

**POLITECNICO DI TORINO**

*Corso di laurea Magistrale in Ingegneria Biomedica*

**TESI DI LAUREA MAGISTRALE**

**Studio sperimentale dell'adsorbimento  
proteico su superfici multifunzionali in  
Ti6Al4V**



**Relatore:**

Prof.ssa SILVIA MARIA SPRIANO

**Candidato:**

TIZIANA PORTA

**Co-relatore:**

Prof.ssa SARA FERRARIS



## Abstract

Nella ricerca biomedica, e soprattutto nell'ambito della scienza dei materiali, sono numerosi, diversi e molto promettenti i biomateriali multifunzionali, dotati di superficie nanostrutturate, in grado di esibire migliorate od aumentate proprietà di biocompatibilità e bioattività. Molti materiali con superficie ingegnerizzate sono attualmente in fase di studio, con l'ambizione di trovare applicazioni in settori come quello dei dispositivi medici innovativi. In questo contesto, negli ultimi anni, gli scienziati hanno concentrato gran parte dei loro sforzi nello studio di biomateriali polimerici. Nonostante ciò, è da ribadire che, attualmente, sono invece i metalli i biomateriali che si rivelano più adatti per sostituire od integrarsi con il tessuto osseo. Questo come conseguenza delle buone proprietà meccaniche e chimiche che i metalli mostrano di avere, proprietà che meglio corrispondono a quelle dell'osso (se rapportate a quelle che altri biomateriali da impianto mostrano).

In particolare, tra i biomateriali metallici ha suscitato grande interesse in letteratura e in ricerca il titanio. La stabilità fisiologica del titanio, associata alla sua notevole resistenza alla corrosione in ambiente biologico (grazie alla sua capacità di auto-passivarsi), nonché le eccezionali proprietà meccaniche e di osteointegrazione favorevole, rendono infatti il titanio uno dei biomateriali più utilizzati per la sostituzione dell'osso in ambito sia ortopedico che dentale.

In anni recenti, peculiare attenzione nel campo dei biomateriali impiantabili ha suscitato l'argomento dell'adsorbimento proteico. Quando un biomateriale viene impiantato nel corpo, infatti, non sono le cellule le prime ad entrare in contatto con la sua superficie, sono bensì le biomolecole presenti nei fluidi biologici circostanti l'impianto. Queste biomolecole, nello specifico proteine, si adsorbono immediatamente sulle superfici degli impianti, già a partire dai primi secondi dopo l'operazione. Tutto ciò ha portato i ricercatori a ipotizzare che la risposta del tessuto ai materiali impiantati derivi principalmente dalle differenze nell'adsorbimento di proteine sulla superficie dell'impianto. Tali differenze sono ritenute dipendenti da svariati fattori, in primo luogo, ad esempio, parametri superficiali come (tra gli altri): la composizione chimica superficiale, la rugosità e la topografia superficiale, la carica superficiale, la bagnabilità e la tensione superficiale del biomateriale impiantato.

L'obiettivo principale di questo lavoro di tesi è proprio quello di andare ad investigare sperimentalmente il fenomeno dell'adsorbimento proteico su superfici metalliche in lega di titanio (Ti6Al4V). Nello studio di quel complesso fenomeno che rientra sotto la definizione di adsorbimento, si è, in particolare, cercato di andare ad esplorare l'argomento dell'adsorbimento di proteine da soluzioni sia a singolo componente sia multi componenti, quali albumina di siero bovino (BSA), fibronectina bovina (BFN) e siero fetale bovino (FBS) rispettivamente. L'albumina è stata utilizzata in quanto proteina plasmatica predominante per concentrazione. Si tratta di una proteina che è generalmente ritenuta dalle caratteristiche anti-adesive. Sono note, infatti, in ambito biochimico, le capacità dell'albumina di impedire l'adesione cellulare/batterica e ridurre notevolmente la risposta infiammatoria acuta (reazione da corpo estraneo) nei confronti del biomateriale impiantato. Al contrario, la fibronectina è stata utilizzata come modello di proteina adesiva. La fibronectina è difatti una tra le proteine più note e studiate, presenti nella matrice extracellulare (ECM), perché coinvolta nei fenomeni di adesione cellulare per la sua capacità di mediare il processo grazie all'interazione con i recettori cellulari detti integrine. Le integrine sono quelle glicoproteine integrali di membrana delle cellule che intervengono sia a mediare i fenomeni di adesione cellulare e riorganizzazione del citoscheletro, sia a regolare i successivi eventi in cascata che portano alla proliferazione e alla differenziazione cellulare. Da ultimo, il siero fetale bovino è stato invece utilizzato per modellizzare il fenomeno dell'adsorbimento proteico in vitro, nelle condizioni in cui una soluzione multi componente e di elevata eterogeneità composizionale (derivata dal plasma) entra in contatto diretto con le superfici in titanio oggetto di studio.

L'adsorbimento di queste sostanze è stato condotto sulla superficie di una lega di titanio sottoposta ad un trattamento chimico brevettato, capace di generare una superficie nanostrutturata dalle caratteristiche di aumentata bioattività. Il presente lavoro di tesi, in dettaglio, si è basato sulla preparazione e caratterizzazione di due diverse superfici in lega di titanio, chimicamente molto simili a quelle utilizzate nella pratica clinica nel settore odontoiatrico, e la loro successiva analisi per la valutazione dell'adsorbimento proteico. Sono state sviluppate, di fatto, due tipologie di superfici: lisce e lucidate a specchio (Ti6Al4V – MP), come controllo per gli esperimenti; trattate chimicamente (Ti6Al4V – CT) con il processo coperto da brevetto. L'approccio sperimentale ha coinvolto, in fase di caratterizzazione, diverse tecniche di misura per andare ad investigare sia la composizione che la carica superficiale delle

superficie prodotte. Sono state condotte analisi composizionali mediante spettroscopia fotoelettronica a raggi X (XPS), studi sulla carica elettrica superficiale dei campioni grazie alla misura del potenziale zeta ( $\zeta$ ) e studi biochimici. Le superfici in lega di titanio, in particolare, sono state valutate con le due tecniche sia prima che dopo il contatto con le soluzioni proteiche. Quello che è stato fatto, in un primo momento, è andare a valutare le caratteristiche delle superficie tal quali. In un secondo momento sono state valutate le caratteristiche delle superficie per quanto riguarda la capacità di adsorbire albumina, fibronectina o siero fetale bovino. I risultati sono poi stati confrontati tra loro. Sono state eseguite, in seguito, misure di angolo di contatto delle superfici tal quali nei confronti di acqua e sangue. Da ultimo, sono stati effettuati dei test cellulari, con cellule e batteri, per andare a determinare la citocompatibilità delle superfici.

L'attività sperimentale ha, nel complesso, perseguito lo scopo di individuare la risposta della superficie Ti6Al4V – CT all'adsorbimento proteico. L'attenzione, nello specifico, si è incentrata sul cercare di determinare la presenza di una relazione tra gli effetti del trattamento superficiale e il comportamento delle proteine adsorbite (per quanto riguarda l'orientamento, la conformazione, la densità di impacchettamento sulla superficie, ...ecc.). Per rendere più completa l'indagine, sono stati anche eseguiti dei test cellulari, mirati alla stima della vitalità cellulare e batterica sulle superficie oggetto di studio. Il comportamento delle cellule e delle proteine su di una determinata superficie, infatti, seppur complicato da elucidare, può essere un aspetto chiave nell'interpretazione dei fenomeni che avvengono tra la superficie di un bioimpianto e i tessuti circostanti. In tale ambito, sarebbe fondamentale, in primis, capire: (i) come si adsorbono le proteine; (ii) come esse si orientano e si dispongono su di una determinata superficie; (iii) quale sia la meccanica generale che regola i fenomeni di adsorbimento proteico; (iv) come e in che misura l'evento di adsorbimento avviene e può influenzare le funzioni biologiche delle proteine adsorbite, e conseguentemente può influenzare l'adesione cellulare. Il presente lavoro di tesi ha come obiettivo quello di cercare di dare risposta, almeno parziale, a tutti questi interrogativi. Si tratta di domande a cui, ad oggi, con il lavoro di diversi gruppi di scienziati in tutto il mondo, non si sono ancora trovate risposte del tutto chiare e soddisfacenti. Ampio spazio è dunque disponibile per tutti gli studiosi che vogliono dedicarsi allo studio dell'adsorbimento proteico sulle superficie solide dei biomateriali.

Obiettivo aggiuntivo che lo studio sperimentale si prefigge è, una volta compreso il meccanismo con cui il fenomeno di adsorbimento proteico ha luogo sulla superficie Ti6Al4V – CT, di andare a valutare e dimostrare l'efficacia della superficie trattata chimicamente nel favorire una risposta cellulare "positiva". Sarebbe infatti auspicabile che la superficie Ti6Al4V – CT fosse in grado di incoraggiare l'adesione di cellule di tipo osteoblastico; in questo modo essa sarebbe potenzialmente capace di osteointegrarsi efficacemente una volta collocata in vivo. In contemporanea, sarebbe auspicabile che la stessa superficie Ti6Al4V – CT fosse in grado, una volta impiantata, di sfavorire (od addirittura inibire) l'adesione batterica; in questo modo essa sarebbe d'aiuto nel prevenire (o evitare) la colonizzazione del bioimpianto da parte di organismi patogeni e dunque di scongiurare l'eventuale e consecutivo insorgere di pericolose infezioni iatrogene in grado di provocare seri rischi per la salute dei pazienti.

In conclusione, comprendere in modo chiaro i meccanismi con i quali l'adsorbimento proteico avviene e si attua, di fatto, è l'unica via percorribile verso la direzione, ad oggi ancora largamente inesplorata, di progettare dispositivi impiantabili in grado di regolare la risposta in vivo andando direttamente a guidare il processo a livello delle interazioni atomiche e molecolari che avvengono all'interfaccia tra la superficie dell'impianto e il suo intorno fisiologico. Brevemente, si ritiene che le nozioni derivate dall'apprendimento dei meccanismi del fenomeno di adsorbimento proteico, se ben comprese e trasferite opportunamente nell'ambito della progettazione di dispositivi medici, potranno in futuro essere l'asso nella manica per tutti quegli ingegneri e scienziati dei materiali che dedicheranno i loro sforzi allo sviluppo di nuovi, sempre più sicuri, efficaci ed efficienti dispositivi medici impiantabili.

## Struttura della tesi

Il presente elaborato è strutturato in modo tale da illustrare, nei capitoli introduttivi, le proteine oggetto di indagine. I Capitoli 1, 2 e 3 sono dedicati rispettivamente ad illustrare le caratteristiche e le proprietà fondamentali della albumina, della fibronectina e del siero bovino. Per ciascun capitolo sono esposti, in breve, cenni sulla struttura e sulle funzioni della proteina (o della miscela di proteine). Queste informazioni sono corredate a sezioni specificatamente dedicate a citare i lavori di letteratura più significativi redatti da altri ricercatori sullo studio dell'adsorbimento proteico su superficie in titanio. L'analisi bibliografica, oltre ad includere lavori che prendono in esame le cinetiche di adsorbimento delle proteine sui substrati, comprende anche una breve rassegna di alcune delle ricerche che hanno concentrato l'attenzione sullo studio dell'interazione (mediata dallo strato di proteine adsorbite) tra superfici in titanio e cellule/batteri.

L'attività sperimentale è presentata in dettaglio nel Capitolo 4, in cui si trova spiegazione del processo di produzione dei campioni oggetto di indagine. Nello stesso capitolo sono introdotti: i protocolli per eseguire i test di adsorbimento proteico con le soluzioni a singolo componente di albumina e fibronectina e con la soluzione multicomponente di siero bovino; i protocolli biochimici per valutare l'esito dell'adsorbimento proteico sui campioni analizzati; i protocolli biochimici per valutare l'esito dei test cellulari sulle superficie analizzate. Il Capitolo 4 si chiude con la presentazione delle tecniche di caratterizzazione dei campioni utilizzate nel lavoro sperimentale: la spettroscopia fotoelettronica a raggi X (XPS), la misura dell'angolo di contatto, la misura del potenziale zeta ( $\zeta$ ).

Il Capitolo 5 è, invece, dedicato alla presentazione dei risultati dello studio sperimentale e al commento e la discussione degli stessi in funzione degli obiettivi prefissati.



# Indice

1	Albumina.....	1
1.1	Albumina del siero.....	1
1.1.1	Funzioni dell'albumina del siero.....	3
1.1.2	Struttura e proprietà chimiche della albumina del siero.....	4
1.2	Adsorbimento dell'albumina del siero sulle superficie dei biomateriali in titanio.....	7
1.3	Interazione tra albumina adsorbita su titanio e cellule.....	20
1.4	Interazione tra albumina adsorbita su titanio e batteri.....	24
2	Fibronectina.....	27
2.1	Fibronectina bovina.....	28
2.1.1	Funzioni della fibronectina.....	30
2.1.2	Struttura e proprietà chimiche della fibronectina bovina.....	31
2.2	Adsorbimento della fibronectina sulle superficie dei biomateriali in titanio.....	34
2.3	Interazione tra fibronectina e cellule.....	42
2.4	Interazione tra fibronectina adsorbita su titanio e batteri.....	47
3	Siero bovino.....	51
3.1	Siero fetale bovino.....	51
3.1.1	Funzioni del siero bovino.....	54
3.1.2	Composizione e proprietà del siero fetale bovino.....	55
3.2	Adsorbimento delle proteine del siero sulle superficie dei biomateriali in titanio.....	58
3.3	Interazione tra proteine del siero e cellule.....	63
4	Materiali e metodi.....	71
4.1	Metodo di preparazione dei campioni.....	71
4.1.1	Taglio.....	71
4.1.2	Lucidatura.....	72
4.1.3	Lucidatura a specchio.....	76

4.1.4	Lavaggio .....	77
4.1.5	Trattamento chimico superficiale.....	79
4.2	Test di valutazione dell'adsorbimento proteico.....	82
4.2.1	Protocolli di preparazione delle soluzioni per l'adsorbimento proteico .....	82
4.2.2	Analisi biochimiche per la valutazione dell'adsorbimento proteico.....	88
4.3	Test cellulari .....	89
4.3.1	Test cellulari di citocompatibilità.....	89
4.3.2	Test cellulari di attività antibatterica .....	90
4.4	Caratterizzazione superficiale .....	92
4.4.1	Spettroscopia fotoelettronica a raggi X (XPS/ESCA) .....	93
4.4.2	Bagnabilità.....	97
4.4.3	Potenziale zeta .....	104
5	Risultati.....	121
5.1	Risultati delle analisi di caratterizzazione superficiale.....	121
5.1.1	Spettroscopia fotoelettronica a raggi X (XPS/ESCA) .....	121
5.1.2	Bagnabilità.....	159
5.1.3	Potenziale zeta .....	163
5.2	Risultati dei test di adsorbimento proteico.....	189
5.3	Risultati dei test cellulari .....	191
5.3.1	Test cellulari di citocompatibilità.....	191
5.3.2	Test cellulari di attività antibatterica .....	193
	Conclusioni.....	197

---

# Capitolo 1

## 1 Albumina

Le albumine sono una famiglia di proteine semplici, contenute in quantità elevata nel plasma dei mammiferi ed anche, ad esempio, nel latte e nell'albume dell'uovo (da cui derivano il proprio nome). Le proteine della classe delle albumine hanno un elevato peso molecolare, compreso, tipicamente, tra i 60 ed i 70 kDa e, nell'uomo, costituiscono circa il 60% di tutte le proteine plasmatiche. Non solo nel mondo animale, però, si può ritrovare l'albumina, infatti essa si trova curiosamente, ad esempio, anche in un vegetale: la mora (*Rubus ulmifolius*) [1].

Nel seguito della trattazione viene analizzata in modo approfondito l'albumina perché utilizzata come biomolecola per la valutazione dell'adsorbimento proteico negli esperimenti legati al presente lavoro di tesi. Per quanto riguarda le informazioni che verranno date sulla struttura della proteina, non si ha la pretesa di inserire in questo lavoro di tesi una trattazione esaustiva dell'argomento. Verranno illustrati solo i concetti principali relativi alla struttura della albumina sierica bovina. Ciò che è importante, infatti, è che la funzione biologica di una proteina dipende dalla sua conformazione.

### 1.1 Albumina del siero

Tipicamente, nel contesto di laboratorio, l'albumina si ritrova sotto il nome di albumina del siero o sieralbumina (SA, *Serum albumin*) ed è usata come reagente in diversi processi biochimici. La SA è, di fatto, l'albumina (cioè un tipo di proteina globulare) che si ritrova nel sangue dei vertebrati, o meglio, più specificatamente, si trova nella frazione di sangue detta siero, per cui proprio dal siero ricava la sua denominazione.

La SA, nell'ambito biochimico, è nota anche come "frazione V" [2]. Questo soprannome si riferisce all'albumina come quinta frazione della metodologia originale di estrazione di Edwin Cohn;

---

questo metodo estrattivo, attraverso una serie di passaggi di purificazione, si pone come scopo quello di estrarre l'albumina dal plasma sanguigno. Il processo Cohn ha come fondamento la teoria che prevede una differente solubilità per l'albumina e le altre proteine plasmatiche, differenza che si basa su pH, temperatura, resistenza ionica e concentrazione proteica della proteina stessa. L'albumina, infatti, ha la più alta solubilità e il punto isoelettrico (pI) più basso rispetto a qualunque delle altre principali proteine plasmatiche e, grazie a particolari accorgimenti, può essere facilmente separata dall'insieme delle proteine plasmatiche del sangue. È proprio in base a queste nozioni che Cohn riuscì a estrarre successivamente "frazioni" del plasma sanguigno, manipolando concentrazioni differenti di solventi (come, ad esempio, l'etanolo) a pH, livelli di ioni e temperature diverse.

La SA è prodotta dal fegato, si presenta disciolta nel plasma sanguigno ed è la più abbondante proteina ematica nei mammiferi. Due diverse tipologie di SA sono di interesse nel nostro contesto (Figura 1.1): l'albumina del siero umano (HSA) e l'albumina del siero bovino (BSA). La HSA è codificata da un gene specifico indicato come ALB. La BSA è chimicamente simile all'albumina del siero umano ma possiede una sequenza amminoacidica leggermente diversa dalla HSA, come riportato dai dati di letteratura di diversi lavori scientifici risalenti agli ultimi decenni del secolo scorso ([3], [4], [5], [6]).

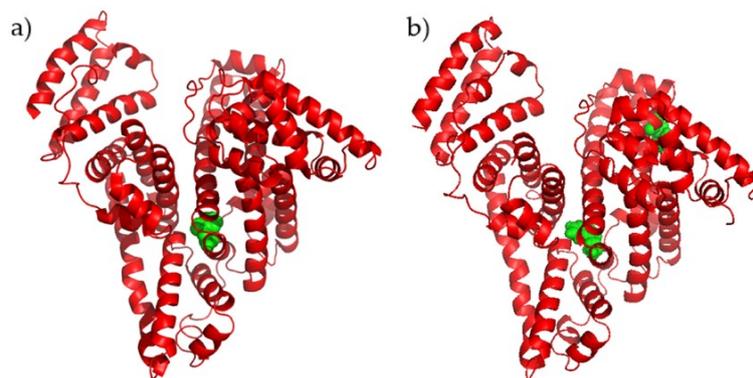


Figura 1.1 Struttura tridimensionale di: a) HSA e b) BSA [7]

Nel seguito della trattazione viene analizzata in modo approfondito la BSA perché utilizzata come biomolecola per la valutazione dell'adsorbimento proteico negli esperimenti legati al presente lavoro di tesi. Una breve panoramica viene offerta anche relativamente alla HSA, per sottolinearne l'importanza nell'organismo date le funzioni che essa è in grado di espletare.

Per quanto riguarda la funzione delle proteine appartenenti alla classe delle albumine del siero, è possibile, invece, riassumere le principali attività di queste proteine e le interazioni cellulari note come mostrato in Tabella 1.1.

Tabella 1.1 Principali funzioni e interazioni cellulari note della sieralbumina [8]

Proteina	Funzioni principali	Recettori cellulari	Tipi di cellula
Sieroalbumina	Proteina di trasporto e di clearance, mantiene l'equilibrio osmotico, lega ad alcune tipologie di recettori cellulari ed interagisce con la superficie di alcune cellule	gp30 e gp18	Endoteliale, epatocita (?)

### 1.1.1 Funzioni dell'albumina del siero

Le proteine del siero negli organismi mostrano molteplici funzioni. È però possibile, per dare un inquadramento generale, affermare che la SA è essenziale innanzitutto per la regolazione e il mantenimento della pressione oncotica, ovvero la pressione osmotica necessaria per la corretta distribuzione dei liquidi corporei nei compartimenti vascolari e nei tessuti. Senza la presenza dell'albumina nel sangue, infatti, l'alta pressione nei vasi sanguigni forzerebbe più liquidi nei tessuti e i vasi sarebbero sottoposti a flussi pressori notevoli, con conseguenti elevati sforzi di taglio sulle pareti. Oltre ad essere la proteina più presente nel sangue, poi, la SA è anche il principale veicolo di altre sostanze e biomolecole trasportate attraverso il sangue medesimo. L'albumina, infatti, è in grado di funzionare da *carrier* plasmatico nei confronti di diversi ormoni steroidei idrofobici a cui è in grado di vincolarsi per via di un legame aspecifico e, ancora, è in grado di comportarsi da proteina di trasporto per acidi grassi o addirittura farmaci. L'elenco delle sostanze per le quali la SA è in grado di fare da *carrier* è corposo. Basti pensare che la SA può coadiuvare nel trasporto: degli ormoni della tiroide; degli altri ormoni, in particolare quelli solubili nei grassi (liposolubili); degli acidi grassi liberi; della bilirubina non coniugata; di molti farmaci. La SA è inoltre in grado di legarsi (con legame competitivo) con gli ioni calcio ( $Ca^{2+}$ ) ed è in grado di svolgere un ruolo attivo come sistema tampone del pH sanguigno. Valori di SA circolante nel

---

flusso ematico o troppo elevati o troppo ridotti, nell'uomo, in generale, sono da tenere attentamente sotto osservazione perché dannosi o indice di stati patologici anche gravi.

### 1.1.2 Struttura e proprietà chimiche della albumina del siero

L'albumina del siero del bovino (BSA) ha massa molecolare di circa 66 kDa ed è una proteina della categoria dell'albumina sierica che è derivata da mucche, o meglio bovini domestici (*Bos taurus*). Tale proteina (Figura 1.2) viene comunemente utilizzata per esperimenti di laboratorio sulla valutazione dell'adsorbimento proteico. Il contenuto di BSA all'interno del siero bovino si aggira tra i 20 e i 36 mg/ml [9] ed essa costituisce uno dei componenti presenti in maggior quantità anche nel siero animale.

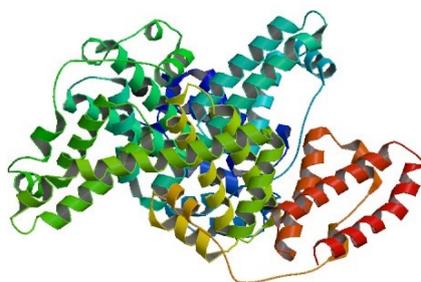


Figura 1.2 Struttura tridimensionale della BSA (modello "ribbon") [10]

La proteina precursore della BSA a piena lunghezza è di 607 aminoacidi (AA) di lunghezza. Un peptide residuo N-terminale di segnalazione viene tagliato dalla proteina precursore al momento della secrezione, quindi il prodotto proteico iniziale contiene 589 residui di aminoacidi. Ulteriori quattro aminoacidi si scindono dalla sequenza peptidica che costituisce la proteina precursore per produrre la proteina matura BSA, contenente complessivamente, al netto, 583 aminoacidi (Tabella 1.2) [10].

Tabella 1.2 Struttura della BSA in termini di unità amminoacidiche [10]

Peptide	Posizione	Lunghezza (aa)	Peso molecolare (Da)
<b>Precursore a lunghezza intera</b>	1-607	607	69'324
<b>Peptide di segnalazione</b>	1-18	18	2'107
<b>Propeptide</b>	19-22	4	478
<b>Proteina matura</b>	25-607	583	66'463

---

Le dimensioni dell'albumina di siero bovino sono estremamente ridotte, anche se, nell'ambito delle proteine la BSA risulta essere una proteina relativamente grossa, dalla forma ellissoide (dove  $a = b < c$ ) con dimensione compresa nel range delimitato dai seguenti estremi:  $14 \times 4 \times 4$  nm. Il *fold*ing, ovvero il ripiegamento, della BSA è caratterizzato da una disposizione unica di nove ripiegamenti disolfuro (*disulfide loops*) creati da 17 legami disolfuro. Questa struttura, caratterizzata da 17 ponti disolfuro, contribuisce alla stabilità della proteina nella circolazione del sangue. La BSA è poi composta da tre domini globulari strutturalmente simili, ognuno dei quali contiene due sottodomini, denominati sottodominio IA, IB, IIA, IIB, IIIA e IIIB. L'analisi della struttura cristallina di BSA indica anche la presenza di due siti di legame principali e strutturalmente selettivi, il sito I e sito II, che si trovano in cavità idrofobiche nei sottodomini IIA e IIIA, rispettivamente (Figura 1.3). L'affinità di legame offerta dal sito I è principalmente attraverso interazioni idrofobiche, mentre il sito II comporta una combinazione di interazioni idrofobiche, elettrostatiche e l'instaurarsi di legami idrogeno tra la proteina e la biomolecola che con essa interagisce.

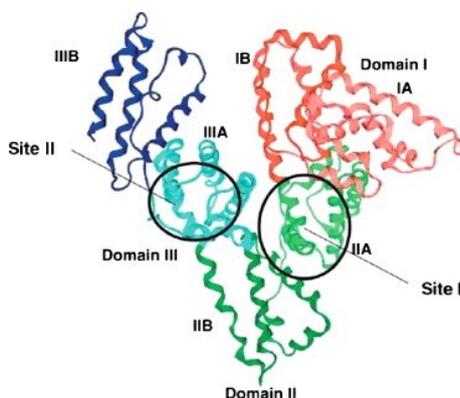


Figura 1.3 Struttura cristallina della BSA e posizione di domini e relativi sottodomini [11].

La carica netta della BSA a pH fisiologico per i domini I, II e III è rispettivamente approssimativa a -9, -8 e +2. Il punto isoelettrico (pI) della BSA si può considerare aggirarsi nell'intorno di circa 4,7 o 4,9 [12]; ciò sta a significare che, in condizioni fisiologiche (pH 7,4) tale proteina assume una carica negativa. Altre proprietà fisico/chimiche importanti da menzionare per il caso della BSA sono riportate in Tabella 1.3.

Tabella 1.3 Valori di peso molecolare e punto isoelettrico della BSA

Proprietà	Valore
Peso molecolare	66'463 Da (= 66'5 kDa)
Punto isoelettrico	4,7 - 4,9 [12]

Anche la HSA, negli studi sulla struttura, è descritta come proteina dalla forma ellissoide con dimensioni di 4 x 4 x 14 nm. La HSA è la proteina predominante del plasma umano, dove costituisce il 60-70% del plasma in una concentrazione di circa 40 mg/ml (per gli adulti) [13]. L'HSA è, come la BSA, una proteina globulare costituita però in questo caso da 585 aminoacidi, e con un peso molecolare di circa 66 kDa. Sebbene diversi residui amminoacidici siano differenti tra la HSA e la BSA, solo alcuni di essi sono sufficientemente esposti sulla superficie della biomolecola per consentire il riconoscimento e il legame specifico di altre molecole con la proteina nella sua forma piegata nativa. Altre regioni amminoacidiche, ad esempio, sono esposte solo dopo la digestione o la denaturazione della proteina. In generale, pertanto, è possibile affermare come la conformazione di BSA sia simile a quella di HSA a causa del 76% di omologia della sequenza di aminoacidi (Figura 1.4), benché la struttura tridimensionale 3D della BSA si differenzi leggermente da quella della HSA.

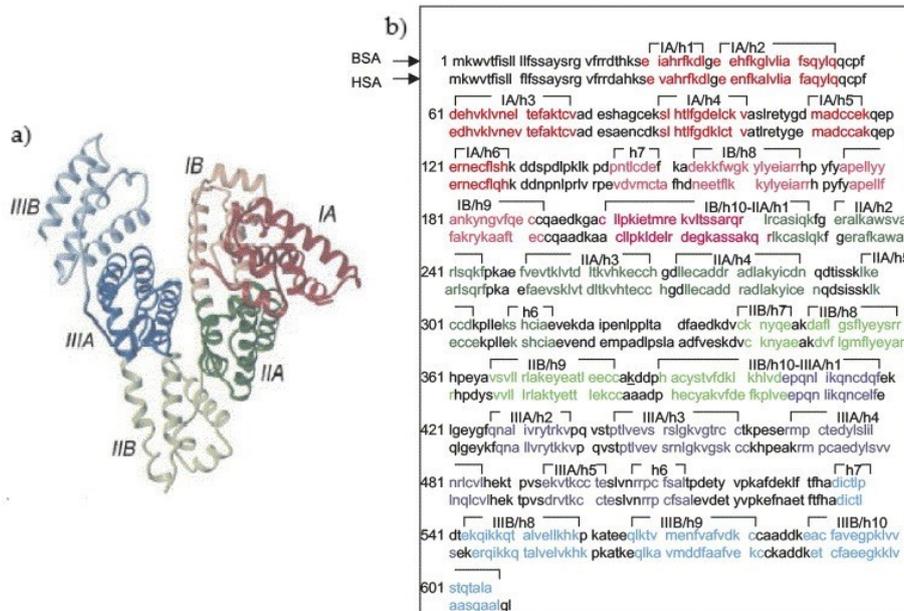


Figura 1.4 Struttura dei domini e sequenze di BSA e HSA; a) Struttura della molecola di albumina; b) omologia tra le sequenze di BSA e HSA [14].

---

Quello che più è importante da far notare, per quanto riguarda la HSA, è il fatto che essa è una proteina relativamente flessibile ed è, inoltre, una proteina chiave nello studio dell'interazione biologica tra biomateriali e tessuti umani (per tessuto si intende anche il sangue). La proteina immobilizzata può, infatti, essere utilizzata per ridurre al minimo le interazioni del sangue con una superficie, riducendo notevolmente la risposta infiammatoria acuta al materiale. Dal momento che la HSA esprime una carica negativa a pH fisiologico ( $pI = 4,7$  [15]), essa dimostra proprietà antiadesive nei confronti delle cellule del sangue, come ad esempio le piastrine. Queste ultime, quando attivate, sono note per esprimere una carica superficiale debolmente negativa, carica che male interagisce a livello elettrostatico con la carica superficiale espressa dalla HSA. La concentrazione di albumina nel sangue (albuminemia), come già ribadito in precedenza, varia fra 3,5 e 5,0 mg/ml e, per darne conto in modo quantitativo, la sua presenza si misura facilmente con metodi biochimici come l'elettroforesi delle proteine. Eventuali valori più bassi di albuminemia sono, nella maggior parte dei casi, da ricondursi a una ridotta produzione di albumina da parte del fegato. La capacità di sintetizzare proteine da parte degli epatociti può infatti risultare compromessa qualora si verificano patologie al fegato (ad esempio: epatiti croniche, cirrosi epatica). In questi casi, la concentrazione di HSA costituisce un indice importante, sia dal punto di vista diagnostico che prognostico.

## **1.2 Adsorbimento dell'albumina del siero sulle superficie dei biomateriali in titanio**

Diversi sono gli studi scientifici che hanno provato, nel corso degli anni, ad indagare in modo approfondito l'interazione tra la SA e la superficie di un biomateriale. Quali proteine si adsorbono preferenzialmente dal siero su di un numero limitato di siti di legame come quelli che può esporre la lega di titanio dipende infatti da molteplici fattori: le concentrazioni relative di proteine nei fluidi considerati e l'affinità superficiale tra proteine e substrato ([16], [17], [18]), la bagnabilità e l'energia libera superficiale del substrato, la carica superficiale del substrato, la topografia superficiale del substrato, la presenza di impurezze superficiali o di particolari gruppi funzionali aggraffati al substrato, ...ecc. La natura delle proteine adsorbite dal siero e la loro conformazione dipendono infatti dall'insieme delle proprietà superficiali che mostra la superficie del biomateriale, ma al contempo dipendono anche dalle stesse proprietà di affinità delle proteine nei confronti dei substrati con i quali esse si interfacciano.

---

Nel seguito della trattazione sono presentati alcuni esempi di lavori di ricerca in cui sono stati indagati gli aspetti del fenomeno di adsorbimento proteico su superficie in titanio a contatto con soluzioni proteiche contenenti SA. Ove possibile, si è cercato di prediligere un'esposizione cronologica dei risultati dei lavori di ricerca; questo perché si è ritenuto interessante dare un'idea di come l'argomento sia stato studiato nel corso degli anni fino ad oggi. Ciascun lavoro è presentato, corredato da brevi commenti, per dare idea degli scopi, delle tecniche di analisi impiegate e dei risultati ottenuti. Si predilige andare ad illustrare nel dettaglio solamente i casi in cui è stata investigata l'interazione tra SA (in generale bovina od umana) e superficie metallica di titanio (puro oppure in lega); questo per non rendere pesante il discorso e per concentrare l'attenzione principale sui materiali oggetto di studio nel presente lavoro di tesi.

