrando in entrambi i casi la banda positiva posizionata tra 405-408 nm e la banda negativa centrata a 416 nm. Quest'ultima viene considerata diagnostica per il legame assiale Fe(III)-Met80, presente nella proteina nativa (Pielak et al, 1986). L'assorbimento dell'eme nella regione Soret, fornisce informazioni sullo stato di spin della proteina e sulla natura dei ligandi di coordinazione del ferro-eme. I risultati ottenuti indicano che il Fe(III) è esa-coordinato a basso spin, e lega l'His18 e la Met80 come ligandi assiali. Nell'insieme, i dati spettrali mostrano che in soluzione la struttura nativa della proteina non viene alterata dal $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$.

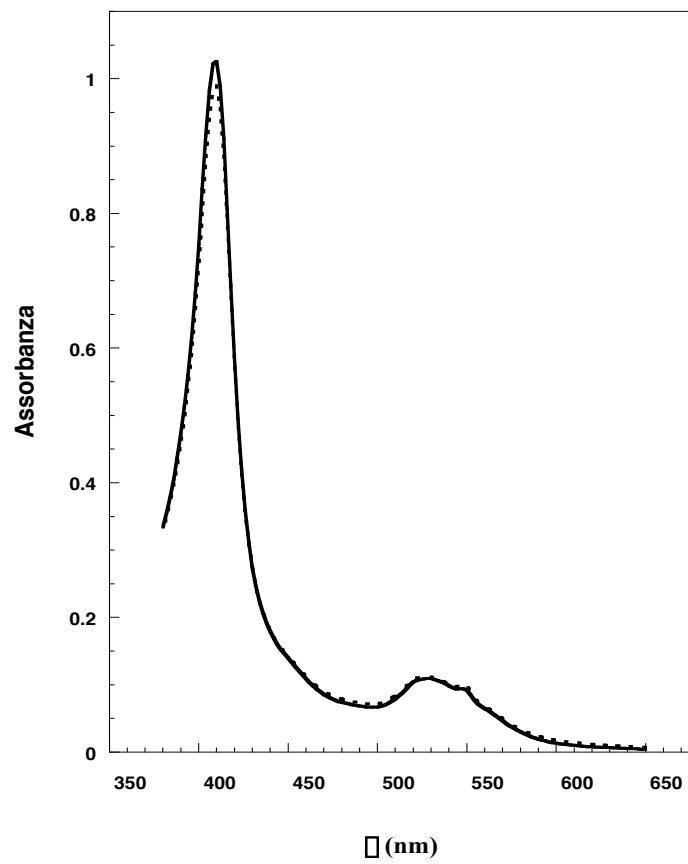


Figura 8.3 Spettri di assorbimento elettronico del citocromo c in una soluzione tampone (50mM Tris-HCl a pH 7.0) in presenza (—) ed in assenza di $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 0.6 M (----).

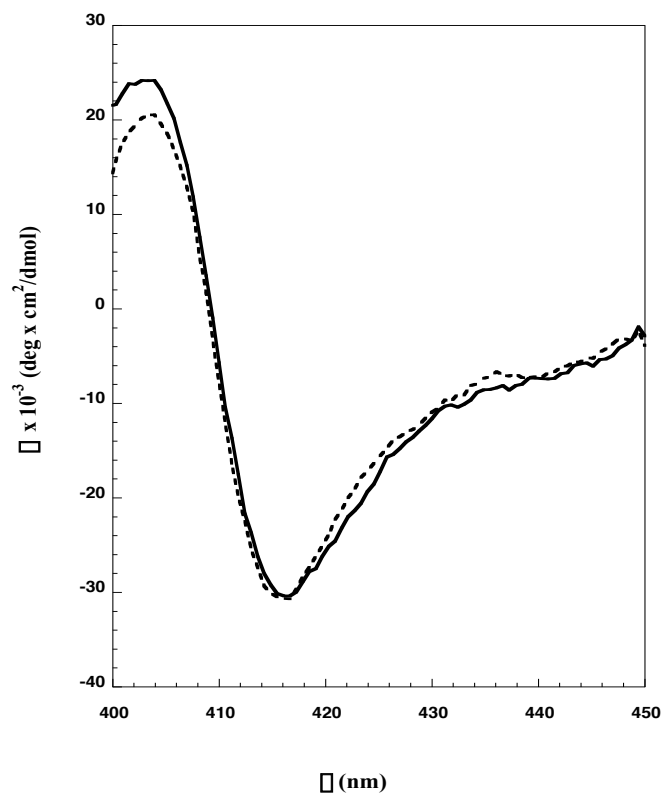


Figura 8.4 Spettri CD nella regione del Soret del citocromo c in presenza (—) ed in assenza (---) di nitrato di calcio. Condizioni sperimentali: tampone 50mM Tris-HCl (pH 7.0); 0.6 M $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$

La stabilità di una proteina viene solitamente determinata attraverso studi di denaturazione indotta da vari fattori, quali ambiente acido, presenza di denaturanti chimici, trattamento termico (Prajapati et al, 1998; Bhakuni et al, 1991). E' stata qui studiata la denaturazione acida del citocromo c (soluzione acquosa di HCl, pH 1.5), allo scopo di determinare gli effetti provocati dall'aggiunta del sale.

La **figura 8.5** mostra gli spettri di assorbimento elettronico relativi alla denaturazione acida del citocromo c, in assenza e in presenza di nitrato di calcio. L'inset della figura 8.5 evidenzia le bande comprese tra 500 e 650 nm. Come precedentemente riportato, lo spettro della proteina a pH 7.0 è caratterizzato da una banda Soret a 409 nm e dalle bande Q tra 560 e 530 nm. La banda Soret, che è correlata allo stato di spin e alla natura dei ligandi del Fe-eme, durante il processo di acidificazione subisce uno spostamento verso il blu (da 410 nm, pH 7.0, a 394 nm, pH 1.5). In presenza di $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ si osserva lo stesso fenomeno; in questo caso, tuttavia, il massimo di assorbimento risulta centrato a 401 nm, non a 394 nm. Da ciò si deduce che a pH acido la proteina si presenta completamente denaturata o parzialmente ripiegata, a seconda che il sale non sia o sia presente in soluzione. Dunque, il sale esercita un effetto protettivo sulla struttura proteica, impedendone la completa denaturazione. L'inset della **figura 8.5** conferma i dati sopra descritti. Gli spettri di assorbimento elettronico del citocromo c registrati a pH 1.5 mostrano la comparsa di una banda centrata a 620 nm, associata alla presenza di specie ad alto spin. La variazione spettrale, da attribuirsi alla conversione di specie a basso spin (forma nativa) in specie ad alto spin (stato denaturato), è molto più accentuata nella soluzione priva di sale. La marcata riduzione dell'intensità della banda a 620 nm in presenza del sale, suggerisce (i) che una significativa popolazione di molecole proteiche è rimasta nello stato di basso spin, e (ii) che esiste un equilibrio tra specie a basso (LS) e specie ad alto spin (HS).

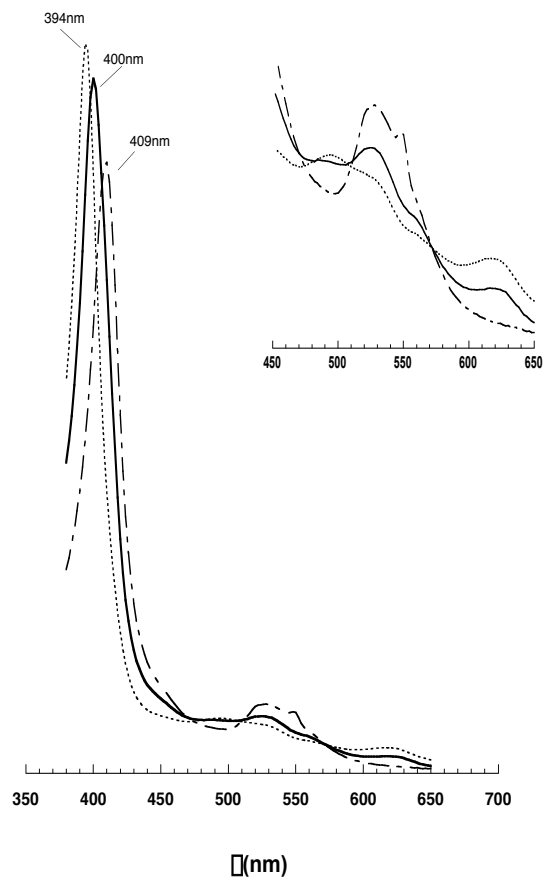


Figura 8.5 Spettri di assorbimento elettronico del citocromo c a pH 1.5 in presenza (—) ed in assenza (...) di nitrato di calcio. Lo spettro della nativa è riportato per confronto. Condizioni sperimentali: 50mM Tris-HCl (pH 7.0); 0.6 M $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$

Numerosi lavori hanno dimostrato che moderate concentrazioni di guanidina o urea inducono nel citocromo c la formazione di uno stato compatto privo della coordinazione nativa Met80-Fe(III). Il legame Fe(III)-His18 non risulta invece perturbato, grazie alla vicinanza dei residui di cisteina che ancorano l'eme alla catena polipeptidica. Il legame Fe-His18 risulta stabilizzato da questo evento e viene rotto solo in condizioni estreme (come, ad esempio, in presenza di guanidina cloridrato, pH 3.3). Mediante misure NMR e di Risonanza Raman è stato evidenziato che alte concentrazioni di guanidina o urea inducono la sostituzione della Met80 con una istidina (His33 o His26), originando un intermedio esa-coordinato (6c) a basso spin (LS), in cui l'eme risulta più rilassato rispetto alla proteina nativa (Yeh et al, 1998). Studi su mutanti hanno dimostrato che il ligande assiale predominante nel processo di denaturazione del citocromo c, è l'His 33 (Colon et al, 1997).

A pH acido, si ha la formazione di specie penta- (5c) ed esa-coordinate (6c) ad alto spin (HS). La presenza di un eme esa-coordinato ad alto spin (6cHS) è da attribuirsi alla configurazione His-H₂O, in cui il ligando della nativa His18 rimane coordinato al ferro mentre uno dei due residui di istidina viene sostituito da una molecola di acqua. In condizioni di estrema acidità, l'ulteriore protonazione dell'His18, porta alla formazione di specie penta-coordinate ad alto spin (5cHS), in cui vengono rotti i legami assiali tra metallo e Met80 ed His18. Pertanto una molecola di H₂O è l'unico ligando assiale dell'eme. La **tabella 8.6** riassume i cambiamenti di stato di spin dell'eme del citocromo c nelle diverse condizioni sperimentali.

| Condizioni sperimentali | Configurazione eme | | | | |
|--------------------------------|--------------------|---------------------------|--|-----------------|------------------|
| | 5cHS His | 5cHS 2H ₂ O | 6cHS2 H ₂ O-H ₂ O | 6cLS Met-His | 6cLS2 His-His |
| pH 7.0 | | | | X | |
| Sol-gel pH 7.0 | | | | X | |
| pH <1.3 □ I.S | | X | X | X | X |
| Sol-gel pH 1.5 | | X | X | X | |
| pH 0.3-1.9 ↑ I.S | | X | X | | X |
| Sol-gel pH 0.35 | | X | X | | |
| pH 7.0 GdHCl 6.3 M | | | | | X |
| Sol-gel pH 7.0, GdHCl 6.3 M | X | | | | X |
| pH 1.5, GdHCl 6.3 M | | X | X | | X |
| Sol-gel pH 1.5, GdHCl 6.3M | | X | X | | X |

Tabella 8.6 Schema dei cambiamenti dello stato di coordinazione-spin osservati per il citocromo c in diverse condizioni sperimentali.

Nella **figura 8.7** sono riportati gli spettri CD nella regione del Soret del citocromo *c* in presenza di $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ a pH 1.5 e a pH 7.0. La denaturazione acida induce la scomparsa della banda negativa centrata a 416 nm ed un incremento della banda positiva centrata a 405-408 nm. Questi dati sono da correlarsi con le variazioni conformazionali nella tasca dell'eme, in particolare alla rottura del legame di coordinazione tra Fe(III) e Met80 (Santucci and Ascoli, 1997).

Il processo di denaturazione/rinaturazione (*unfolding/folding*) è completamente reversibile, sia in assenza che in presenza di sale; ripristinate le condizioni di neutralità, gli spettri UV-Vis e dicroici tornano quelli tipici della proteina nativa (non mostrati).

In accordo con i dati riportati in letteratura, i nostri risultati indicano che il sale impedisce la completa denaturazione del citocromo *c*. In ambiente acido, i Sali stabilizzano stati intermedi di proteine, che presentano regioni ordinate con struttura simile a quella della nativa, e regioni più fluttuanti. Generalmente, la struttura secondaria è comparabile a quella dello stato nativo, mentre la struttura terziaria è molto meno rigida. In particolare, in ambiente acido (pH 2.0-2.2) i sali stabilizzano lo stato-A del citocromo *c*, uno stato compatto con le proprietà tipiche del *molten globule* (Goto et al, 1990; Jeng et al, 1990; Goto et al, 1991). L'effetto stabilizzante del sale è stato attribuito agli anioni, la cui concentrazione e le cui dimensioni giocano un ruolo importante (l'effetto è tanto più grande quanto maggiore è la loro dimensione) (Sinibaldi et al, 2003).

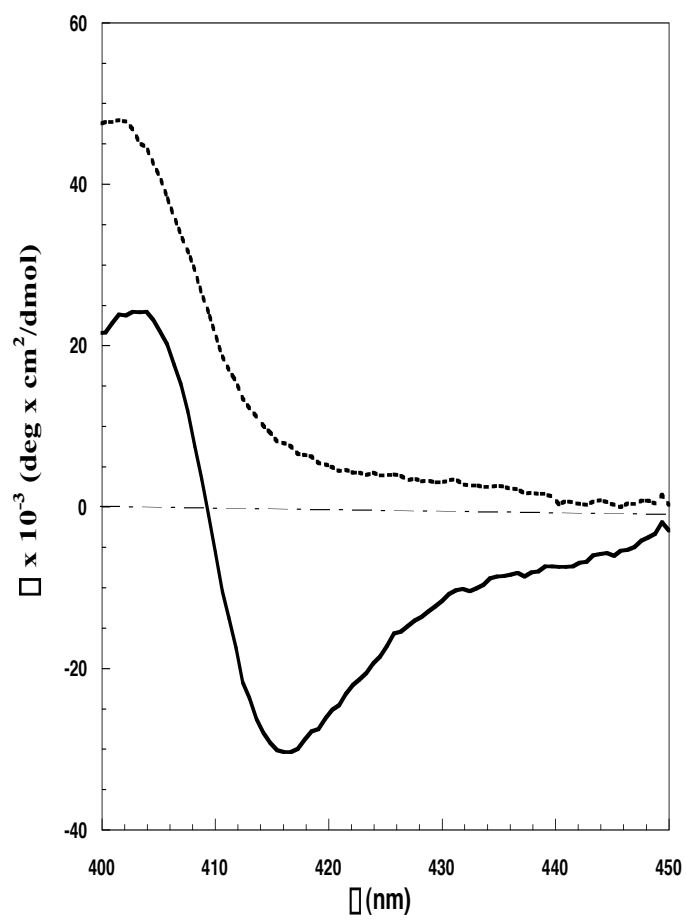


Figura 8.7 Spettri CD nella regione del Soret del citocromo c a pH 1.5 (---) e a pH 7.0 (—) in presenza di nitrato di calcio. Condizioni sperimentali: tampone 50mM Tris-HCl plus 0.6 M Ca(NO₃)₂.

8.3 Il Citocromo c incapsulato nel bio sol-gel

Sebbene numerosi lavori dimostrino che le molecole incapsulate in una matrice sol-gel mantengano le proprietà strutturali tipiche della forma nativa, ad oggi non ci sono notizie di studi effettuati su proteine immobilizzate in un bio-sol-gel, ossia in un sol-gel biocompatibile sintetizzato aggiungendo nitrato di calcio al precursore siliceo.

Negli studi effettuati nel nostro laboratorio i campioni, preparati sotto forma di monoliti, si presentano trasparenti ed omogenei (condizioni essenziali per le tecniche spettroscopiche utilizzate). Le **figure 8.8** ed **8.9** mostrano gli spettri di assorbimento elettronico e CD del campione di citocromo c nel bio-sol-gel, immediatamente dopo la sua sintesi. Gli spettri sono confrontati con quelli della proteina nativa.

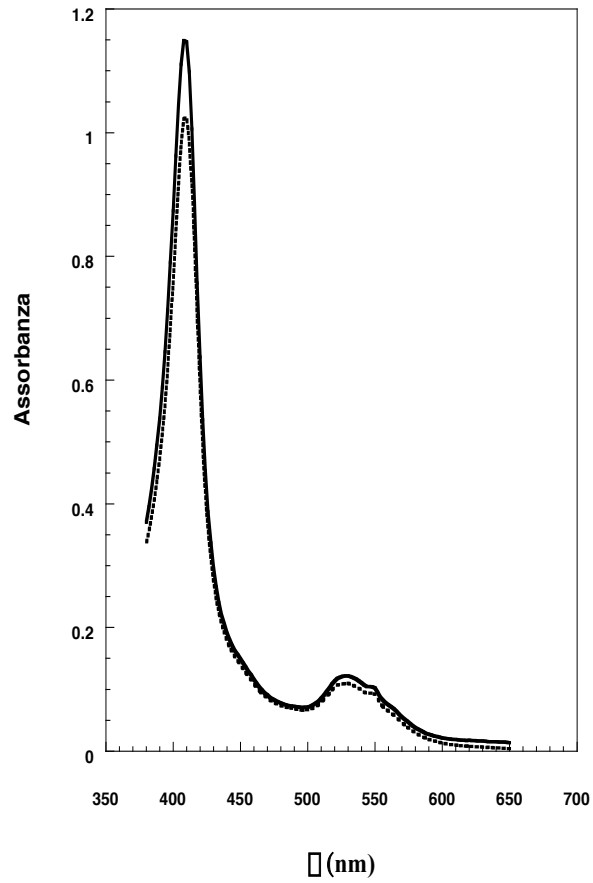


Figura 8.8 Spettro di assorbimento elettronico del citocromo c incapsulato nel bio sol-gel (—); lo spettro della proteina nativa (---) è riportato per confronto. Condizioni sperimentali: 50mM Tris-HCl, pH 7.0.

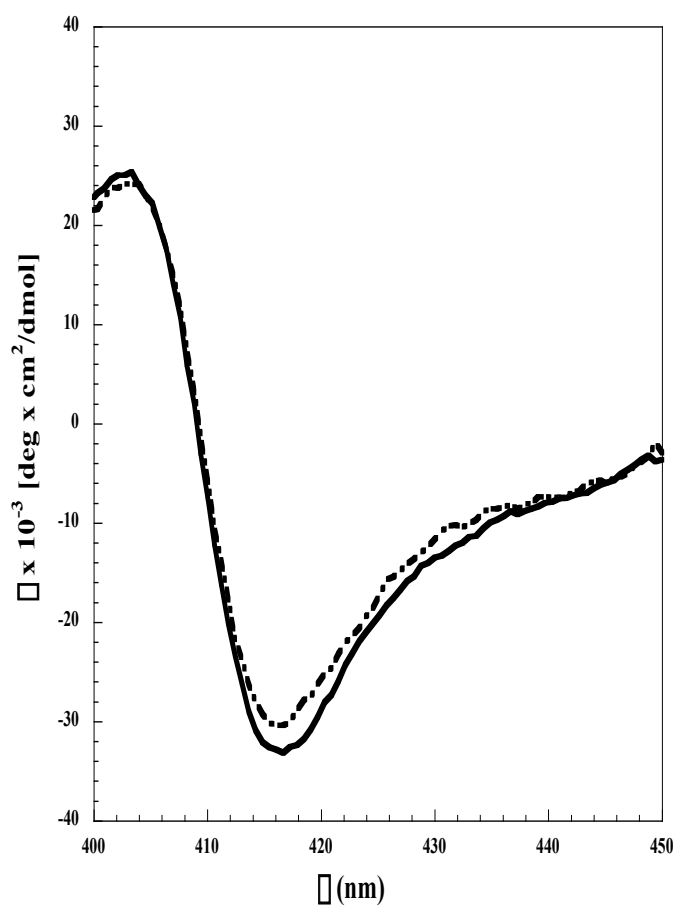


Figura 8.9 Spettro CD nella regione del Soret del citocromo c incapsulato nel bio sol-gel (—); lo spettro della proteina nativa è riportato per confronto (---). Condizioni sperimentali: 50mM Tris-HCl pH 7.0.