In passato è stato proposto, da alcuni studiosi, che la SA potesse essere adsorbita sulla superficie dei metalli dalle forze elettrostatiche, dal momento che le superfici metalliche portano generalmente con sé una carica superficiale intrinseca e anche le proteine sono dotate di una certa carica in ambiente fisiologico [19]. Ad esempio, le proteine con un pI inferiore a 7,4 come l'albumina sono caricate negativamente al pH fisiologico. Nello stesso studio gli autori proposero una teoria in grado di correlare la bagnabilità di una superficie con la sua capacità di adsorbire proteine. Dai risultati emerse infatti che le superfici idrofiliche testate erano in grado di adsorbire meno proteine rispetto alle superfici idrofobiche. Inoltre, emerse come le interazioni elettrostatiche tra la proteina e il metallo potessero essere di grande importanza nel determinare la quantità di proteina adsorbita. Conferma a questi risultati sembrò arrivare anche da altri esperimenti [20] dedicati ad un più approfondito studio dell'adsorbimento di SA sulle superfici metalliche. Dei metalli oggetti di studio, il gruppo di ricercatori affiliati a Williams e Williams, trovò che quelli che adsorbivano bassi livelli di albumina erano di carattere elettronegativo. È da considerare, però, che per l'epoca, tali osservazioni, seppure interessanti, si rivelarono già inizialmente molto difficili da conciliare al contesto del titanio, dove oltre alla cinetica di adsorbimento proteico era necessario valutare, in contemporanea, il fatto che il titanio esposto ad un ambiente ricco di ossigeno tendesse a passivarsi facilmente e molto rapidamente. Se dunque fosse anche stato dato per certo che carica superficiale e bagnabilità tra le superfici metalliche e l'albumina in soluzione potessero contribuire al comportamento di adsorbimento della proteina stessa, non poteva essere invece dato per scontato di riuscire in modo semplice a ricavare un modello di comportamento generale (valido in

---

tutte le situazioni) in grado di descrivere con appropriatezza il fenomeno dell'adsorbimento proteico sul titanio. Mentre ci potevano essere delle chiare tendenze nell'adsorbimento delle proteine rispetto alla bagnabilità e alle forze elettrostatiche, va infatti notato che i protocolli sperimentali impiegati in quel periodo potevano non tenere conto del fatto che più proteine venissero adsorbite dalle superficie in modo reversibile ([21], [22]) e che spesso, in vivo, si verificava l'effetto Vroman [23]. Diversi studi scientifici dimostrarono infatti come l'adsorbimento da miscele di proteine fosse un processo piuttosto selettivo e gerarchico, in grado di portare tendenzialmente ad un arricchimento delle superficie per via di adsorbimento delle sole proteine con l'affinità superficiale più elevata al substrato stesso. Secondo la definizione di effetto Vroman l'adsorbimento di soluzioni multicomponenti su superficie solide è infatti un processo dinamico: prima arrivano ad adsorbirsi sulla superficie le proteine a basso peso e alta concentrazione; tali proteine, in un secondo momento, sono poi sostituite da proteine più grosse, che magari sono presenti nel fluido a più bassa concentrazione, ma che hanno una maggiore affinità per la superficie. Le proteine ad alta concentrazione, di fatto, monopolizzano il processo di adsorbimento sulla superficie in tempi brevi a causa della loro maggiore concentrazione; con il passare del tempo, però, si verificano processi per i quali le proteine con affinità superficiali più elevate (rispetto alle prime proteine adsorbite) tendono a scalzare le concorrenti dalla superficie. Si verifica, di fatto, un desorbimento di alcune biomolecole, le quali vengono scalzate e prontamente sostituite da specie di altra tipologia, in un processo in continua evoluzione. In tempi molto lunghi, pertanto, risultano presenti sulla superficie solo le proteine ad affinità più elevata, anche se la loro concentrazione in soluzione risulta bassa. A rigore, per soluzioni a singolo componente, come quelle oggetto di studio nel lavoro di Ivarsson, l'effetto Vroman non sarebbe stato riscontrabile. Nello studio del fenomeno dell'adsorbimento proteico, però, non tanto quando si considerano soluzioni di singola proteina, ma quando si considerano miscele multicomponenti tale effetto è da considerarsi come di fondamentale importanza. L'effetto Vroman dipende, infatti, oltre che dall'affinità proteina/substrato, anche dal tempo di interazione tra i due elementi; perciò si possono osservare sulle superficie testate dei cambiamenti significativi in tempi molto brevi, di pochi minuti appena, e ciò contribuisce senza dubbio a rendere variegata e di difficile interpretazione la composizione dello strato superficiale rilevato sulle superficie analizzate. Il processo di competizione delle proteine adsorbite su di un substrato, poi, è più pronunciato su superficie idrofiliche come l'ossido di titanio [24], a cui le proteine sono tipicamente meno

---

---

strettamente ritenute [25]. L'effetto Vroman, di fatto, introduce un'ulteriore complicazione allo studio del fenomeno di adsorbimento proteico. Con l'obiettivo di produrre modifiche superficiali per variare la bagnabilità delle superfici in titanio, e valutare l'influenza della bagnabilità sul fenomeno di adsorbimento proteico di SA sul titanio vennero condotti, in tempi successivi, numerosi studi. Alcuni risultati di queste ricerche sembrarono dimostrare che il titanio idrofilo mostrava un ridotto adsorbimento di albumina ([26], [27]).

Altri studi interessanti vennero condotti allo scopo di comprendere la cinetica di adsorbimento, le isoterme di adsorbimento e desorbimento caratterizzanti l'interazione tra SA e una vasta gamma di ossidi metallici. Per prima cosa, venne osservato e confermato come alcuni metalli fossero in grado di assorbire quantità di proteine considerevolmente superiori a quelle che ci si poteva aspettare dalla sola energia di superficie; come già detto, si ipotizzò per giustificare il tutto il fatto che le forze elettrostatiche potessero essere responsabili di tale fenomeno [19]. Approfondendo gli studi sul fenomeno dell'adsorbimento proteico in vitro, in modo non competitivo, da soluzioni a singola proteina di albumina del siero umana (HSA-<sup>125</sup>I) si dedusse come alcuni materiali metallici fossero in grado di adsorbire solo quantità molto basse di albumina e la quantità adsorbita raggiungesse un valore costante entro le prime ore di esposizione alla soluzione proteica; questi metalli includevano, ad esempio, la lega di titanio Ti6Al4V e i metalli puri come il titanio e l'alluminio. Il titanio, seguendo questo tipo di comportamento in vitro, adsorbiva livelli molto bassi di albumina (che rimanevano costanti col progredire degli esperimenti); l'albumina adsorbita inoltre si dimostrava capace di desorbirsi relativamente facilmente. Quest'ultima importante rilevazione consentì di ipotizzare che l'albumina adsorbita sul titanio fosse non legata chimicamente in modo molto saldo al suo substrato. Questo meccanismo venne interpretato come conseguenza dell'effetto Vroman ([28], [25]).

Indagini ulteriori mostrarono, poi, come i diversi ossidi di titanio potessero influenzare l'adsorbimento di HSA e del fibrinogeno dal plasma (Fib) [29]. Le superfici in titanio con diverse strutture di ossido sembravano legarsi significativamente a quantità importanti di HSA e Fib. I risultati dell'adsorbimento di proteine in questo studio, tuttavia, si dimostrarono difficili da correlare alla bagnabilità delle superficie e alla contaminazione superficiale. Quello che emerse fu invece come parametri superficiali delle superficie in titanio (i.e. rugosità e composizione chimica a

---

livello molecolare, e non la bagnabilità di per sé) fossero fondamentali e giocassero un ruolo significativo nella determinazione della bagnabilità delle superficie.

Ancora, in tempi successivi (1998), nello studio di Fangyan e collaboratori albumina di siero umano e fibrinogeno iodurati vennero adsorbiti da soluzioni in PBS su dei film di ossido di titanio, in condizioni di ambiente e temperatura normali [30]. Il titanio venne evaporato su film polimerici e l'adsorbimento proteico su quei sottili strati venne in seguito quantificato con saggi radioimmunologici (RIA). L'incubazione delle soluzioni delle diverse proteine venne studiata per valutare il profilo di adsorbimento e di desorbimento sulle superficie oggetto di studio. I risultati misero in luce come, anche in questo caso, venisse adsorbita inizialmente dalle superfici una quantità maggiore di albumina (in confronto con il fibrinogeno), ma che in tempi successivi il fibrinogeno tendesse progressivamente a scalzare l'albumina dalla propria sede di adsorbimento. Questi fenomeni furono ricollegati, nuovamente, alle conseguenze dell'effetto Vroman ed a differenti proprietà delle due proteine. Lo studio non riuscì però a dare alcuna dimostrazione in merito ai fenomeni di cambiamento conformazionale delle proteine sulle differenti superficie, dal momento che venne dedotta una apparente influenza dei metodi di radiomarcatura delle proteine sulla conformazione delle proteine prima dell'incubazione delle stesse sulle superficie in titanio analizzate.

Altri autori studiarono le conseguenze dell'adsorbimento di BSA sulle superfici di particelle di ossido di titanio ( $\text{TiO}_2$ ) ed altri tipi di ossidi (tra i quali diossido di silicio, ossido di zirconio e ossido di alluminio) in funzione del pH [31]. Eseguendo i test di adsorbimento proteico di BSA sulle particelle, a pH 5, venne riscontrata una elevata affinità nei confronti dell'adsorbimento di albumina in particolare sugli ossidi metallici che esibivano una maggiore densità superficiale di cariche positive (ad esempio, zirconia e allumina). Gli stessi autori dimostrarono come il comportamento di adsorbimento di BSA alle interfacce tra soluzione proteica ed ossido metallico fossero influenzate dalla carica superficiale degli ossidi di metallo e dal grado di dissociazione dei gruppi ionici sulle molecole di BSA. Fukuzaki e colleghi, inoltre, scoprirono anche come le quantità di proteine adsorbite fossero influenzate dal pH, dalla forza ionica e dalla natura delle superfici adsorbenti. In dettaglio, venne individuato il ruolo importante dell'orientamento dei gruppi carbossilici ed amminici delle molecole di BSA nella formazione di legami sulle superfici di contatto. Venne infatti valutato come l'adsorbimento di BSA risultasse più pronunciato nella

---

regione acida e nei casi di titania, zirconia e allumina (che mostravano cariche superficiali positive a pH 5,0). Questi risultati suggerirono che i gruppi ionici negativi, principalmente i gruppi carbossilici, sulle molecole di BSA fossero orientati verso le superfici di contatto e interagissero con i gruppi superficiali degli ossidi metallici. I dati presentati, di fatto, rivelarono come la natura elettrostatica dei substrati di ossido di metallo potesse influenzare l'affinità di adsorbimento e la quantità di BSA adsorbita e come la densità di carica superficiale dell'ossido di metallo fosse un fattore chiave a governare l'entità del massimo adsorbimento di BSA (in funzione della conformazione assunta dalla BSA stessa nell'interagire con la superficie).

Nello stesso periodo, il fenomeno dell'adsorbimento proteico della BSA su polveri di ossido di titanio ( $\text{TiO}_2$ ) venne valutato da altri scienziati in funzione della concentrazione della proteina, del pH ed in presenza di ioni calcio e fosfato in soluzione [32]. Vennero studiati gli effetti del pH, della concentrazione della soluzione proteica e della forza ionica. Gli studiosi incubarono le polveri di ossido di titanio in BSA per specifici intervalli di tempo (a pH differenti) con concentrazioni proteiche variabili. Gli esperimenti indicarono chiaramente come il legame dell'albumina sul titanio fosse  $\text{Ca}^{2+}$  e/o  $\text{Mg}^{2+}$  dipendente. Ciò trovò conferma in uno studio successivo [33], il quale mostrò che quando l'adsorbimento di albumina di siero umano (HSA) su polveri di titanio era preceduto da pretrattamenti di  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  o  $\text{K}^+$  a pH fisiologico, le quantità assorbite aumentavano considerevolmente dopo  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$  ma non dopo i pretrattamenti di  $\text{K}^+$ .

L'adsorbimento di BSA all'interfaccia tra soluzioni acquose di NaCl e  $\text{TiO}_2$  in funzione della concentrazione di pH ed elettrolita venne poi valutato utilizzando misure cinetiche e stazionarie [34]. Fu rilevato, in tale studio, che la struttura delle proteine adsorbite era correlata ai diversi stati conformazionali che le molecole di albumina di siero bovino adottavano a seconda delle variazioni di pH. È noto infatti come la conformazione della BSA subisca vari cambiamenti su diversi tipi di superfici a seconda delle condizioni di processo in cui avviene l'adsorbimento proteico [35]. Ai tempi, tuttavia, in letteratura non erano ancora facilmente reperibili molte informazioni su ciò che accadeva alla proteina adsorbita sul titanio bioattivo e su come questi cambiamenti nella struttura secondaria della BSA regolassero la reazione biologica in vivo. Studi successivi a quello di Giacomelli e collaboratori, cercarono di ampliare ulteriormente le nozioni sino ad allora disponibili sull'argomento.

---

Ad esempio, venne scoperto come la rugosità superficiale dei campioni fosse un fattore di notevole importanza sulla risposta cellulare. Questo aspetto venne studiato approfonditamente in vari studi di letteratura. Deligianni e collaboratori, nel 2001, condussero diversi esperimenti per andare a studiare l'effetto della rugosità superficiale della lega di titanio Ti6Al4V sull'adsorbimento di proteine [36]. In particolare, essi valutarono l'adsorbimento proteico di BSA e BFN, da soluzioni a singola proteina, su superfici in lega di titanio ruvide e lisce (si veda, per un confronto tra i risultati, il Capitolo 2 dove lo stesso studio è citato per l'analisi dell'adsorbimento della fibronectina). Entrambi i metodi di indagine utilizzati (spettroscopia fotoelettronica a raggi X e radiomarcatura proteica), dimostrarono come la BSA venisse adsorbita preferenzialmente sul substrato liscio rispetto a quello rugoso. La BSA era in realtà adsorbita in grandi quantità in un tempo molto breve per entrambe le superficie, lisce e rugose, ma si poteva osservare una netta dipendenza tra la quantità di BSA adsorbita e la rugosità della superficie, dal momento che la BSA era due volte e mezzo più adsorbita sulla lega liscia anziché sulla stessa tipologia di materiale ma con superficie ruvida (si veda il Capitolo 2 per il confronto con l'adsorbimento di un'altra proteina, la fibronectina, sulle stesse superfici). L'irrugosimento di una superficie di titanio creava una superficie più idrofila, e questo era noto in letteratura grazie a studi precedenti. L'aumento di idrofilia superficiale del titanio sembrò, dunque, dai risultati dello studio, tradursi in un adsorbimento di albumina inferiore. Ulteriore informazione derivata da tale studio fu l'indicazione che il processo di produzione chimica o meccanica, utilizzato per ottenere la topografia superficiale dei campioni, potesse influenzare il comportamento di adsorbimento della proteina.

Sulla scia di questi risultati, altri gruppi di ricerca intrapresero nuovi studi per indagare gli effetti del comportamento delle proteine adsorbite su superficie in titanio. Nello stesso anno in cui Deligianni divulgò i suoi risultati, anche il gruppo di Tidwell espose al pubblico i risultati dei propri studi sull'adsorbimento proteico relativi alla caratterizzazione di film di BSA e BFN adsorbiti su diverse tipologie di superficie (tra le quali anche fogli di titanio) ed analizzati attraverso differenti tecniche, quali: spettrometria di massa di ioni secondari statici a tempo di volo (ToF-SIMS), spettroscopia fotoelettronica a raggi X (XPS) e tecniche di radiomarcatura [37]. Il tentativo, in questo caso, fu quello di fornire informazioni sull'identità delle proteine adsorbite e sulla loro conformazione, orientamento, denaturazione, ecc. I diversi pattern di intensità di ToF-SIMS statici amminoacidici osservati indicarono infatti come la distribuzione degli amminoacidi

---

nella regione più esterna dei film di albumina adsorbita fosse diversa sui vari substrati testati. Ciò fu ipotizzato correlato alla possibilità che l'albumina si disponesse con un orientamento o una conformazione leggermente diversa sulle diverse superficie oggetto di indagine.

In uno studio del 2004, Sousa e collaboratori dimostrarono come la cinetica dell'adsorbimento della HSA sulle superficie in ossido di titanio di diversa natura (realizzate una attraverso la tecnica dello *sputtering* e l'altra mediante ossidazione in perossido di idrogeno) fosse differente [38]. In particolare, dimostrarono come la superficie ossidata chimicamente assorbisse meno albumina in confronto a quella creata per *sputtering*, ma ciononostante le molecole fossero aderenti e più fortemente attaccate alla superficie ossidata chimicamente. Essi dedussero e dimostrano come l'idrofilia di una superficie metallica potesse essere un fattore importante nella determinazione dell'esito dell'adsorbimento di proteine, ma ipotizzarono come potessero anche esserci altri fattori rilevanti per l'adsorbimento su superfici metalliche: la carica superficiale e il legame chimico in grado di instaurarsi tra il metallo e la proteina. Dallo studio emerse anche come le macromolecole adsorbite potessero utilizzare diversi siti di adsorbimento a seconda della loro struttura e della loro massa molecolare. A basse concentrazioni, si ipotizzò che le proteine adsorbite fossero in uno stato dispiegato con siti di legame più pronti per l'adsorbimento, dal momento che venne rilevata una sostanziale maggiore predisposizione della proteina ad adsorbirsi velocemente a basse concentrazioni.

Lo studio dell'influenza dei film di titanio con la topografia su scala nanometrica sull'adsorbimento delle proteine venne portato avanti anche da altri ricercatori [39]. Utilizzando differenti modelli di film in titanio, vennero studiate le composizioni chimiche, le topografie superficiali e la bagnabilità. I film analizzati condividevano la stessa chimica di superficie ma esibivano, tra loro, diverse topografie su scala nanometrica. Vennero valutati film in titanio di quella tipologia proprio come sistemi modello per studi biologici riguardanti gli effetti di topografia di superficie. I film, ottenuti per evaporazione, furono prodotti variando rispettivamente la velocità di deposizione e lo spessore del film in modo da ottenere rugosità superficiale su scala nanometrica, con diverse granulometrie sulla loro superficie. Lo studio andò a valutare l'adsorbimento di BSA su questi film in titanio. Nessuna differenza statisticamente significativa, tuttavia, venne osservata per l'adsorbimento di BSA tra i diversi gruppi di film di titanio. Il gruppo andò allora in seguito a studiare la relazione tra la carica elettrica e

---

l'adsorbimento di proteine sulla superficie di materiali in titanio funzionalizzati con molecole organiche, per comprendere il meccanismo di integrazione biologica dei materiali con i tessuti [40]. Venne indagata l'influenza della chimica superficiale e della carica elettrica superficiale dei film sottili di titanio (con la tecnica del potenziale  $\zeta$ ) sull'adsorbimento di fibrinogeno e sulla proliferazione cellulare. I film sottili in titanio, in particolare, vennero funzionalizzati in superficie con diversi gruppi terminali funzionali, come i gruppi  $-\text{CH}=\text{CH}_2$ ,  $-\text{NH}_2$  e  $-\text{COOH}$ , al fine di produrre superfici di proprietà di carica elettrica variabile tra loro. La composizione chimica, la carica elettrica e la bagnabilità superficiale vennero studiate utilizzando, rispettivamente: spettroscopia fotoelettronica a raggi X (XPS), potenziale  $\zeta$  e angolo di contatto con l'acqua. In particolare, per quanto riguarda le misure di potenziale  $\zeta$ , vennero identificate differenze abbastanza nette nelle interazioni elettrocinetiche all'interfaccia tra elettrolita acquoso e la superficie dei materiali oggetto di analisi, sia prima che dopo l'adsorbimento proteico. In dettaglio, risultò che i campioni in titanio funzionalizzati con i gruppi  $-\text{COOH}$  mostravano un adsorbimento proteico di fibrinogeno inferiore rispetto a tutti gli altri gruppi, cioè i film sottili di titanio funzionalizzati  $-\text{NH}_2$ ,  $-\text{CH}=\text{CH}_2$ , in accordo con i risultati di altri ricercatori [41]. Venne anche osservata una generale tendenza ad un adsorbimento più basso sulle superficie dei campioni che mostravano potenziale  $\zeta$  inferiore.

Gli effetti del pH e della temperatura sull'equilibrio e la cinetica dell'adsorbimento della BSA su polveri biossido di titanio ( $\text{TiO}_2$ ) vennero approfonditi e i risultati vennero conseguentemente affinati anche in tempi successivi. Si trovò, ad esempio, come le capacità di adsorbimento di BSA sull'ossido di titanio fossero superiori in alcuni range di pH e di temperature [42]. Nello specifico, vennero condotti esperimenti per la valutazione del tasso di adsorbimento di BSA e delle isoterme di adsorbimento alle condizioni di pH 4, 5 e 10 e in un intervallo di temperatura compreso tra i 20 e i 40 °C. I risultati degli esperimenti mostrarono come l'adsorbimento risultasse migliorato a bassi pH e temperature elevate. A pH 4 e temperatura di 40 °C l'adsorbimento di BSA sulle polveri di titanio risultava più elevato. Sempre nello stesso studio, vennero anche indagate la capacità di adsorbimento e la cinetica di adsorbimento della BSA sul titanio. La cinetica di adsorbimento di BSA sull'ossido di titanio a pH e temperature differenti, in tale studio, in particolare, portò ad ipotizzare come valori differenti delle costanti di velocità di adsorbimento a determinati pH potessero essere attribuiti o al cambiamento della struttura topografica dei pori delle polveri in

---

TiO<sub>2</sub> o, in alternativa, alla denaturazione mediante cambiamento conformazionale di BSA con pH crescente.

In uno studio ulteriore, più recente, sottili film in ossido di titanio TiO<sub>2</sub> vennero utilizzati come superficie campione per studiare l'adsorbimento di BSA dall'immersione in due soluzioni con diversa concentrazione di proteine [43]. L'adsorbimento di BSA venne seguito in situ mediante ellissometria dinamica e gli strati di BSA adsorbiti vennero caratterizzati mediante elettrometria spettroscopica. Ne risultarono le seguenti considerazioni: la velocità di adsorbimento del BSA diminuiva con il diminuire della concentrazione proteica nella soluzione; quantità diverse di BSA venivano adsorbite sulle diverse pellicole di ossido di metallo. La bagnabilità dei film di ossido di titanio, in aggiunta, sembrava avere una forte influenza sull'adsorbimento della BSA, cosa peraltro già osservata come risultato dei lavori precedentemente citati.

Uno studio ancora più recente, infine, dimostrò in vitro come le diverse caratteristiche del titanio bioattivo potessero avere effetti diversi sulla BSA [44]. Vennero testati, specificatamente, campioni differenti: (i) sottoposti a trattamento acido-alcalino (AA-Ti); (ii) sottoposti ad attacco alcalino e trattati termicamente (AH-Ti); (iii) non sottoposti ad alcun trattamento (P-Ti). Secondo i risultati di questi ricercatori, la superficie totale occupata da gruppi idrossile e la carica sulla superficie del titanio erano di importanza cruciale per la quantità, l'orientamento e la modifica di conformazione della BSA (in relazione alla struttura secondaria della proteina). I campioni sottoposti a trattamento chimico, vennero ipotizzati infatti dotati di un comportamento bioattivo legato ad una migliorata idrofilicità e ad una più alta energia superficiale, entrambe caratteristiche apportate come conseguenza del trattamento chimico stesso. Conferma venne dedotta dalla rilevazione di un trend nella presenza di gruppi OH sulle superficie testate, maggiori sul titanio sottoposto a trattamento acido alcalino, inferiori sul titanio sottoposto a trattamento acido e termico e ancora inferiori per i substrati di controllo (nell'ordine AA-Ti > AH-Ti > P-Ti). Per il substrato con predominanza di gruppi OH, inoltre, venne rilevato una maggiore capacità adsorbente, in confronto agli altri substrati. Il gruppo di ricerca suppose che questa diversità nella densità di gruppi OH sulle superficie dei substrati fosse in grado di influenzare la capacità di adsorbimento della BSA di interagire con la superficie stessa. La BSA in soluzione contiene infatti differenti gruppi -NH<sub>3</sub><sup>+</sup> e -COO<sup>-</sup> nella sua sequenza amminoacidica; questi gruppi possono essere più o meno esposti e pronti all'interazione con un certo substrato a seconda delle condizioni in cui

l'adsorbimento avviene. Hu e Yang, da queste premesse, dedussero come fosse possibile che, a seconda delle modalità di interazione dei gruppi carichi della proteina con il substrato, la proteina potesse adsorbirsi con una orientazione o più laterale (*side-on*) o più frontale (*end-on*). La successiva risposta biologica cellulare risultò proprio dipendere, di fatto, dallo stato della BSA sui metalli titanio, perché la struttura superficiale del titanio mostrava effetti notevoli sul cambiamento di conformazione delle proteine adsorbite. La BSA adsorbita sui metalli in titanio, in particolare, risultò essere fondamentale nel regolare la bioattività delle superficie stesse nei confronti di cellule precursori di osteoblasti. Il cambiamento conformazionale indotto dalla struttura superficiale dei campioni testati sulle proteine adsorbite venne individuato come primo responsabile della differenza nella risposta bioattiva data dalle differenti superficie in titanio (si veda la sezione seguente del presente capitolo, Interazione tra albumina adsorbita su titanio e cellule).

Nella Tabella 1.4 sono riportati in modo schematico i lavori più significativi che hanno indagato l'aspetto dell'interazione tra albumina e substrati in titanio.

*Tabella 1.4 Riassunto schematico dell'analisi della letteratura scientifica nell'ambito dello studio sull'interazione tra albumina e substrati in titanio*

<b>Tipo di superficie</b>	<b>Tipo di proteina</b>	<b>Tecnica di analisi</b>	<b>Sintesi dei risultati significativi</b>	<b>Riferimento</b>
Particelle di ossido di titanio (TiO <sub>2</sub> , rutilo)	BSA	Titolazione potenziometrica	Densità superficiale di carica e natura elettrostatica del substrato influenzano l'adsorbimento proteico	[31]
Particelle di ossido di titanio	BSA	Misure di mobilità elettroforetica, titolazione potenziometrica	Idratazione, effetti elettrostatici e ioni adsorbiti sul substrato influenzano l'adsorbimento proteico	[34]
Film di ossido di titanio	HSA	Tecniche di radiomarcatura	Proteine differenti hanno affinità differenti verso un determinato substrato. L'affinità della proteina al substrato genera un effetto di adsorbimento competitivo se si testano soluzioni multicomponenti	[30]
Dischi di lega di titanio lisci e rugosi (Ti6Al4V)	BSA	Spettroscopia fotoelettronica a raggi X (XPS), tecniche di radiomarcatura	Topografia superficiale e rugosità del substrato influenzano l'adsorbimento proteico	[36]

Fogli di titanio	BSA, I-125 BSA	Spettrometria di massa di ioni secondari, (ToF-SIMS), spettroscopia fotoelettronica a raggi X (XPS), tecniche di radiomarcatura ( <sup>125</sup> I radiolabeling)	Proteine adsorbite su differenti substrati possono andare incontro a diversi cambiamenti conformazionali (a seconda dei casi possono presentarsi in forma biologicamente attiva oppure denaturata/inattiva)	[37]
Ossido di titanio (titanio c.p.)	HSA	Microscopia a forza atomica (AFM), spettroscopia fotoelettronica a raggi X (XPS), angolo di contatto statico, tecniche di radiomarcatura ( <sup>125</sup> I radiolabeling)	Idrofilia e carica superficiale del substrato influenzano l'adsorbimento proteico. La concentrazione di proteina utilizzata per eseguire i test ha un ruolo nel determinare l'esito del fenomeno di adsorbimento	[38]
Film di ossido di titanio; film di ossido di titanio funzionalizzati	BSA; /	Spettroscopia fotoelettronica a raggi X (XPS), microscopia a forza atomica (AFM), angolo di contatto statico; spettroscopia fotoelettronica a raggi X (XPS), misure di potenziale ζ, angolo di contatto statico	A parità di chimica superficiale, la sola rugosità dei substrati non ha influenza sull'adsorbimento proteico e sulla risposta cellulare. La carica elettrica superficiale ha un ruolo nel determinare l'esito del fenomeno di adsorbimento	[39], [40]
Polveri di ossido di titanio (TiO <sub>2</sub> )	BSA	Spettrofotometria, misure di mobilità elettroforetica, potenziale ζ	pH e temperatura a cui l'adsorbimento proteico ha luogo influenzano le cinetiche di adsorbimento e i tassi di adsorbimento di proteina sui substrati	[42]
Ossido di titanio amorfo	BSA	Ellissometria dinamica ellissometria spettroscopica	Bagnabilità superficiale e chimica del substrato influenzano l'adsorbimento proteico. La concentrazione di proteina utilizzata per eseguire i test influisce sull'esito del fenomeno di adsorbimento.	[43]
Superficie bioattive in titanio c.p.	BSA	Spettroscopia ad infrarossi (FTIR-ATR), spettroscopia di fluorescenza sincrona, spettroscopia fotoelettronica a raggi X (XPS)	Idrofilicità ad energia di superficie influenzano il modo in cui il substrato interagisce con la proteina adsorbita. Cambiamenti conformazionali e di orientazione della proteina adsorbita influenzano la risposta biologica del substrato.	[44]

---

Nell'ambito dello studio dell'adsorbimento proteico, infine, un discorso a parte è quello che riguarda il campo delle simulazioni a livello atomico di dinamica molecolare. In questo campo, interesse hanno suscitato i lavori di ricerca come quelli del gruppo di Raffaini che si è concentrato sulla modellizzazione di interfacce rutilo/anatasiche create appositamente allo scopo di simulare superficie proprio come quelle che potrebbero costituire i campioni in titanio o in lega di titanio analizzati nel presente lavoro di tesi. Raffaini e collaboratori, usando metodi di dinamica molecolare, in un lavoro recente, sono andati a studiare l'effetto della struttura su scala nanometrica dei comuni polimorfi di  $\text{TiO}_2$  (rutilo, anatasio e brookite) sull'adsorbimento di un sottodominio della proteina albumina e di due moduli della proteina fibronectina (si veda Capitolo 2). In questo modo hanno scoperto che la brookite mostra l'adsorbimento più debole nei confronti del sottodominio albuminico, mentre l'anatasio porta ad un più forte adsorbimento intrinseco. I risultati dei loro esperimenti *in silico* hanno dimostrato come l'adsorbimento sulla brookite sia molto più debole rispetto a quello riscontrato sugli altri polimorfi del titanio (i.e. rutilo e anatasio). In particolare, il sottodominio di albumina modellizzato nello studio, essendo l'albumina considerata come una proteina "morbida", dimostra una espansione molto ampia sulla superficie dell'anatasio, in grado addirittura di massimizzare l'interazione superficiale [45]. La brookite, al contrario, mostra un adsorbimento più debole. La forza di interazione intrinseca, cioè la forza di interazione per residuo proteico a contatto con la superficie, è valutata scarsa per i moduli di albumina su anatasio (in confronto all'adsorbimento intrinseco che interessa i moduli di fibronectina, si veda il Capitolo 2). In aggiunta, altro aspetto interessante derivato dalle simulazioni e non trascurabile è l'indicazione di un significativo cambiamento conformazionale dei sottodomini proteici adsorbiti. A questo cambiamento conformazione non è ancora attribuibile una ben chiara relazione tra causa ed effetto, anche se indicazioni possono essere tratte dalle considerazioni teoriche di alcuni rigorosi studi matematici del passato sull'argomento ([46], [47]). È auspicabile, per il futuro, prevedere di svolgere in maniera sinergica e collaborativa i lavori sperimentali e quelli di modellizzazione computerizzata per la valutazione dei meccanismi coinvolti nell'adsorbimento proteico. In questa maniera si pensa possibile raggiungere una ancor più approfondita comprensione del fenomeno in sé.

---

### 1.3 Interazione tra albumina adsorbita su titanio e cellule

Molti degli studi citati nella sezione precedente e relativi allo studio dell'adsorbimento dell'albumina su substrati in titanio non si sono limitati ad andare ad investigare solo la relazione tra substrato e proteina, ma hanno anche tentato di approfondire la relazione tra substrato e cellule, mediata dalla proteina adsorbita.

Vengono riportati in questa sezione alcuni dei lavori che hanno indagato gli aspetti sopra citati.

Ad esempio, Deligianni e collaboratori, nel 2001, condussero diversi esperimenti per andare a studiare, in un primo momento, l'effetto della rugosità superficiale della lega di titanio Ti6Al4V sull'adsorbimento di proteine [36]. In quel particolare studio, valutarono l'adsorbimento proteico di BSA e BFN, da soluzioni a singola proteina, su superfici in lega di titanio ruvide e lisce, dimostrando come la BSA venisse adsorbita preferenzialmente sul substrato liscio rispetto a quello rugoso. Si ipotizzò che fosse il processo di produzione (chimica o meccanica) utilizzato per ottenere la topografia superficiale dei campioni, ad influenzare il comportamento di adsorbimento della proteina. Venne inoltre studiato, dagli stessi autori, l'effetto della rugosità superficiale dei campioni sulla risposta in vitro, a breve e lungo termine, di cellule del midollo osseo umano. I risultati dimostrarono come la rugosità avesse un'importanza fondamentale nel determinare il comportamento cellulare. Il substrato ruvido induceva una risposta più rapida e migliore delle cellule del midollo osseo. I tipi e le quantità di proteine adsorbite sulla superficie, prima della deposizione cellulare, vennero ipotizzati essere in grado di mediare l'attaccamento delle cellule al loro substrato. L'esperimento dimostrò l'effetto inibitorio della BSA adsorbita sull'adesione a breve termine delle cellule del midollo osseo ai substrati sia lisci che rugosi. L'inibizione risultò, inoltre, più prominente sul substrato ruvido.