In accordo con i risultati di numerosi studi su emoproteine incapsulate in sol-gel (Ellerby et al, 1992; Droghetti and Smulevich, 2005), nel bio sol-gel la proteina mantiene, a pH neutro, la struttura tipica della forma nativa, dal momento che non si osservano variazioni spettrali rispetto alla proteina in soluzione. Da un'attenta analisi della figura 8.8 emerge che, nella regione Soret, la banda d'assorbimento della proteina incapsulata è lievemente più intensa di quella della nativa. Tale incremento è da attribuirsi ad una variazione delle proprietà ottiche del sistema o alla presenza di solventi polari (come ad esempio il metanolo) che, formati durante la preparazione del sol-gel, interagiscono con gli aminoacidi aromatici delle proteine.

Lo spettro dicroico della proteina incapsulata nel bio sol-gel, registrato nella regione Soret, risulta identico a quello del citocromo c in soluzione. In particolare, il posizionamento delle bande dicroiche (praticamente identico a quello tipico della forma nativa) dimostrano che il processo di immobilizzazione non altera la struttura del citocromo c (Savini et al, 1999).

La transizione sol-gel, con la quale si intende il passaggio dalla fase sol alla fase gel e che corrisponde ad una maggiore reticolazione della matrice, è stata seguita mediante spettroscopia UV-Vis e dicroismo circolare. Le **figure 8.10a ed 8.10b** mostrano gli spettri di assorbimento elettronico relativo alla transizione della proteina incapsulata nella matrice sol-gel (sintetizzata in presenza o in assenza di $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$). Il processo è stato monitorato in un arco di tempo pari a 2h dalla sintesi dei campioni. I dati ottenuti mostrano che il processo di immobilizzazione non modifica le proprietà strutturali del citocromo c; tuttavia, si osserva in entrambi i casi (i.e., in presenza o assenza di sale) una riduzione della banda Soret. Poiché la concentrazione della proteina è costante nel tempo, la variazione di assorbanza della banda Soret può essere attribuita ad una possibile variazione del coefficiente di estinzione molare della proteina indotto dal processo di gelificazione della matrice. Durante il processo di gelazione, la struttura proteica potrebbe infatti essere influenzata dalla presenza del solvente alcolico e/o dal confinamento fisico nella matrice gelificata.

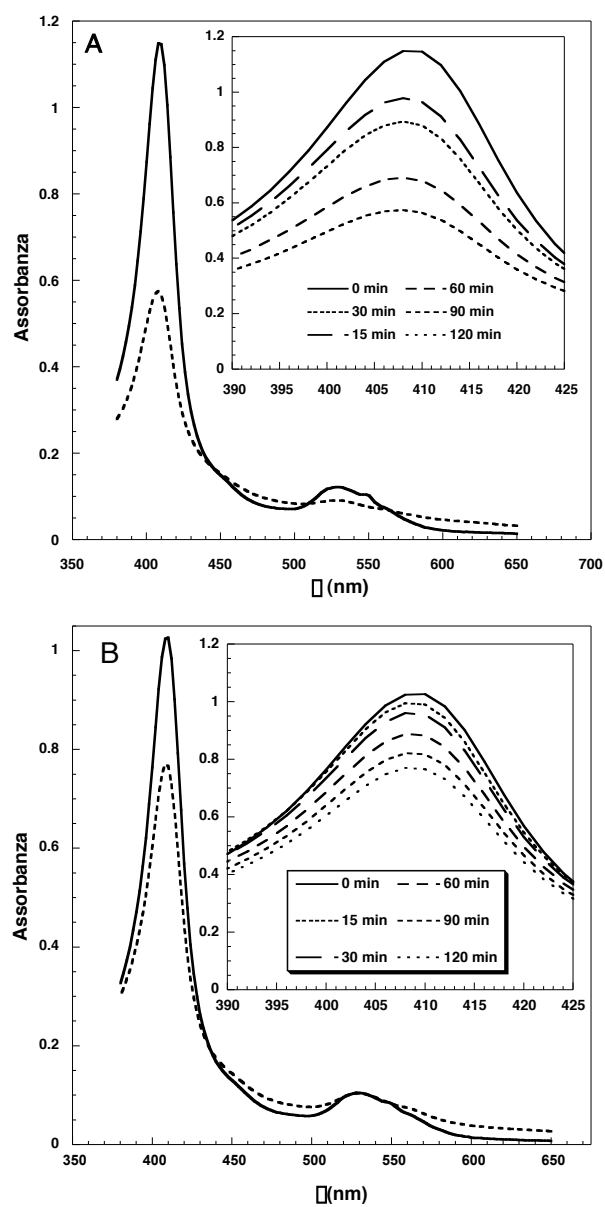


Figura 8.10 Transizione sol-gel. Spettri UV-Vis del citocromo c incapsulato nel bio sol-gel (pannello A) e nel sol-gel (pannello B) immediatamente dopo la sintesi del campione (—) e dopo 120 min (---).

Gli spettri dicroici (**figura 8.11a e 8.11b**) relativi alla transizione sol-gel confermano le misure di assorbimento elettronico. Anche in questo caso, non si osservano spostamenti nelle bande Soret (riconducibili ad alterazioni della tasca dell'eme).

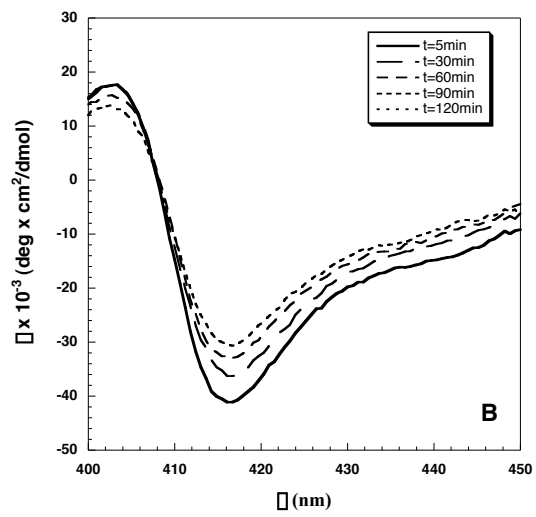
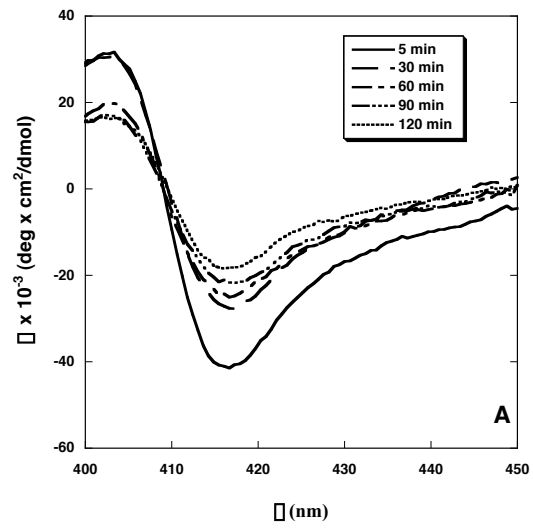


Figura 8.11 Transizione sol-gel. Spettri CD del citocromo c incapsulato nel bio sol-gel (pannello A) e nel sol-gel (pannello B).

Il processo di denaturazione del citocromo c incapsulato in bio-sol-gel è stato studiato mediante l'aggiunta di una soluzione acquosa di HCl, pH 1.5. La matrice silicea, mentre intrappola le grandi molecole, consente la diffusione di piccole molecole, permettendo così lo studio del processo di denaturazione del citocromo c incapsulato nella matrice sol-gel. Il processo di denaturazione acido-indotta è stato studiato seguendo la variazione di intensità della banda Soret. Nella **figura 8.12** sono messe a confronto le cinetiche di denaturazione del citocromo c incapsulato nel bio sol-gel o nel solo sol-gel. Il processo di acidificazione induce la completa denaturazione della proteina in entrambi i casi. Perciò, contrariamente a quanto avviene in soluzione, nel sol-gel il $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ non ostacola il processo di denaturazione. La **figura 8.12** mostra tuttavia che la cinetica di denaturazione della proteina è influenzata dal sale. Nel bio sol-gel il citocromo c si denatura più rapidamente (120-150 min), mentre la proteina intrappolata nel puro sol-gel richiede un tempo più lungo, circa 200 min.

Il diverso comportamento cinetico del citocromo c potrebbe essere riconducibile a due diversi fattori:

- ✓ il sale modifica la reticolazione della matrice sol-gel. In questo caso, viene generato un network siliceo con pori di maggiori dimensioni, in grado di facilitare l'accessibilità del solvente. Diffondendo più velocemente all'interno della matrice, il denaturante richiede tempi più brevi per denaturare la proteina.
- ✓ l'elevata concentrazione del sale diminuisce le interazioni elettrostatiche tra proteina e silice. Come conseguenza, il citocromo c risulta destabilizzato e viene denaturato più facilmente dall'agente chimico.

Nel sol-gel il processo di denaturazione acido-indotta dipende principalmente dalle interazioni elettrostatiche tra proteina e matrice sol-gel. Le superficie silicea presenta non solo gruppi polari, ma anche gruppi funzionali carichi negativamente, quali silossani (Si-O-Si), silanoli (Si-OH) e silossidi (SiO^-), presenti in concentrazione diversa a seconda del pH. La silice possiede un punto isoelettrico acido, $\text{pI} = 2.1$, mentre per il citocromo c tale valore è $\text{pI} = 10.2$. Ciò significa che in condizioni di neutralità, la configurazione nativa della proteina viene stabilizzata da interazioni elettrostatiche tra proteina incapsulata (carica positivamente) e matrice sol-gel (carica negativamente) (Yamanaka et al, 1996; Droghetti and Smulevich, 2005).

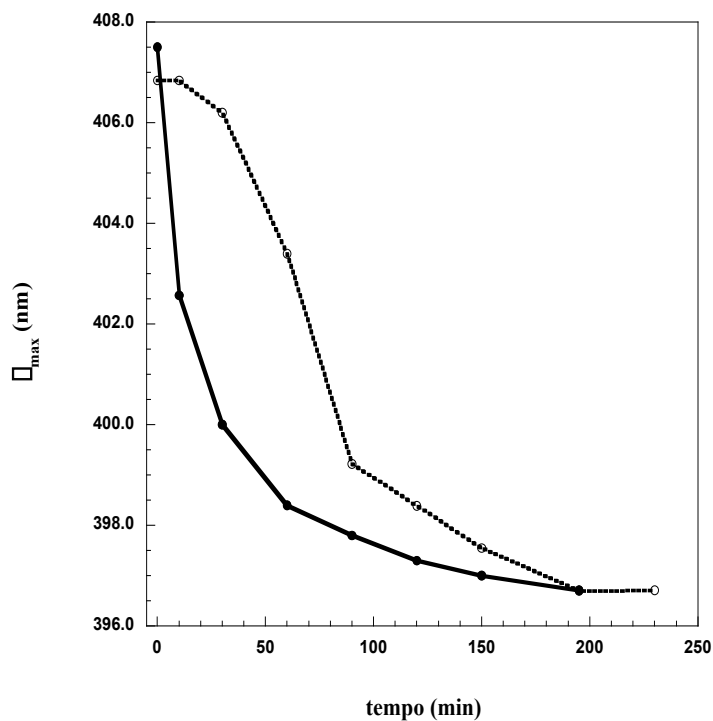


Figura 8.12 Cinetica di denaturazione a pH 1.5 del citocromo c incapsulato nel sol-gel in presenza (—) ed in assenza (---) di nitrato di calcio.

La **figura 8.13** mostra la cinetica di riavvolgimento (*refolding*) del citocromo c incapsulato nel bio sol-gel.

Il processo è stato seguito osservando lo spostamento verso il rosso della banda Soret. La proteina si riavvolge completamente nella sua conformazione nativa in 250 min, i.e., il tempo necessario per lo spostamento completo della banda Soret da 396nm (tipica dello stato denaturato) a 408nm (tipica dello stato nativo).

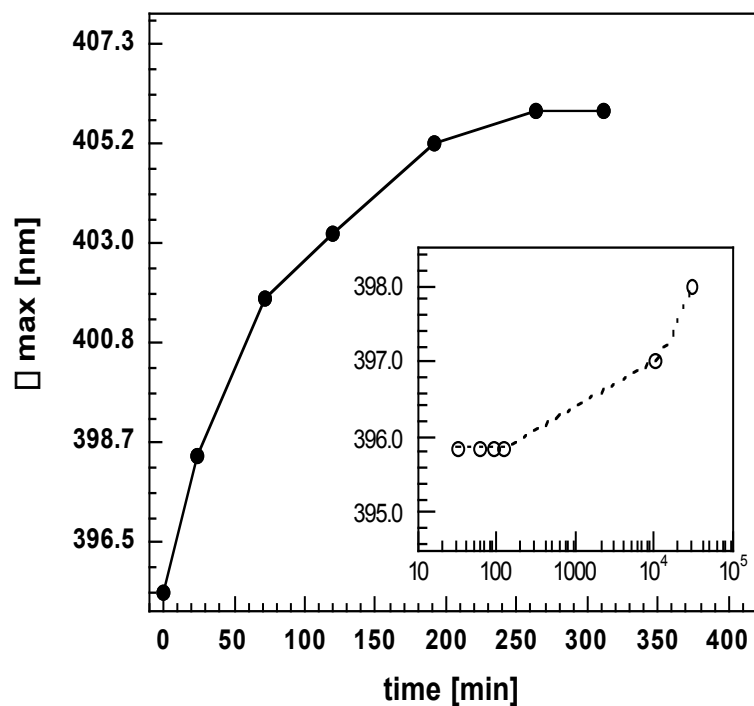


Figura 8.13 Cinetica di rinaturazione del citocromo c incapsulato nel bio sol-gel. L' inset della figura mostra la cinetica di rinaturazione del citocromo c intrappolato nel sol-gel.

Alla luce di questi dati è possibile affermare che la transizione di “*unfolding/refolding*” della proteina, è completamente reversibile. Al contrario, come chiaramente illustrato nell' *inset* della **figura 8.13**, la proteina intrappolata nel sol-gel (privo di sale) rimane completamente denaturata anche dopo 20 giorni. Questo risultato suggerisce un'azione del sale tendente a stabilizzare la conformazione compatta della proteina.

Ciò viene confermato dagli spettri CD; le **figure 8.14a e 8.14b** mostrano la transizione dicroica indotta dalla denaturazione acida del citocromo c incapsulato nel bio-sol-gel o nel solo sol-gel. Mentre in presenza del sale la

proteina presenta uno spettro Soret identico a quello della nativa, ciò non si osserva nella proteina immobilizzata nel solo sol-gel. Questo risultato indica che il nitrato di calcio svolge un ruolo critico nel processo di riavvolgimento (*refolding*) del citocromo c intrappolato, in accordo con l'ipotesi di un'azione stabilizzante degli anioni (in questo caso, il nitrato) verso la formazione di uno stato compatto della proteina, lo stato-A (*A-state*), avente le proprietà tipiche del *molten globule*.

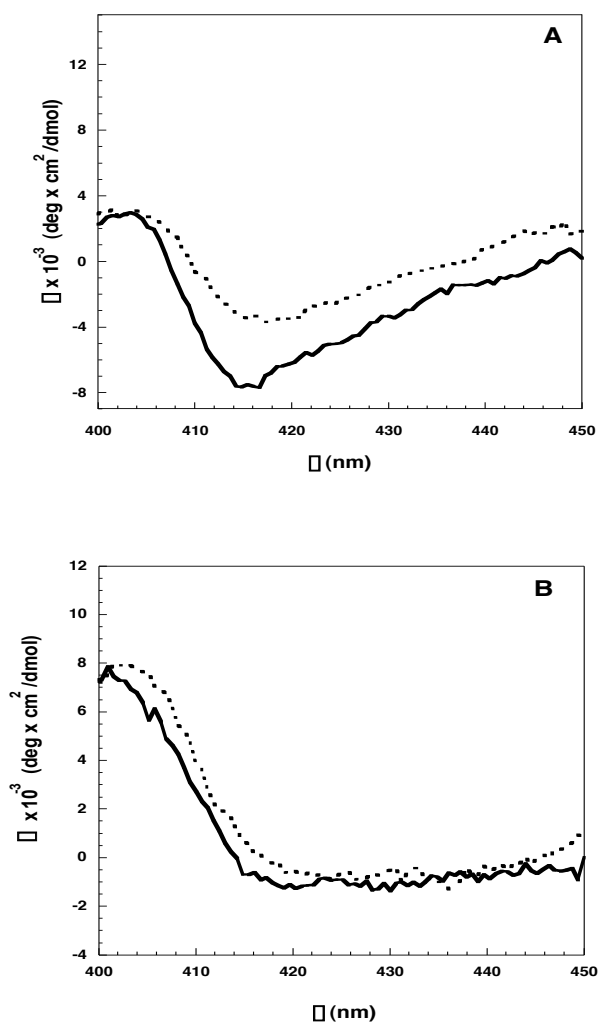


Figura 8.14 Spettro CD nella regione del Soret relativo al riavvolgimento del citocromo c incapsulato nel bio sol-gel (pannello A) e nel sol-gel (pannello B).
 Pannello A: Confronto tra la proteina nativa (—) e la proteina rinaturata (---).
 Pannello B: Confronto tra la proteina denaturata (—) e rinaturata (---)

I dati relativi alla cinetica di denaturazione (**figura 8.12**) ci hanno indotto a eseguire un test che permettesse di analizzare il ruolo del nitrato di calcio nel modulare l'accessibilità al solvente nei campioni sol-gel. A tal fine, prove di denaturazione/rinaturazione (*unfolding/folding*) sono stati eseguite in eccesso di solvente, immergendo i monoliti relativi ai campioni di citocromo c in una provetta Falcon contenente 20 ml di soluzione. In queste condizioni, non solo la proteina intrappolata in bio-sol-gel si denatura molto più rapidamente (in soli 120 min), ma il citocromo c incapsulato in sol-gel riesce a riavvolgersi in una conformazione tipo-nativa, in 28 h. Si può dunque concludere che la diversa porosità delle due matrici sol-gel, indotta dall'aggiunta del sale, influenza la velocità di diffusione del solvente attraverso il network siliceo, influenzando così la cinetica di denaturazione/rinaturazione (*unfolding/folding*) della proteina incapsulata.

Infine, è stata investigata la stabilità della proteina nel tempo. I gel invecchiati appaiono omogenei e trasparenti. E' inoltre chiaramente visibile la caratteristica colorazione rosso-brunastra del citocromo c. Gli spettri di assorbimento elettronico della proteina (non mostrati), registrati ad 1 mese dalla preparazione dei gel, non presentano spostamenti del picco Soret, a conferma del fatto che le proteine incapsulate nella matrice sol-gel mostrano stabilità nel tempo (Droghetti and Smulevich, 2005). La buona stabilità del sistema proteina/sol-gel può essere attribuita alla presenza dei gruppi -OH del materiale siliceo, che attraverso la formazione di legami idrogeno, impediscono la dispersione della proteina dal sistema (Gill and Ballesteros, 1998).

8.4 Voltammetria ciclica

Al fine di valutare se la matrice sol-gel è in grado di influenzare le proprietà redox della proteina (e, quindi, la sua funzionalità), sono state effettuate misure di voltammetria ciclica sulla proteina intrappolata. In questo modo è stato possibile stabilire se il processo di immobilizzazione altera o meno la funzionalità della proteina. Questa tecnica, infatti, fornisce importanti informazioni sulla cinetica di trasferimento elettronico tra macromolecole e superficie elettrodica, e permette di determinare il potenziale di ossidoriduzione del sistema in esame.

L'appropriato orientamento delle macromolecole, al momento in cui esse contattano l'elettrodo, è fondamentale per l'acquisizione di un forte segnale elettrochimico. Molti studi hanno infatti dimostrato che la reversibilità del processo redox di proteine in soluzione è fortemente influenzata dall'orientazione delle macromolecole all'interfaccia soluzione/superficie elettrodica. Nel caso del citocromo c, il trasferimento elettronico è facilitato dalla presenza di gruppi funzionali carichi negativamente sulla superficie dell'elettrodo; l'interazione con il citocromo c (che, a pH neutro, ha carica netta positiva) determina una diminuzione della distanza tra il gruppo prostetico della proteina e la superficie dell'elettrodo, favorendo così il trasferimento elettronico (Gorton et al, 1999).