Yang e colleghi, in un primo momento ripresero gli studi sulla cinetica di adsorbimento dell'albumina, andando a valutare il fenomeno di adsorbimento su superfici di titanio passivate in acido nitrico per valutarne gli effetti [48]. Sostanzialmente, i loro risultati confermarono quelli di ricerche precedenti nei quali si era osservato come l'adsorbimento proteico massimo di BSA su superfici in titanio raggiungesse un plateau dopo un determinato intervallo temporale (dipendente da pH e temperatura delle soluzioni testate). In un secondo tempo, il gruppo di ricerca si dedicò ad investigare l'influenza delle proteine adsorbite sull'attaccamento di una linea cellulare di cellule

---

mesenchimali palatali embrionali umane (precursori di osteoblasti). Le superfici in titanio dove si era verificato adsorbimento, si mostrarono migliori nel favorire l'adesione delle cellule rispetto alle superfici di controllo. Tuttavia, l'effetto delle diverse proteine sull'adesione cellulare era significativamente differente. Come suggerito in altri studi, inoltre, l'adesione cellulare non poteva ritenersi dipendente dalla quantità di proteine adsorbite sulla superficie, ovvero dalla concentrazione di proteina adsorbita nel tempo. Venne ipotizzato, per giustificare queste osservazioni, che l'adesione cellulare fosse dipendente dalla conformazione con cui le proteine venivano adsorbite al substrato. In particolare, nel caso di albumina, la presenza della proteina adsorbita sembrava avere un ruolo nel mediare l'adesione di osteoblasti sulle superfici di titanio passivate rispetto a quanto si osservava sulle superfici di controllo. Tuttavia, non si attestò una significativa influenza sul numero di cellule adese, se confrontata con l'effetto indotto dalla fibronectina sulla stessa linea cellulare. Questo a conferma della natura scarsamente prona all'induzione dell'adesione cellulare dell'albumina rispetto, ad esempio, ad altre proteine.

Lo studio dell'influenza dei film di titanio con topografia su scala nanometrica sulla crescita delle cellule venne approfondito anche da altri ricercatori [39]. Utilizzando differenti modelli di film in titanio si andò a valutarne gli effetti in studi biologici riguardanti la risposta cellulare alla topografia di superficie. In particolare, i film con rugosità superficiale su scala nanometrica, oltre ad essere testati per l'adsorbimento di albumina, vennero studiati a contatto con cellule osteoblastiche derivate da osteosarcoma umano. Dai dati ottenuti, non venne però rilevata alcuna influenza statisticamente significativa riguardo alla rugosità superficiale sulla proliferazione e sulla vitalità cellulare degli osteoblasti sulle superfici analizzate. Lo stesso gruppo andò allora, in seguito, a studiare la relazione tra la carica elettrica e l'adesione cellulare su film in titanio funzionalizzati superficialmente con molecole organiche, per investigare meglio gli eventi all'interfaccia biologica cellule/biomateriali [40]. Venne indagata, specificatamente, l'influenza della chimica superficiale dei film sottili di titanio e delle proprietà di carica elettrica superficiale (potenziale  $\zeta$ ) sulla proliferazione cellulare. La risposta di cellule osteoblastiche derivate da osteosarcoma umano venne pertanto valutata nei confronti di alcuni tipi di film sottili in titanio funzionalizzati in superficie con diversi gruppi ( $-\text{CH}=\text{CH}_2$ ,  $-\text{NH}_2$  e  $-\text{COOH}$ ). Dai test di proliferazione in vitro eseguiti risultò come i film in titanio funzionalizzati con  $-\text{NH}_2$  mostrassero buona proliferazione cellulare e buona tendenza a favorire la vitalità cellulare; una proliferazione

---

di cellule inferiori venne invece rilevata su film di titanio con terminazione -COOH (rispetto al caso dell'-NH<sub>2</sub>). Questo effetto venne attribuito alla differenza nell'adsorbimento delle proteine di questi campioni e, in particolare, alla conformazione con cui le proteine risultavano adsorbite sulle superficie oggetto di analisi. Dai risultati dello studio infatti emerse come, ad esempio, la proteina fibrinogeno (Fib) venisse adsorbita con modalità differenti e statisticamente significative sulle superficie dei vari campioni testati. In particolare, l'adsorbimento di Fib risultava progressivamente decrescere sui campioni in questo preciso ordine: -NH<sub>2</sub>, -CH=CH<sub>2</sub>, e -COOH. I ricercatori tentarono di correlare questo risultato con le misure di potenziale  $\zeta$ , dalle quali emerse come tutte quante le superficie analizzate fossero cariche negativamente a pH neutro (7,0) ma, specificatamente, le superficie funzionalizzate -COOH fossero le maggiormente elettronegative mentre, al contrario, le superficie -NH<sub>2</sub> fossero debolmente elettronegative. Come ipotizzato dagli stessi autori, l'andamento osservato relativamente all'adsorbimento proteico poteva trovare spiegazioni se considerato insieme alla carica superficiale. Il pI del Fib (riportato dagli autori stessi intorno ai 5,5 in base ad altri lavori di letteratura) rendeva la molecola caricata negativamente a pH neutro, così come risultavano cariche negativamente al medesimo pH anche le superficie considerate. Venne così ipotizzato un effetto di repulsione elettrostatica tra particelle cariche a spiegare il differente quantitativo di Fib adsorbito sui campioni oggetto di indagine.

Come verrà riproposto in modo analogo nel Capitolo 2 per la fibronectina, Sousa e collaboratori, nel 2008, andarono ad approfondire il fenomeno del preadsorbimento competitivo dell'albumina sierica umana e della fibronectina plasmatica umana da soluzioni binarie sull'adesione e sulla morfologia di osteoblasti MC3T3-E1 su due tipi di substrati TiO<sub>2</sub> (trattati chimicamente e depositati via *sputtering*) [49]. I ricercatori individuarono come il TiO<sub>2</sub> trattato chimicamente assorbisse meno albumina e più fibronectina rispetto alla controparte realizzata per *sputtering*, supportando un numero superiore previsto di cellule aderenti, per tutte le condizioni testate di preadsorbimento (cioè andando a variare le concentrazioni proteiche relative). Parte dell'effetto venne attribuito all'influenza della bagnabilità della superficie, che si ipotizzò avere contribuito ad aumentare l'affinità cellulare verso TiO<sub>2</sub> trattato chimicamente; questa ipotesi però non trovò conferme, dal momento che non si fu in grado di stabilire, per gli osteoblasti, quanto avesse importanza (oltre alla bagnabilità superficiale) la chimica della superficie sull'attaccamento e la diffusione cellulare. Si scoprì però, relativamente all'albumina, un effetto positivo di coadsorbimento ("*albumin*

---

*rescuing*”, si veda il Capitolo 2), oltre che di competizione, con altre proteine come, ad esempio, la fibronectina.

In uno studio più recente, infine, gli autori andarono a valutare in vitro come il potenziale di favorire l’adesione cellulare fosse mediato, ad esempio, dai cambiamenti conformazionali subiti dall’albumina adsorbita su titanio bioattivo [44]. Secondo i risultati del gruppo, la topografia e la carica sulla superficie del titanio erano di importanza cruciale per la quantità, l’orientamento e la modifica di conformazione della BSA, relativamente alla struttura secondaria della proteina. A dimostrare questo, vennero testati i differenti campioni in titanio bioattivo a contatto con osteoblasti del tipo MC3T3-E1. Venne valutata l’attività cellulare e i risultati si dimostrarono molto interessanti. Sebbene l’adsorbimento di BSA risultasse migliorare l’adesione cellulare sulle superfici di tutti i campioni testati, tuttavia, l’affinità alla BSA si mostrava ridotta sui campioni trattati, rispetto al controllo. La spiegazione fu attribuita al diverso cambiamento conformazionale indotto dalle superfici bioattive in titanio sull’albumina: in, particolare, ad una perdita osservabile nel contenuto di  $\alpha$ -eliche di  $\beta$ -sheet, accompagnata da un aumento nel contenuto di ripiegamenti (*turn*) e strutture disordinate. Questo cambiamento venne osservato per l’adsorbimento di BSA su tutte le superficie testate dallo studio, e venne attribuito alla differenza nelle proprietà di idrofobicità/idrofilicità dei substrati in titanio resi bioattivi dai trattamenti. Per quanto riguarda la capacità di favorire proliferazione cellulare, inoltre, i dati documentarono la tendenza seguente, nell’ordine: P-Ti > AA-Ti > AH-Ti. Ciò venne interpretato come indicazione del cambiamento di conformazione proteica sulle diverse superfici di titanio bioattivo, cambiamento in grado di apportare un effetto significativo non solo sull’adesione ma anche sull’attività cellulare e la vitalità osteoblastica. Conseguentemente, la diversa risposta biologica ai metalli in titanio bioattivi venne anch’essa ritenuta dipendente dal cambiamento di conformazione delle proteine indotto dalla struttura chimico-fisica superficiale.

Nella Tabella 1.5 sono riportati in modo riassuntivo i lavori più significativi relativi all’interazione tra cellule e substrati in titanio sui quali è stata adsorbita albumina.

Tabella 1.5 Riassunto schematico dell'analisi della letteratura scientifica nell'ambito dello studio sull'interazione (mediata dall'adsorbimento di albumina) tra cellule e superfici in titanio

Tipo di superficie	Tipo di proteina	Tipo di cellula/linea cellulare	Sintesi dei risultati significativi	Riferimento
Dischi di lega di titanio lisci e rugosi (Ti6Al4V)	BSA	Cellule stromali di midollo osseo umano	Tipo e quantità di proteina adsorbita al substrato e morfologia del substrato determinano la risposta cellulare. La BSA si adsorbe meglio su substrati lisci	[36]
Dischi di titanio c.p.	BSA	Cellule mesenchimali palatali embrionali umane (hEPM)	A seconda della tipologia di proteina adsorbita sui substrati la risposta cellulare è differente. La BSA mostra carattere anti-adesivo	[48]
Film di ossido di titanio	BSA	Cellule osteoblastiche umane derivate da osteosarcoma	La vitalità cellulare è strettamente correlata alle modalità con cui le proteine si adsorbono ai substrati	[40]
Ossido di titanio (titanio c.p.)	HSA	Cellule osteoblastiche MC3T3-E1	In presenza di adsorbimento competitivo la HSA ha un ruolo nel determinare il <i>packaging</i> dello strato adsorbito (effetto <i>rescuing</i> )	[49]
Superficie bioattive in titanio c.p.	BSA	Cellule osteoblastiche umane MG-63 derivate da osteosarcoma	La conformazione della BSA adsorbita sulle superficie regola l'adesione e la proliferazione cellulare sui substrati	[44]

#### 1.4 Interazione tra albumina adsorbita su titanio e batteri

Altra tipologia di cellule che sono da considerare, parlando degli impianti in titanio per applicazioni in vivo, è la categoria delle cellule batteriche. Va ricordato, infatti, come molte proteine (sieriche o proteine costituenti i tessuti), tra cui anche l'albumina, sono state studiate per i loro effetti sull'adesione batterica alle superfici dei materiali. L'interazione iniziale tra il tessuto ospite e la superficie impiantata è difatti condizionata dalle caratteristiche fisico-chimiche dei fluidi tissutali circostanti l'impianto a partire già dai primi istanti di contatto. Questa interazione porta alla deposizione sul substrato in titanio di uno strato di macromolecole composte da componenti del plasma e della matrice extracellulare, in grado di modulare la colonizzazione e la conseguente risposta cellulare all'impianto. In questo contesto, anche l'albumina si ritiene importante nel determinare la reazione interfacciale. L'albumina adsorbita sulle superfici dei materiali ha mostrato, in numerosi studi del passato, evidenti effetti inibitori sull'adesione batterica a superficie polimeriche, ceramiche e metalliche [50], e questo è stato spesso attribuito alla capacità della proteina adsorbita di indurre variazioni nell'idrofobicità dei substrati.

---

Diversi lavori di letteratura sono andati a testare la risposta di ceppi batterici in grado di aderire alla albumina adsorbita su titanio. Tra gli studi che hanno investigato il ruolo della albumina sulle superficie in titanio con potenzialità antibatteriche si ritiene meritevole citarne un paio a scopo illustrativo. Nei seguenti esempi è mostrata l'interazione, mediata dall'adsorbimento di albumina, tra titanio e batteri del tipo *Staphylococcus aureus* o *Staphylococcus epidermis* perché noti per avere una maggiore propensione ad aderire su materiali metallici (in confronto a quelli polimerici [51]).

Ad esempio, in uno studio risalente al 1995, An e collaboratori andarono ad investigare gli effetti di diverse rugosità superficiali di campioni di titanio c.p. e l'influenza delle proteine del siero umano adsorbite sull'adesione batterica. Batteri del ceppo *Staphylococcus epidermis* vennero incubati con i campioni di titanio, con rugosità superficiali diverse e rivestiti con (HSA) [52]. I risultati portarono a concludere come le diverse rugosità delle superfici di titanio testate non avessero alcun ruolo nella determinazione dell'adesione batterica. Inoltre, venne dimostrato come la HSA adsorbita fosse in grado di ridurre in modo molto rilevante (>90%) l'aderenza del ceppo alla superficie. Per questo, i ricercatori suggerirono l'ipotesi di sfruttare l'adsorbimento (o meglio, la funzionalizzazione) dei biomateriali impiantati con albumina, allo scopo di ridurre la possibilità di colonizzazione dell'impianto/protesi da agenti patogeni come gli stafilococchi.

In uno studio più recente Kinnari e collaboratori esaminarono, invece, l'aderenza in vitro di colonie di *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* su superficie in titanio rivestite o non rivestite in albumina [53]. Anche loro, come altri ricercatori, rilevarono come i ceppi batterici coltivati sui campioni rivestiti aderissero in una percentuale significativamente inferiore rispetto a quanto si verificava sulle superfici non rivestite. L'adesione batterica complessiva si dimostrò naturalmente dipendente dalla concentrazione batterica. Tuttavia, il legame dello *Staphylococcus aureus* su superfici rivestite con HSA veniva lo stesso inibito in quantità significativa (variabile dall'82% al 95% a seconda della concentrazione di batteri utilizzata in coltura). Il legame del ceppo *Pseudomonas aeruginosa* alle superfici rivestite, al contrario, veniva inibito in percentuali minori (dal 29 al 37%) rispetto a quanto riscontrato per le superfici non rivestite.

Nella Tabella 1.6 sono riportati in modo riassuntivo i lavori più significativi relativi all'interazione tra batteri e substrati in titanio sui quali è stata adsorbita albumina.

Tabella 1.6 Riassunto schematico dell'analisi della letteratura scientifica nell'ambito dello studio sull'interazione (mediata dall'adsorbimento di albumina) tra batteri e superfici in titanio

Tipo di superficie	Tipo di proteina	Tipo di cellula/linea cellulare	Sintesi dei risultati significativi	Riferimento
Sottili piastre di titanio commercialmente puro acidate	HSA	Staphylococcus epidermis	HSA è in grado di ridurre l'adesione batterica alle superficie dei substrati (siano esse rugose oppure no)	[52]
Sottili piastre di titanio commercialmente puro lucidate meccanicamente	HSA	Staphylococcus aureus e Pseudomonas aeruginosa	Superfici rivestite in HSA sono in grado di inibire l'adesione batterica	[53]

---

# Capitolo 2

## 2 Fibronectina

La FN è una delle glicoproteine presenti nell'organismo umano a livello del plasma e di altri fluidi corporei e si trova, tuttavia, anche legata alla superficie di molti diversi tipi di cellule ([54], [55]). Si tratta di una delle principali proteine del sangue e dei tessuti, nei quali è presente in entrambe le sue forme (come proteina solubile ed insolubile) ed è stata studiata in modo molto approfondito nel corso della storia recente della medicina e della biochimica a causa delle sue numerose interazioni con le cellule e con altre macromolecole [56]. La fibronectina, infatti, è in grado di legarsi alle proteine recettoriali di membrana delle cellule, le integrine, e inoltre è capace di legarsi a diversi tipi di componenti della matrice extracellulare [57]. Da queste considerazioni si evince l'importanza della fibronectina all'interno della matrice extracellulare. La sua funzione più importante, in particolare, sembra esplicitarsi nel rimodellamento dei tessuti durante l'embriogenesi e la guarigione delle ferite. La fibronectina, in aggiunta, è in grado di influenzare un certo numero di altri processi fisiologici, compresa la fagocitosi [56].

Nel seguito della trattazione viene analizzata in modo approfondito la fibronectina bovina perché utilizzata come biomolecola per la valutazione dell'adsorbimento proteico negli esperimenti legati al presente lavoro di tesi. Per quanto riguarda le informazioni che verranno date sulla struttura della proteina, anche in questo caso, come per l'albumina, non si ha la pretesa di inserire in questo lavoro di tesi una trattazione esaustiva dell'argomento. Verranno illustrati solo i concetti principali relativi alla struttura della fibronectina bovina, che si ritiene utile come modello. Ciò che è importante da sottolineare, infatti, è che la funzione biologica di una proteina dipende dalla sua conformazione.

---

## 2.1 Fibronectina bovina

La fibronectina (FN) è una glicoproteina ad alto peso molecolare della matrice extracellulare che si lega alle proteine recettoriali trans-membrana chiamate integrine. La FN, grazie alla sua struttura e alla sua composizione amminoacidica, è in grado di legare componenti della matrice extracellulare come collagene, fibrina ed eparan solfato proteoglicani (per esempio i sindecani). La FN è poi una delle glicoproteine della matrice extracellulare più abbondanti, che si adsorbe molto spesso bene sui biomateriali. È una proteina con un ruolo biologico molto importante, perché è in grado di mediare l'adesione cellulare. Oltre alla FN, esistono anche altre glicoproteine contenenti domini in grado di mediare l'adesione cellulare, come ad esempio: vitronectina, laminina e collagene. Tuttavia, la FN è un substrato importante per l'adesione cellulare, ma non solo; la FN gioca un ruolo importante nella migrazione, nella crescita, e nella differenziazione cellulare ([58], [59], [60]) e anche in processi come la guarigione delle ferite, lo sviluppo embrionale e nei processi infiammatori o di generazione di metastasi [61]. L'espressione alterata della fibronectina, la sua degradazione e la sua disorganizzazione sono state associate a numerose patologie, tra cui cancro e fibrosi [62].

In realtà, come già anticipato, sarebbe opportuno fare la distinzione tra due tipi differenti fibronectina che sono presenti nei vertebrati:

- la fibronectina plasmatica solubile (anni fa nota con il nome di "globulina fredda-insolubile del plasma", o CIg) [57]. Essa è la componente proteica principale del plasma sanguigno ed è prodotta nel fegato dagli epatociti. Il valore della sua concentrazione nel plasma varia tra i 200 e i 300  $\mu\text{g/ml}$  e viene prodotta nel fegato dagli epatociti. La fibronectina viene sintetizzata e secreta in grandi quantità da un numeroso gruppo di tipi di cellule in coltura.
- la fibronectina cellulare insolubile è invece un componente principale della matrice extracellulare (ECM). Essa viene secreta da varie cellule, in primo luogo i fibroblasti, come dimero proteico solubile e poi è assemblata in una matrice insolubile in un processo complesso mediato da cellule. La fibronectina insolubile è un componente delle strutture extracellulari fibrillari e delle membrane basali di tutti i tessuti (ad eccezione del sistema nervoso).

In forma solubile, i legami di tipo van der Waals e le interazioni elettrostatiche tra i moduli stabilizzano la FN in una conformazione compatta, non reattiva ad altre proteine della matrice extracellulare e al *self assembly* [63]. La FN, nell'adsorbimento su di una certa superficie con cui si viene a trovare in contatto, può però cambiare la propria conformazione, esponendo i siti di adesione che sono sepolti e o non esposti quando essa è in forma solubile [64].

Come verrà meglio spiegato in seguito, la FN è una glicoproteina e si trova prevalentemente nella matrice extracellulare in forma fibrillare; essa si lega alle cellule e ad altre molecole della matrice, contribuendo così all'organizzazione della matrice stessa e fornendo importanti siti di adesione per le cellule. La proteina è costituita da domini simili ma non identici (tipo I, II, III), la maggior parte dei quali derivano da un singolo esone. La ripetizione di tipo III, circa 90 residui di amminoacidi in lunghezza, si verifica 15 volte in ciascun monomero ed è un elemento strutturale presente anche in altre proteine. Mentre la proteina è codificata da un singolo gene, molteplici varianti di splicing danno luogo a diverse isoforme che differiscono nei loro siti e funzioni di legame cellulare. Una isoforma si trova proprio come proteina abbondante nel sangue e si ritiene che possa partecipare alla cicatrizzazione delle ferite, alla fagocitosi da parte dei globuli bianchi e alla coagulazione del sangue. Altre forme, come anticipato, sono incorporate nelle fibrille della matrice extracellulare di alcuni tessuti [65]. La FN è quindi una componente importante e quasi onnipresente del corpo, che esiste in una forma dimerica solubile in concentrazione micromolare nel plasma sanguigno mentre assume una forma multimerica insolubile in ECM.

Per quanto riguarda la funzione della fibronectina, è possibile, invece, riassumere le principali attività di questa proteina come mostrato in Tabella 2.1.

Tabella 2.1 Principali funzioni e interazioni cellulari note della fibronectina [8]

Proteina	Funzioni principali	Recettori cellulari	Tipi di cellula
Fibronectina	Proteina della matrice extracellulare che si lega alle cellule attraverso la sequenza peptidica RDG (Arg-Gly-Asp)	CD49c, CD49d, CD49e, CD41a, CD61	Granulociti (cellule polimorfonucleate, PMN), macrofagi

---

### 2.1.1 Funzioni della fibronectina

La FN è una delle glicoproteine ECM meglio caratterizzate. In vitro, in generale, supporta l'adesione di molti tipi di cellule e può anche stimolare la proliferazione cellulare, la differenziazione e la migrazione. Le cellule in coltura spesso aderiscono, si attaccano e si appiattiscono al proprio substrato e sviluppano matrici di actina prominenti in risposta alla presenza di fibronectina sul substrato stesso. La risposta dipende però sempre dal particolare tipo di cellula e da che tipo di recettori per la fibronectina essa possiede.

La FN ha numerose funzioni che garantiscono il normale funzionamento degli organismi vertebrati [66]. È coinvolta, come già ribadito, nell'adesione cellulare, nella crescita, nella migrazione e nella differenziazione. È importante anche per processi quali la guarigione delle ferite e lo sviluppo embrionale e l'embriogenesi. La FN è difatti importante per guidare l'attaccamento e la migrazione cellulare durante lo sviluppo embrionale; l'assenza di fibronectina in queste fasi può portare a difetti di sviluppo sia neurale che vascolare. La FN si trova anche nella saliva umana e alcuni ricercatori, nel passato hanno ipotizzato un suo ruolo nell'aiutare a prevenire la colonizzazione della cavità orale e della faringe da batteri potenzialmente patogeni ([67], [68]). La FN si trova, poi, anche nella matrice extracellulare di tessuti embrionali e adulti (ma non nelle membrane basali dei tessuti adulti), e può essere più diffusa nei siti di lesioni od infiammazioni. Durante la coagulazione del sangue, la FN rimane associata al coagulo, legata covalentemente alla fibrina con l'aiuto del fattore XIII (fattore stabilizzante della fibrina). I fibroblasti svolgono un ruolo importante nella guarigione delle ferite proprio aderendo alla fibrina; l'adesione fibroblastica alla fibrina richiede fibronectina. La deposizione di collagene nel sito della ferita da parte dei fibroblasti avviene con l'aiuto della FN. La FN, dunque, svolge un ruolo cruciale nella guarigione delle ferite: insieme alla fibrina, la fibronectina plasmatica viene depositata nel sito di lesione, formando un coagulo di sangue che interrompe il flusso emorragico ed è pertanto in grado di proteggere il tessuto sottostante. La FN ha infatti effetti profondi sulla guarigione delle ferite, tra cui la formazione di substrato appropriato per la migrazione e la crescita delle cellule durante lo sviluppo e l'organizzazione del tessuto di granulazione, nonché il rimodellamento e la risistemazione della matrice dei tessuti connettivi. Il significato biologico della FN in vivo è stato studiato da molti studiosi per valutare il ruolo della proteina nel meccanismo della guarigione delle ferite [54].

---

### 2.1.2 Struttura e proprietà chimiche della fibronectina bovina

La fibronectina ha massa molecolare di circa 440 kDa ed è presente nello spazio extracellulare della maggior parte dei tessuti umani. La FN esiste come dimero proteico, costituito da due monomeri quasi identici collegati da una coppia di legami disolfuro (Figura 2.1 e Figura 2.2).

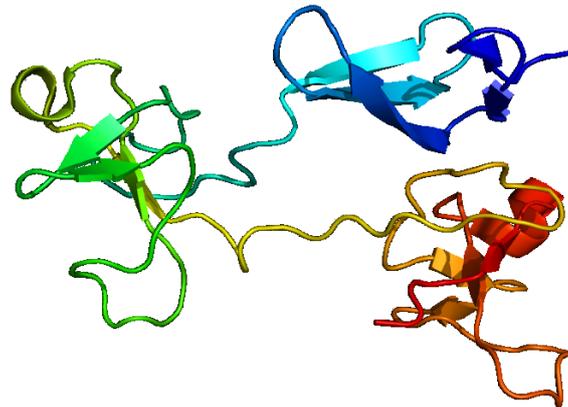


Figura 2.1 Struttura tridimensionale della fibronectina FN1 (modello "ribbon")

La proteina fibronectina è prodotta da un singolo gene, ma lo *splicing* alternativo del suo pre-mRNA porta alla creazione di diverse isoforme.

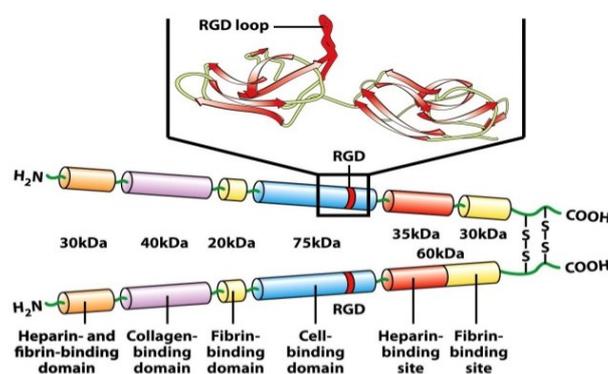


Figura 2.2 Rappresentazione schematica del dimero della fibronectina che mostra la sua struttura modulare e la funzionalità di vari domini [69]

La molecola di FN assume forma compatta con una lunghezza approssimativa di  $15,5 \pm 1,3$  nm, una larghezza compresa tra gli 8,8 e i 1,7 nm e un rapporto assiale di circa 2:1,1 [70]. Ogni catena dimerica che costituisce la proteina, però, in forma estesa, è lunga circa 70 nm. Ognuna delle due sub-unità, inoltre, ha un peso molecolare compreso tra circa 230 e 250 kDa e contiene tre tipi di moduli globulari: tipo I, II e III (classificati, talvolta, anche come ripetizioni di fibronectina FN-I, FN-II e FN-III). Tutti e tre i moduli sono composti da due  $\beta$ -sheet anti-paralleli che risultano in un

$\beta$ -sandwich; tuttavia, il modulo di tipo I e il tipo II sono stabilizzati da legami di disolfuro intracatena, mentre i moduli di tipo III non contengono legami disolfuro, e per questo risulta più labile all'azione di stimoli chimici o meccanici (Figura 2.3). L'assenza di legami di disolfuro nei moduli di tipo III consente infatti loro di dispiegarsi parzialmente sotto una forza applicata (di tipo chimico o meccanico).

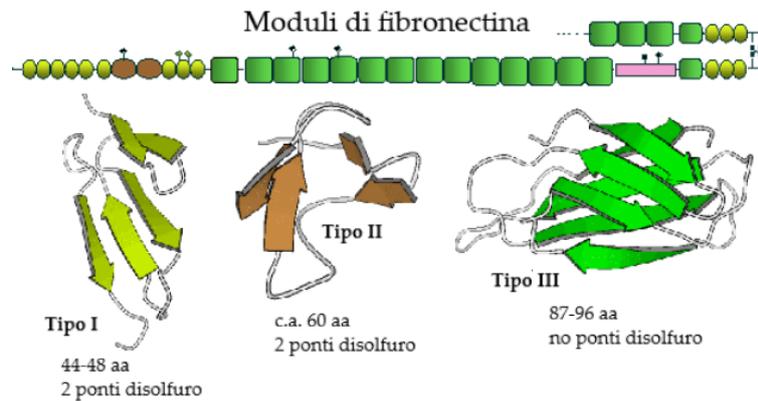


Figura 2.3 Rappresentazione schematica della struttura dei moduli di tipo I, II e III della FN [69].

I diversi moduli della FN sono raggruppati tra loro a costituire domini funzionali che si legano alle superfici cellulari (integrine), fibrina, eparina e collagene, come verrà illustrato meglio anche nel seguito della trattazione. I moduli sebbene facciano parte della stessa catena di amminoacidi, possono essere immaginati come "perline su una corda", ciascuno collegato ai suoi vicini in modo molto ravvicinato. I moduli sono, inoltre, disposti in diversi domini funzionali e sono in grado di legarsi a differenti tipi di proteine a seconda della loro posizione lungo la lunghezza del monomero fibronectinico. Ci sono quattro domini in grado di legare fibronectina, che permettono di associare fibronectina ad altre molecole di fibronectina. Uno di questi domini fibronectino-adesivo, I1-5, è definito come "assembly domain" ed è richiesto per l'inizio del processo di formazione di una matrice di fibronectina. I moduli III9-10 corrispondono al "cell-binding domain" della fibronectina (Figura 2.4). La sequenza di RGD (Arg-Gly-Asp) si trova nel modulo III10 ed è il sito di adesione cellulare mediante integrine  $\alpha 5 \beta 1$  sulla superficie cellulare. Il "synergy site" è in III9 e ha un ruolo nella modulazione dell'associazione di fibronectina con le integrine di tipo  $\alpha 5 \beta 1$  (Figura 2.4). La FN contiene anche domini per il legame con la fibrina (I1-5, I10-12), il legame con il collagene (I6-9), il legame con l'eparina e con i sindecani (III12-14).

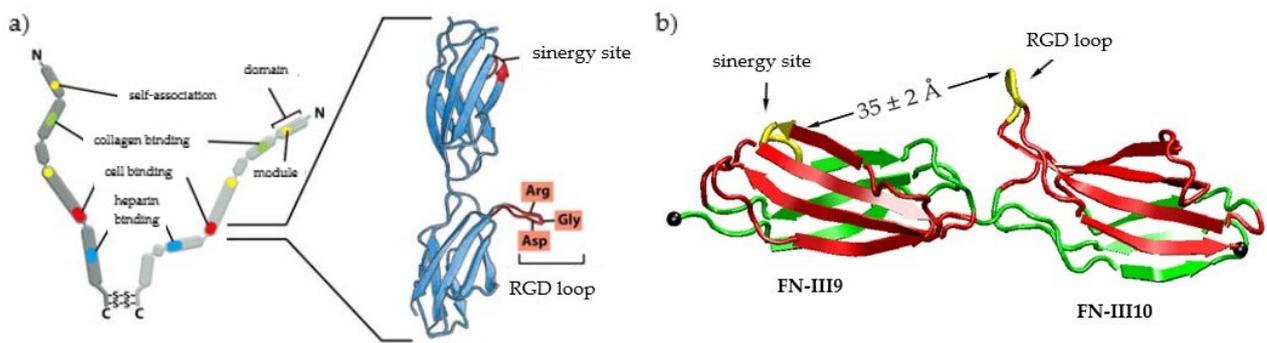


Figura 2.4 Diagramma schematico che mostra a) la fibronectina e i suoi domini, comprensivi del sito di sinergia e dell'RGD-loop che si trovano rispettivamente su FN-III9 e FN-III10; b) immagine ingrandita dei moduli FN-III9 e FN-III10 [71]

La FN si lega alle integrine ( $\alpha 5 \beta 1$ ) attraverso un sito adesivo per le cellule comprendente i moduli dal III8 al III10. Il sito più critico per l'adesione cellulare è la sequenza Arg-Gly-Asp (RGD) nel modulo III10, che si trova nel dominio C-terminale. FN-III9, come anticipato, contiene invece un sito di sinergia che migliora il legame delle integrine al loop RGD su FN-III10.

A seguito del legame con le cellule mediato da integrine attraverso la sequenza di RGD, la FN si assembla in fibrille che costituiscono una sorta di matrice extracellulare primitiva, una sorta di impalcatura, che resiste fino al momento della deposizione di collagene (sia nel processo di guarigione e che nel processo di riparazione delle ferite). Il meccanismo che controlla la polimerizzazione è probabile che coinvolga siti critici necessari per l'autoassemblaggio, siti esposti grazie a cambiamenti conformazionali della FN.