Nel caso presente, il citocromo c immobilizzato in bio-sol-gel mostra un voltammogramma ciclico ben definito, di tipo quasi-reversibile, nell'intero intervallo di velocità di scansione esplorato (0.02-2.0 V/s).

La **figura 8.15** mostra il voltammogramma ciclico del citocromo c intrappolato nel bio-sol-gel, ad alta velocità di scansione (1.5 V/s). Dalla figura, si osserva che la separazione di picco, ΔE_p , è di circa 200 mV, maggiore quindi del valore teorico (57 mV) associato a processi redox che coinvolgono il trasferimento di un solo elettrone. Ciò conferma la quasi-reversibilità del processo (un fenomeno comune alla maggior parte delle proteine studiate per via voltammetrica). Il potenziale di ossidoriduzione calcolato, $E_{1/2} = 0.244 \pm 0.005$ V vs NHE, è molto vicino al valore del potenziale redox del citocromo c in soluzione, nelle stesse condizioni sperimentali ($E_{1/2} = 0.255$ V) (Clark, 1972). I dati elettrochimici confermano che, a pH neutro, la proteina immobilizzata mantiene la struttura tipica della forma nativa. Il valore del potenziale di ossidoriduzione del citocromo c, infatti, dipende dalla natura del sesto ligande di coordinazione del Fe-eme. Nella proteina nativa, tale ligande è la Met80, ritenuta responsabile dell'elevato potenziale di riduzione della proteina (Dickerson and

Timkovich, 1975; Senn and Wuthrich, 1985). La sostituzione della metionina con ligandi assiali endogeni, quali His e/o Lys, è sempre accompagnata da una diminuzione del valore del potenziale di ossidoriduzione di qualche centinaio di mV, che causa, tra l'altro, la perdita dell'attività biologica della proteina. La sua sostituzione, quindi, verrebbe immediatamente osservata elettrochimicamente.

Nell'insieme, lo studio elettrochimico del citocromo c immobilizzato nel bio-sol-gel permette di affermare che:

- ✓ la Met 80, e non un altro ligando, è legata al Fe-eme in posizione assiale;
- ✓ la matrice bio-sol-gel non altera la conformazione della proteina;
- ✓ le proprietà del citocromo c non vengono alterate dalla procedura utilizzata per l'immobilizzazione della proteina nella matrice vetrosa;
- ✓ il network siliceo modificato rappresenta un ambiente favorevole per la proteina poiché, contrariamente a quanto osservato per altri films, sembra favorire una corretta orientazione tra citocromo c ed elettrodo;
- ✓ La matrice vetrosa aumenta la stabilità della proteina, perché attraverso l'immobilizzazione vengono evitati molti degli inconvenienti osservati con proteine in soluzione (quali basse correnti dovute alla scarsa velocità di diffusione delle macromolecole, o la possibile denaturazione della proteina quando essa contatta l'elettrodo).

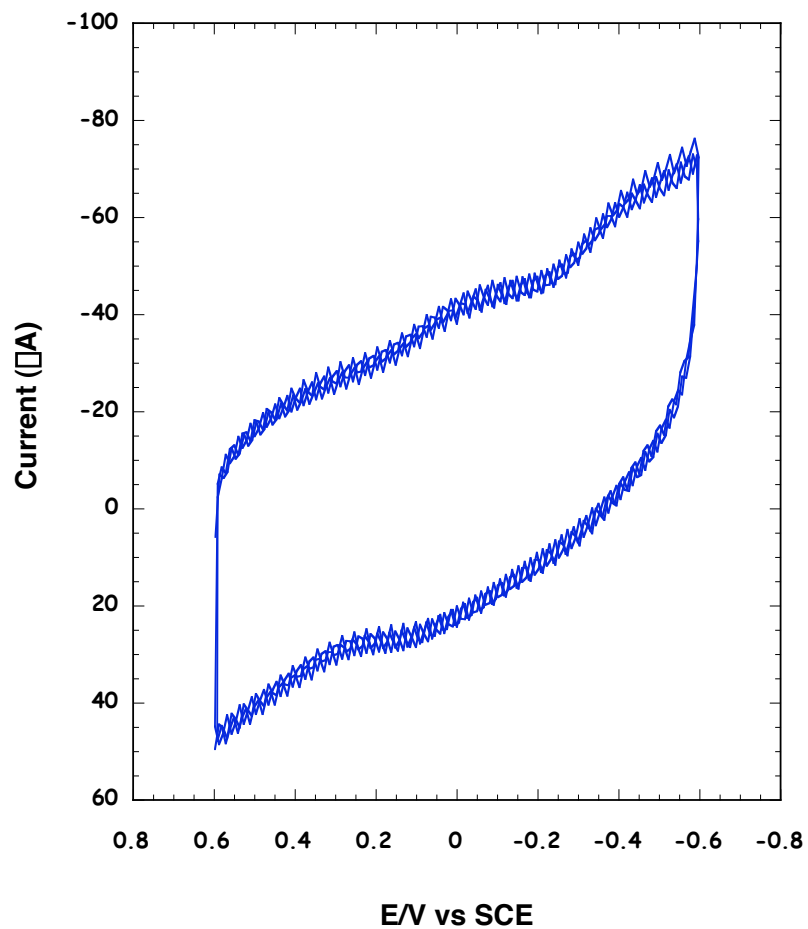


Figura 8.15 Voltammogramma ciclico del citocromo c ($25 \mu\text{M}$) immobilizzato nel bio sol-gel su di un elettrodo di grafite pirolitica. Condizioni sperimentali: 0.1M tampone fosfato pH 7.0, $T = 25^\circ\text{C}$. Velocità di scansione 1500 mV/s.

Capitolo 9

Conclusioni

Questo studio dimostra la versatilità della tecnologia sol-gel e le sue potenzialità applicative.

Tale metodologia è stata utilizzata per sintetizzare un nuovo biomateriale ibrido prodotto combinando il chitosano con una fase inorganica, precedentemente modificata mediante l'aggiunta di ioni calcio e fosfato. I campioni a diverso contenuto di chitosano sono stati sottoposti ad una serie di analisi chimico-fisiche al fine di comprendere quali sono gli effetti indotti dall'aggiunta del biopolimero.

La spettroscopia infrarossa in trasformata di Fourier, utilizzata per investigare le proprietà strutturali delle matrici in esame, ha dimostrato che il chitosano non altera profondamente il network siliceo. Gli spettri FTIR degli ibridi, come nel gel bioattivo sono caratterizzati dalle tipiche bande relative alle frequenze di stretching dei legami Si-O-Si ($\approx 1100 \text{ cm}^{-1}$) e Si-OH (950 cm^{-1}), tuttavia la loro intensità varia in funzione del contenuto di chitosano. In particolare l'intensità della frequenza di assorbimento relativo allo stretching del legame Si-O-Si diminuisce all'aumentare del rapporto polimero/sol-gel.

La banda più interessante dal punto di vista strutturale è quella centrata ad una frequenza di circa 1400 cm^{-1} caratteristica del legame Si-C, che testimonia prepotentemente l'interazione tra la componente inorganica ed organica del sistema.

Le prove di dissoluzione degli ibridi hanno dimostrato che tale processo è fortemente dipendente dal contenuto di chitosano e che il polimero inibisce il rilascio degli ioni calcio e fosfato dalla fase inorganica.

I campioni contenenti chitosano sembrano essere maggiormente stabili. Probabilmente il polimero carico positivamente (il pH del sistema è acido) interagisce con i gruppi silanolo del gel attraverso legami idrogeno SiOH stabilizzando la matrice stessa.

La minore solubilizzazione degli ibridi potrebbe anche essere correlata con la natura igroscopica del biopolimero; il chitosano favorendo il riequilibrarsi della pressione osmotica, potrebbe rallentare il rilascio degli ioni dalla matrice, quanto meno in un primo intervallo di tempo. I dati confermano tale ipotesi.

La quantità di ioni rilasciata dai campioni [gel bioattivo, privo di chitosano (B); Ibridi contenenti chitosano (BK1, BK2 e BK3)] quando questi sono immersi in una soluzione di Tri-HCl, varia sia in funzione del tempo d'immersione sia in relazione alla concentrazione di chitosano. Il processo di dissoluzione, analizzato negli intervalli di tempo Δt_1 (30 min-6 h) e Δt_2 (6h-24h) ha evidenziato l'esistenza di distinte fasi: una fase iniziale in cui è osservabile un incremento di concentrazione degli ioni ed una fase successiva in cui la quantità di ioni rilasciata si riduce notevolmente.

Questo fenomeno può essere attribuito al progressivo ri-adsorbimento degli ioni sulla superficie dei campioni con la conseguente formazione di uno strato di idrossicarbonato di apatite (HCA). I dati relativi alla percentuale di riadsorbimento degli ioni calcio e fosfato dimostrano che, sebbene il chitosano sia in grado di rallentare il loro rilascio, questo non sembra influenzare il tasso di riadsorbimento, ad eccezione del solo campione BK3.

La microscopia confocale dimostra ulteriormente la bioattività degli ibridi.

Le prove di swelling e di permeabilità dimostrano che il polimero modifica la struttura del reticolo siliceo, rendendola meno rigida e compatta. Il rigonfiamento del chitosano all'interno degli ibridi potrebbe influenzare la diffusione del probe all'interno della matrice, ostruendo i pori del reticolo siliceo.

La metodologia sol-gel è stata altresì utilizzata per immobilizzare una proteina emica, il citocromo *c*. Si sono quindi investigate le proprietà strutturali del citocromo *c* nella matrice sol-gel, (priva di nitrato di calcio) e nella matrice bio sol-gel (contenente nitrato di calcio).

Gli spettri di assorbimento elettronico e dicroici della proteina in soluzione a pH 7.0, registrati in assenza ed in presenza di $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, sono praticamente indistinguibili.

Le misure di denaturazione acida (pH 1.5) della proteina in soluzione, dimostrano che il sale esercita un effetto protettivo, impedendone la sua completa denaturazione.

La marcata riduzione, nello spettro UV-Vis, dell'intensità della banda a 620 nm, in presenza del sale, associata alla presenza di specie ad alto spin, suggerisce (i) che una significativa popolazione di molecole proteiche è rimasta nello stato di basso spin, e (ii) che esiste un equilibrio tra specie a basso (LS) e specie ad alto spin (HS).

La proteina incapsulata nel bio sol-gel, a pH neutro, mantiene la struttura tipica della forma nativa, dal momento che non si osservano variazioni spettrali rispetto alla proteina in soluzione.

Confrontando le cinetiche di denaturazione del citocromo c incapsulato nel bio sol-gel e nel solo sol-gel, si deduce che in entrambe i casi il processo di acidificazione induce la completa denaturazione della proteina. Quindi, contrariamente a quanto avviene in soluzione, nel sol-gel il $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ non ostacola il processo di denaturazione.

La cinetica di denaturazione della proteina è però influenzata dal sale; il processo è molto più rapido (120-150 min) nel caso del bio sol-gel.

La transizione di “ *unfolding/refolding*” della proteina nel bio sol-gel, contrariamente alla proteina immobilizzata nella matrice sol-gel, è completamente reversibile.

Le misure di voltammetria ciclica, hanno dimostrato che il processo di immobilizzazione non altera la funzionalità della proteina incapsulata. Il citocromo c immobilizzato nel bio-sol-gel mostra un voltammogramma ciclico ben definito, di tipo quasi-reversibile ed il potenziale di ossidoriduzione calcolato, $E_{1/2} = 0.244 \pm 0.005 \text{ V vs NHE}$, è molto vicino al valore del potenziale redox del citocromo c in soluzione, nelle stesse condizioni sperimentali.

Bibliografia

Anfinsen C.B. Principles that govern the folding of protein chains. *Science*. 1973. 181:223-224.

Ayers M. R and Hunt A.J. Synthesis and properties of chitosan-silica hybrid aerogels. *J. Non-Cryst. Solids*. 2001. 285:123-127.

Avnir D., Braun S., Lev O. and Ottolenghi M. Enzymes and other proteins entrapped in sol-gel materials. *Chem. Mater*. 1994. 6:1605-1614.

Bai Y., Sosnick T.R., Mayne L., Englader S.W. Protein folding intermediates: native-state hydrogen exchange. *Science* 1995. 269:192-197.

Baldwin R.L. Experimental studies of pathways of protein folding. *Ciba Found Symp*. 1991.161:190-201; discussion 201-5.

Battistuzzi G., Borsari M., Francia F. and Sola M. Redox Thermodynamics of the Native and Alkaline Forms of Eukaryotic and Bacterial Class I Cytochromes c. *Biochemistry*. 1997. 36:16247-16258.

Beppu M. M., Santana C.C. Influence of calcification solution on in vitro chitosan mineralizzazione. *Mat. Res*. 2002.

Berger J., Reist M., Mayer J.M., Felt O., Peppas N.A. and Gurny R. Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. *European J. of Pharm. And Bioph*. 2004. 57:19-34

Bhakuni V., Xie D. and Friere E. *Biochemistry*. 1991. 30:305-321.

Brennan J.D. Using intrinsic fluorescence to investigate proteins entrapped in sol-gel derived materials. *Appl. Spec*. 1999. 53:106-121.

Brinker C. J. and Scherer G. W. The physics and chemistry of sol-gel processing. Academic Press Inc, San Diego, CA, USA. 1990.

Bushnell G. W., Louie G. V. and Brayer, G. D. High-resolution three-dimensional structure of horse heart cytochrome c. *J. Mol. Biol.* 1990. 214: 585-595.

Chan C.K., Peng S. L., Chu I. M., Ni S. C. Effects of heat treatment on the properties of poly(methyl methacrylate)/silica hybrid materials prepared by sol- gel process. *Polymer.* 2001. 42:4189-4196.

Chanachai R., Jiratananon D., Uttapap G.Y., Moon W.A., Anderson R.Y. and Huang M. Pervaporation with chitosan/hydroxyethylcellulose (CS/HEC) blended membranes. *J. Membr. Sci* 2000. 166:271-280.

Chandy T., Das G.S and Rao G.H. 5- Fluorouracil- loaded chitosan coated polylactic acid microspheres as biodegradable drug carriers for cerebral tumor. *J. Microencapsul.* 2000. 17:625-638.

Chevance S., Le Rumeur E., De Certaines J.D., Simonneaux G. and Bondon A. ¹H NMR Structural Characterization of the Cytochrome c Modifications in a Micellar Environment *Biochemistry.* 2003. 42:15342-15351.

Cho S.B., Nakanishi K., Kokubo T., Soga N., Ohtsuki C. and Nakamura T. Apatite formation on silica gel in simulated body fluid: its dependence on structures of silica gels prepared in media different media. *J. Biomed. Mater. Res. Appl. Biomater.* 1996. 33:145-151.

Clark W. M. Oxidation-reduction potentials of organic system, R. E. Krieger, Huntington, NY, 1972, p. 451.

Colon W., Wakem L. P., Sherman F. and Roder H. Identification of the Predominant Non-Native Histidine Ligand in Unfolded Cytochrome c. *Biochemistry.* 1997. 36:12535-12541.

Curran M. D. and Stiegman A. E. Morphology and pore structure of silica xerogels made at low pH. *J. Non-Cryst. Solids.* 1999. 249:62-68.

Dave B.C, Dunn B., Valentine J.S and Zink J.I. Sol-gel encapsulation methods for biosensors. *Anal. Chem.* 1994. 66:1120-1127.

Davis K. M. and Tomozawa M. An infrared spectroscopic study of water-related species in silica glasses. *J. Non-Cryst. Solids*. 1996. 201:177-198.

Dickerson R.E., Takano T., Eisenberg D., Kallai O.B., Samson L., Cooper A. and Margoliasch E.. General features of the horse and bonito proteins at 2.8 Å resolution. *J. Biol. Chem.* 1971. 246:1511-1535.

Dickerson, R.E., Timkovich, R. (1975). Cytochromes c. In: Boyer PD (ed) *The Enzymes*, 3rd edn, Vol.1 Academic Press, London New York, pp 397-547.

Dickerson R. E. and Timkovic R. in *The Enzymes*. 1975. Vol XI, (Boyer P. Ed), p. 397-492, Academic Press, New York.

Dinesh K.S. and Alok R.R. Controlled release of glucose through modified chitosan membranes. *J. Memb. Sci.* 1990. 155:107-112.

Dinner A.R., Sali A., Smith L.J., Dobson C.M. and Karplus M. Understanding protein folding via free energy surfaces from theory and experiment. *Trends Biochem. Sci.* 2000. 25:331-339.

Dobson C. M. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 1992. 2:6-12.

Dobson C.M. and Hore P.J. Kinetic studies of protein folding using NMR spectroscopy. *Nature. Struct. Biol.* 1998. 5:504-507.

Droghetti E. and Smulevich G. Effect of sol-gel encapsulation on the unfolding of ferric horse heart cytochrome c. *J. Biol. Inorg. Chem.* 2005. 10:696-703.

Ellis R.J. and Hartl F.U. Principles of protein folding in the cellular environment. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 1999. 9:102-110.

Ellerby M.L., Nishida C.R., Nishida F., Yamanaka S.A., Dunn B., Valentine J.S. and Zink J. Encapsulation of proteins in transparent porous silicate glasses prepared by the sol-gel method. *Science*. 1992. 255:1113-1115.

Felt O., Furrer P., Mayer J.M., Plazonnet B., Buri P. and Gurny R. Topical use of chitosan in ophthalmology: tolerance assessment and evaluation of precorneal retention. *Int. J. Pharm.* 1999. 180:85-193.

Ferguson-Miller S., Brautigan D.L., and Margoliash E. Definition of cytochrome c binding domains by chemical modifications. III. Kinetics of reaction of carboxydinitrophenyl cytochrome c with cytochrome c oxidase. *J Biol Chem*. 1978. 253:149-159.

Fiandanca G., Vitrano E. and Cupane A. Ferricytochrome c encapsulated in silica nanoparticles: structural stability and functional properties. *Biopolymers*. 2004. 74:55-59.

Filgueiras M.R., La Torre G. And Hench L.L. Solution effects on the surface reactions of a bioactive glass. *J. Biomed. Mater. Res.* 1993. 27:445-453.

Finkelstein A.V., Badretdinov A. and Ptitsyn O.B. Physical reasons for secondary structure stability: alpha-helices in short peptides. *Proteins*. 1991. 10:287-299.

Francio S.J.K. and Matthew. H.W.T. Application of chitosan –based polysaccharide biomaterials in cartilage tissue engineering: a review. *Biomaterials*. 2000. 21:2589-2598.

Gao Y., Choudhury N. R., Dutta N., Matisons J., Reading M. and Delmotte L. Organic-inorganic hybrid from ionomer via Sol-Gel reaction. *Chem. Mater*. 2001. 13:3644-3652.

Gething M. and Sambrook J. Protein folding in the cell. *Nature*. 1992. 355:33-45.

Gill I. Bio-doped Nanocomposite Polymers: Sol_Gel Bioencapsulates. *Chem. Mater*. 2001. 13:3404-3421.

Gill I. and Ballesteros A. Encapsulation of biologicals within silicate, siloxane and hybrid-sol gel polymers: an efficient and generic approach. *J. Am. Chem. Soc.* 1998. 120:8587-8598.

Gill I. and Ballesteros A. Bioencapsulation within synthetic polymers (part 1): sol-gel encapsulated biologicals. *Trends Biotechnol.* 2000. 18: 282-296.

Gorton L., Lindgren A., Larsson T., Munteanu F.D., Ruzgas T. And Gazaryan I. Direct transfer between heme-containing enzymes and electrodes as basis for third generation biosensors. *Analytica Chimica Acta.* 1999. 400:91-108.

Goto Y., Calciano L.J. and Fink A. L. Acid-induced folding of proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1990. 87:573-577.

Goto Y. and Nishikiori. S. Role of electrostatic repulsion in the acidic molten globule of cytochrome c. *J. Mol. Biol.* 1991. 222:679-686.