Per quanto riguarda le proprietà legate alla carica elettrica della proteina, il punto isoelettrico della FN (in particolare della BFN) varia da 5,0 a 6,1 il che indica che a pH fisiologico la BFN ha una carica leggermente negativa.

Tabella 2.2 Valori di peso molecolare e punto isoelettrico della BFN

Proprietà	Valore
<b>Peso molecolare</b>	440'000 Da (= 440 kDa)
<b>Punto isoelettrico:</b>	5,0 [72]

Quello che più è importante da far notare, per quanto riguarda la FN, è che le sue dimensioni e struttura presentano una grandissima variabilità che è conto dell'estrema flessibilità della proteina. La FN possiede forme globulari oppure filamentose a seconda delle condizioni di substrato e di

---

soluzione con cui è posta in contatto. Fattori come temperatura, pH e resistenza ionica dell'ambiente locale anche svolgono un ruolo importantissimo nell'influenzare la forma finale della BFN. Le interazioni elettrostatiche tra regioni di carica netta opposta all'interno o tra le catene della proteina stessa potrebbero contenere la molecola in una conformazione relativamente compatta, conformazione che diventa più aperta in presenza di soluzioni saline concentrate oppure quando il pH viene spostato di poche unità rispetto al valore neutro. In soluzione in normali condizioni fisiologiche, tuttavia, la FN è stato documentato come possa assumere una forma globulare o compatta. Anche la FN si pensa esprima una carica debolmente negativa a pH fisiologico, ma al contrario di altre biomolecole essa è annoverata tra le proteine adesive nei confronti di diverse tipologie di cellule dell'organismo. Questo comportamento si spiega grazie alla presenza, nella sequenza amminoacidica della FN, del motivo RGD, un tripeptide coinvolto nell'adesione e nell'attaccamento cellulare mediato da integrine. Oltre alle integrine, poi, la fibronectina si lega a molte altre biomolecole. Per esempio, è stato dimostrato che la fibronectina è in grado di interagire con proteine quali fibrina, tenascina, BMP-1 e, inoltre, molte proteine batteriche sono in grado di legare la fibronectina, così come accade anche per alcuni tipi di glicosaminoglicani (GAGs) e l'eparan solfato.

La concentrazione media di fibronectina nel sangue si assesta intorno ai 0,2 mg/ml [49] e per darne conto in modo quantitativo, la sua presenza si misura facilmente con metodi biochimici come l'elettroforesi delle proteine. Eventuali valori più bassi di fibronectina nel sangue sono, nella maggior parte dei casi, da ricondursi a stati patologici dei tessuti. In questi casi, la concentrazione di fibronectina nel siero e nei tessuti umani costituisce un indice importante, sia dal punto di vista diagnostico, che da quello prognostico.

## **2.2 Adsorbimento della fibronectina sulle superficie dei biomateriali in titanio**

Diversi sono gli studi scientifici che hanno provato, nel corso degli anni, ad indagare in modo approfondito l'interazione tra la fibronectina e la superficie di un biomateriale. Quali proteine si adsorbono preferenzialmente dal siero su di un numero limitato di siti di legame come quelli che può esporre la lega di titanio dipende infatti da molteplici fattori: le concentrazioni relative di proteine nei fluidi considerati e l'affinità superficiale tra proteine e substrato ([16], [17], [18]), la bagnabilità e l'energia libera superficiale del substrato, la carica superficiale del substrato, la topografia superficiale del substrato, la presenza di impurezze superficiali o di particolari gruppi

---

funzionali aggraffati al substrato, ...ecc. La natura delle proteine adsorbite e la loro conformazione dipendono infatti dall'insieme delle proprietà superficiali che mostra la superficie del biomateriale, ma al contempo dipendono anche dalle stesse proprietà di affinità delle proteine nei confronti dei substrati con i quali esse si interfacciano.

Nel seguito della trattazione sono presentati alcuni esempi di lavori di ricerca in cui sono state indagati gli aspetti del fenomeno di adsorbimento proteico su superficie in titanio a contatto con soluzioni proteiche contenenti FN. Ove possibile, si è cercato di prediligere un'esposizione cronologica dei risultati dei lavori di ricerca; questo perché si è ritenuto interessante dare un'idea di come l'argomento sia stato studiato nel corso degli anni fino ad oggi. Ciascun lavoro è presentato, corredato da brevi commenti, per dare idea degli scopi, delle tecniche di analisi impiegate e dei risultati ottenuti. Si predilige andare ad illustrare nel dettaglio solamente i casi in cui è stata investigata l'interazione tra FN (in generale bovina od umana) e superficie metallica di titanio (puro oppure in lega); questo per non rendere pesante il discorso e per concentrare l'attenzione principale sul materiale oggetto di studio nel presente lavoro di tesi.

In passato è stato proposto, da alcuni studiosi, che la FN potesse essere adsorbita sulla superficie dei metalli per effetto di forze elettrostatiche. Le superfici metalliche come il titanio, a contatto con fluidi acquosi, assumono una carica superficiale debolmente negativa. Le proteine con un pH inferiore a 7,4 come la fibronectina sono anch'esse caricate negativamente al pH fisiologico, perché dotate di pI inferiore a 7 [19]. I risultati di altri studi sulla FN consentirono di trarre ulteriori conclusioni importanti riguardo alle proprietà di adsorbimento della fibronectina plasmatica. Forse, la scoperta più interessante fu che l'attività biologica della FN adsorbita non era direttamente correlata alla quantità di proteina adsorbita quando si confrontavano i risultati su superfici bagnabili e poco bagnabili [73]. Sembrò infatti che su superfici non bagnabili, la FN fosse in grado di adsorbirsi a basse concentrazioni in modi che non consentivano una favorevole interazione con le cellule. Secondo studi ottici e idrodinamici, si scoprì che la FN, molecola flessibile ma molto complessa, assumeva forma approssimativamente sferica in soluzione, ma una volta adsorbita essa non sempre manteneva questa conformazione attiva. Al contrario, la FN poteva anche svolgersi in una struttura filamentosa, inattivandosi, a basse concentrazioni su piatti. Tale srotolamento della FN si scoprì essere impedito od ostacolato usando alte concentrazioni di proteina o aggiungendo albumina sierica per alterare la disposizione e la conformazione delle

---

molecole adsorbite. Quest'ultimo risultato venne interpretato come conseguenza dell'effetto Vroman. Considerando poi la resistenza al desorbimento della FN, così come le differenze negli effetti del pH e la cinetica di adsorbimento, i risultati dello studio sembrarono confermare come la FN si adsorbisse molto più saldamente sulle superfici non bagnabili. Ciò è coerente con le osservazioni riportate per diverse altre proteine plasmatiche. Tuttavia, la fibronectina sembrò già dagli studi iniziali avere una straordinaria affinità per le superfici in titanio rispetto ad altre proteine studiate. Sempre gli stessi autori provarono in tempi successivi a dare una spiegazione delle differenze nell'attività biologica tra FN adsorbita su superfici bagnabili e FN adsorbita su superfici non bagnabili. Giustificarono il comportamento in una differenza nell'orientamento delle molecole di FN sulle superfici [73]. Shelton et collaboratori, già nel 1988, attribuirono le differenze rilevate tra il comportamento di cellule su substrati su cui era adsorbita FN alle stesse cause: differenze, principalmente dovute all'attrazione e alla repulsione elettrostatica tra cellule e substrato e differenze nell'adsorbimento delle proteine [74]. Ad esempio, la fibronectina sembrava essere presente prevalentemente solo su superfici caricate positivamente. La FN mostrò la stessa affinità per le superfici caricate positivamente in altri studi ([75], [76]). Tuttavia, MacDonald e collaboratori, utilizzando una serie di modifiche alle superfici in titanio, suggerirono che l'idrofobicità fosse una spinta più dominante per l'assorbimento rispetto alla carica superficiale [76].

In tempi successivi, altri gruppi di ricerca si dedicarono alla comprensione del fenomeno di adsorbimento proteico di fibronectina specificatamente sul titanio. In questo caso vennero valutati gli effetti della rugosità superficiale dei campioni oggetto di studio, per correlarli all'adsorbimento proteico e alla risposta cellulare. L'aspetto della topografia superficiale dei materiali e la sua relazione con la risposta biologica sono stati studiati approfonditamente in vari studi di letteratura e in vari volumi dedicati ad investigare sia gli effetti macroscopici delle rugosità dei biomateriali da impianto (capaci di garantire l'osteointegrazione) sia gli effetti micro e nanoscopici delle asperità superficiali caratterizzanti la topografia di campioni in titanio. Deligianni e collaboratori, in questo contesto, nel 2001, condussero diversi esperimenti per andare a studiare l'effetto della rugosità superficiale della lega di titanio Ti6Al4V sull'adsorbimento di proteine [36]. In particolare, essi valutarono l'adsorbimento proteico di BSA e BFN, da soluzioni a singola proteina, su superfici in lega di titanio rugose e lisce. Entrambi i metodi di indagine utilizzati (XPS e radiomarcatura

---

proteica), dimostrarono come la BFN venisse adsorbita preferenzialmente sul substrato rugoso rispetto a quello liscio (in quantità relativa superiore di 10 volte) e come anche le proteine totali venissero adsorbite preferenzialmente sui campioni rugosi rispetto a quelli lisci. L'affinità molto più elevata dei substrati grezzi alla BFN venne individuata come responsabile della forza trainante per l'adsorbimento preferenziale di fibronectina dal siero nei primi minuti di contatto o del desorbimento dell'albumina inizialmente adsorbita, con sostituzione della BFN, per effetto della cinetica di adsorbimento che prevedeva l'esistenza di una competizione proteica per raggiungere la superficie. Esperimenti di adsorbimento competitivo per chiarire i risultati di cui sopra e verificare le ipotesi, però, non vennero inclusi nello studio. Venne notato invece come la lavorazione dei substrati (meccanica oppure mediante lucidatura o sabbatura, seguita da un attacco acido) a produrre una determinata rugosità potesse influenzare il comportamento di adsorbimento della proteina di una superficie.

Nello stesso anno in cui Deligianni pubblicò i suoi risultati, anche il gruppo di Tidwell espose al pubblico i risultati dei propri studi sull'adsorbimento proteico relativi alla caratterizzazione di film di BFN adsorbiti su diverse tipologie di superficie (tra le quali anche fogli di titanio) ed analizzati attraverso differenti tecniche, quali: spettrometria di massa di ioni secondari statici a tempo di volo (ToF-SIMS), spettroscopia fotoelettronica a raggi X (XPS) e tecniche di radiomarcatura [37]. Il tentativo, in questo caso, fu quello di fornire informazioni sull'identità delle proteine adsorbite e sulla loro conformazione, orientamento, denaturazione, ecc. La spettroscopia fotoelettronica a raggi X può infatti distinguere i film sottili di proteine pure, ma la specificità molecolare più alta delle ToF-SIMS è più utile, rispetto all'XPS, per l'analisi di film proteici complessi. Le condizioni di adsorbimento (concentrazioni di soluzione proteica, tipo di substrato, temperatura, ecc.) testate, in particolare, generarono differenze minori ma significative nel modello di frammentazione SIMS, indicando pertanto che, oltre a identificare il tipo di proteina adsorbita presente, fosse possibile utilizzare l'apparecchiatura della ToF-SIMS statica per studiare la conformazione, l'orientamento, il grado di denaturazione, ecc. dei film proteici adsorbiti ed individuarne le differenze. I diversi pattern di intensità di ToF-SIMS amminoacidici osservati indicarono infatti come la distribuzione degli amminoacidi nella regione più esterna dei film di BFN adsorbita fosse diversa sui vari substrati testati. Ciò fu ipotizzato correlato alla possibilità che la fibronectina si disponesse con un orientamento o una conformazione leggermente diversa sulle diverse superfici oggetto di

---

indagine. In particolare, come emerse anche da studi successivi, sembrò giocare un ruolo fondamentale da subito, nell'adsorbimento proteico, il ruolo delle catene laterali della fibronectina. Queste catene, come confermato da altri ricercatori, erano coinvolte nel processo di adsorbimento su superfici inorganiche [77]. I risultati del lavoro di ricerca del gruppo di Strehle, in particolare, dimostrarono proprio, attraverso analisi spettroscopiche Raman, come i cambiamenti nella struttura secondaria si verificassero durante l'adsorbimento sia di fibronectina che di fibrinogeno. In particolare, l'adsorbimento di proteine dal grosso peso molecolare, formate da un grande numero di amminoacidi, e contenenti al loro interno motivi incentivanti l'adesione cellulare (ad esempio, il tripeptide RGD), si dimostrò supportato dalle catene laterali caricate negativamente delle proteine stesse, nel caso di adesione proteica a nanoparticelle di titanio.

In uno studio successivo di Sousa e colleghi venne studiato l'adsorbimento della HFN su titanio commercialmente puro con uno strato di ossido di titanio formato in una soluzione di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e uno strato di ossido di titanio depositato per *sputtering* su silicio [78]. Le isoterme di adsorbimento e il lavoro di adesione vennero valutati mediante studi di bagnabilità, spettroscopia fotoelettronica a raggi X (XPS) e mediante radiomarcatura. Le determinazioni dell'angolo di contatto dimostrarono, in tale studio, come la HFN mostrasse un'affinità più elevata per la superficie del TiO<sub>2</sub> trattato chimicamente, cioè quello più idrofilo, e un'affinità più bassa per il substrato depositato per *sputtering*, più idrofobo. Sempre Sousa e collaboratori, nel 2008, andarono ad approfondire il fenomeno dell'adsorbimento di fibronectina su superficie in titanio e andarono, in particolare, a valutare l'adsorbimento competitivo di soluzioni binarie di HSA e HFN (in confronto alle soluzioni usate singolarmente) [49]. Gli autori trovarono che l'adsorbimento di HFN per superfici diverse diminuiva significativamente o veniva completamente bloccato da altri componenti del siero (ad esempio, albumina o vitronectina) a concentrazioni sieriche. La HFN adsorbita in modo competitivo da soluzioni binarie con albumina si ritrovò, comunque, in quantità più elevate su substrati di TiO<sub>2</sub> trattati chimicamente (in confronto a quelli depositati per *sputtering*). Sebbene la densità di HFN adsorbita su substrati di TiO<sub>2</sub> fosse bassa, gli autori la ipotizzarono sufficiente per supportare la formazione dei contatti focali (in accordo con i risultati di altri ricercatori ([79], [80])). Inoltre, gli stessi autori dimostrarono come il processo di regolazione della risposta biologica alla superficie fosse dipendente non solo dalle caratteristiche topografiche del substrato indagato ma anche proprio dalla conformazione della HFN adsorbita.

---

In uno studio del 2007, invece, Protivinsky e collaboratori andarono a studiare gli effetti di diverse superfici di titanio chimicamente modificate (macchinate, sottoposte ad attacco acido e attacco acido/basico) sull'adsorbimento di HFN, ottenendo interessanti risultati che dimostrarono, in accordo con i dati di altri ricercatori, come la composizione e la morfologia della superficie influenzassero la cinetica dell'adsorbimento proteico [81]. In particolare, le superfici sottoposte ad attacco acido manifestarono una maggiore affinità per l'adsorbimento della HFN rispetto alle altre tipologie di superfici. Inoltre, la cinetica di adsorbimento della fibronectina risultò diversa e dipendente dal tempo, infatti venne riscontrato come le concentrazioni di HFN sui campioni trattati chimicamente fossero legate al tempo di esposizione dei campioni alla soluzione proteica oggetto di indagine.

Nel lavoro di ricerca di Rapuano e MacDonald del 2011, invece, l'adsorbimento della HFN su dischi in Ti6Al4V non trattati e trattati con trattamento termico e al plasma (RFGD) venne misurato su un intervallo di concentrazioni variabili [82]. Non vennero riscontrate differenze consistenti tra i campioni di controllo e quelli sottoposti a trattamento termico nella quantità di HFN assorbita sulla superficie (dopo un'incubazione notturna) a una qualsiasi delle concentrazioni testate. Il trattamento con RFGD si notò per provocare una leggera diminuzione dell'adsorbimento della fibronectina rispetto ai controlli lucidati, sebbene non vennero osservate differenze statisticamente significative. Sulla base dei risultati dell'interazione tra le superficie testate e dei ceppi cellulari, però, il gruppo fu in grado di dimostrare che il pretrattamento dell'ossido di metallo con plasma potenziasse la capacità intrinseca della HFN adsorbita di legarsi ai recettori integrinici delle cellule ossee. Tutto ciò venne interpretato come una dimostrazione indiretta del fatto che il contributo di un certo numero di variabili ambientali e di superficie (come la forza ionica, il pH, la temperatura, la carica superficiale e l'idrofilia superficiale) fossero in grado di modulare la struttura tridimensionale della HFN a seguito del legame con un substrato. A risultati del tutto simili sembrarono pervenire Rivera e colleghi, nel 2013, andando ad investigare delle superficie in ossido di titanio nano porose [83]. A causa della maggiore area superficiale, i campioni di TiO<sub>2</sub> nano porosi in titanio anodizzato si dimostrarono in grado di assorbire più proteine rispetto ai materiali micro strutturati piatti come il Ti6Al4V o il Ti c.p. utilizzati come controllo, consentendo una migliore adesione cellulare e una migliore capacità proliferativa. In aggiunta, gli stessi autori osservarono come i modelli nano porosi in ossido di titanio anodizzato sembrassero consentire alle

proteine della matrice extracellulare (come la HFN) di dispiegarsi in modo favorevole a consentire alle cellule circostanti l'accesso ai loro siti di legame cellulare, come il tripeptide RGD. Questo venne interpretato come un vantaggio offerto dalla superficie nel mediare una risposta cellulare favorevole per legarsi più efficientemente agli osteoblasti.

I risultati più recenti derivati dallo studio di Lv e collaboratori, mirati ad identificare gli effetti delle composizioni di fase cristallina di ossido di titanio sull'adsorbimento proteico, infine, permisero le seguenti osservazioni aggiuntive [84]. Il gruppo di ricerca preparò su substrati di silicio dei film sottili di TiO<sub>2</sub> di anatasio e rutilo con spessore del film simile, topografia superficiale e idrofilia, mediante tecnica ALD (*Atomic Layer Deposition*, una tecnica derivata dalla CVD), successiva ricottura termica e irradiazione UV. I film vennero studiati con diverse tecniche, tra le quali XPS, FTIR e di angolo di contatto. Non venne rilevata alcuna differenza significativa nella quantità di HFN adsorbita tra i differenti tipi di campioni, dal momento che la topografia superficiale e l'idrofilia erano confrontabili per entrambi i film. Comportamenti differenti vennero invece rilevati per la risposta cellulare, cosa che portò a concludere come, essenzialmente, la risposta cellulare fosse strettamente dipendente dalla conformazione con cui la HFN veniva adsorbita sulle diverse tipologie di superfici.

Nella Tabella 2.3 sono riportati in modo schematico i lavori più significativi che hanno indagato l'aspetto dell'interazione tra fibronectina e substrati in titanio.

Tabella 2.3 Riassunto schematico dell'analisi della letteratura scientifica nell'ambito dello studio sull'interazione tra fibronectina e substrati in titanio

Tipo di superficie	Tipo di proteina	Tecnica di analisi	Sintesi dei risultati significativi	Riferimento
Dischi di lega di titanio lisci e rugosi (Ti6Al4V)	BFN	Spettroscopia fotoelettronica a raggi X (XPS), tecniche di radiomarcatura	Topografia superficiale e rugosità del substrato influenzano l'adsorbimento proteico	[36]
Fogli di titanio	BFN	Spettrometria di massa di ioni secondari, (ToF-SIMS), spettroscopia fotoelettronica a raggi X (XPS), tecniche di radiomarcatura ( <sup>125</sup> I radiolabeling)	Proteine adsorbite su differenti substrati possono andare incontro a diversi cambiamenti conformazionali (a seconda dei casi possono presentarsi in forma biologicamente attiva oppure denaturata/inattiva)	[37]

Nanoparticelle di biossido di titanio	HFN	Spettroscopia Raman	Differenti condizioni di processo e substrati differenti influenzano l'adsorbimento. La FN assume orientazioni diversi a seconda dei casi e interagisce con i substrati preferenzialmente attraverso le sue catene laterali	[77]
Ossido di titanio (titanio c.p.)	HFN	Spettroscopia fotoelettronica a raggi X (XPS), tecniche di radiomarcatura ( <sup>125</sup> I radiolabeling), misure di angolo di contatto statico	Affinità maggiore si rileva per l'adsorbimento di FN su substrati idrofili	[78]
Superficie in titanio macchinate e trattate chimicamente	HFN	Saggio colorimetrico	Composizione e morfologia della superficie influenzano la cinetica dell'adsorbimento di FN. La cinetica di adsorbimento è tempo e concentrazione dipendente	[81]
Ossido di titanio (titanio c.p.)	HFN	Tecniche di radiomarcatura ( <sup>125</sup> I radiolabeling)	FN ha più affinità nei confronti di substrati idrofili, andamento generale rilevabile anche in presenza di adsorbimento competitivo di FN e altre proteine	[49]
Dischi in Ti6Al4V non trattati e trattati con trattamento al plasma	HFN	Metodi immunostochimici	Forza ionica, pH, temperatura, carica superficiale e idrofilia superficiale non hanno influenza sull'adsorbimento di FN in sé ma influenzano la struttura tridimensionale della proteina adsorbita	[82]
Fogli di ossido di titanio nanoporoso	HFN	Tecniche di radiomarcatura	Nanostruttura, area superficiale e chimica superficiale hanno influenza sull'adsorbimento di FN e influenzano anche la struttura tridimensionale della proteina adsorbita	[83]
Film sottili in ossido di titanio (rutilo, anatasio) preparati via ALD	HFN	Diffrazione a raggi X (XRD), spettroscopia fotoelettronica a raggi X (XPS), FE-SEM, microscopia a forza atomica (AFM), spettroscopia ad infrarossi (FTIR) e misure di angolo di contatto.	Differenze statisticamente significative sull'adsorbimento di FN tra i campioni non sono osservabili. Si osservano differenze nella conformazione con cui la FN viene adsorbita.	[84]

---

Nell'ambito dello studio dell'adsorbimento proteico, infine, un discorso a parte è quello che riguarda il campo delle simulazioni atomistiche di dinamica molecolare. In questo campo, interesse hanno suscitato i lavori di ricerca come quelli del gruppo di Raffaini. In questo contesto, le recenti simulazioni computazionali (simulazioni MD) stanno guadagnando sempre più importanza nell'ambito della ricerca nella scienza dei materiali. Per questo motivo molti gruppi di ricerca si sono concentrati, dapprima, sulla modellizzazione di interfacce rutilo/anatasiche create appositamente allo scopo di simulare superficie comuni di questi polimorfi, come quelle che si potrebbero trovare sui campioni in titanio o in lega di titanio analizzati nel presente lavoro di tesi. In un lavoro recente, ad esempio, Raffaini e collaboratori, usando metodi di dinamica molecolare, sono andati a studiare l'effetto della struttura su scala nanometrica dei comuni polimorfi di  $\text{TiO}_2$  (rutilo, anatasio e brookite) sull'adsorbimento di due moduli collegati della proteina fibronectina [45]. Aspetto interessante derivato dalle simulazioni e non trascurabile è l'indicazione di un significativo cambiamento conformazionale dei sottodomini proteici adsorbiti. A questo cambiamento conformazione non è ancora attribuibile una ben chiara relazione tra causa ed effetto, ma gli studi successivi sono volti alla comprensione più approfondita di questo fenomeno. Ciò dimostra come anche i metodi classici di dinamica molecolare possano fornire informazioni utili sull'influenza della nanostruttura e della topologia sull'adsorbimento delle proteine su di una superficie dotata di una specifica, prefissata, chimica superficiale.

### **2.3 Interazione tra fibronectina e cellule**

Molti degli studi citati nella sezione precedente e relativi allo studio dell'adsorbimento della fibronectina su superficie in titanio non si sono limitati ad andare ad investigare solo la relazione tra substrato e proteina, ma hanno anche tentato di approfondire la relazione tra substrato e cellule, mediata dalla proteina adsorbita.

Vengono riportati in questa sezione alcuni dei lavori che hanno indagato gli aspetti sopra citati.

Deligianni e collaboratori nei loro esperimenti per andare a studiare l'effetto della rugosità superficiale della lega di titanio Ti6Al4V sull'adsorbimento di proteine e sulla risposta a breve e a lungo termine delle cellule del midollo osseo umano in vitro [36]. Dopo aver dimostrato come la BFN venisse adsorbita dal siero bovino preferenzialmente sul substrato rugoso rispetto a quello liscio (in quantità relativa superiore di 10 volte) e come anche le proteine totali venissero adsorbite

---

preferenzialmente sui campioni rugosi rispetto a quelli lisci, gli studiosi mostrarono come il substrato rugoso inducesse una risposta più rapida e migliore delle cellule del midollo osseo. Nella loro indagine, poi, i ricercatori tentarono di correlare l'affinità di adsorbimento dei substrati di lega di titanio lisci e ruvidi per la BFN adsorbita con il comportamento in vitro degli osteoblasti umani. I risultati portarono ad osservare come le cellule proliferassero preferenzialmente sui substrati rugosi, e come invece la differenziazione e l'espressione del fenotipo osteoblastico avvenisse per tutte le tipologie di superficie investigate. I dati ottenuti, poi, non portarono a stabilire una correlazione netta tra rugosità e vitalità cellulare, ma sembrarono invece dimostrare come non fosse solamente il contributo della rugosità ad influire sul fenomeno di interazione tra cellula e substrato: anche la quantità e la conformazione assunta dalla proteina adsorbita sul substrato sembravano dare un contributo non trascurabile.

In uno studio successivo dagli obiettivi simili, Protivinsky e collaboratori andarono a studiare gli effetti di diverse superfici di titanio chimicamente modificate (macchinate, sottoposte ad attacco acido e attacco acido/basico) sull'adsorbimento di HFN e sulla differenziazione osteoblastica di cellule umane mesenchimali embrionali (HEPM) [81]. Dai risultati emerse anche in questo studio come la composizione e la morfologia della superficie influenzassero la cinetica dell'adsorbimento di fibronectina. Inoltre, venne osservato come, sulle superfici trattate chimicamente, l'adesione e l'attaccamento cellulare migliorassero significativamente (rispetto a quanto accadeva per le superfici macchinate). Per quanto riguarda la proliferazione cellulare, nonostante studi precedenti indicassero una relazione esistente con la rugosità superficiale dei campioni, in questo caso il gruppo di ricerca non osservò alcuna differenza significativa nella proliferazione cellulare; su tutti i campioni analizzati si verificò una significativa crescita e divisione delle cellule, poiché probabilmente tutti i campioni valutati in quello studio fornivano un ambiente biologicamente favorevole alla proliferazione cellulare. Nei confronti della differenziazione cellulare, invece, le superfici sottoposte ad attacco acido/basico mostrarono una maggiore efficienza nel promuovere l'espressione dei marcatori di differenziazione osteoblastica rispetto alle altre superficie investigate. Non fu possibile però stabilire una netta correlazione tra la sola rugosità superficiale dei substrati e la differenziazione cellulare, e per questo venne ipotizzato un ruolo rilevante della chimica superficiale migliorare la differenziazione cellulare, un ruolo potenzialmente in grado di accelerare il processo di osteointegrazione.

---

Sousa e collaboratori, nel 2008, nell'approfondire il fenomeno dell'adsorbimento di fibronectina su superficie in titanio, andarono a valutare l'influenza del preadsorbimento competitivo della HSA e della HFN da soluzioni binarie sull'adesione e sulla morfologia di osteoblasti MC3T3-E1 su due tipi di substrati TiO<sub>2</sub> (trattati chimicamente e depositati via *sputtering*) [49]. Come precedentemente riferito, i ricercatori individuarono come il TiO<sub>2</sub> trattato chimicamente assorbisse meno albumina e più fibronectina rispetto alla controparte realizzata per *sputtering*, supportando un numero superiore previsto di cellule aderenti, per tutte le condizioni testate di preadsorbimento (testate andando a variare le concentrazioni proteiche relative). Parte dell'effetto venne attribuito all'influenza della bagnabilità della superficie, che si ipotizzò avere contribuito ad aumentare l'affinità cellulare verso TiO<sub>2</sub> trattato chimicamente; questa ipotesi non trovò conferme, dal momento che non si fu in grado di stabilire per gli osteoblasti, quanto avesse importanza, oltre alla bagnabilità superficiale, la chimica della superficie sull'attaccamento e la diffusione cellulare. Altro risultato meritevole di attenzione fu la scoperta e la conseguente ipotesi che la presenza di piccole quantità di HSA coadsorbita con la HFN potesse migliorare la disposizione della HFN stessa in una conformazione più affine al legame con le integrine (effetto soprannominato "*albumin rescuing*"), andando dunque ad influenzare anche la risposta cellulare successiva.

Nel lavoro di ricerca di Rapuano e MacDonald del 2011, invece, venne valutato prima l'adsorbimento della HFN su dischi in Ti6Al4V non trattati e trattati con trattamento termico e al plasma e poi venne valutata l'adesione cellulare sulle stesse superfici testando il comportamento di due linee cellulari osteogeniche (MG63 e MC3T3) e una linea di cellule staminali mesenchimali (C3H10T1/2) [82]. Sebbene non fossero state riscontrate differenze significative nella quantità di proteina adsorbita sulle superficie a confronto, sulla base dei risultati di adesione cellulare, invece, il gruppo fu in grado di dimostrare come il pretrattamento dell'ossido di metallo con plasma potenziasse la capacità intrinseca della HFN adsorbita di legarsi ai recettori integrinici delle cellule ossee. L'aumento indotto dal trattamento al plasma verso l'attività di adesione cellulare nei confronti della fibronectina adsorbita venne pertanto correlato con la chimica superficiale dei campioni e, in particolare, con l'aumento della carica superficiale netta negativa dell'ossido di Ti6Al4V a pH fisiologico prodotto dal trattamento termico associato al trattamento RFGD. Non essendo rilevabile un aumentato adsorbimento della HFN da parte di nessuno dei campioni testati, questi risultati suggerirono ai ricercatori un ruolo dei gruppi funzionali (con carica negativa)

---

dell'ossido superficiale in Ti6Al4V nel modulare l'attività dei recettori integrinici della fibronectina. L'alterazione nella conformazione della proteina adsorbita dovuta all'interazione con questi gruppi funzionali caricati negativamente presenti sulla superficie dell'ossido venne ritenuta fondamentale nell'osteointegrazione sui materiali metallici come il titanio; tutto ciò, inoltre, venne interpretato come una ulteriore dimostrazione indiretta del fatto che il contributo di un certo numero di variabili di superficie (tra cui la carica e l'idrofilia superficiale) fossero in grado di modulare la struttura tridimensionale della HFN a seguito del legame con un substrato.

Rivera e colleghi, nel 2013, andando ad investigare il fenomeno dell'adsorbimento di fibronectina e vitronectina sulle superficie in ossido di titanio nano porose dedussero che, oltre alla nano topografia, le superfici dei biomateriali su cui le proteine venivano adsorbite in modo favorevole mostravano uno spiccato aumento dell'adesione cellulare [83]. Così, i ricercatori andarono ad investigare l'influenza dei substrati di TiO<sub>2</sub> nano porosi fabbricati, su cui era stata adsorbita proteina, sulla risposta di cellula osteoblastiche del tipo fetale umano (hFOB 1.19). Per tutti i substrati testati (ossido di titanio nano poroso, lega di titanio e titanio commercialmente puro) la presenza di proteine diede modo di riscontrare un effetto significativo sull'adesione. In particolare, venne ipotizzato che la HFN si dispiegasse sulla superficie nano porosa, consentendo alle cellule l'accesso al tripeptide RGD, il sito di adesione cellulare (altrimenti nascosti). I modelli di TiO<sub>2</sub> nano porosi si ipotizzarono in grado di consentire una migliorata propensione al legame cellulare (rispetto ai controlli) fornendo una maggiore densità di motivi di associazione cellulare rispetto agli altri substrati. Ciò venne confermato dai dati raccolti, che dimostrarono l'adesione cellulare significativamente migliorata sui campioni di TiO<sub>2</sub> nano porosi in confronto ad entrambi i substrati in lega di titanio e titanio commercialmente puro. In generale, infatti, venne osservato come la struttura nano porosa dell'ossido di titanio fosse in grado di promuovere una più fitta copertura di superficie da parte delle cellule in fase proliferativa (se in confronto con i substrati di controllo). Oltre a migliorare l'adsorbimento e la disposizione nello spazio tridimensionale delle proteine per consentire alle cellule l'accesso ai siti di legame, i nano pori si ipotizzò potessero anche funzionare come serbatoi di fattori di crescita in grado di influenzare la proliferazione e la differenziazione delle cellule osteoprogenitrici.

Un risultato più recente, si trova, infine, riportato nello studio di Lv et al. Il gruppo di ricerca preparò su substrati di silicio dei film sottili di TiO<sub>2</sub> di anatasio e rutilo con spessore del film,

topografia superficiale e idrofilia simili, mediante tecnica ALD (*Atomic Layer Deposition*), successiva ricottura termica e irradiazione UV [84]. Sebbene lo studio dell'adsorbimento proteico non rilevò alcuna differenza significativa nella quantità di HFN adsorbita tra i differenti tipi di campioni, comportamenti differenti vennero invece rilevati per la risposta cellulare di cellule osteoblastiche di ratto del tipo MC3T3-E1. I siti di legame cellulare della HFN, infatti, risultavano più esposti sul film in anatasio rispetto al film rutilo. Una migliore risposta osteogenica delle cellule MC3T3-E1, conseguentemente, venne osservata sull'ossido di titanio in forma anatasica rispetto a quello in forma di rutilo. Il film di TiO<sub>2</sub> in fase anatasica si mostrò in grado di promuovere in maniera migliore l'adesione, la diffusione e la proliferazione dei preosteoblasti rispetto al rutilo. Inoltre, il film di anatasio si dimostrarono in grado di determinare una sovraregolazione dell'attività dell'ALP e dei livelli di espressione genica osteogenica in confronto al film di rutilo. Poiché per entrambi i film si riscontrarono topografia superficiale e idrofilia comparabili, i comportamenti osteogenici migliorati delle cellule MC3T3-E1 sul film di TiO<sub>2</sub> dell'anatasio vennero ipotizzati spiegabili, anche in questo caso, per l'effetto positivo indotto sulle cellule delle proteine adsorbite.

Nella Tabella 2.4 sono riportati in modo riassuntivo i lavori più significativi relativi all'interazione tra cellule e substrati in titanio sui quali è stata adsorbita fibronectina.

*Tabella 2.4 Riassunto schematico dell'analisi della letteratura scientifica nell'ambito dello studio sull'interazione (mediata dall'adsorbimento di fibronectina) tra cellule e superfici in titanio*

<b>Tipo di superficie</b>	<b>Tipo di proteina</b>	<b>Tipo di cellula</b>	<b>Sintesi dei risultati significativi</b>	<b>Riferimento</b>
Dischi di lega di titanio lisci e rugosi (Ti6Al4V)	BFN	cellule stromali di midollo osseo umano	Tipo e quantità di proteina adsorbita al substrato e morfologia del substrato determinano la risposta cellulare. La FN si adsorbe meglio su substrati rugosi	[36]
Superficie in titanio macchinate e trattate chimicamente	HFN	cellule embrioniche mesenchimali del palato (HEPM)	Composizione, morfologia e chimica della superficie influenzano la cinetica dell'adsorbimento di FN e determinato variazioni nella risposta cellulare al substrato (in particolare, nell'espressione genica)	[81]
Ossido di titanio (titanio c.p.)	HFN	osteoblasti MC3T3-E1	FN si presenta alle cellule con una conformazione differente a seconda che vi sia adsorbimento competitivo. Tutto ciò influenza la risposta cellulare	[49]

Dischi in Ti6Al4V non trattati e trattati con trattamento al plasma	HFN	Linee cellulari osteogeniche (MG63 e MC3T3), linea cellulare staminale mesenchimale (C3H10T1/2)	Gruppi funzionali (con carica negativa) esposti dal substrato hanno ruolo nel determinare la conformazione della FN adsorbita e nel modulare l'attività dei recettori integrinici della FN	[82]
Fogli di ossido di titanio nanoporoso	HFN	Cellule osteoblastiche fetali umane hFOB	Nanoporosità, area superficiale disponibile e chimica superficiale hanno ruolo nel determinare la conformazione della FN adsorbita e la sua affinità ad interagire con i recettori cellulari	[83]
Film sottili in ossido di titanio (rutile, anatasio) preparati via ALD	HFN	Osteoblasti MC3T3-E1	Substrati diversi portano cambiamenti conformazionali diversi nella struttura della FN. La FN su anatasio assume conformazione più pronta al legame cellulare in confronto a ciò che si riscontra sul rutilo	[84]

## 2.4 Interazione tra fibronectina adsorbita su titanio e batteri

Altra tipologia di cellule che sono da considerare, parlando degli impianti in titanio per applicazioni in vivo, è la categoria delle cellule batteriche. L'interazione iniziale tra il tessuto ospite e la superficie impiantata è condizionata dai fluidi tissutali emessi nella fase di risposta infiammatoria del processo di guarigione della ferita che viene a formarsi nel momento dell'impianto. Questa interazione porta alla deposizione sull'impianto in titanio di uno strato di macromolecole composte da componenti del plasma e della matrice extracellulare, come fibrinogeno o fibrina, fibronectina e altre glicoproteine o componenti dei glicosamminoglicani, i quali modulano la colonizzazione e le conseguenti risposte cellulari. In questo contesto, la fibronectina si pensa giochi un ruolo importante nella reazione interfacciale. La fibronectina infatti è una proteina multifunzionale che esibisce diversi domini, ciascuno dei quali riconosce specificamente diversi tipi di cellule, tra cui anche le cellule batteriche. Siccome la fibronectina è però coinvolta anche nell'adesione degli osteoblasti, come dimostrato dagli studi citati in precedenza, si capisce come diventi piuttosto difficile ottenere superfici che siano contemporaneamente osteointegrabili e antibatteriche. Le cellule batteriche, infatti, possono aderire al sottile film di strato adsorbito dalla superficie, e ciò è stato dimostrato in diversi lavori di letteratura dove sono stati rilevati batteri in grado di aderire a collagene e fibronectina [85]. Alcuni

---

ceppi di *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*, ad esempio, hanno recettori specifici o gruppi di recettori per gli epitopi di collagene e fibronectina ([86], [87]). Gli studi hanno mostrato che i batteri patogeni hanno un numero maggiore di recettori del film proteico adsorbito sui bioimpianti rispetto a ceppi simili di batteri non patogeni; questo però di per sé non ha rilevanza in modo singolo, perché è necessario considerare che l'interazione tra cellule batteriche e strato adsorbito dipende dallo stato fisico-chimico delle proteine adese e dalla quantità e dal tipo di proteine presenti. Ad esempio, diversi studi in vitro hanno dimostrato come biomateriali ricoperti di fibronectina ad una bassa concentrazione vadano a migliorare l'adesione batterica, mentre alte concentrazioni di fibronectina siano di ostacolo all'adesione degli stessi batteri [86]. Di fatto, non è possibile trarre conclusioni generali dal momento che tutto dipende dalle concentrazioni e dalle condizioni ambientali in cui la proteina aderisce al substrato.

Tra gli studi che hanno investigato il ruolo della fibronectina sulle superficie in titanio con potenzialità antibatteriche si ritiene meritevole citarne un paio a scopo illustrativo. Nei seguenti esempi è mostrata l'interazione tra titanio e batteri del tipo *Staphylococcus aureus* perché noti per avere una maggiore propensione ad aderire su materiali metallici (in confronto a quelli polimerici [51]).

Ad esempio, in uno tra i primi studi sull'argomento, Francois et al. andarono ad investigare l'influenza delle proprietà della superficie del titanio sulle isoterme di adsorbimento di fibronectina in vitro e sulla promozione dell'adesione dello *Staphylococcus aureus*. Trattamenti che producevano rugosità superficiale diversa vennero applicati su un lato singolo di campioni in titanio commercialmente puri a diversa rugosità: (i) lucidati meccanicamente; (ii) lucidati e poi attaccati con acido; (iii) sabbiati e poi acidati. Quello che venne osservato fu la promozione dell'adesione di *Staphylococcus aureus* mediante la fibronectina adsorbita su tutte le superfici. Si osservò inoltre come l'estremità amino-terminale della fibronectina presentasse un'alta affinità per il batterio *Staphylococcus aureus* e fosse in grado di promuovere l'adesione di questa specie batterica ([88], [89]). Quello che emerse di interessante, però, fu un minore adsorbimento di fibronectina al substrato lucidato e acidato, in paragone a quello solo lucidato e a quello sabbiato, che si rivelò portare, di conseguenza, una ridotta adesione batterica ai rispettivi substrati. Da qui venne ipotizzato, per la prima volta, che un'aumentata rugosità della superficie di titanio non si

traducesse necessariamente in un aumento dell'adsorbimento di fibronectina in vitro né in un aumento dell'adesione batterica.

In uno degli studi più recenti, al contrario, ad esempio Puckett e collaboratori andarono ad investigare in vitro gli effetti delle caratteristiche topografiche di superfici di titanio con dimensioni nanometriche differenti, caratterizzate in studi precedenti per migliorate caratteristiche di adsorbimento di proteine (come la fibronectina) e funzioni osteoinduttive [90]. Le stesse superficie vennero studiate come mezzo per ridurre anche l'adesione dei batteri. Questo studio esaminò l'adesione di tre tipologie di batteri, tra cui anche lo *Staphylococcus aureus*, su titanio convenzionale, titanio nano rugoso prodotto per evaporazione con un cannone elettronico e titanio nano tubulare (dotato di particolare nano topografia) prodotto con due diversi processi di anodizzazione. Questo studio rilevò come rispetto al titanio convenzionale, le superfici di titanio nano rugoso prodotte dall'evaporazione del fascio di elettroni riducevano al minimo l'aderenza di tutti i suddetti batteri. Le superfici di titanio convenzionali e nano rugose, in particolare, risultarono avere superficie caratterizzata dalla presenza di  $TiO_2$  cristallino, mentre le superfici di titanio nano tubulari risultarono avere superficie in ossido di titanio amorfo. I risultati di questo studio in vitro rilevarono una diminuzione dell'adesione dei batteri limitanti la funzionalità e l'efficacia dell'impianto ortopedico su superfici di titanio nano rugoso create attraverso l'evaporazione del fascio elettronico; al contrario, il titanio nano tubulare creato per anodizzazione provocava un aumento dell'adesione batterica. Ciò portò a dimostrare come, attraverso un'attenta selezione delle proprietà della superficie su scala nanometrica, fosse possibile regolare l'adsorbimento di un certo tipo di proteina (come la BFN), pur mantenendo chimica e cristallinità favorevoli a ridurre l'adesione batterica.

Nella Tabella 2.5 sono riportati in modo riassuntivo i lavori più significativi relativi all'interazione tra batteri e substrati in titanio sui quali è stata adsorbita fibronectina.

*Tabella 2.5 Riassunto schematico dell'analisi della letteratura scientifica nell'ambito dello studio sull'interazione (mediata dall'adsorbimento di fibronectina) tra batteri e superfici in titanio*

<b>Tipo di superficie</b>	<b>Tipo di proteina</b>	<b>Tipo di cellula</b>	<b>Sintesi dei risultati significativi</b>	<b>Riferimento</b>
Titanio commercialmente puro	HFN	<i>Staphylococcus aureus</i>	Presenza di FN e caratteristiche superficiali del substrato influenzano l'adesione batterica	[89]

---

Superficie nanostrutturate in ossido di titanio	BFN	Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis e Pseudomonas aeruginosa	Nanostruttura e chimica superficiale influenzano l'adsorbimento di BFN e l'adesione batterica	[90]
---	-----	--	---	------

---

Quello che si può proporre come considerazione generale, a seguito degli esempi dimostrati, è la seguente osservazione: la natura della superficie dell'impianto sembra influenzare, in primo luogo, l'adsorbimento proteico. Ciò ha poi una conseguenza diretta sia sulla colonizzazione cellulare dell'impianto, che sulla colonizzazione batterica. Indagare entrambi i fenomeni per approfondirne i meccanismi di regolazione può essere una via molto efficace per andare a produrre superfici nano-strutturate bioattive in grado sia di massimizzare l'adesione di cellule osteogeniche, al fine di avere osteointegrazione del dispositivo impiantato, sia di ridurre l'adesione di batteri, onde evitare pericolose infezioni peri-implantari e conseguenti fallimenti dell'impianto stesso.

---

# Capitolo 3

## 3 Siero bovino

Il siero fetale bovino, spesso indicato con la sigla FBS (o FCS, dall'inglese *fetal bovine serum* o, in alternativa, *fetal calf serum*, siero fetale di vitello) è un liquido costituito dalla frazione del plasma sanguigno che rimane dopo la coagulazione del sangue e quindi da ciò che rimane a seguito della conversione di fibrinogeno in fibrina. Il FBS è il supplemento più utilizzato per il mantenimento in vitro di colture cellulari di cellule eucariote, con lo scopo di simulare un ambiente fisiologico.

Nel presente capitolo sono riportate una breve descrizione delle funzioni e della composizione del FBS. Solo avendo una comprensione chiara di come l'FBS viene raccolto, prodotto e stoccato, e una conoscenza dei vari componenti che esso contiene, infatti, è possibile poi andare a studiare e capire in dettaglio le caratteristiche importanti ai fini degli studi biochimici in vitro dell'adsorbimento proteico.

### 3.1 Siero fetale bovino

Il FBS è il tipo di siero più comune e più spesso impiegato nei laboratori di ricerca (a causa del suo alto contenuto di fattori di crescita embrionali). È molto economico e facilmente reperibile perché prodotto secondario dell'industria della carne.

Il FBS è ottenuto dal sangue raccolto presso macelli commerciali da bovini allevati per la produzione di carni destinate al consumo umano. Il siero, per la precisione, viene ottenuto dal sangue che viene raccolto dal feto di bovine gravide, durante o negli istanti immediatamente successivi al processo di macellazione. Il sangue viene, in quelle fasi, raccolto tramite un sistema chiuso di collettori che garantiscono la sterilità del prodotto finale. Il primo stadio della produzione di FBS consiste nel prelievo del sangue dal feto. L'utero gravido viene rimosso dalla vitella macellata. Una volta isolato il feto, il sangue fetale o viene drenato dai vasi ombelicali (preventivamente cateterizzati) del feto, oppure, più tradizionalmente, il sangue del feto viene

---

prelevato attraverso una puntura cardiaca, per avere un agevole accesso al cuore fetale; questo secondo sistema minimizza il rischio di contaminazione del siero da parte di microrganismi ambientali o provenienti dal feto stesso. Il sangue viene successivamente raccolto in un contenitore sterile e, a seguire, viene lasciato coagulare. Il coagulo viene quindi rimosso tramite centrifugazione. Il risultante surnatante, designato come FBS vero e proprio, viene accuratamente rimosso. La colorazione tipica del FBS assume una sfumatura intermedia tra il giallo/arancione; questo perché nel siero rimane dell'emoglobina residua in soluzione. L'emoglobina è la proteina principale responsabile del conferimento della tinta caratteristica al siero. Il siero viene poi congelato prima di subire le ulteriori preparazioni che sono necessarie per controllarlo e testarlo per verificarne l'idoneità alla coltura cellulare.

Il secondo stadio della lavorazione prevede che il FBS venga sottoposto a severi controlli di qualità prima di essere stoccato nei contenitori adatti all'utilizzo in laboratorio. Prima dell'imbottigliamento e del congelamento, è dunque prevista una omogeneizzazione del siero cui segue una filtrazione. Nella fase di omogeneizzazione, piccole vasche di siero (con all'interno siero proveniente, in media, da una decina di capi) vengono versate e mescolate in vasche più grandi (fino a 2000 l), con l'obiettivo di ottenere un prodotto finale che non sia enormemente variabile da lotto a lotto. La fase successiva di filtrazione, invece, avviene per stadi attraverso una catena di filtrazione che termina all'applicazione di un filtro a membrana con pori di diametro 0,1  $\mu\text{m}$  (ma che, in alcuni casi, può scendere addirittura alle dimensioni di 0,04  $\mu\text{m}$  in modo tale da garantire la rimozione efficace di micoplasmi). Dopo la filtrazione, il siero viene distribuito in bottiglie mediante un processo di riempimento asettico che è validato per assicurare la sterilità del prodotto finale.

Le sostanze a base di siero vengono prodotte in un ambiente severamente controllato (camera bianca), appositamente progettato per controllare attentamente la pressione dell'aria e la presenza di particolato. Le camere pulite sono, inoltre, monitorate regolarmente per particolato, contaminanti e livelli microbici per garantire che il sistema di trattamento dell'aria, i protocolli di pulizia e il personale addetto alla produzione mantengano il controllo degli standard [91].

Al termine dell'imbottigliamento del siero, il prodotto finale viene rapidamente congelato a -20 °C e tenuto in quarantena fino al completamento di tutti i test di controllo qualità. È consigliabile conservare l'FBS congelato (a temperature comprese tra i -10 e i -40 °C) per preservarne la stabilità

---

dei componenti, come, ad esempio, i fattori di crescita. Quando il siero viene scongelato, può accadere che si osservi la presenza di precipitati sul fondo del contenitore. Questo è un fenomeno normale e non compromette in alcun modo la qualità del siero; il precipitato può essere rimosso per centrifugazione. Per limitare la quantità di precipitati, tipicamente, si raccomanda di scongelare, il siero in frigorifero a 2-8 °C. È necessario evitare cicli di congelamento/scongelamento ripetuti, che sono invece dannosi per il prodotto.

Se destinato al mercato, infine, il FBS è soggetto a stringenti controlli di qualità e viene accompagnato da un dettagliato certificato di analisi. Tale certificato fornisce risultati completi e informazioni sull'origine del siero e riporta, oltre ai dati sull'origine e sulla lavorazione del prodotto (dichiarazione di filtrazione), informazioni riguardanti l'effetto sulla crescita cellulare, informazioni sulla sterilità e sulla presenza di microrganismi e informazioni sulla presenza di micoplasmi, virus, endotossine, emoglobina, anticorpi e proteine totali. A seconda della sostanza o del microorganismo di cui si vuole indagare la presenza all'interno del siero, si possono individuare tre diverse principali categorie di analisi [91]: test composizionali e biochimici; test per individuare la presenza di contaminanti; test di valutazione della capacità di supporto alla crescita cellulare. È importante sottolineare, però, che i controlli di qualità sul siero, non vengono svolti in modo uguale e standardizzato in tutti i paesi; spesso vengono eseguiti controlli diversi da paese a paese, e non esistono, ad oggi, protocolli internazionali in grado di unificare le procedure di verifica sui lotti di produzione. Da ciò risulta che la qualità del siero può variare anche di molto, a seconda che lo stesso venga acquistato in uno stato o in un altro. Nonostante poi il FBS sia vantaggioso per gli scopi sopra citati, inoltre, non è un prodotto del tutto esente da problematiche severe. Il problema principale è il seguente: non si ritiene il siero un mezzo di coltura completamente e chiaramente definito in termini di composizione [92]. Il FBS, infatti, non ha una composizione univoca, ripetibile e sempre uguale a sé stessa ma può variare in composizione (anche di molto) tra lotti perché derivato da un fluido biologico animale. Esiste una variabilità intrinseca individuale tra gruppi di capi di bestiame differenti, che si riflette più in generale in una differenza che può essere (spesso) rilevante tra lotti di FBS raccolti in diverse regioni territoriali e in diversi allevamenti. Per questo si è cercato, nel corso degli anni, di andare a sviluppare alternative al siero in modo da migliorare i protocolli di coltura cellulare e renderli più ripetibili, cosa che è prevista ed auspicabile dalle norme generali che definiscono le buone prassi di

---

laboratorio. Sono state, inoltre, sollevate domande etiche relative al processo di raccolta del sangue da cui estrarre il FBS.

### 3.1.1 Funzioni del siero bovino

Il FBS è il supplemento più utilizzato per il mantenimento in vitro di colture cellulari di cellule eucariote, con lo scopo di simulare un ambiente fisiologico. L'aggiunta di siero, in percentuali che variano, in media, tra 5-15% in volume, al terreno di coltura è la procedura tipica che viene seguita nei protocolli di coltura cellulare. Il supplemento di siero ai mezzi di coltura di cellule, tessuti e organi è infatti di fondamentale importanza per dare il corretto apporto di: proteine, fattori di crescita, sostanze nutritive, ormoni, vitamine, chelanti e altri innumerevoli e vari composti necessari per la crescita in vitro di cellule, in modo da indurre la sopravvivenza e la proliferazione della coltura cellulare. Il siero aggiunge anche capacità tampone al terreno di coltura e possiede, nella sua composizione, sostanze detossificanti in grado di legare o neutralizzare i componenti tossici.

Le principali funzioni del siero utilizzato come mezzo di coltura cellulare sono riportate nella Tabella 3.1 [65] che associa ad alcuni componenti della miscela sierica la rispettiva funzione principale.

*Tabella 3.1 Principali funzioni che il siero esprime nei confronti delle colture cellulari [65]*

<b>Funzioni</b>	<b>Costituenti</b>
Attività mitogenica	Fattori di crescita
Fattori di adesione	Fibronectina, fetuina
Legante di tossine, cuscinetto tampone per le cellule sanguigne contro i danni meccanici	Albumina
Detossificante per i radicali liberi	Selenio

Il siero bovino di origine fetale (FBS) è caratterizzato, in generale, da una maggiore concentrazione di fattori di crescita e livelli inferiori di anticorpi rispetto al siero prelevato da un soggetto adulto. Molte tipologie di siero derivate da adulti contengono infatti, naturalmente, in presenza più o meno accentuata, degli anticorpi eterofili. Tipicamente, per gli scopi di laboratorio è meglio avere disponibilità di sieri privi di anticorpi. Proprio in questo contesto diventa dunque importante il ruolo del FBS. Il siero fetale, se raccolto in modo appropriato e con i dovuti accorgimenti, è per natura quasi del tutto privo di anticorpi materni (nel bestiame, difatti, non si verifica trasferimento transplacentare di anticorpi; gli anticorpi sono invece trasferiti interamente attraverso il colostro).

---

A questa particolare ed esclusiva caratteristica è dovuto il largo impiego in biochimica del FBS, per garantire il mantenimento delle cellule in coltura. Ulteriore vantaggio, non da trascurare, è la relativa facile reperibilità e stabilità in composizione del siero. La ricca varietà di proteine presenti nel siero di origine fetale, come già anticipato, è in grado di garantire e favorire la sopravvivenza di molte tipologie di linee cellulari, per cui il mantenimento di cellule in tale mezzo di coltura è in grado di assicurare buone possibilità di crescita e anche di proliferazione delle colture in vitro. La scelta di utilizzare un supplemento di siero per applicazioni in biologia e biochimica, nell'ambito delle colture cellulari in vitro, dipende, però, essenzialmente, da tre fattori principali: definizione chimica del mezzo basale, tipo di cellula da coltivare e sistema di coltura impiegato.

### **3.1.2 Composizione e proprietà del siero fetale bovino**

Come riportato numerose volte nei paragrafi introduttivi del capitolo, nel corso degli ultimi cinquant'anni, con il progredire delle conoscenze nelle scienze biologiche e cellulari, sono stati sviluppati un gran numero di diversi tipi di terreni di coltura (a base di siero oppure senza siero) per la coltura tissutale di linee cellulari [93]. Molti di questi mezzi sono ora disponibili in commercio. Gran parte delle colture cellulari di laboratorio, però, ad oggi viene ancora eseguita in presenza di siero di varia origine (tipicamente umano, oppure di bovino). Questo sempre per i motivi precedentemente giustificati: il siero fornisce alle cellule una moltitudine di fattori di crescita, ormoni, nutrienti e minerali tali da rendere l'ambiente di coltura adatto alla sopravvivenza cellulare, ma, a controbilanciare questo grande vantaggio, il siero è altrettanto scarso in quanto a (i) riproducibilità, perché è variabile in termini di qualità e costituzione; (ii) sicurezza, a causa di possibili contaminazioni da virus e micoplasma.

Il siero bovino, infatti, essendo un liquido biologico prelevato da animali (e non prodotto artificialmente), introduce numerose incognite nel sistema di coltura cellulare, in quanto la concentrazione dei vari componenti può variare nei differenti lotti utilizzati per le sperimentazioni. Quest'ultimo è un problema che va attentamente considerato nell'analisi dei risultati di laboratorio quando si avviano sperimentazioni che prevedono colture cellulari mantenute in FBS.

I dati sull'analisi del siero animale sono tradizionalmente derivati dai laboratori clinici e dipendono da saggi ed analisi convenzionali mirati ad indagare spesso solo i principali costituenti

oppure i componenti che mostrano fluttuazioni anomale (probabile indice di malattia o carenza nutrizionale della coltura analizzata).

I principali costituenti del siero derivato da animale sono elencati nella Tabella 3.2 [9]. In Tabella 3.2 sono riportati i componenti che ci si aspetta di trovare in un campione di FBS, con i rispettivi range e valori medi di concentrazione.

*Tabella 3.2 Composizione del siero fetale bovino [9]*

<b>Componente</b>	<b>Valore medio fisiologico</b>	<b>Intervallo fisiologico</b>
Endotossine (mg/ml)	0,35	0,01 - 10,0
Glucosio (mg/ml)	1,25	0,85 - 1,81
Proteine (mg/ml)	38	32 - 70
Albumina (mg/ml)	23	20 - 36
Emoglobina (mg/ml)	0,113	0,024 - 0,181
Bilirubina, totale (mg/ml)	0,004	0,003 - 0,011
Bilirubina, diretta (mg/ml)	0,002	0 - 0,005
Urea (mg/ml)	0,160	0,140 - 0,200
Acido urico (mg/ml)	0,029	0,013 - 0,041
Creatinina (mg/ml)	0,031	0,016 - 0,043
Insulina ( $\mu$ U/ml)	10	6 - 14
Cortisolo (ng/ml)	0,5	0,1 - 23
Ormone della crescita (ng/ml)	39	18,7 - 51,6
Paratormone, PTH (ng/ml)	1,72	0,085 - 6,18
Triiodotironina, T3 (ng/ml)	1,2	0,56 - 2,23
Tiroxina, T4 (ng/ml)	0,12	0,08 - 0,16
Ormone tiro-stimolante, TSH (ng/ml)	1,22	0,2 - 4,5
Ormone follicolo-stimolante, FSH (pg/ml)	95	20 - 238
Testosterone (pg/ml)	400	210 - 990
Progesterone, P4 (pg/ml)	80	3 - 360
Prolattina - ormone luteotropico, LTH (pg/ml)	176	20 - 500
Ormone luteinizzante, LH (pg/ml)	8	1,2 - 18
Prostaglandina E (ng/ml)	5,9	0,5 - 30,5
Prostaglandina F (ng/ml)	12,3	3,8 - 42,0
Vitamina A (ng/ml)	90	10 - 350
Vitamina E (ng/ml)	1,1	1 - 4,2

---

Colesterolo (ug/ml)	310	120 - 630
Lattato deidrogenasi, LDH (mU/ml)	864	260 - 1.215
Fosfatasi alcalina (mU/ml)	255	110 - 352
Aspartato - Aminotransferasi, ASAT (mU/ml)	130	20 - 200
Sodio, Na <sup>+</sup> (µeq/ml)	137	125 - 143
Potassio, K <sup>+</sup> (µeq/ml)	11,2	10,0 - 14,0
Calcio, Ca <sup>2+</sup> (µeq/ml)	6,75	6,30 - 7,15
Cloro, Cl <sup>-</sup> (µeq/ml)	103	98 - 108
Fosfati, P <sub>i</sub> (µg/ml)	98	43 - 114
Selenio (µg/ml)	0,026	0,014 - 0,038
pH	7,4	7,20 - 7,60

---

Il mantenimento di linee cellulari in vitro richiede condizioni in grado di mimare l'ambiente presente in vivo per quel particolare tipo cellulare. Il terreno di coltura cellulare, in generale, contiene principalmente glucosio e aminoacidi con funzioni energetiche, tuttavia molte linee di cellule eucariote necessitano per la sopravvivenza della presenza di altri fattori (principalmente fattori di crescita) e oligoelementi per essere vitali ed eventualmente proliferare: il siero è proprio il mezzo adatto a fornire queste sostanze. Il FBS, come evidenziato dalla Tabella 3.2, contiene in sé una moltitudine di componenti: proteine plasmatiche, fattori di crescita, fattori di adesione, sali minerali, chelanti, vitamine, elettroliti, ...ecc. tutte sostanze che sono adatte a favorire la sopravvivenza e la proliferazione di cellule mantenute in coltura. In particolare, per ciò che riguarda le proteine del siero si può osservare, come anticipato, che esse svolgono molte funzioni diverse, tra cui il trasporto di lipidi, ormoni, vitamine e minerali nel sistema circolatorio e la regolazione dell'attività acellulare e il funzionamento del sistema immunitario. Altre proteine del sangue agiscono come enzimi, componenti del complemento, inibitori della proteasi o precursori della chinina. Sebbene le proteine del siero abbiano una concentrazione molto elevata, mostrano una distribuzione non omogenea in termini di composizione. Cioè, solo circa 22 proteine rappresentano il 99% di tutte le proteine del siero (Tabella 3.3). Queste includono l'albumina sierica, immunoglobuline e fibrinogeno. Il restante 1% delle proteine del sangue è composto da proteine circolatorie a bassa abbondanza e proteine secrete da cellule vive, apoptotiche e necrotiche. La maggior parte delle proteine del sangue sono secrete dal fegato e dall'intestino ad eccezione delle gammaglobuline, sintetizzate dal sistema immunitario [94].

Tabella 3.3 Panoramica delle principali proteine presenti nel siero e relativa abbondanza [94]

Tipo di proteina	Abbondanza relativa nel siero
Albumina	55%
Globuline alfa-1	
Globuline alfa-2	
Beta globuline	38%
Gamma globuline	
Proteine regolatrici	<1%

### 3.2 Adsorbimento delle proteine del siero sulle superfici dei biomateriali in titanio

Tipicamente, vengono svolti test di adsorbimento utilizzando FBS per analizzare tre aspetti del fenomeno: le proporzioni, la quantità e la distribuzione delle proteine adsorbite. Gli studi dettagliati nei capitoli precedenti relativi ad adsorbimento di albumina e fibronectina hanno cercato di rivelare gli aspetti più significativi dell'adsorbimento proteico quando si ha a che fare con soluzioni monocomponenti. Differente e più complesso diventa il discorso dell'analisi dell'adsorbimento proteico da parte di superficie poste in contatto con soluzioni multicomponenti (come è lo stesso FBS).

Precedenti studi, alcuni dei quali analizzati nei capitoli relativi ad albumina e fibronectina, hanno valutato la cinetica dell'adsorbimento di proteine sul titanio ma si sono concentrati sull'esposizione di titanio a soluzioni proteiche singole. Tuttavia, il processo di adsorbimento delle proteine è un fenomeno complesso che dipende da molti parametri, alcuni dei quali non sono stati considerati in quei particolari studi. Ad esempio, nei sistemi multiproteici come il plasma/siero del sangue, aumentando la concentrazione di proteine e/o il numero di piccole molecole di solito migliora la diffusione delle particelle stesse e viene accelerata la loro capacità di spostarsi. Con il tempo, le molecole con maggiore affinità per la superficie, ma velocità di diffusione più lente (a causa della loro bassa concentrazione o delle loro grandi dimensioni) sostituiscono le molecole più piccole, come accade per effetto Vroman [28]. Il processo di adsorbimento delle proteine plasmatiche o del siero, infatti, si basa su una vasta gamma di fattori come la disponibilità e il profilo delle biomolecole che sono adsorbite alla superficie (ad esempio, a seconda di dimensioni, carica e stabilità conformazionale) e fattori cinetici (ad esempio concentrazione e dimensioni). Tutte queste

---

caratteristiche, con semplici soluzioni proteiche a singola proteina non si possono riprodurre [95]. Si possono invece simulare, o perlomeno modellizzare in situazioni semplificate utilizzando il siero.

L'identificazione delle proteine all'interfaccia tra superficie in titanio e soluzione multicomponente, infatti, può essere di importanza nel migliorare la comprensione della funzione fisiologica di questo strato proteico adsorbito, l'affinità della superficie per le diverse componenti proteiche presenti nel mezzo complesso e il suo impatto sulle interazioni cellulari e sul risultato dell'osteointegrazione. Per questo motivo, gli obiettivi di molti studi sono stati direzionati a caratterizzare il proteoma dello strato proteico adsorbito su superficie in titanio dopo l'esposizione al siero oppure al plasma sanguigno umano, per valutarne gli effetti.

Già Waliwaara e collaboratori, nel 1993, grazie ad uno studio in vitro di superfici in titanio trattate con perossido di idrogeno a contatto con plasma ematico e soluzione fisiologica simulata cercarono di produrre risultati significativi ([29], [96]) andando ad investigare l'adsorbimento di albumina e fibrinogeno. In tempi successivi, Imamura e collaboratori, valutarono, nel 2006, l'adsorbimento proteico di differenti tipi di polipeptidi e di proteine su substrati in titanio in dipendenza dal pH ([97], [98]). L'anno successivo, lo stesso gruppo andò ad investigare le caratteristiche di adsorbimento di alcune sequenze peptidiche (ottapeptidi, contenenti diverse unità di acido aspartico, lisina e residui di alanina) sulla superficie delle particelle di titanio in range variabili di pH ed a una temperatura fissata [98].

Sulla base dell'analisi mediante spettrometria di massa, invece, Sela e collaboratori identificarono fibronectina, albumina, fibrinogeno, IgG e componente C3 adsorbiti su una superficie in titanio modificata dopo incubazione in plasma umano per 24 h [99]. In particolare, il gruppo di ricerca andò a testare superficie in titanio con tre tipi di modifiche superficiali: macchinate, acidate e acidate e sabbiate. Dai risultati si evidenziò che l'adsorbimento delle proteine plasmatiche sulle superfici di titanio acidificate e sabbiate era sia qualitativamente che quantitativamente più elevato rispetto alle superfici lavorate a macchina e acidificate. Questo, in particolare, venne dimostrato per ciascuna proteina esaminata e per le proteine totali.

L'anno successivo, Lima e colleghi proposero un interessante studio sull'adsorbimento di proteine salivari e sieriche su superfici in titanio e zirconia [100]. I materiali vennero incubati in vitro con

---

saliva intera, siero o una miscela di saliva e siero. La composizione proteica dello strato adsorbito, in ciascuno degli esperimenti, venne poi studiata con tecniche biochimiche (SDS-PAGE, *immunodetection*). In generale, l'analisi elettroforetica non portò a rivelare particolari differenze qualitative della composizione delle proteine degli strati adsorbiti presenti sulle superfici oggetto di analisi. I componenti degli strati adsorbiti, in generale, risultavano includere: amilasi, IgA, IgG, albumina, fibronectina e fibrinogeno, in accordo con i risultati di studi precedenti.