Goto Y., Takahashi N. and Fink A. L. Mechanism of acid-induced folding of proteins. *Biochemistry.* 1990. 29:3480-3488.

Greenfield N. J. Applications of circular dichroism in protein and peptide analysis. *Trends in analytical chemistry.* 1999. 18:236-244.

Hench L.L. Bioactive ceramics in bioceramics: materials characterisation versus in vivo behaviour. *Ann. New York Acad. Sci.* 1988. 523:54-71.

Hench L.L., Splinter R.J., Allen W.C. and Greenlee T.K. Bonding mechanism at the interface of ceramic prosthetic materials. *J. Biomed. Mater. Res.* 1971. 2:117-141.

Hobbs J.D. and Shelmett J.A. Conserved non planar heme distortions in cytochromes c. *J Protein chem.* 1995. 14:19-25.

Indiani C., De Sanctis G., Neri F., Santos H., Smulevich G., and Coletta M. Effect of pH on axial ligand coordination of cytochrome c from *Methylophilus methylotrophus* and horse heart cytochrome c. *Biochemistry.* 2000. 39:8234-8242.

Jeng M. F., Englander S. W., Elove G. A., Wand A. J., Roder H. Structural description of acid-denatured cytochrome c by hydrogen exchange and 2D NMR. *Biochemistry*. 1990. 29:10433-10437.

Jordan T., Eads J.C., and Spiro T.G. Secondary and tertiary structure of the A-state of cytochrome c from resonance Raman spectroscopy. *Protein Sci*. 1995. 4:716-728.

Kelly S. M and Price N.C. The application of circular dichroism to studies of protein folding and unfolding. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1997. 1338:161-185.

Kim P.S. and Baldwin R.L. Intermediates in the folding reactions of small proteins. *Ann. Rev. Biochem*. 1990. 59:631-660.

Kokubo T. Surface chemistry of bioactive glass-ceramics. *J. Non Cryst. Solids*. 1990. 120:138-151.

Kokubo T., Kushitami H., Sakka S., Kitsugi T. and Yamamuro T. Solutions able to reproduce in vivo surface-structure changes in bioactive glass-ceramic A-W³. *J. Biomed. Mater. Res*. 1990. 24:721-734.

Konig B.W., Osheroff N., Wilms, J., Muijsers A.O., Dekker H.L. and Margoliash E. Mapping of interaction domain for purified cytochrome c1 on cytochrome c. *FEBS Lett*. 1980. 11:395-398.

Koppenol W.H. and Margoliash E.. The asymmetric distribution of charges on the surface of horse cytochrome c. *J. Biol. Chem*. 1982. 257: 4426-4437.

Kristl J., Smidx-Korbar J., Struc E., Schara M. And Rupprecht H. Hydrocolloids and gels of chitosan as drug carriers. *Int. J. Pharm*. 1993. 99:13-19.

Levinthal C. Are there pathways for protein folding? *J. Chim. Phys*. 1968. 65:44-45.

Li P., Ohtsuki C., Kokubo T., Nakanishi K., Soga N, Nakamura T. and Yamamuro T. Apatite formation induce by silica gel in a simulated body fluid. *J. Am. Ceram. Soc.* 1992. 75:2094-2097.

Liu X.F., Guan Y.L, Yang D.Z., Li Z. and Yao K.D. Antibacterial action of chitosan and carboxymethylated chitosan. *J. App. Polym.Sci.* 2001. 79:1324-1335.

Margoliash E. and Sheijter A. Cytochrome c. *Adv. Protein Chem.* 1966. 21:113-286.

Martinez Y., Retuert J., Yazdani-Pedram M. and Colfen H.. Hybrid ternary organic–inorganic films based on interpolymer complexes and silica. *Polymer.* 2004. 45:3257-3265.

Miao Y. and Tan S.N. Amperometric hydrogen peroxide biosensor with silica sol-gel/chitosan film as immobilization. *Anal.Chim. Acta.* 2001. 437:87-93.

Muzzarelli R., Chitosan in : R. Muzzarelli (Ed.), Natural Chelating Polymers. Pergamon Press, Oxford, 1973, pp. 144-176.

Oellerich S., Wackerbarth H. and Hildebrandt P. Spectroscopic Characterization of nonnative conformational states of cytochrome c. *J. Phys Chem B.* 2002. 106:6566-6580.

Ogino M., Ohuchi F. and Hench L.L. Compositional dependence of the formation of calcium phosphate films on bioglass. *J. Biomed. Mater. Res.* 1980. 14:55-64.

Ohgushi M. and Wada A. ‘Molten-globule state’: a compact form of globular proteins with mobile side chains. *FEBS Lett.* 1983.164: 21–24.

Ohtsuki C., Kokubo T. and Yamamuro T. Mechanism of apatite formation on CaO- SiO₂-P₂O₅ glasses in a simulated body fluid. *J. Non-Cryst. Solids.* 1992. 143:84-92.

Padilla S., Roman J., Carenas A. and Vallet-Regi M. The influence of the phosphorous content on the bioactivity of sol-gel glass ceramics. *Biomaterials*. 2005. 26:475-483.

Palumbo G., Avigliano L., Strukul G., Pinna F., Del Principe D., D' Angelo I., Annicchiarico-Petruzzelli M., B. Locardi and Rosato N. Fibroblast growth and polymorphonuclear granulocyte activation in the presence of a new biologically active sol-gel glass. *J. Mater. Sci.* 1997. 8:417-421.

Park S.B., You J.O., Park H.Y., Haam S.J. and Kim W.S. A novel pH-sensitive membrane from chitosan-TEOS IPN; preparation and its drug permeation characteristics. *Biomaterials*. 2001. 22: 323-330.

Patashnik S., Rabinovich L. and Golomb G.. Preparation and evaluation of chitosan microspheres containing biphosphonates. *J. Drug Targ.* 1997. 4:371-380.

Peltola T., Jokinen M., Radiala H, Levanen E., Rosenholm J.B, Kangasniemi I. and Yli- Urpo A. Calcium phosphate formation on porous sol-gel-derived SiO₂ and CaO-P₂O₅-SiO₂ substrates in vitro. *J. Biomed. Mater. Res.* 1999. 44:12-21.

Pereira M.M., Clark A.E, Hench L.L. Homogeneity of bioactive sol-gel-derived glasses in the system CaO- P₂O₅- SiO₂. *J. Mater. Synthesis Proc.* 1994. 2:189-196.

Pettigrew, G.W. *FEBS Lett.* 1978. 86:14-16.

Pettigrew, G.W., Moore, G.R. (1987). *Cytochromes c. Biological Aspects.* Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York.

Pielak G. J., Oikawa K., Mauk A.G., Smith M. and Kay C.M. Elimination of the negative Soret Cotton effect of eukaryotic cytochromes c by replacement of an invariant phenylalanine residue by site-directed mutagenesis. *Am. Chem. Soc.* 1986. 108:2724-2727.

Prajapati S, Bhakuni V., Babu K.R. and Jain S. *Eur. J. Biochem.* 1998. 255:178-184.

Ptitsyn O.B. Protein Folding, (Creighton, T.E., Ed) 1992. pp243-300, Freeman and Company, New York.

Ptitsyn O.B. Protein folding and protein evolution: common folding nucleus in different subfamilies of c-type cytochromes? *J. Mol. Biol.* 1998. 278:655-666.

Qi L., Xu Z., Jiang X, Xu C. and Zou X. Preparation and antibacterial activity of chitosan nanoparticles. *Carbohydr. Res.* 2004. 16:2693-2700.

Radin S., Falaize S., Lee M. H and Ducheyne P. In vitro bioactivity and degradation behaviour of silica xerogels intended as a controlled materials. *Biomaterials.* 2002. 23:3113-3122.

Ramila A. And Vallet-Regi M. Static and dynamic in vitro study of a sol-gel bioactivity. *Biomaterials.* 2001. 22:2301-2306.

Rao V.and Kalesh R.R. *Science and Tech. Of advanced materials.* 2003. 4:509.

Rashidova S. Sh., Shakarova D. Sh., Ruzimuradov O.N., Satubaldieva D.T., Zalyalieva S.V., Shipigun O.A., Varlamov V.P. and Kabulov B.D. Bionanocompositional chitosan –silica sorbent for liquid chromatography. *J. Chromatogr. B.* 2004. 800:49-53.

Retuert J., Quijada R., Arias V. and Yazdani-Pedram M. Porous silica derived from chitosan- containing hybrid composites. 2003. 18:487-494.

Ro J.C. and Chung I.J. Structures and properties of silica gels prepared by the sol-gel method. *J.Non-Cryst. Solids.* 1991. 130:8-17.

Roller S. and N. Covill. The antifungal properties of chitosan in laboratory media and apple juice. *Int. J. Food Microbiol.* 1999. 47:67-77.

Salemme F.R., Kraut J. and Kamen M.D. Structural bases for function in cytochromes c. *J. Biol. Chem.* 1973. 248:7701-7716.

Santucci R. and Ascoli F. The Soret circular dichroism spectrum as a probe for the heme Fe(III)-Met(80) axial bond in horse cytochrome c. *J. Inorg. Biochem.* 1997. 68:211-214.

Saravanapavan P. and Hench L.L. Mesoporous calcium silicate glasses. I. Synthesis. *J. Non-Cryst. Solids.* 2003. 318:1-13.

Savini I., Santucci R., Di Venere A., Rosato N., Strukul G., Pinna F. and Avigliano L. Catalytic and spectroscopic properties of Cytochrome c, Horseradish peroxidase, and ascorbate Oxidase embedded in a Sol-Gel silica matrix as a function of gelation time. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 1999. 82:227-241.

Schubert U., Husing N., Lorens A. Hybrid Inorganic-Organic Materials by Sol-Gel Processing of Organofunctional Metal Alkoxides. *Chem. Mater.* 1995. 7:2010

Senn H. and Wuthrich K.. Amino acid sequence, haem iron co-ordination geometry and functional properties of mitochondrial and bacterial c-type cytochromes. *Q. Rev. Biophys.* 1985. 18:11-134.

Shi X.Y. and Tan T.W. Preparation of chitosan/ethylcellulose complex microcapsule and its application in controlled release of vitamin D₂. *Biomaterials.* 2002. 23:4469-4473.