Recentemente, analisi proteomiche quantitative che non sfruttano tecniche di immunofluorescenza si sono dimostrate capaci di fornire una visione più completa della composizione e della funzione degli strati proteici adsorbiti. Questo è stato fatto, ad esempio, da Dodo e collaboratori nel 2013 [101]. Nel loro studio è stato utilizzato un approccio proteomico senza marcatura molecolare a fluorescenza per studiare la composizione dello strato di proteine adsorbito dal titanio rugoso (sabbaiato ed acidato) dopo l'esposizione al plasma sanguigno umano. I dischi di titanio incubati con plasma sanguigno, sottoposti a cromatografia liquida accoppiata ad analisi spettrometrica di massa (LC/MS), risultarono caratterizzati dalla presenza, in superficie, di un totale di 129 diversi peptidi (riconducibili alla probabile presenza di 25 distinte proteine plasmatiche, tra le quali, le più abbondanti identificate erano: fibronectina, albumina sierica, apolipoproteine e fibrinogeno). Lo strato adsorbito sulla superficie ruvida di titanio inoltre, si dimostrò composto principalmente da proteine correlate all'adesione cellulare, al trasporto di molecole e ai processi di coagulazione, e si dimostrò capace di creare una sorta di interfaccia polare e idrofila per le successive interazioni con le cellule ospiti.

In tempi recenti, infine, è stato invece investigato l'adsorbimento di proteine del siero umano sulla superficie di impianti in titanio progettati per garantire l'osteointegrazione in vivo di impianti dentali [102]. Sono stati analizzati, allo scopo, strati proteici formati su dischi in titanio lisci e trattati (sabbaiati ed acidati) prima e dopo l'incubazione con siero umano per 3 h (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>). Utilizzando la spettrometria di massa (LC/MS/MS), vennero identificate 114 proteine sui dischi in titanio liscio e 108 proteine sulla superficie dei campioni sabbaiati ed acidati. Ciò suggerì che le differenze osservate tra le superfici derivassero dalla modalità diversa di alcune proteine di instaurare un legame con il substrato e non dalla quantità totale di proteine in sé. Interessante da notare fu anche il fatto che i ricercatori osservarono che le proteine adsorbite sul titanio liscio erano

in grado di intervenire in una gamma più ampia di percorsi di segnalazione biologica rispetto a quelle proteine che si trovavano sul titanio sabbiato ed acidato.

In Tabella 3.4 è riportato l'elenco schematico degli studi, citati nella presente sezione, relativi all'adsorbimento delle proteine del siero/plasma su superficie in titanio.

*Tabella 3.4 Riassunto schematico dell'analisi della letteratura scientifica nell'ambito dello studio sull'interazione tra siero fetale bovino o plasma e substrati in titanio*

<b>Tipo di superficie</b>	<b>Tipo di fluido</b>	<b>Tecnica di analisi</b>	<b>Sintesi dei risultati significativi</b>	<b>Riferimento</b>
Superfici di titanio (trattate con H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	Plasma di sangue umano	Tecniche di immunofissazione (ELISA)	Trattamento con perossido di idrogeno favorisce l'adsorbimento proteico superficiale	[96]
Superfici in titanio (macchinate, acidate, acidate e sabbiate)	Plasma di sangue umano	Spettrometria di massa di ioni secondari (SIMS), microscopia confocale (CLSM), tecniche di immunofissazione (ELISA)	Superfici rugose mostrano livelli di adsorbimento elevati	[99]
Superfici in titanio, zirconia e idrossiapatite	Saliva, siero, miscela di siero e saliva	Elettroforesi (SDS-PAGE), deteazione immunocistochimica	/	[100]
Dischi in titanio rugosi (sabbiati ed acidati)	Plasma di sangue umano	Saggio colorimetrico di Bradford, cromatografia liquida-spettrometria di massa (LC-MS),	Superfici rugose inducono adsorbimento di proteine correlate all'adesione cellulare	[101]
Superfici in titanio liscio e in titanio acidato e sabbiato	Siero umano	Cromatografia liquida-spettrometria di massa (LC-MS),	Superfici diverse inducono adsorbimento di proteine di tipo diverso e con funzioni differenti	[102]

Sebbene gli studi citati in questa sezione abbiano valutato il comportamento competitivo dell'adsorbimento di proteine da siero o plasma (di origine bovina o umana), la composizione dello strato proteico adsorbito sul titanio a contatto con tali fluidi non è stata, ad oggi, completamente descritta e chiarita. Tante sono infatti le variabili che possono andare ad influire sull'esito del processo di adsorbimento. Alcune linee guida generali, però, possono dare indicazione sul comportamento delle superficie in titanio nei confronti di soluzioni multicomponenti.

---

In sintesi, l'albumina, in qualità di proteina plasmatica più abbondante, dovrebbe assorbirsi alla più alta densità sui substrati in titanio. Tuttavia, in alcuni studi ([99], [103]; [101]), la fibronectina è stata la proteina più abbondante identificata nello strato proteico adsorbito. Il fenomeno biologico responsabile di questo comportamento rimane ad oggi poco chiaro. Probabilmente esiste una dipendenza dalle caratteristiche del substrato, dipendenza che però a sua volta può essere correlata con la capacità della superficie sia di adsorbire determinate proteine che di interfacciarsi (ed osteointegrarsi) con i tessuti circostanti. È stato dimostrato che alcune piccole proteine (come proprio l'albumina) possono essere sostituite da proteine con un peso molecolare maggiore (ad esempio, fibronectina e fibrinogeno), per effetto Vroman [104]. È importante infatti sottolineare che, come già più volte ribadito, non è da escludere una relazione tra quantitativo, tipologia e conformazione delle proteine adsorbite e caratteristiche della superficie stessa. La capacità di una superficie di osteointegrarsi, infatti, può essere messa in relazione con la presenza o assenza di determinate proteine adsorbite al substrato del bioimpianto considerato. Questo è un parametro da tenere ben presente ogni volta in cui si vanno a studiare i processi che si verificano all'interfaccia tra un biomateriale e i tessuti.

Altro aspetto fondamentale, nell'adsorbimento di proteine da soluzioni multicomponente, sembra essere l'interazione elettrostatica tra proteine e biomateriali. Le proteine più grandi di solito hanno più siti di legame, attraggono più cariche opposte e quindi aumentano l'affinità proteica con la superficie. Sebbene sia la superficie del titanio (pI 5.0 - 5.9) [97] che le principali proteine identificate, tra cui albumina e fibronectina, siano cariche negativamente a pH fisiologico, è possibile ipotizzare che si stabilisca un'interazione elettrostatica attraverso catene laterali a carica positiva o specifici domini [103]. Questo potrebbe avere risvolti interessanti sulla successiva risposta cellulare delle superficie alla conformazione delle proteine adsorbite. Ad esempio, la sequenza amminoacidica arginina-glicina-acido aspartico (dominio RGD) presente nella struttura della fibronectina è identificata come mediatore dell'adesione cellulare ed è stata correlata a più alti tassi di adesione di cellule di tipo osteoblastico, le quali rimangono adese al substrato con una migliore disposizione su una superficie in titanio. Inoltre, come già analizzato in precedenza, quando è associata alla presenza dell'albumina sierica, la fibronectina sembra presentare una conformazione più disponibile al legame con i recettori integrinici; ciò suggerisce che un certo grado di impaccamento molecolare può essere un fattore che contribuisce a migliorare l'adesione

---

cellulare [49]. Le proteine, poi, come è noto, possono avere diversi siti di adsorbimento, a seconda della loro conformazione e del loro peso molecolare. Tuttavia, lo strato proteico derivato da fluidi con un alto contenuto proteico (come il siero bovino od il plasma sanguigno) può perdere in volume comprimendo le proteine insieme. Questo strato di proteina compresso può creare una barriera che blocca alcune molecole dal raggiungere la superficie sottostante. Pertanto, la velocità con cui una nuova proteina o un'altra grande molecola viene adsorbita su una superficie può dipendere anche dalla struttura dello strato proteico plasmatico che si è già formato [105]. In questo senso, le indagini dei ricercatori devono mirare a valutare il ruolo delle proteine legate debolmente, che non hanno raggiunto la superficie e che potrebbero essere scalzate da essa, ad esempio, durante il risciacquo dei campioni o la manipolazione. Capire quale sia il ruolo di queste proteine e in che modo esse possono intervenire ad influenzare l'adesione delle cellule è argomento ancora da approfondire.

Ancora, una parentesi è da aprire riguardo all'effetto della bagnabilità sull'adsorbimento proteico. Sebbene la bagnabilità delle superfici solide lisce sia un concetto noto, il processo su superfici solide rugose è molto meno chiaro. Le superfici di titanio rugose presentano angoli di contatto con l'acqua apparentemente più bassi ed energia libera superficiale superiore [106] rispetto alle superfici lisce. Questo è plausibile, dal momento che una superficie ruvida ha una superficie più ampia e, di conseguenza, un'energia libera superficiale superiore a una superficie liscia [107]. Ciononostante, la relazione tra bagnabilità, rugosità ed energia di superficie dei substrati in titanio, non è ancora del tutto perfettamente inquadrata in una descrizione modellistica fisico-chimica generale, perché anche questo fenomeno, ad oggi, non è del tutto compreso (specialmente a livello dell'analisi alla micro e nano scala).

L'adsorbimento di proteine da soluzioni di siero o plasma è, in sintesi, il risultato della somma di varie forze intermolecolari e può essere difficilmente correlato in modo semplice, con l'impiego di principi fisici elementari, all'insieme di topografia, rugosità, polarità, bagnabilità superficiale ed energia libera superficiale del titanio.

### **3.3 Interazione tra proteine del siero e cellule**

Come già anticipato nelle sezioni precedenti, la maggior parte delle proteine del plasma e del siero si assorbe in modo e quantitativo simile sulle superfici in titanio, sia che esse siano lisce che rugose

---

(ad esempio, trattate o non trattate chimicamente o irrugosite con altre tipologie di tecniche manifatturiere). Nelle miscele proteiche, infatti, il comportamento di adsorbimento è spesso il risultato di una sovrapposizione di processi di trasporto, adsorbimento e repulsione. Le piccole proteine si diffondono più velocemente di quelle grandi e sono le specie dominanti nella fase iniziale di adsorbimento. Le proteine più grandi, tuttavia, tipicamente si legano più forte alla superficie a causa di un'area di contatto più ampia e possono persino respingere altre proteine pre-adsorbite durante la diffusione sulla superficie. La situazione, inoltre, risulta ancora più complicata del previsto considerando che le differenti proteine presenti nel siero esistono in una grande varietà di proprietà strutturali, dimensioni e forma. A causa di un definito *fold*ing che caratterizza la loro struttura secondaria e terziaria, poi, le proteine contengono una distribuzione specifica di catene laterali idrofobiche, idrofile, a carica positiva e con carica negativa che ha un impatto importante sulle loro caratteristiche di adsorbimento. Le cose diventano più complicate ulteriormente considerando che molte proprietà come lo stato di *fold*ing o il numero di cariche positive e negative all'interno delle proteine possono variare in diverse condizioni ambientali a seconda del pH, della forza ionica o della temperatura in cui vengono eseguiti gli esperimenti.

Le proteine in soluzione, poi, si comportano in modo molto diverso rispetto a quanto accade quando sono adsorbite. Le proteine in soluzione ruotano liberamente. Al contrario, su una superficie, ogni proteina assume un certo specifico orientamento che determina quale parte della molecola interagisce con la superficie e quale parte è invece esposta alla soluzione in massa. È ormai generalmente accettato che sia proprio questo cambiamento conformazionale che le proteine subiscono in seguito ad adsorbimento su una interfaccia solida a determinare in modo più o meno favorevole la risposta cellulare al substrato [95].

In particolare, sono molte le proteine presenti nel siero che una volta adsorbite in una determinata conformazione hanno il vantaggio di essere coinvolte in fenomeni di adesione, proliferazione o differenziazione cellulare. La maggior parte di queste proteine del siero, specificatamente, mostra attività biologiche collegate all'omeostasi ossea (in modo diretto o indiretto). Questa considerazione spinge a studiare l'effetto delle proteine adsorbite dal siero o dal plasma nei confronti non di tutti i tipi di cellule, ma nello specifico delle cellule ossee. Come già anticipato, infatti, il FBS è un supplemento utilizzato per diluire varie tipologie di mezzi di coltura cellulari; indagare l'effetto dell'adsorbimento delle proteine del FBS su qualsiasi tipologia cellulare è

---

ritenuto non appropriato ai fini del presente studio. Un gran numero di linee cellulari, infatti, sono state impiegate negli studi relativi all'interazione tra substrati in titanio e cellule, anche se, il grado in cui esse rappresentino le popolazioni cellulari rilevanti in vivo, è ad oggi poco conosciuto. In generale, però, è possibile affermare come un'ampia varietà di tipi di cellule, tra cui cellule epiteliali, fibroblasti, condrociti e cellule osteogeniche di diversa origine aderiscano bene alle superfici in titanio, per cui diventa possibile osservare, in coltura, popolazioni cellulari di densità paragonabili a quelle ottenibili sulle piastre plastiche di controllo.

Per quanto riguarda l'effetto delle proteine adsorbite da siero o plasma sulle cellule che sono fatte aderire sulle superficie in titanio, si rimanda ai capitoli precedenti e agli studi relativi alle conseguenze dell'adsorbimento di albumina e fibronectina sulle varie linee cellulari. Tutti gli studi citati nel Capitolo 1 e nel Capitolo 2 dove si è analizzata la risposta cellulare ad un determinato substrato, infatti, tipicamente implicano l'utilizzo di un mezzo di coltura arricchito con siero (10% FBS, miscelato ad altre tipologie di nutrienti). Il siero in questa percentuale, addizionato ad altre sostanze viene, di fatto, lasciato adsorbire sui substrati nel processo di incubazione delle superficie, allo scopo di favorire: in primo luogo, l'interazione cellula/superficie mediata da un substrato adsorbito possibilmente favorevole; in secondo luogo, la sopravvivenza cellulare.

A livello generale, è possibile però individuare un preciso aspetto che accomuna gli studi analizzati nei capitoli precedenti: il fatto che l'attenzione dei ricercatori sia rivolta, in particolare, verso lo studio dell'interazione tra osteoblasti e superficie in titanio. Poiché il titanio è generalmente impiegato come bioimpianto nel settore ortopedico e dentale, la giustificazione allo studio del comportamento degli osteoblasti è immediata e chiara. Quello che si può aggiungere, come precisazione, è che le cellule tipo osteoblastico sono ritenute in grado di discriminare differenze tra materiali come ad esempio, tra titanio commercialmente puro e titanio in lega, anche se le superfici di entrambi sono principalmente costituite da ossido di titanio. Diversi studi hanno altresì dimostrato come gli osteoblasti siano sensibili alla composizione delle superficie dei materiali e alla cristallinità dei materiali. Gli osteoblasti, poi, essendo cellule ancoraggio dipendenti sembrano subire anche l'influenza della carica superficiale nelle fasi di adesione, proliferazione, differenziazione e migrazione cellulare. Non solo, infatti l'espressione fenotipica degli osteoblasti in vitro sembra anche dipendere dalla carica del substrato con cui le cellule si trovano a contatto. Gli osteoblasti, su superficie caricate positivamente, aderiscono saldamente e si appiattiscono

---

---

(*spread*) bene, ricreando un contatto molto intimo tra la membrana cellulare (carica negativamente) e la superficie del biomateriale. Sulle superfici caricate negativamente, al contrario, le cellule osteoblastiche tendono a mostrare una morfologia compatta, non distesa, con siti di adesione deboli e presenti in modo isolato sul substrato ([108], [8]).

È molto probabile che il comportamento illustrato sia attribuibile ad un effetto indiretto delle cariche superficiali del biomateriale sia sul comportamento cellulare, sia sul comportamento delle specie proteiche presenti nel terreno di coltura e, in particolar modo, della conformazione delle proteine adsorbite attraverso interazioni deboli od elettrostatiche al substrato. Nel complesso, infatti, l'effetto delle proprietà chimiche e idrofobiche di un biomateriale come il titanio sull'adsorbimento di proteine può essere illustrato come in Figura 3.1.

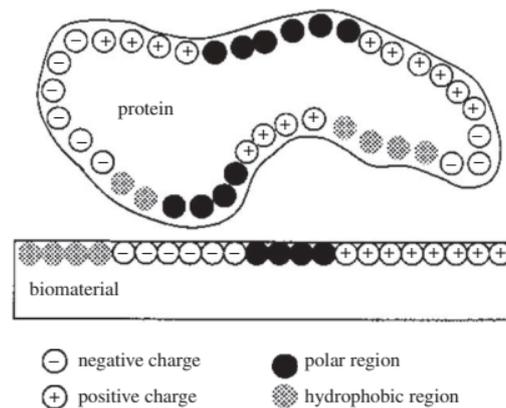


Figura 3.1 Schema che illustra l'importanza delle proprietà del substrato e delle proteine nel fenomeno dell'adsorbimento proteico [109]

Tutte le variazioni nei parametri del materiale che costituisce il substrato (ad esempio, potenziale  $\zeta$ , difetti di cristallina e solubilità, idrofilicità, bagnabilità, ...ecc.), in questo senso, possono contribuire a regolare le proprietà chimiche o l'idrofobicità del materiale stesso in modo da migliorare oppure magari inibire l'adsorbimento delle proteine. È proprio il tipo e la conformazione delle proteine adsorbite, che media il fenomeno di interazione tra osteoblasti e substrato, ed avvia la cascata di eventi che prevede attaccamento, adesione, diffusione, migrazione, proliferazione e differenziazione delle cellule, come mostrato schematicamente in Figura 3.2.

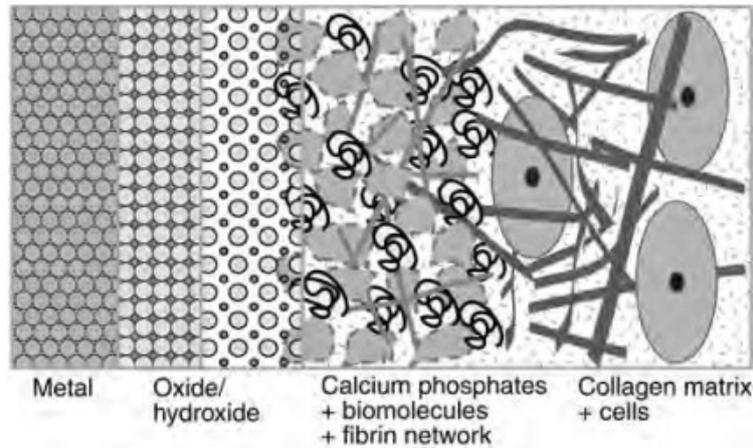


Figura 3.2 Interazioni che avvengono all'interfaccia tra bioimpianto e tessuti circostanti [8]

In particolare, proliferazione e differenziazione degli osteoblasti sono i processi più sensibili alla composizione chimica delle proteine adsorbite al substrato. Insieme alla topografia della superficie implantare, la chimica superficiale dell'interfaccia tra biomateriale e tessuti è quella che va a determinare il vero destino del materiale in vivo ([110], [111]).

Solo gli studi in vitro, però, per semplicità di esposizione, sono stati analizzati in questo lavoro di tesi. In particolare, dai risultati dei lavori di ricerca sull'interazione tra osteoblasti e soluzioni multicomponenti come il siero o plasma, è stato possibile dedurre la seguente proprietà generale: le cellule osteoblastiche in vitro si dimostrano dipendere principalmente dalla vitronectina adsorbita e/o dalla fibronectina per adesione iniziale e diffusione, sia su substrati come le piastre di coltura che sui materiali implantari come titanio ([112], [113], [48]). Pertanto, la capacità dei materiali di adsorbire tali proteine (in uno stato attivo) dal siero (che sia esso fetale oppure di diversa provenienza) sembra dunque determinante per la capacità stessa delle superfici dei bioimpianti di supportare l'adesione e l'attaccamento cellulare. L'adsorbimento proteico delle proteine del siero o del plasma, di fatto, diviene un aspetto importante nell'indagine della citocompatibilità delle superficie.

Per quanto riguarda l'aspetto della citocompatibilità e del potenziale antibatterico delle superficie in titanio, si è scelto di riportare in questa sezione un solo esempio di letteratura per ciascun argomento. Si ricorda, innanzitutto, come una qualsiasi superficie, a seconda delle caratteristiche fisico chimiche di cui è dotata, può essere in grado, mediante adsorbimento selettivo, di guidare la successiva risposta cellulare all'impianto. La risposta di cellule osteoblastiche è una possibilità; altra possibilità è quella che contempla l'interazione tra cellule batteriche e substrato.

---

**Esempio di studio dell'interazione tra proteine adsorbite dal siero e cellule.** Nello studio di Rivera e collaboratori del 2013, ad esempio, i ricercatori andarono ad investigare la risposta cellulare di particolari superficie in ossido di titanio nano porose, a contatto con soluzioni differenti, rispettivamente: la prima al 10% di FBS; la seconda e la terza, invece, a valori di fibronectina e vitronectina fisiologici [83]. A causa della maggiore area superficiale, i campioni di TiO<sub>2</sub> nano porosi in titanio anodizzato si dimostrarono in grado di assorbire più proteine rispetto ai materiali utilizzati come controllo (superficie in titanio commercialmente puro e in lega di titanio lisce), consentendo una migliore adesione cellulare e una migliore capacità proliferativa. Gli stessi autori osservarono infatti come i modelli nano porosi sembrassero consentire alle proteine della ECM di dispiegarsi in modo favorevole a consentire alle cellule circostanti l'accesso ai loro siti di legame cellulare. Nello stesso studio, per valutare gli effetti dell'adsorbimento proteico, venne poi analizzata la risposta dei substrati nei confronti di cellule osteoblastiche fetali umane hFOB 1,19. I dati preliminari di adesione cellulare mostrarono un effetto significativo delle proteine della ECM sull'adesione cellulare sulla superficie di ciascuno dei materiali testati. Sui substrati di controllo, però, l'FBS portò a riscontrare un diminuito numero di cellule adese ai substrati (rispetto al caso di adsorbimento di fibronectina o vitronectina singola), il che venne giustificato in considerazione dell'adsorbimento competitivo di quelle proteine che nel siero sono in quantità maggiori o con una maggiore affinità per il substrato. Sempre i substrati di controllo, inoltre, in presenza di proteine adsorbite da FBS oppure in assenza di proteine adsorbite non mostrarono alcuna differenza significativa nell'adesione cellulare. I modelli di TiO<sub>2</sub> nano porosi, al contrario, non presentarono differenze significative nella quantità di cellule adese sui substrati preadsorbiti con le diverse soluzioni testate. Si ipotizzò, di conseguenza, che i materiali nano strutturati consentissero un generale aumento in densità di proteine adsorbite e fossero in grado di indurre, per le proteine adsorbite, una conformazione favorevole all'adesione cellulare. Si pensò, conseguentemente, che il TiO<sub>2</sub> nano poroso avesse una maggiore affinità verso l'adesione di cellule osteoblastiche, a causa proprio della maggiore densità di siti di legame cellulare esposti dalle proteine adsorbite su di esso (rispetto a quelli mostrati dalle proteine adsorbite sui substrati di controllo). I risultati dell'adesione cellulare, significativamente migliorata sui modelli di TiO<sub>2</sub> nano porosi rispetto ai controlli, confermarono le congetture.

---

**Esempio di studio dell'interazione tra proteine adsorbite dal siero e batteri.** Nello studio risalente al 2008, invece, Lima e collaboratori, oltre ad investigare gli esiti dell'adsorbimento proteico di proteine salivari e sieriche su superfici in idrossiapatite, titanio e zirconia [100], andarono ad investigare la capacità di alcune cellule batteriche di aderire ai substrati adsorbiti. Innanzitutto, i dati di SDS-PAGE e immunoblotting rivelarono alcune differenze qualitative della composizione delle proteine delle pellicole di proteine adsorbite formate sulla superficie del titanio e della zirconia. In particolare, in accordo ai risultati derivanti da precedenti studi gli autori dimostrarono come l' $\alpha$ -amilasi, l'albumina e l'IgG fossero le principali proteine adsorbite sulle superfici in titanio. Per i saggi di adesione batterica, in particolare, selezionarono due ceppi differenti: *Streptococcus mutans* e *Actinomyces naeslundii*, microorganismi noti per la capacità di esplicare la loro azione soprattutto nella cavità orale. L'adesione delle cellule batteriche sulla superficie dei materiali, in base ai dati ottenuti, risultò variare a seconda del tipo di materiale testato, del ceppo batterico e della presenza (o assenza) dello strato proteico adsorbito. L'aderenza batterica su superfici dure nella cavità orale è infatti ritenuta essere mediata da legami non specifici (ad esempio attrazioni elettrostatiche e interazioni idrofobiche) e processi altamente specifici (ad esempio, l'interazione tramite recettori tipo adesine). Le superfici di titanio e zirconia, tuttavia, in questo studio dimostrarono un numero simile di cellule batteriche aderenti probabilmente a causa delle proprietà fisico-chimiche comparabili tra i due materiali. Vennero invece rilevate differenze notevoli di adesione batterica tra i materiali dentali e l'idrossiapatite. Tali differenze vennero correlate all'effetto di altri fattori fisici (non determinati nello studio dagli autori) come ad esempio, la rugosità superficiale e l'energia superficiale dei batteri stessi, che fu ritenuta fattore in grado di influenzare l'adesione batterica iniziale.

---

---

# Capitolo 4

In questo capitolo viene affrontato in modo semplice e schematico il processo che porta alla produzione dei campioni che sono oggetto di analisi di valutazione dell'adsorbimento proteico negli esperimenti legati al presente lavoro di tesi.

## 4 Materiali e metodi

Tutte le attività descritte nel seguito della trattazione sono condotte a temperatura ambiente, a meno che non sia diversamente specificato.

### 4.1 Metodo di preparazione dei campioni

I campioni che sono analizzati nel presente lavoro di tesi sono realizzati seguendo un procedimento che comprende diversi stadi progressivi. Tutte le fasi che caratterizzano i diversi stadi sono brevemente descritte nel seguito del presente capitolo.

#### 4.1.1 Taglio

La tecnica di taglio utilizzata per la produzione dei campioni è quella del taglio abrasivo ad umido. Lo scopo del taglio, in questo caso, è quello di sezionare dal materiale dato, irregolare e di grandi dimensioni, un campione che ne sia rappresentativo e maggiormente maneggiabile. L'operazione di taglio è una fase molto delicata della produzione dei campioni; si tratta di una fase fondamentale, che va ad influenzare tutte le fasi successive di manipolazione dei campioni e, conseguentemente, nel complesso va ad inficiare il buon esito di tutto il lavoro di ricerca. Importantissimo, in fase di taglio, è non creare alcuna deformazione della struttura del metallo e non introdurre elementi quali inomogeneità, graffiature o fratture che sarebbero da ostacolo ad ogni operazione di trattamento o di analisi successiva.

I campioni in lega di titanio per i test del presente lavoro di tesi sono prodotti a partire da barre cilindriche di Ti6Al4V (ASTM B348, grado 5, Titanium Consulting and Trading) del diametro di 10 mm. Le barre sono sezionate in direzione trasversale per ricavare dischi dello spessore di 2 mm,

---

grazie all'impiego di una lama tagliente abrasiva in allumina ( $Al_2O_3$ ) montata all'interno di una troncatrice automatica (Brillant 220, ATM GmbH, Mammelzen, Germania). Un'immagine della macchina per il taglio dei campioni è riportata nella Figura 4.1.



Figura 4.1 Brillant 220, macchina utilizzata per il taglio dei campioni [114]

Il singolo campione, così come appare a operazione di taglio ultimata (Figura 4.2), ha un aspetto superficiale rugoso, caratterizzato dalla presenza di difetti, rigature e bave.



Figura 4.2 Campione in Ti6Al4V ricavato a seguito delle operazioni di taglio

#### 4.1.2 Lucidatura

Al fine di ottenere un campione dalla superficie liscia e riflettente, le bave e le rigature generatesi in conseguenza del processo di taglio sono rimosse mediante lucidatura manuale, utilizzando una macchina per la lucidatura (LaboPol-2, Struers, Birmendorf, Svizzera). Il piatto rotante sul quale vengono posizionate le carte abrasive è ben visibile nella Figura 4.3, dove si evidenzia anche la presenza di un rubinetto integrato all'apparecchiatura. Da quel rubinetto fuoriesce acqua, fluido senza il quale il processo di lucidatura non può concretizzarsi con successo. L'acqua svolge infatti due ruoli fondamentali: è in grado di ridurre il grippaggio (*galling*) tra campione e piatto di

---

lucidatura; è in grado di minimizzare la produzione di calore conseguente all'insorgere dei fenomeni di attrito che avvengono al contatto tra superficie del campione e carta abrasiva [115].



*Figura 4.3 LaboPol-2, macchina utilizzata per la lucidatura dei campioni [116]*

Ciascun campione è lavorato a mano dall'operatore. Una prima, grossolana, rettificazione di entrambe le facce di ciascun campione è eseguita utilizzando una carta abrasiva impermeabile in carburo di silicio (SiC) con numero di grana 120. La Figura 4.4 riporta un'immagine di esempio per dare l'idea di come un campione appare dopo il primo passaggio di rettificazione.



*Figura 4.4 Campione in Ti6Al4V lucidato con carta abrasiva di numero di grana 120*

Successivamente, ciascun campione viene marcato su di un lato con un numero identificativo unico. Allo scopo, è impiegato un incisore elettrico manuale (Signograph 25, Brennenstuhl®, Tübingen, Germania).

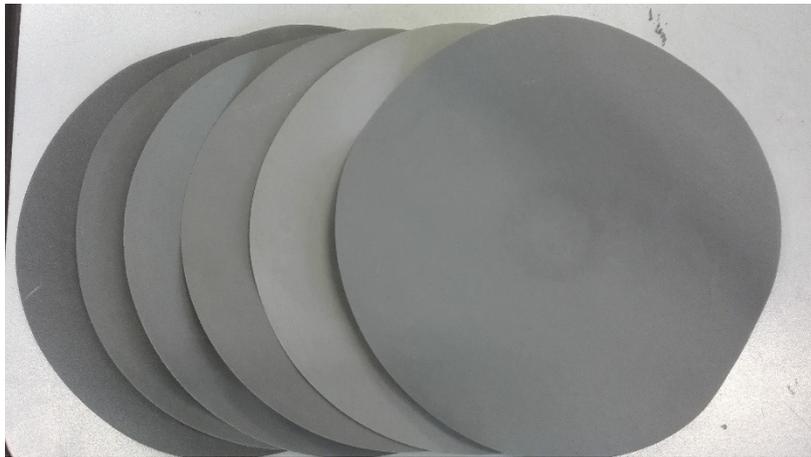
Al termine delle fasi preliminari di preparazione e marcatura dei campioni, ciascun disco viene sottoposto a lucidatura solamente da un lato. In prima battuta, la superficie da trattare viene tenuta a contatto con la carta abrasiva cercando di mantenere un angolo costante con la direzione di rotazione del piatto. In questo modo si producono sulla superficie, come risultato della

---

lavorazione, creste e solchi paralleli tra loro. In seconda battuta, poi, ruotando il campione su sé stesso di un angolo approssimativamente pari a novanta gradi, viene eseguita una ulteriore lucidatura, sempre sulla stessa carta, ma questa volta in direzione perpendicolare rispetto al verso descritto in precedenza. La lucidatura aggiuntiva, in direzione perpendicolare, si considera completa quando le rigature e le creste derivate dalla lucidatura precedente non sono più visibili, o comunque non percettibili ad occhio nudo.

Questa strategia, sebbene non automatizzata né standardizzata nel metodo, è da considerarsi ugualmente un valido strumento in grado di fornire una indicazione visuale sull'esito più o meno favorevole del processo.

I due stadi di lucidatura appena descritti vengono ripetuti, in sequenza, sulla faccia del campione non numerata, adoperando carte abrasive dalla grana progressivamente più fine ed impiegando, in ciascuna fase, una velocità di rotazione del piatto rotante di 200 giri/min. Si parte dall'utilizzo della carta abrasiva 320, dalla grana più grezza, e, passando per i numeri di grana 600, 800, 1000 e 2500 si arriva infine a lucidare il campione sulla carta 4000. In Figura 4.5 si riporta l'immagine che mette in rassegna tutte la serie di carte abrasive utilizzate per portare a termine il processo di lucidatura.



*Figura 4.5 Carte abrasive. Da sinistra a destra, nell'ordine, carta abrasiva di numero di grana 120, 320, 600, 800, 1000, 2500, 4000.*

L'obiettivo finale, che motiva tutti questi passaggi intermedi, che prevedono di aumentare progressivamente il numero di grana della carta abrasiva impiegata, è quello di ottenere un campione dalla superficie il più possibile lucida e priva di rigature od imperfezioni. In Figura 4.6 è

in mostra l'immagine di un campione così come si presenta a seguito della lucidatura con la carta abrasiva 4000, caratterizzata dalla grana più fine.



Figura 4.6 Campione in Ti6Al4V lucidato con carta abrasiva di numero di grana 4000.

Nella Tabella 4.1 si riportano i numeri di carta abrasiva impiegati per la lucidatura e, per ciascuno, è indicato il diametro medio delle particelle che costituiscono la grana [117].

Tabella 4.1 Carte abrasive utilizzate per la lucidatura dei campioni [117]

		Numero di grana (assegnazione ISO/FEPA)	Diametro medio dei grani ( $\mu\text{m}$ )
<b>Macro-grana</b>	Fine	120	125
	Molto fine	320	46,2
	Extra fine	600	25,8
<b>Micro-grana</b>	Super fine	800	21,8
		1000	18,3
	Ultra fine	2500	8,4
		4000	2,5

La pressione applicata al campione è ridotta gradualmente man mano che si procede a lucidare con carte abrasive più fini. Al passaggio da una carta di lucidatura alla successiva è opportuno sciacquare abbondantemente con acqua il campione, per rimuovere eventuali residui della lavorazione e, al contempo, accertarsi, ad un primo esame visivo, della qualità delle caratteristiche superficiali del campione.

Una volta terminata la lucidatura dei campioni con la carta abrasiva 4000, dopo un attento risciacquo dei campioni ed una verifica delle proprietà ottiche della superficie, è possibile proseguire secondo due diverse modalità. La prima consiste in una pulizia approfondita dei campioni, lucidati con le varie carte abrasive, sfruttando il lavaggio ad ultrasuoni. La seconda,

---

invece, prevede, prima del lavaggio ad ultrasuoni, un'ulteriore passaggio di lucidatura dei campioni, per ottenere quella che viene definita una superficie lucidata a specchio, una superficie riflettente, levigata al punto che la luce riflessa mantenga il suo parallelismo e, quindi, dal riflesso che la stessa superficie genera possa emergere un'immagine definita. Il lavaggio ad ultrasuoni viene effettuato allo scopo di avere un substrato appropriato sul quale, in un momento successivo, divenga possibile effettuare i trattamenti chimici di modifica superficiale. La lucidatura a specchio, al contrario, viene eseguita in modo tale da ottenere un sottoinsieme di campioni adatto a costituire il gruppo di controllo per il protocollo di sperimentazione scientifica oggetto di studio.

### **4.1.3 Lucidatura a specchio**

Il passaggio di lucidatura a specchio per la produzione di un sottoinsieme di campioni di controllo viene effettuato sfruttando la stessa apparecchiatura impiegata per la lucidatura tradizionale con carte abrasive in carburo di silicio (LaboPol-2, Struers, Birmendorf, Svizzera). Nel caso della lucidatura a specchio, però, sul piatto di lucidatura non viene fissato un foglio abrasivo, ma un panno morbido sul quale viene dispersa, aiutandosi con una pipetta plastica, una piccola quantità di sospensione di silice colloidale. Spesso, in letteratura, si fa riferimento a tale sospensione tramite il termine inglese "*slurry*". La silice colloidale è una sospensione di fini particelle di silice (biossido di silicio) amorfe, non porose e tipicamente sferiche, in fase liquida. Viene utilizzata, in metallurgia, per affinare la lucidatura del substrato del campione, per eliminare eventuali difettosità residue presenti e rendere la superficie del campione piana e riflettente. Descritta come grani ultra-fini di sabbia dispersa in un liquido, la silice colloidale è il mezzo più comunemente utilizzato per lucidatura a specchio di campioni metallici.

La miscela di silice colloidale utilizzata nel presente lavoro di tesi è del tipo standard per lucidatura (Struers OP-U, Birmendorf, Svizzera). Si tratta di polveri, dalla granulometria di 0,04  $\mu\text{m}$ , diluite in acqua bi-distillata nelle seguenti proporzioni: 25 ml sospensione di silice – 10 ml acqua bi-distillata. La sospensione di silice colloidale così realizzata può, in seguito, essere sonicata per 5 min. Dopodiché, risulta pronta all'uso. La sospensione così prodotta risulta all'apparenza un fluido dal colore lattiginoso.

La lucidatura a specchio è in grado di agire meccanicamente sulla superficie lavorata, consentendo una lucidatura pressoché priva di tracce. Gli inconvenienti che si possono verificare nel processo di

---

preparazione dei campioni lucidati a specchio, seppur rari, possono però presentarsi sotto forma di, ad esempio: comparsa di modificazioni superficiali ed inclusioni (quando i grani dell'abrasivo penetrano nel campione, ma non lo scalfiscono, e al contrario si incastrano su di esso; cosa che accade spesso qualora l'abrasivo utilizzato abbia un grado di durezza troppo elevato rispetto al campione) e comparsa di rigature sulla superficie del campione. Tenendo conto di queste possibili limitazioni, che risultano certamente impossibili da riconoscere ad occhio nudo, si cerca di operare per generare superfici lucidate a specchio di qualità adatta alla ricerca, per cui l'insieme di campioni destinati al gruppo di controllo viene lucidato con la sospensione di silice colloidale per tempi relativamente lunghi (dai 5 ai 10 min), avendo l'accortezza di controllare che la sospensione stessa non si aggrega o forma dei piccoli grani in grado di rigare (e dunque potenzialmente rovinare) i campioni. Si persiste nel processo di lucidatura fino a quando la superficie di ciascun campione non risulta perfettamente riflettente, come mostrato in Figura 4.7.



*Figura 4.7 Campioni in Ti6Al4V lucidati a specchio con sospensione di silice colloidale*

A lucidatura a specchio ultimata, si procede sottoponendo anche i campioni del gruppo di controllo a lavaggio ad ultrasuoni, come descritto nella sezione successiva, al fine di eliminare o ridurre le possibili contaminazioni ed impurezze superficiali.

#### **4.1.4 Lavaggio**

Il passaggio di pulizia dei campioni, tramite lavaggio ad ultrasuoni, viene condotto servendosi di una macchina per la sonicazione (Sonica® Ultrasonic Cleaner 2200 S3, Soltec, Milano, Italia), la cui immagine è riportata in Figura 4.8.



*Figura 4.8 Sonica Ultrasonic Cleaner 2200 S3, apparecchiatura utilizzata per il lavaggio ad ultrasuoni dei campioni [118]*

La pulizia ad ultrasuoni si attua in tre passaggi: il primo, per cinque minuti, in acetone ( $C_3H_6O$ ); il secondo, per dieci minuti, in acqua ultra pura (Milli-Q); il terzo, nuovamente per dieci minuti, sempre in acqua ultra pura (Milli-Q). Questi passaggi sono riportati, schematicamente, nella Tabella 4.2 dove, per ciascuna fase, è indicato il tipo di solvente e la durata del trattamento.

*Tabella 4.2 Fasi del lavaggio ad ultrasuoni dei campioni*

	<b>Solvente</b>	<b>Durata del trattamento (min)</b>
<b>Fase 1</b>	Acetone	5
<b>Fase 2</b>	Acqua ultra pura (Milli-Q)	10
<b>Fase 3</b>	Acqua ultra pura (Milli-Q)	10

In tutte e tre i passaggi di lavaggio, i campioni vengono riposti in un becher che viene riempito, di volta in volta, con l'opportuno solvente, come proposto nel protocollo riportato nella Tabella 4.2. Per ciascun trattamento, i campioni vengono riposti nel becher di lavaggio in modo tale che il lato marcato, non interessato dai successivi trattamenti, sia a diretto contatto con il fondo. Procedendo così, l'effetto di pulizia scaturito dalla sonicazione risulta efficace sulla superficie libera del campione (quella non a contatto diretto con la parte inferiore del contenitore, ma a contatto con il solvente).

Il becher contenente i campioni, opportunamente riempito di solvente per il trattamento di lavaggio, viene dunque coperto con un foglio di alluminio per evitare possibili contaminazioni. Successivamente, l'insieme viene inserito nel bagno di sonicazione. Viene impostato ed avviato il

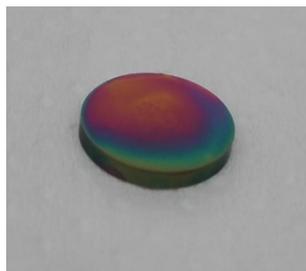
---

primo programma di lavaggio e, al termine, i campioni vengono trasferiti nel becher destinato al secondo programma di lavaggio. Si procede con la medesima procedura anche per il terzo programma di lavaggio. Una volta terminate le tre fasi di pulizia mediante sonicazione secondo il protocollo previsto in Tabella 4.2, i campioni possono essere riposti sotto cappa a flusso laminare, su fogli di carta assorbente, affinché si possano adeguatamente asciugare senza contaminazioni.

#### **4.1.5 Trattamento chimico superficiale**

Nel presente lavoro di tesi è stato utilizzato, per il trattamento dei campioni, un protocollo coperto da brevetto (EP2214732, 2008 [119]). L'intera procedura è descritta dagli inventori come processo per la produzione di superfici in titanio multifunzionali per l'integrazione ossea. Si tratta di un innovativo processo di modifica superficiale del titanio che ha come scopo quello di migliorare le prestazioni in vivo del metallo, amplificandone le proprietà di bioattività delle superficie. È un trattamento chimico che, comprende: innanzitutto, un primo attacco acido in acido fluoridrico (HF) diluito, seguito da una ossidazione controllata in perossido di idrogeno ( $H_2O_2$ ) ed un trattamento termico finale in modo da stabilizzare lo strato di ossido creato. Lo strato di ossido che si sviluppa in tali condizioni si è dimostrato dotato di un alto numero di gruppi ossidrilici e una morfologia superficiale nanostrutturata [120].

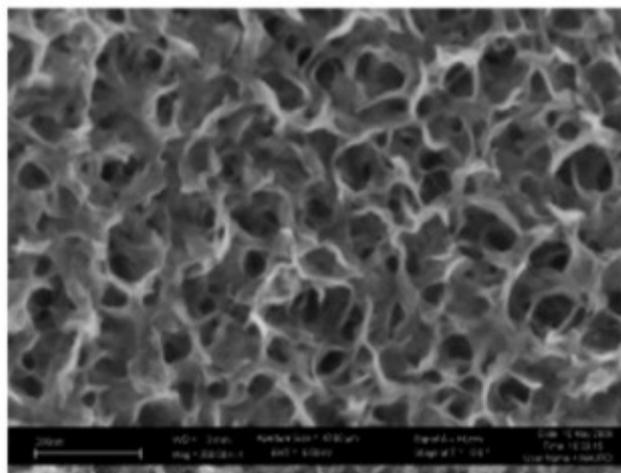
I risultati attesi, a seguito di tale modifica superficiale, sono: l'ottenimento di una superficie micro e nano-strutturata; l'ottenimento di una modifica della chimica superficiale al fine di rendere il materiale attivo nei confronti dell'ambiente biologico. Per ottenere una superficie multifunzionale dotata di tutte queste caratteristiche, è chiaro come diventi necessario un controllo rigoroso di tutti i parametri nelle varie fasi di trattamento, al fine di ottenere una superficie che sia al contempo priva di fessurazioni o cricche superficiali ma anche dotata di una adeguata e salda adesione al substrato di titanio metallico sottostante. Un'immagine di come si presenta un campione a trattamento chimico ultimato è riportata in Figura 4.9. La lega di titanio così modificata in superficie, nel seguito denominata tramite l'abbreviazione Ti6Al4V – CT, possiede diverse caratteristiche innovative. È capace di promuovere la precipitazione di idrossiapatite in vitro ed è adatta per subire un'ulteriore funzionalizzazione biologica tramite innesto (*grafting*) di biomolecole. Nel complesso, pertanto, il processo protetto da brevetto pare molto promettente al fine di promuovere la guarigione ossea, stimolando la crescita sia della componente inorganica che organica del tessuto stesso.



*Figura 4.9 Campione in Ti6Al4V sottoposto al trattamento chimico*

Una caratterizzazione più approfondita della superficie Ti6Al4V - CT prodotta mediante trattamento chimico brevettato è esposta brevemente nel seguito.

I substrati in Ti6Al4V - CT, come già valutato in studi precedenti [121], presentano uno strato di ossido di titanio interfacciale che mostra proprietà diverse da quelle dell'ossido nativo. In termini di caratteristiche chimiche e topografiche, infatti, le superfici in Ti6Al4V - CT presentano uno strato di ossido con spessore elevato (circa compreso tra i 200 e i 350 nm) e una nano topografia superficiale peculiare [120], come mostrato nell'immagine FE-SEM in Figura 4.10.



*Figura 4.10 Immagine FE-SEM della nano rugosità che caratterizza la superficie dei campioni Ti6Al4V - CT [122]*

Questa particolare rugosità su scala nanometrica ( $R_a$  di circa 10 nm) è caratterizzata da una morfologia nano porosa [120], ed è dovuta a come lo strato di ossido superficiale della lega si accresce durante il trattamento di ossidazione in  $H_2O_2$ . Una superficie con rugosità tale, se utilizzata in vivo, si ritiene abbia due importanti aspetti principali da considerare: il primo è la capacità di influenzare la risposta osteoblastica; il secondo la capacità di inibire l'adesione batterica. Le superfici di Ti6Al4V - CT, poi, come già anticipato, presentano un ulteriore vantaggio: sono caratterizzate, infatti, un'alta densità di gruppi OH come dimostrato anche dalle analisi XPS

---

---

di studi precedenti [119] e, di conseguenza, esibiscono elevata capacità, ad esempio, di indurre precipitazione di apatite da SBF (*Simulated Body Fluid*) cioè sono in grado di mostrare quella che potrebbe essere definita bioattività inorganica. La presenza dei siti di gruppi funzionali (gruppi OH) sul Ti6Al4V – CT, in aggiunta, oltre ad avere un ruolo bioattivo verso composti organici si ritiene abbia anche un ruolo nell'influenzare l'idrofilicità del substrato e, di conseguenza, nell'influenzare il comportamento di biomolecole che si interfacciano con il substrato in ambienti acquosi. Quest'ultimo aspetto risulta molto importante da considerare, soprattutto quando si parla di adsorbimento di proteine su substrati metallici.

Per questo motivo, nel presente lavoro di tesi viene studiato il comportamento della superficie Ti6Al4V – CT nei confronti dell'adsorbimento proteico. La superficie Ti6Al4V – CT, come spiegato più in dettaglio nel seguito, viene testata a contatto con una soluzione di albumina, una soluzione di fibronectina, una soluzione di siero bovino ed un campione di sangue umano. L'intenzione è infatti quella di andare a misurare gli effetti dell'adsorbimento proteico e i cambiamenti che tale fenomeno induce sulla carica superficiale della superficie ingegnerizzata; tali risultati vengono in seguito confrontati con quelli ottenuti, per i medesimi esperimenti, sui campioni di controllo. L'obiettivo più ampio dello studio sarebbe infatti quello di andare a delucidare come le proteine vengono adsorbite dalle superficie oggetto di indagine. La quantità di proteina adsorbita e la carica superficiale che essa espone, diretta conseguenza di come la proteina si dispone una volta adsorbita sulla superficie, potrebbero fornire utili dati da confrontare (con la dovuta prudenza) con ciò che si riscontra in vivo sulla superficie dei bioimpianti per applicazioni a contatto con l'osso. Non solo, infatti la possibilità di andare a valutare come la configurazione delle proteine è influenzata dalle caratteristiche della superficie su cui esse vengono adsorbite potrebbe costituire un importante passo verso una più completa comprensione dell'interazione tra cellule e biomateriali. Il ruolo delle proteine adsorbite nel mediare ed influenzare la risposta cellulare è risaputo da tempo e trattato in modo estensivo in tutta una serie di volumi dedicati allo studio dei materiali ad uso biomedico. Ciò che si è tentato, con questo lavoro di tesi, è dare un contributo di indagine proprio su questi aspetti. Le tecniche di indagine utilizzate per quantificare e misurare il complesso fenomeno dell'adsorbimento proteico sulle superficie Ti6Al4V – CT ed i rispettivi controlli sono presentate nella sezione "Caratterizzazione superficiale" del presente capitolo.

---

## **4.2 Test di valutazione dell'adsorbimento proteico**

Prima di entrare nel merito delle analisi biochimiche per la valutazione dell'adsorbimento proteico è necessario andare a chiarire come vengono realizzate le soluzioni per i test. È inoltre necessario andare a specificare nel dettaglio i passaggi dei protocolli che si impiegano per compiere gli esperimenti. Nel seguito della sezione vengono illustrati, in prima battuta, i protocolli di preparazione delle soluzioni di proteine che vengono poste in contatto con i campioni. In seconda battuta vengono spiegati, in breve e senza entrare nello specifico dettaglio, i protocolli impiegati per eseguire le analisi biochimiche sui campioni ad adsorbimento proteico avvenuto.

### **4.2.1 Protocolli di preparazione delle soluzioni per l'adsorbimento proteico**

I fluidi contenenti proteine usati per i test descritti nel presente lavoro di tesi sono tre: (i) albumina di siero bovino in soluzione tampone fosfato; (ii) fibronectina bovina in soluzione tampone fosfato; (iii) siero fetale bovino (FBS).

Sono scelte, tra tutte le varie possibilità, le proteine albumina e fibronectina poiché la prima è una delle proteine più abbondanti presenti nel plasma sanguigno dei mammiferi, mentre la seconda è una proteina chiave della matrice extracellulare, responsabile dell'adesione cellulare e della cicatrizzazione delle ferite. Il siero fetale, invece, derivando dal plasma sanguigno, è impiegato nei test per andare ad effettuare una prima previsione di quello che potrebbe essere il comportamento delle superficie oggetto di indagine a contatto con un fluido biologico complesso e multi componente come è il sangue. Il siero, come già anticipato ed ampiamente ribadito in precedenza nel Capitolo 3, non è altro che la frazione di plasma sanguigno che risulta dalla coagulazione del sangue; come il sangue, per composizione, il siero si rivela un vero e proprio pot-pourri di biomolecole, ciascuna con ruolo e funzione fisiologica differente e specifica.

Nelle sezioni presentate di seguito vengono illustrati i protocolli che sono stati seguiti, nel corso delle sperimentazioni effettuate, per realizzare le soluzioni da porre in contatto con i campioni prodotti ai fini di indagare il comportamento e la risposta della lega di titanio (liscia e trattata chimicamente) nei confronti di quel fenomeno (complesso e dalle molteplici sfaccettature) che rientra sotto la definizione generale di adsorbimento proteico in vitro.

---

#### 4.2.1.1 Albumina di siero bovino (BSA) in soluzione tampone fosfato (PBS)

La preparazione della soluzione PBS + BSA avviene in due passaggi: inizialmente si prepara una soluzione tampone fosfato (PBS), dopodiché alla soluzione tampone viene aggiunta una precisa quantità di albumina di siero bovino (BSA) al fine di ottenere la soluzione PBS + BSA di concentrazione desiderata.

Si impiegano, per la preparazione della soluzione PBS, delle compresse preconfezionate (*Phosphate Buffered Saline*, Sigma Aldrich, Saint Louis, USA). Una compressa di tale prodotto viene disciolta in 200 ml di acqua deionizzata, tramite agitazione meccanica per 10-20 min con l'ausilio di un *stirrer* magnetico. Si produce così una soluzione 0,01 M di soluzione tampone fosfato, 0,0027 M di cloruro di potassio e 0,137 M di cloruro di sodio, che presenta pH di circa 7,4 a 25 °C, e può essere conservata facilmente in frigorifero per circa un mese senza pericolo che se ne alteri il contenuto.

Una volta preparata la soluzione tampone fosfato, e controllato il pH per accertarsi della qualità della soluzione stessa, è possibile andare ad aggiungere la BSA. La BSA impiegata per gli esperimenti oggetto di studio è sotto forma di polvere liofilizzata, cristallizzata (*Bovine Serum Albumin*, Sigma Aldrich, Saint Louis, USA). Si tratta di un prodotto estremamente volatile e che deve essere accuratamente conservato in frigorifero (ad una temperatura compresa tra i 2 e gli 8 °C), onde evitare che le sue proprietà si degradino.

La BSA bovino in polvere da sciogliere nella soluzione tampone fosfato deve essere attentamente dosata. Si prende come riferimento il valore di concentrazione di albumina in soluzione tampone fosfato di 20 mg/ml; questo valore è scelto di proposito con l'obiettivo di andare a simulare una soluzione la cui concentrazione di proteina sia paragonabile alla concentrazione presente nel FBS [9], ma non contenga nessun altro tipo di biomolecola al di fuori di quella di interesse per i test. Questo per rendere i risultati dell'esperimento con l'albumina meglio confrontabili con quelli ottenuti per la soluzione singola di fibronectina, proteine entrambe oggetto di indagine nel presente studio. Le differenze tra la HSA e la BSA sono note, ma si è scelto di utilizzare la BSA per ricreare una soluzione di concentrazione paragonabile al plasma umano consapevolmente, in quanto l'interesse dello studio è quello di andare a valutare l'effetto complessivo della proteina quando adsorbita sui campioni di titanio in lega nelle loro varie forme.

---

Tenendo presente che è necessario impiegare almeno 1 ml di soluzione per riempire un singolo pozzetto della piastra di coltura multi-pozzetto in cui si eseguono i test di adsorbimento proteico, si calcolano conseguentemente le rispettive proporzioni in base a quanti esperimenti è necessario svolgere. Una volta pesata la giusta quantità di BSA è possibile andare a sciogliere i cristalli di proteina in PBS. L'operazione viene svolta tramite agitazione meccanica con l'aiuto di uno *stirrer* magnetico impostato su bassa velocità, per un tempo complessivo variabile tra circa 15 e 20 min. In questo contesto, agitare a bassa velocità risulta fondamentale per evitare che si formi una gran quantità di bolle d'aria nel contenitore della soluzione.

A conclusione del processo di agitazione, la soluzione è pronta per essere utilizzata negli esperimenti in vitro. Si inserisce, per mezzo di una micropipetta, 1 ml di soluzione per pozzetto (di fatto, si impiega 1 ml di soluzione a campione). Ripartita la soluzione PBS + BSA in ciascuno dei pozzetti della piastra multi-pozzetto nella quale sono stati inseriti i campioni, si sigilla il tutto con para film. La piastra multi-pozzetto viene dunque sigillata esternamente con un foglio di alluminio e, infine, l'insieme dei campioni immersi in soluzione PBS + BSA viene inserito in incubatore a 37 °C per 2 h. Si attende per questo tempo per assicurarsi che il processo di adsorbimento proteico possa avere luogo.

Al termine della fase di incubazione la piastra multi-pozzetto viene estratta dall'incubatore e dissigillata. Ciascun campione viene risciacquato in acqua Milli-Q e posto ad asciugare su carta assorbente. L'insieme di queste operazioni viene svolto sotto cappa a flusso laminare (dotata di filtri HEPA). Una volta asciutti, i campioni vengono riposti accuratamente in piastra multi-pozzetto sterile, uno per ogni pozzetto. Si utilizza gel di silice granulare per trattenere l'umidità residua che potrebbe essere dannosa per i campioni aventi proteine in superficie; allo scopo vengono messi uno o due granelli per ciascun pozzetto. A questo punto, i campioni sono pronti per essere conservati oppure per essere sottoposti ad analisi, come nel caso del presente lavoro di tesi dove vengono eseguite analisi XPS (*survey* e alta risoluzione delle regioni di C, O e N) e di carica superficiale in funzione del pH (misure elettrocinetiche di potenziale  $\zeta$ ).

#### **4.2.1.2 *Fibronectina bovina (BFN) in soluzione tampone fosfato (PBS)***

La preparazione della soluzione PBS + BFN avviene in due passaggi: inizialmente si prepara una soluzione tampone fosfato (PBS), dopodiché alla soluzione tampone viene aggiunta una precisa

---

quantità di fibronectina (BFN) al fine di ottenere la soluzione PBS + BFN di concentrazione desiderata.

Si impiegano, per la preparazione della soluzione PBS, delle compresse preconfezionate (*Phosphate Buffered Saline*, Sigma Aldrich, Saint Louis, USA). Una compressa di tale prodotto viene disciolta in 200 ml di acqua deionizzata, tramite agitazione meccanica per 10-20 min con l'ausilio di uno *stirrer* magnetico. Si produce così una soluzione 0,01 M di soluzione tampone fosfato, 0,0027 M di cloruro di potassio e 0,137 M di cloruro di sodio, che presenta pH di circa 7,4 a 25 °C, e può essere conservata facilmente in frigorifero per circa un mese senza pericolo che se ne alteri il contenuto.

Una volta preparata la soluzione tampone fosfato, e controllato il pH per accertarsi della qualità della soluzione stessa, è possibile andare ad aggiungere la fibronectina di origine bovina (BFN). La fibronectina bovina impiegata per gli esperimenti oggetto di studio è ricavata da plasma bovino e si presenta sotto forma di polvere (*Fibronectin Bovine Plasma*, Sigma Aldrich, Saint Louis, USA). Il prodotto, così come consigliato dal produttore, va conservato in congelatore. Come fornito, il prodotto deve essere conservato a -20 °C e rimane attivo per almeno 2 anni. Dopo lo scongelamento iniziale, può essere impiegato in aliquote monouso; una volta scongelato, il prodotto non è raccomandabile sottoporlo ad ulteriori cicli di congelamento/scongelamento, pertanto deve essere utilizzato e maneggiato con la massima attenzione.

La fibronectina in polvere da sciogliere nella soluzione tampone fosfato deve essere attentamente dosata. Si prende come riferimento il valore di concentrazione di fibronectina in soluzione tampone fosfato di 0,2 mg/ml; questo valore è scelto di proposito con l'obiettivo di andare a simulare una soluzione la cui concentrazione di proteina sia paragonabile alla concentrazione presente nel plasma umano [49], ma non contenga nessun altro tipo di biomolecola al di fuori di quella di interesse per i test. Questo per rendere i risultati dell'esperimento con la fibronectina meglio confrontabili con quelli ottenuti per la soluzione singola di albumina, proteine entrambi oggetto di indagine nel presente studio. Le differenze tra la fibronectina umana e quella bovina sono note, ma si è scelto di utilizzare la fibronectina bovina per ricreare una soluzione di concentrazione paragonabile al plasma umano consapevolmente, in quanto l'interesse dello studio è quello di andare a valutare l'effetto (sia singolo che competitivo) della proteina quando adsorbita sui campioni di titanio in lega nelle loro varie forme e confrontare i risultati con quelli che si

---

ottengono per altre tipologie di proteine usate singolarmente oppure miscelate sotto forma di siero o plasma.

Avendo a disposizione 1 mg di fibronectina bovina in polvere, si è diluita la proteina in 5 ml di PBS al fine di ottenere la concentrazione adatta per compiere gli esperimenti. Allo scopo, viene utilizzata una micropipetta per trasferire la proteina nella soluzione. L'operazione di diluizione si svolge tramite agitazione meccanica con l'aiuto di uno *stirrer* magnetico su piastra impostata su bassa velocità, per un tempo complessivo variabile tra circa 15 e 20 min. In questo contesto, agitare a bassa velocità risulta fondamentale per evitare che si formi una gran quantità di bolle d'aria nel contenitore della soluzione.

A conclusione del processo di agitazione, la soluzione è pronta per essere utilizzata negli esperimenti in vitro. Si inserisce, per mezzo di una micropipetta, 1 ml di soluzione per pozzetto (di fatto, si impiega 1 ml di soluzione a campione). Ripartita la soluzione PBS + BFN in ciascuno dei pozzetti della piastra multi-pozzetto nella quale sono stati inseriti i campioni, si sigilla il tutto con para film. La piastra multi-pozzetto viene dunque sigillata esternamente con un foglio di alluminio e, infine, l'insieme dei campioni immersi in soluzione PBS + BFN viene inserito in incubatore per 2 h. Si attende per questo tempo per assicurarsi che il processo di adsorbimento proteico possa avere luogo.

Al termine della fase di incubazione la piastra multi-pozzetto viene estratta dall'incubatore e dissigillata. Ciascun campione viene risciacquato in acqua Milli-Q e posto ad asciugare su carta assorbente. L'insieme di queste operazioni viene svolto sotto cappa a flusso laminare dotata di filtri HEPA. Una volta asciutti, i campioni vengono riposti accuratamente in piastra multi-pozzetto sterile, uno per ogni pozzetto. Si utilizza gel di silice granulare per trattenere l'umidità residua che potrebbe essere dannosa per i campioni metallici; allo scopo vengono messi uno o due granelli per ciascun pozzetto. A questo punto, i campioni sono pronti per essere conservati oppure per essere sottoposti ad analisi, come nel caso del presente lavoro di tesi dove vengono eseguite analisi XPS (*survey* e alta risoluzione delle regioni di C, O e N) e di carica superficiale in funzione del pH (misure elettrocinetiche di potenziale  $\zeta$ ).

---

#### 4.2.1.3 Siero fetale bovino (FBS)

Non sono necessari particolari accorgimenti per la preparazione del siero fetale bovino (FBS), dal momento che il prodotto si acquista in lotti direttamente dal produttore (o rivenditore) e viene utilizzato senza subire manipolazioni aggiuntive. Il siero fetale bovino utilizzato per i test di adsorbimento proteico del presente studio è conservato congelato e protetto dalla luce in congelatore, in appositi contenitori sterili. Per una spiegazione più dettagliata delle peculiarità e delle principali proprietà fisico-chimiche del siero fetale bovino e le peculiarità si rimanda al Capitolo 3.

Per mantenere stabilità e prestazioni ottimali, il siero è conservato tra -10 e -40 °C e deve essere utilizzato prima della data di scadenza indicata; inoltre non deve essere sottoposto, se possibile, a cicli multipli di congelamento/scongelo poiché bruschi cambiamenti di temperatura possono degradarne od alterarne le proprietà.

Una volta scongelato, il siero fetale bovino è utilizzato nella dose di 1ml/pozzetto. Sul campione, in singolo multi-pozzetto, si introduce per mezzo di una micropipetta 1 ml di FBS per ciascun pozzetto a ricoprire il campione. Una volta ripartito il siero nei pozzetti, la piastra multi-pozzetto, sigillata opportunamente con para film ed avvolta in un foglio di alluminio, viene trasferita in incubatore per 2 h alla temperatura di 37 °C affinché il processo di adsorbimento delle proteine possa avere luogo.

Al termine della fase di incubazione la piastra multi-pozzetto viene estratta dall'incubatore e dissigillata. Ciascun campione viene risciacquato in acqua Milli-Q e posto ad asciugare su carta assorbente. L'insieme di queste operazioni viene svolto sotto cappa a flusso laminare dotata di filtri HEPA. Una volta asciutti, i campioni vengono riposti accuratamente in piastra multi-pozzetto sterile, uno per ogni pozzetto. Si utilizza gel di silice granulare per trattenere l'umidità residua che potrebbe essere dannosa per i campioni aventi proteine in superficie; allo scopo vengono messi uno o due granelli per ciascun pozzetto. A questo punto, i campioni sono pronti per essere conservati oppure per essere sottoposti ad analisi, come nel caso del presente lavoro di tesi dove vengono eseguite analisi XPS (*survey* ed alta risoluzione delle regioni di C, O e N) e di carica superficiale in funzione del pH (misure elettrocinetiche di potenziale  $\zeta$ ).

---

#### 4.2.2 Analisi biochimiche per la valutazione dell'adsorbimento proteico

Le indagini biochimiche per la valutazione dell'adsorbimento proteico che sono descritte nel presente paragrafo sono state condotte nei laboratori del Dipartimento di Scienze della Salute (DISS) dell'Università del Piemonte Orientale Amedeo Avogadro di Novara.

Per la misurazione della quantità di proteine adsorbite dai campioni esistono diverse metodiche. Per gli esperimenti discussi nel presente lavoro di tesi è stato deciso di utilizzare un metodo classico (non impiegato di frequente ma utilizzato solo occasionalmente al giorno d'oggi): il saggio BCA (*BCA assay*), dove la sigla BCA sta per acido bicinconinico. Per l'identificazione e la separazione delle proteine (assorbite su una superficie a seguito del contatto con una soluzione complessa come il siero fetale bovino) si è invece pensato di utilizzare la tecnica di immunofissazione *western blot* (anche spesso definita *immunoblot*) anche se non è stato possibile eseguire l'esperimento in tempo utile per inserirne i risultati in questo elaborato di tesi. Questi metodi di valutazione quantitativa e quali/quantitativa dell'adsorbimento proteico non verranno discussi nel dettaglio. Ai fini del presente lavoro di tesi, non si ritiene significativo né appropriato (per non dilungare la trattazione) inserire una spiegazione approfondita dei principi fisici su cui queste tecniche si basano. Per approfondimenti, si rimanda ai numerosi testi specifici esistenti sull'argomento e inerenti agli aspetti biochimici delle analisi.

Nel presente lavoro di tesi è stato impiegato il saggio BCA per lo studio dell'adsorbimento di siero fetale bovino sia su campioni lisci lucidati a specchio (Ti6Al4V – MP) che su campioni sottoposti a trattamento chimico (Ti6Al4V – CT). Di seguito è esposto il protocollo di analisi, tramite saggio BCA, dei campioni su cui sono adsorbite le proteine del siero fetale bovino.