Shi Z., Neoh K.G., Kang E.T. and Wang W. Antibacterial and mechanical properties of bone cement impregnated with chitosan nanoparticles. *Biomaterials.* 2006. 27(11):2440-2449.

Sinibaldi F., Howes B.D., Smulevich G., Ciaccio C., Coletta M. and Santucci R.. Anion concentration modulates the conformation and stability of the molten globule of cytochrome c. *J. Biol. Inorg. Chem.* 2003. 8:663-670.

Song J. S., Such C.H. Park Y. B., Lee S.H., Yoo N.C., Lee J.D., Kim K.H. and Lee S.K. A phase, I/II a study on intra- articular injection of holmium-166-chitosan complex for the treatment of knee synovitis of rheumatoid arthritis. *Eur. J. Nucl. Med.* 2001. 28:489-497.

Speck S.H., Ferguson-Miller S., Osheroff N. and Margoliash E. Definition of cytochrome c binding domain by chemical modification: kinetics of reaction with beef mitochondrial reductase and functional organization of the respiratory chain. *Proc. Nat. Acad. Sci USA* 1979. 76:155-159.

Staudenmayer N., Smith M.B., Millet F. Effect of specific trifluoroacetylation of individual cytochrome c lysines on the reaction with cytochrome c oxidases. *Biochemistry* 1977. 16:600-604.

Stellwagen E. The reversible unfolding of horse heart ferricytochrome c. *Biochemistry*. 1968. 7:2496-2501.

Stellwagen E. Haem exposure as the determinant of oxidation-reduction potential of haem proteins. *Nature* (London) 1978. 275:73-74.

Takano T. and Dickerson R.E. Conformation change of cytochrome c. I. Ferrocyanochrome c structure refined at 1.5 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 1981. 153:79-94.

Tamaki R. and Chujo Y. Synthesis of Polystyrene and Silica Gel Polymer Hybrids Utilizing Ionic Interactions. *Chem. Mater.* 1999. 11: 1719-1726.

Thomas Y.G., Goldbeck R.A. and Kliger D.S. *Biopolymers*. 2000. 57:29-36.

Tuominen E.K.J., Zhu K., Wallace C.J.A., Clark-Lewis I., Craigh D.B., Rytomaa M. and Kinnunen P.K.J. ATP induces a conformational change in lipid-bound cytochrome c. *J. Biol. Chem.* 2001. 276:19356-19362.

Vanderberg, E.T., Brown R.S. and Krull U.J. in: I. E. Veliky (Ed.), *Immobilized biosystems in Theory and Practical Applications*, Elsevier, Holland, 1983, p. 129.

Wallace R.E., Hill R.G., Pembroke J.T., Brown C.J. and Hatton P.V. Influence of sodium oxide content on bioactive glass properties. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 1999. 10:697- 701.

Wang T., Turhan M. and Gunasekaran S. Selected properties of pH-sensitive, biodegradable chitosan-poly(vinyl alcohol) hydrogel. *Polym Int.* 2004. 53:911-918.

Wen J. and Wilkes G.L. Organic/Inorganic Hybrid Network Materials by the Sol-Gel Approach. *Chem. Mater.* 1996. 8:1667-1681.

Xu Y., Mayne L. and Englander S.W. Evidence for an unfolding and refolding pathway in cytochrome c. *Nature Struct. Biol.* 1998. 5:774-778.

Yamanaka S.A., Nguyen N.P., Dunn B., Valentine J. S. and Zink J.I. Enzymatic Activity of Oxalate Oxidase and Kinetic Measurements by Optical Methods in Transparent Sol-Gel Monoliths. *J. Sol-gel Sci. Technol.* 1996. 7:117-121.

Yeh S. R., Han S. and Rousseau D.L. Cytochrome c folding and unfolding: A Biphasic mechanism. *Acc. Chem. Res.* 1998.31:727-736.

Zhong J. and Greenspan D.C. Processing and properties of sol-gel bioactive glasses. *J. Biomed. Mater. Res (Appl. Biomater).* 2000. 53:694-701.

Zimmerman S.B. and Trach S.O. Estimation of macromolecular concentrations and excluded volume effects for the cytoplasm of *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 1991. 222:599-620.

DERIU DANIELA

Curriculum Vitae et Studiorum

Data e luogo di nascita: 26/04/1973 Roma
Residenza: Via della Mattonata, 6 Mentana (Roma)
Telefono (39) 06-9092444
Cell: 340-2894495
e-mail: daniela.deriu@uniroma2.it

Studi universitari:

Ottobre 2003: Vincitrice con borsa di studio del concorso per l' Ammissione al I anno del dottorato di ricerca in Biochimica e biologia molecolare – XIX Ciclo – presso l' Università Tor Vergata di Roma.

Dicembre 2002: Conseguimento del Diploma di Abilitazione all' esercizio della professione di biologo.

Marzo 2002: Laurea in Scienze biologiche (indirizzo bioecologico) conseguita presso l'Università degli Studi "La Sapienza di Roma" con votazione 110/110.

Titolo della tesi: Studio degli effetti dei fanghi di cartiera su suoli contaminati da metalli pesanti, seguendo la crescita di Hordeum Disticum, Glicine Max e Phaseolus Vulgaris. Relatore: Prof.ssa B.M. Petronio

Esperienze professionali:

Aprile 2000- Marzo 2002:

Internato svolto presso i laboratori di chimica ambientale della Prof.ssa B.M. Petronio dell' Università "La Sapienza" di Roma

Novembre-Dicembre 2002:

Stage post-lauream presso il laboratorio di analisi chimiche e microbiologiche I.C.Q di Roma nel settore del Controllo della qualità ambientale ed alimentare

1 Gennaio 2003- 30 giugno 2003:

Contratto di prestazione autonoma occasionale con il Policlinico Universitario A.Gemelli - Istituto d'ematologia- presso il Laboratorio di diagnostica ematologia.

Progetto: Diagnosi delle malattie onco-ematologiche mediante tecnica FISH (ibridazione in situ con sonde fluorescenti)

1 Luglio- 30 Settembre 2003:

Contratto di collaborazione occasionale presso il Dipartimento di Medicina Sperimentale e Biochimica dell'Università di Tor Vergata di Roma.

Progetto: Sintesi di biomateriali

Da ottobre 2003 ad oggi:

Attualmente impegnata in attività di ricerca presso il Dipartimento di Medicina Sperimentale e Scienze biochimiche dell'Università di Tor vergata.

Linee di ricerca: Immobilizzazione di proteine in ibridi sol gel. Studi strutturali e funzionali di proteine mediante fluorescenza statica e dinamica, dicroismo circolare e voltammetria ciclica. Sviluppo di un biosensore.

Collaborazione con la Prof.ssa B.M. Petronio del Dipartimento di Chimica dell'Università "La Sapienza" di Roma nell'ambito dello studio dell'influenza di contaminanti ambientali sulla crescita di piante di interesse agro- alimentare.

Lingue straniere:

- ✓ Buona conoscenza dell'inglese.
- ✓ Conoscenza scolastica del greco moderno. Permanenza ad Atene per un periodo di 4 anni.

Conoscenze informatiche:

- ✓ Sistemi operativi: Windows 95/98/2000/XP e Mc OS
- ✓ Pacchetti applicativi: Word, Excell, Powerpoint, CaleidaGraph, ed Internet.

PUBBLICAZIONI

1) Nicoletta Calace, Bianca Maria Petronio, Marco Pietroletti, Daniela Deriu and Letizia Pompili.

Treatment of heavy metal contaminated soils to reduce metal uptake by cultivations.

Recent Res. Devel. Agronomy & Horticulture. 2004. 1:29-46.

2) D. Deriu, A. Di Venere, G. Mei, R. Santucci and N. Rosato.

Structural characterization of new chitosan - containing hybrid bioactive gels

J. of Non-Cryst.Solids. 2005. 351:3037-3043

3) Daniela Deriu, Nicoletta Calace, Bianca Maria Petronio and Marco Pietroletti.

Ecomorphological analysis of two barley populations characterized by multi element toxicity and copper deficiency.

Annali di Chimica, In Press

PARTECIPAZIONE A CONGRESSI

1. Automated Bone Marrow Analysis: Dream or reality?
G.Zini, M.Garzia, D.Deriu, M. De Spirito.
Research center for the development and Clinical evaluation of automated methods in Haematology (ReCAMH). Catholic University of Sacred Heart -Rome-
Sysmex Symposium 2003, Sirmione 27- 28 Marzo 2003.
2. Fanghi di cartiera per il recupero di suolo contaminati da Zn e Pb: effetti sull'assorbimento del Phaseolus Vulgaris.
N.Calace, M.Chicca, D.Deriu, B.M Petronio, M. Pietroletti
XXI Congresso Nazionale Società Chimica italiana Torino 22-27 Giugno 2003.
3. Chemical and physical characterization of a new bio-glass matrix
E. Nicolai, D. Deriu, A. Di Venere, G. Mei e Rosato N.
INFMeeting, Genova, Italia, 8-10 Giugno 2004.
4. Azurin-doped sol gel derived matrices: a fluorometric studies.
E. Nicolai, M. Bottini, A. Di Venere, G. Mei, D. Deriu, N. Rosato
INFMeeting, Genova, Italia, 8-10 Giugno 2004.
5. Analisi ecomorfologica di piante di Hordeum Disticum cresciute su un terreno contaminato da Pb e su uno carente di metalli essenziali..
V. Barbabietola, D. Deriu, B. M Petronio, M. Pietroletti.
III Conferenza sull' inquinamento da metalli pesanti: la biodisponibilità.
Sassari 5-6 Maggio 2005
6. Structural characterization of chitosan containing new hybrid bio-active glasses. E. Nicolai, D. Deriu, A. Di Venere, G. Mei e Nicola Rosato
INFMeeting, Genova, Italia, 22-25 Giugno 2005
7. Effect of sol-gel encapsulation on the spectroscopic and electrochemical properties of horse cyt c.
Deriu D., Pagnotta S.E., Santucci R. and Rosato N.
Acta biophysica Romana, Roma, 22-23-24 February 2006

8. Effect of sol-gel encapsulation on the spectroscopic and electrochemical properties of horse cyt *c*.

Deriu D., Pagnotta S.E., Santucci R. and Rosato N.

1° Simposio Dottorandi, Villa Mondragone, Frascati (Roma), 12 Maggio 2006.