**Valutazione quantitativa dell'adsorbimento di FBS.** Due gruppi di tre campioni di Ti6Al4V diversi (3 MP, 3 CT) vengono incubati in FBS per 2 h a 37 °C al fine di determinare la diversa capacità di adsorbimento dei campioni. La quantità totale di proteine adsorbite è quantificata mediante saggio dell'acido bicinconinico (BCA), utilizzando un kit appositamente preparato (Bicinchoninic Acid Kit, BCA-1, Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA). Dopo incubazione in FBS, le proteine adsorbite sulla superficie dei differenti campioni sono state lisate in 50 µl di tampone RIPA (50 mM Hepes, 150 mM NaCl, 0,1% SDS, 1% Triton-X100, 1% sodio desossicolato, 10% glicerolo, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EGTA, 1 mM NaF) e raccolte delicatamente con un raschietto. Per

---

determinare il peso ( $\mu\text{g}$ ) delle proteine presenti e dunque adsorbite su ciascun campione, è stata generata una curva standard di calibrazione utilizzando albumina di siero bovino (BSA, Sigma, 0-5  $\mu\text{g}$ ) e miscelata con i reagenti del kit BCA. Il valore di assorbanza associato alla soluzione derivante dalle proteine presenti su ciascuno dei campioni e la curva standard è stato misurato a 570 nm da uno spettrometro (SpectraCount, Packard Bell, USA) e la quantità di proteine presenti in soluzione è stata stimata in funzione della curva standard.

Il risultato dei test di adsorbimento proteico è presentato in dettaglio nel Capitolo 5.

### 4.3 Test cellulari

I test di citocompatibilità sono condotti nei laboratori del Dipartimento di Scienze della Salute (DISS) dell'Università del Piemonte Orientale Amedeo Avogadro di Novara. Nelle fasi sperimentali sono testati sia i campioni lisci lucidati a specchio (Ti6Al4V – MP) che i campioni sottoposti a trattamento chimico (Ti6Al4V – CT).

#### 4.3.1 Test cellulari di citocompatibilità

Per i test cellulari di citocompatibilità sono utilizzate le cellule di una linea cellulare immortalizzata definita come hFOB. Si tratta di cellule molto utilizzate nei laboratori di ricerca, perché in grado di fornire un sistema modello omogeneo e di rapida proliferazione per studiare la differenziazione degli osteoblasti umani, la fisiologia degli osteoblasti e gli effetti di ormoni, fattore di crescita e citochine sulla funzione normale degli osteoblasti. Le cellule hFOB hanno la capacità di differenziarsi in osteoblasti maturi che esprimono il normale fenotipo osteoblastico.

Per valutare la salute e la vitalità dei ceppi cellulari di cellule hFOB in coltura sono disponibili numerosi metodi. Nel presente lavoro di tesi si è impiegato il saggio colorimetrico alamarBlue®, che funziona come un indicatore di salute cellulare utilizzando il potere ossidoriducibile delle cellule vitali, al fine di misurare quantitativamente la proliferazione delle linee cellulari analizzate.

Di seguito sono brevemente esposti i protocolli di analisi dei campioni su cui si sono eseguiti i test di citocompatibilità.

**Ceppo cellulare.** Le cellule utilizzate per gli esperimenti sono acquistate dall'*American Type Culture Collection* (ATCC, Manassas, USA). Pre-osteoblasti fetali umani hFOB (hFOB 1.19, ATCC CRL-11372) sono coltivati in Dulbecco's Modified MEM (DMEM): miscela di Ham's F12 medium (50:50,

---

Sigma) integrata con 10% di siero bovino fetale, 1% di antibiotici e 0,3 mg/ml di neomicina (G418 salt, Sigma). Le cellule sono, in prima istanza, coltivate a 37 °C, in atmosfera controllata al 5% di CO<sub>2</sub> fino all'80-90% di confluenza, poi staccate con soluzione di tripsina-EDTA (Sigma) e utilizzate per gli esperimenti.

**Viability assay.** I campioni sterili sono maneggiati delicatamente con una pinzetta chirurgica, evitando qualsiasi danno alla superficie e depositi su una piastra sterile da 24 pozzetti; i pre-osteoblasti fetali umani (hFOB) sono seminati in un numero definito ( $1 \times 10^4$  cellule/campione) direttamente sulla superficie dei campioni e coltivati utilizzando 1 ml di DMEM fresco: il terreno F12 di Ham's medium per 24, 48 e 72 h a 37 °C, in atmosfera controllata al 5% di CO<sub>2</sub>. Successivamente, in ciascuno degli istanti temporali selezionato, la vitalità delle cellule è valutata mediante il saggio colorimetrico Alamar blu (AlamarBlue®, Thermo Fisher) seguendo le istruzioni del produttore. In breve, 100 µl della soluzione di Alamar pronta all'uso sono aggiunti in ciascun pozzetto contenente il campione con le cellule seminate e la piastra è incubata per 4 h a 37 °C al buio. In seguito, 100 µl di del surnatante di ciascun pozzetto sono raccolti e trasferiti su una nuova piastra da 96 pozzetti con fondo nero; dopo aver scosso delicatamente la piastra, l'intensità della fluorescenza è rilevata a 600 nm con uno spettrofotometro (Victor, IBM).

I risultati dei test di citocompatibilità sono presentati nel Capitolo 5.

#### **4.3.2 Test cellulari di attività antibatterica**

Per i test cellulari di attività antibatterica si utilizzano colonie di *Staphylococcus aureus*, un batterio gram-positivo tra i più virulenti nella categoria dei batteri appartenenti al genere degli stafilococchi. Lo *Staphylococcus aureus* è anche un comune responsabile di infezioni nosocomiali, per questo riscuote interesse studiarlo in laboratorio per avere la possibilità di sviluppare strategie efficaci a contrastarne l'azione. Viene valutata, per la stima dell'attività batterica, sia la crescita planctonica che quella sessile delle colonie.

Per valutare la salute dei ceppi batterici di *Staphylococcus aureus*, nel presente lavoro di tesi è impiegato il test di vitalità cellulare microbica BacTiter-Glo™, il quale fornisce un metodo per determinare il numero di cellule microbiche vitali in coltura basato sulla quantificazione dell'ATP presente (attraverso la generazione di un segnale luminescente).

---

Di seguito sono brevemente esposti i protocolli di analisi dei campioni su cui si sono eseguiti i test di attività cellulare batterica.

**Condizioni di crescita dei ceppi cellulari.** I ceppi batterici utilizzati per gli esperimenti sono raccolti da isolati clinici e testati per la loro resistenza a diversi farmaci (MDR) dall'unità di microbiologia clinica dell'Ospedale Maggiore di Novara. Tutti i campioni sono ottenuti dopo l'approvazione informata del paziente e in piena conformità con la Dichiarazione di Helsinki.

Una singola colonia di *Staphylococcus aureus* MDR, derivante da una coltura overnight su piastra selettiva per l'Agar sale mannitolo (Sigma-Aldrich, Milano, Italia) è risospesa in 9 mL di terreno Luria-Bertani (LB, Sigma) e incubata a 37 °C per 18 h. Dopo l'incubazione, è preparata una nuova provetta di LB fresca diluita in rapporto 1:10. La nuova provetta è incubata a 37 °C per 3 h per raggiungere la fase di crescita logaritmica. Infine, prima di ogni esperimento è preparato un nuovo terreno di coltura diluendo i batteri nel brodo LB fino a che la densità ottica (O.D.) risulti pari a 0,001 a 600 nm, corrispondente cioè ad una concentrazione finale di  $1 \times 10^5$  cellule/ml.

**Formazione di biofilm.** Campioni sterili sono collocati in una piastra da 24 pozzetti (Nunclon Delta Surface, Thermo Scientific, USA) e immersi con 1 ml di terreno LB contenente  $1 \times 10^5$  cellule/ml preparato come descritto in precedenza. La piastra è incubata a 37 °C, in agitazione continua a 120 giri/min, per distinguere le cellule del biofilm aderenti e quelle planctoniche flottanti per 2, 4, 6, 24, 48 e 72 h a 37 °C. In ciascuno degli istanti temporali selezionato, i sopranatanti sono estratti dai pozzetti e seminati su una piastra separata per rimuovere le cellule planctoniche galleggianti, mentre i campioni sono lavati delicatamente 3 volte con PBS per rimuovere le cellule non aderenti. Questo modo di procedere consente di analizzare separatamente, in corrispondenza di ciascun istante di tempo, il biofilm cresciuto sulle superfici dei campioni e le cellule planctoniche galleggianti presenti nel mezzo di coltura.

**Viability assay.** Per ciascun istante temporale selezionato, la vitalità dei batteri (sia costituenti il biofilm che le cellule planctoniche) è valutata mediante il saggio basato su ATP BacTiter-Glo™ (Promega, Madison, USA) seguendo le istruzioni del produttore. In breve, il tampone e il substrato forniti dal kit sono miscelati per preparare il reagente operativo, il quale è stato conservato alla temperatura di 4 °C. Poi, la soluzione di reagente è aggiunta a ciascun pozzetto contenente batteri in un rapporto 50:50, lavorando a temperatura ambiente. La reazione è equilibrata per 15 minuti e,

---

a seguire, i sopranatanti sono immediatamente raccolti, centrifugati per rimuovere eventuali detriti presenti (2000 giri/min, 5 min). La densità ottica del prodotto della centrifugazione è in seguito valutata a 600 nm mediante spettrofotometro (Victor, Perkin Elmer, Waltham, USA).

I risultati dei test cellulari di attività antibatterica sono presentati nel Capitolo 5.

#### **4.4 Caratterizzazione superficiale**

L'importanza di dedicare una sezione all'analisi superficiale del titanio può essere facilmente giustificata partendo dalla seguente considerazione: i primi eventi che hanno luogo a seguito dell'impianto di un biomateriale in un organismo umano sono senza dubbio dovuti alle interazioni dell'ambiente biologico con la superficie del materiale. Gli scienziati sono concordi nel ritenere che l'inizio delle reazioni biologiche e le particolari vie di risposta scelte dal corpo nei confronti del corpo estraneo, cioè il biomateriale impiantato, dipendano fortemente da una ampia gamma di proprietà non del biomateriale in sé ma, più specificatamente, della sua superficie. Quali di questi fattori siano clinicamente rilevanti e in che modo questi siano in grado di influenzare la risposta del corpo, tuttavia, nella maggior parte dei casi è, ad oggi, aspetto ancora poco compreso. Diventa importante però, in un lavoro incentrato sullo studio e la valutazione in vitro dell'adsorbimento proteico su superfici in titanio, cercare di approfondire meglio l'argomento.

L'assunto principale, prima di addentrarsi nell'argomento, è il seguente: le tecniche di caratterizzazione superficiale hanno bisogno di attrezzature e conoscenze specializzate. L'interpretazione dei dati che ne derivano, poi, è spesso resa difficile in considerazione delle piccolissime quantità di materiale che devono essere analizzate e degli estremi cambiamenti nella composizione della superficie che si verificano tipicamente su distanze molto piccole (dell'ordine dei micro o nano metri). In aggiunta, si ha una ulteriore difficoltà nel valutare le tecniche di caratterizzazione superficiale nel contesto della scienza dei biomateriali: è noto a tutti come molte delle ben consolidate tecniche analitiche di superficie sono eseguite in condizioni di alto vuoto; in che misura i risultati di tali analisi siano significativi per descrivere la situazione di una superficie di un certo biomateriale a contatto con fluidi biologici (o fluidi che simulano fluidi biologici) resta da valutare per ogni singolo caso, e questo è quanto si cercherà di fare nei successivi paragrafi.

In questa sezione verranno esposte, in maniera breve e semplice, le principali tecniche impiegate nel presente lavoro di tesi per valutare le proprietà delle superfici dei campioni realizzati. L'enfasi

---

maggior verrà data nell'illustrare il principio fisico generale che permette di sfruttare le potenzialità di una certa tecnica, facendo riferimento e sottolineando gli aspetti peculiari del metodo analitico e cercando di darne descrizione completa e sintetica.

#### 4.4.1 Spettroscopia fotoelettronica a raggi X (XPS/ESCA)

L'XPS è una tecnica di indagine che consente di conoscere gli elementi chimici che compongono la superficie di un materiale e di determinarne talvolta lo stato di legame.

Il principio su cui l'XPS si basa è il seguente: il campione oggetto di studio viene irraggiato con una sorgente di raggi X monocromatica. I fotoni entrano nel materiale e subiscono varie interazioni, tra le quali l'effetto fotoelettrico e l'emissione Auger. In entrambi i casi un elettrone viene espulso dal materiale con una precisa e specifica energia cinetica legata alla energia di legame dello stesso. Si hanno pertanto, nell'XPS, un certo numero di fotoelettroni che vengono emessi in conseguenza dell'eccitazione della superficie del campione con un fascio di raggi X, come illustrato in Figura 4.11. I raggi X penetrando nel campione, infatti, stimolano l'emissione di elettroni in tutta la zona irradiata ma solo gli elettroni emessi dalla superficie che non hanno subito alcuna perdita di energia vanno a contribuire al picco di fotoemissione, come mostrato in Figura 4.11(a). Gli elettroni emessi dalla zona superficiale che, al contrario, perdono energia a causa di interazioni anelastiche vanno conteggiati come particelle che subiscono *scattering* e non portano informazione analitica utile; essi daranno solamente un contributo di *background*, di rumore di fondo da cui è impossibile ricavare dati relativi alla composizione del campione, come messo in evidenza in Figura 4.11(b). Gli elettroni emessi in profondità, che originano all'interno del un campione, infine, dovendo percorrere uno spessore notevole per giungere alla superficie del campione, tipicamente perdono tutta la propria energia cinetica a causa di collisioni anelastiche nel mezzo attraversato e dunque non vengono emessi né rilevati, come rappresentato in Figura 4.11(c).

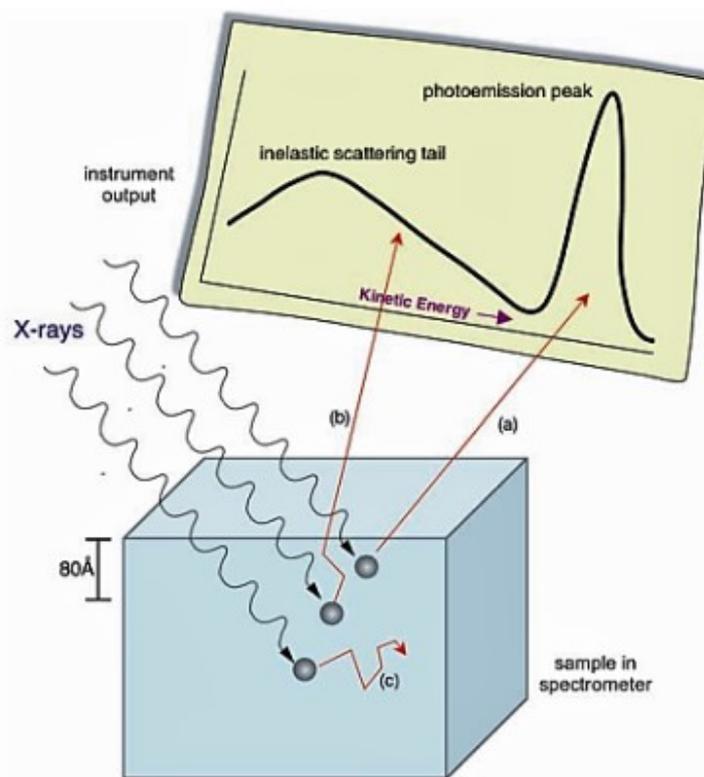


Figura 4.11 Principio di funzionamento dell'XPS. Schema delle interazioni che avvengono sulla superficie del campione per effetto dell'irraggiamento con una sorgente di raggi X monocromatica [123]

Questi fotoelettroni vengono contati dall'apparecchio, per determinare informazioni relative alla composizione superficiale del campione analizzato. Una rappresentazione schematica di uno spettrometro XPS che utilizza una sorgente di raggi X monocromatica è riportata in Figura 4.12. In particolare, il numero di elettroni emessi (*count rate*) è misurato in funzione della loro energia cinetica (spettro energetico). I picchi di emissione del fotoelettrone osservabili nello spettro sono conseguenza della rilevazione di elettroni a diversi livelli di energia; ciascun elettrone, sulla superficie del materiale, è legato alla presenza di un determinato elemento chimico (atomo o molecola) e possiede una sua propria e caratteristica energia di legame nella sostanza originaria. Le energie dello spettro XPS, pertanto, sono correlate alle energie di legame degli elettroni sulla superficie del campione. Se le energie di legame sono, a loro volta, specifiche per ciascun elemento, risulta possibile risalire alla composizione di superficiale del campione ignoto solamente basandosi sui principi e le relazioni appena descritte.

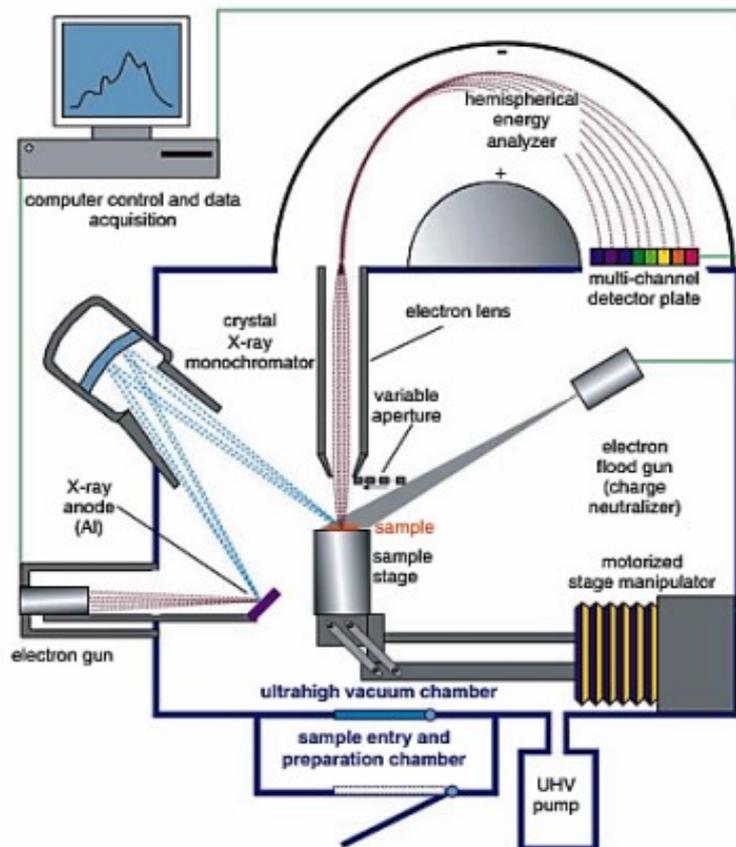


Figura 4.12 Schema dei componenti chiave di uno spettrometro XPS moderno [123]

In sintesi, misurando l'energia cinetica dei fotoelettroni emessi dal campione ( $E_{CIN}$ ) si risale alla loro energia di legame ( $E_B$ ), indicativa dell'elemento chimico interessato, secondo la formula:

$$E_B = h\nu - E_{CIN} \quad (1)$$

dove  $h\nu$  è l'energia dei raggi X utilizzati (1253,6 eV e 1486,6 eV, ad esempio, nel caso dei due anodi più comunemente utilizzati per il funzionamento dei tubi radiogeni che vanno a costituire l'impianto di un dispositivo XPS). Le applicazioni analitiche dell'XPS si basano tutte quante su questo principio.

Si osservi, però, che l'XPS non è di per sé una tecnica in grado di permettere l'indagine di ampie porzioni di materiali. Anche se i raggi X penetrano profondamente nel materiale oggetto di analisi, infatti, solo i fotoelettroni con energie cinetiche tipicamente nell'intervallo 100-1000 eV possono essere emessi dal campione, e dunque osservati. Da ciò consegue che, in generale, solo da uno strato superficiale molto sottile, di spessore compreso tra i 2 e i 10 nm di spessore, è possibile

---

estrarre informazioni sulla chimica e la composizione del substrato (si osservi, comunque, che molto dipende però anche dal materiale in esame e dall'angolo di rilevamento).

Altra caratteristica distintiva dell'XPS è relativa alle condizioni ambientali in cui l'analisi viene svolta: si tratta di una tecnica che prevede di lavorare in condizioni di alto vuoto, UHV (*ultrahigh vacuum*). L'XPS rientra pertanto nella categoria delle tecniche *ex situ*, ovvero quei metodi che consentono solo di definire lo stato del campione quando esso è stato isolato o rimosso dall'ambiente corrispondente alle tipiche condizioni di funzionamento.

In merito alle informazioni che l'XPS permette di ricavare, si deve tenere presente che la tecnica fornisce informazioni quantitative, più che qualitative, sulla composizione chimica elementare del campione. L'XPS, non è una tecnica dotata di elevata specificità di analisi; è però una tecnica invece dotata di buona sensibilità/accuratezza, dal momento che è in grado di rilevare elementi presenti con concentrazioni dell'ordine dello 0,1%. Innanzitutto, grazie all'XPS è consentito identificare quali elementi siano presenti sulla superficie del campione studiato grazie all'analisi e all'interpretazione degli spettri *survey*. Poi, è possibile identificare gli stati di ossidazione e i gruppi funzionali degli elementi presenti sulla superficie del campione analizzato (basandosi sulle transizioni energetiche di legame degli elementi, i *chemical shifts*) grazie invece all'analisi degli spettri *high resolution*. Si può, infatti, attraverso una procedura matematica di deconvoluzione dei picchi (*curve-fitting*) andare ad analizzare in dettaglio la forma dei picchi fotoelettronici di emissione, andando a separare le diverse componenti relative ai diversi elementi chimici rilevati. Mediante XPS, pertanto, è possibile rilevare tracce di contaminazioni superficiali ed è eventualmente permesso, ad esempio, di determinare lo spessore di straterelli superficiali del campione in analisi (ad esempio, spessori di strati di ossido o di sottili film organici). Un vantaggio che l'XPS offre, inoltre, è la possibilità di effettuare misure ed indagini sia materiali elettricamente conduttivi che materiali isolanti.

La sensibilità di rilevazione della tecnica XPS è in generale buona, e compresa tra  $10^{12}$ - $10^{13}$  atomi/cm<sup>2</sup>. La tecnica XPS, poi, offre il grande vantaggio di non indurre alcun danno del campione fatta eccezione per campioni organici, che possono decomporsi durante l'analisi. Per le altre tipologie di campioni, come ad esempio i campioni metallici, al contrario, generalmente non si riscontra alcun danno (a meno che lo strumento non venga utilizzato per analizzare il profilo composizionale dei campioni in profondità) [8].

---

---

Nel presente lavoro di tesi sono stati analizzati con la tecnica XPS diversi gruppi di campioni. Lo strumento utilizzato è uno spettrofotometro a raggi X per analisi superficiale del tipo M-Probe (Surface Science Instruments, Mountain View, CA, USA).

Nel dettaglio, sono stati analizzati i campioni seguenti:

- Ti6Al4V – MP;
- Ti6Al4V – CT;
- Ti6Al4V – MP su cui è stata fatta adsorbire albumina (Ti6Al4V – MP + BSA);
- Ti6Al4V – MP su cui è stata fatta adsorbire fibronectina (Ti6Al4V – MP + BFN);
- Ti6Al4V – MP su cui è stato fatto adsorbire siero fetale bovino (Ti6Al4V – MP + FBS);
- Ti6Al4V – CT su cui è stata fatta adsorbire albumina (Ti6Al4V – CT + BSA);
- Ti6Al4V – CT su cui è stata fatta adsorbire fibronectina (Ti6Al4V – CT + BFN);
- Ti6Al4V – CT su cui è stato fatto adsorbire siero fetale bovino (Ti6Al4V – CT + FBS).

I risultati di queste analisi, messi a confronto, sono presentati ed esaminati nel Capitolo 5.

#### 4.4.2 Bagnabilità

L'angolo di contatto è la tecnica più comunemente utilizzata nei laboratori scientifici per determinare la bagnabilità di una superficie. Il principio su cui si basa questa tecnica è fisicamente descritto dalla legge di Young, che corrisponde al bilancio delle forze totali agenti su una goccia di volume trascurabile deposta su una superficie ideale.

$$0 = \gamma_{SV} - \gamma_{SL} - \gamma \cos(\vartheta_c) \quad (2)$$

In equilibrio, infatti, la forma di una goccia di liquido (L) che cade sulla superficie di un solido (S) in presenza di una fase di vapore (V) è regolata dal bilanciamento tra tre componenti di tensione superficiale ( $\gamma_{SL}$ ,  $\gamma_{SV}$ ,  $\gamma_{LV}$ ). Considerando la sezione di una goccia di liquido depositata su un solido, l'angolo di contatto è quindi l'angolo compreso tra la direzione della tensione solido-liquido e la direzione della tensione liquido-vapore, tangente alla superficie esterna della goccia, con il vertice nel punto trifase liquido-solido-vapore (Figura 4.13). L'angolo di contatto, con queste ipotesi, corrisponde alla grandezza termodinamica che minimizza l'energia libera superficiale del sistema. Per questo motivo ci si riferisce a tale angolo come angolo di contatto di equilibrio.

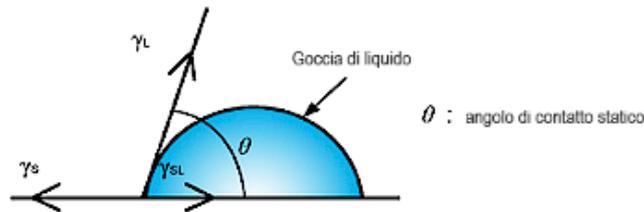


Figura 4.13 Angolo di contatto. Angolo compreso tra la linea tangente al punto di contatto e la linea orizzontale rappresentata dalla superficie solida oggetto di studio [124]

In sintesi, pertanto, quando una goccia di liquido viene posizionata su una superficie solida, il liquido ha la possibilità di comportarsi in due modi: (i) diffondersi sulla superficie per formare una pellicola sottile, approssimativamente uniforme (Figura 4.14); (ii) distribuirsi in misura limitata ma rimanere comunque con una forma a goccia discreta sulla superficie.

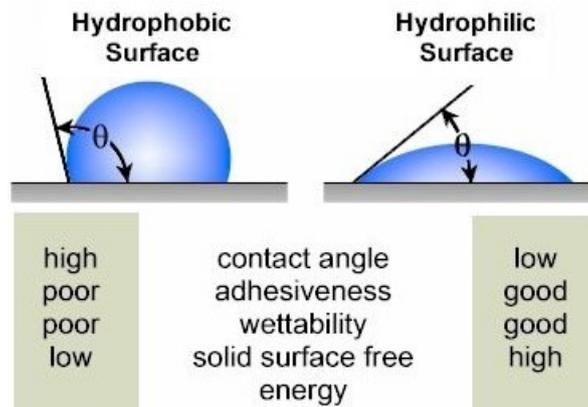


Figura 4.14 Superficie idrofobica ed idrofilica. Proprietà a confronto [124]

La condizione finale del liquido versato sulla superficie viene considerata come indicazione della bagnabilità della superficie da parte del liquido o, viceversa, della capacità del liquido di bagnare la superficie, a seconda del punto di vista dell'operatore che esegue l'analisi. La misura quantitativa del processo di bagnatura è considerata come l'angolo di contatto. A questo punto, si distinguono diversi scenari. Nel caso di un liquido che forma un film uniforme (cioè, dove  $\theta = 0$ ), si dice che il solido è completamente bagnato dal liquido, o che il liquido bagna il solido. Se, al contrario, tra superficie e liquido si forma una goccia con angolo di contatto diverso da zero, ci sono discussioni in merito al come descrivere il sistema. L'argomento è dibattuto. Per convenzione, in questo lavoro di tesi, si farà riferimento alla classificazione più nota ed impiegata nel mondo accademico, che prevede si definiscano idrofobiche le superfici aventi un angolo di contatto di

---

equilibrio con l'acqua maggiore di 90 gradi, idrofiliche le superfici con angoli minori di 90 gradi, come mostrato schematicamente in Figura 4.15.

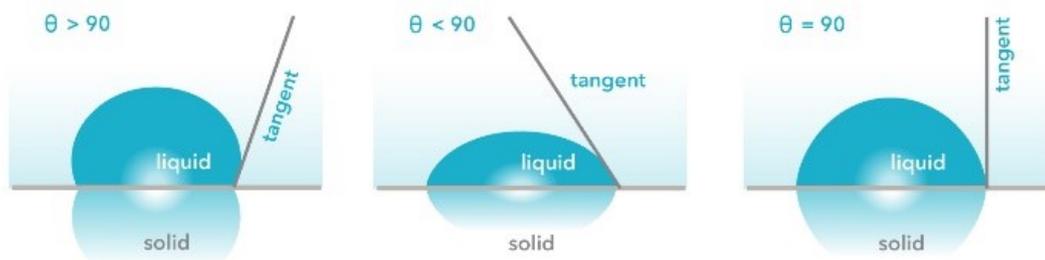


Figura 4.15 Angoli di contatto che definiscono l'idrofilicità/idrofobicità di una superficie solida nei confronti di un determinato liquido [125]

Trovato accordo sulle definizioni, restano alcuni aspetti della misura dell'angolo di contatto su cui è meritevole un approfondimento. È stato detto come l'angolo di contatto di un liquido su un solido possa essere considerato una caratteristica del sistema, ma ciò è vero solo se l'angolo viene misurato in determinate condizioni di equilibrio, tempo, temperatura, purezza dei componenti e altri parametri. Gli angoli di contatto, pertanto, nonostante siano misure piuttosto semplici da effettuare e possano portare informazioni significative riguardo alle proprietà di superficie, se non eseguite prendendo le dovute precauzioni possono risultare invece anche molto fuorvianti. A queste considerazioni si aggiunge il fatto che l'osservazione del fenomeno fisico, cioè la formazione della goccia su una determinata superficie, e la valutazione visiva dell'immagine che si presenta all'operatore è l'unico metodo noto (seppur scarsamente sicuro e riproducibile) per condurre l'indagine per la misura dell'angolo di contatto. Queste premesse, se considerate nel complesso, possono facilmente portare a prendere atto di come la corretta interpretazione della misura dell'angolo di contatto su una superficie reale sia una misura molto complessa. Innanzitutto, l'ipotesi di superficie valida nella legge di Young decade immediatamente quando si ha a che fare con una superficie reale qualsiasi, la cui rugosità ed eterogeneità, come si può facilmente intuire, è ben distante dall'idealità. Poi, come anticipato, a causa delle diverse condizioni iniziali del sistema (ad esempio, delle modalità di deposizione della goccia, dell'umidità ambientale della stanza in cui viene eseguita la misura, ecc.) si deve considerare la possibile insorgenza di molti e diversi equilibri metastabili alle cui condizioni la forma della goccia può rimanere vincolata ed ai quali corrispondono valori diversi di angoli di contatto. Per questo motivo non risulta sempre possibile definire un valore di angolo di contatto di equilibrio. Allora,

---

spesso, si eseguono diverse misure e si va a rilevare quello che viene definito angolo di contatto dinamico, andando a determinare due diversi angoli: uno di avanzamento e uno di recessione. Si parla di angolo di contatto dinamico nel caso di una goccia di liquido in moto sulla superficie di un solido. Nella misura di angolo di contatto dinamico, l'angolo di contatto varia a seconda del punto di intersezione tra le fasi (considerato rispetto alla direzione del moto): l'angolo dal valore maggiore è detto di avanzamento, quello di valore minore di recessione, e la loro differenza viene detta isteresi dell'angolo di contatto. Gli angoli di contatto, infatti, in realtà, spesso presentano isteresi e non possono essere definiti in modo univoco in alcune condizioni sperimentali. Esistono diverse modalità di misura di angoli di contatto dinamico, tra cui le più comuni sono la bilancia di Wilhelmy e la goccia sessile [8]. Nel presente lavoro di tesi solo il metodo di misura dell'angolo di contatto di equilibrio è stato sfruttato per la caratterizzazione superficiale dei campioni in analisi. Per quanto concerne le condizioni ambientali in cui la misura viene effettuata non ci sono particolari accorgimenti da seguire. È sufficiente testare il campione che si desidera a contatto con piccole gocce di liquidi (ad esempio, acqua oppure altri solventi).

In merito alle informazioni che la misura di angolo di contatto di equilibrio permette di ricavare, si deve osservare che la tecnica, pur essendo molto sensibile alla chimica di superficie del campione, allo stesso tempo fornisce indicazioni nel complesso indirette. Grazie alla misura dell'angolo di contatto di equilibrio è infatti possibile carpire informazioni sull'energia superficiale del materiale, sulla bagnabilità, sul grado di idrofilicità/idrofobicità della superficie. È inoltre possibile indagare l'eventuale presenza di componenti polari o apolari dispersi sulla superficie, e anche valutare se particolari riarrangiamenti superficiali del campione possono alterarne significativamente le proprietà di bagnabilità.

In conclusione, come mostrato anche nello schema in Figura 4.16, esiste una relazione tra bagnabilità ed energia di superficie del materiale/tensione superficiale. Nella scienza dei materiali la tensione superficiale è definita, a rigore, come la densità superficiale di energia di legame sull'interfaccia tra un corpo continuo e un materiale di un'altra natura (ad esempio un solido, un liquido o un gas). Si capisce, pertanto, da tale definizione, come la tensione superficiale sia un parametro valido a quantificare la forza necessaria per la rottura dei legami intermolecolari che formano la superficie stessa. Se per i liquidi, la tensione superficiale coincide con l'energia superficiale, per i solidi il discorso è differente e si deve distinguere tra superficie solide ad alta

---

energia e superficie solide a bassa energia. Le superfici solide ad alta energia presentano legami chimici forti (ionico, metallico o covalente) tra atomi e vengono bagnate completamente dalla maggior parte dei liquidi polari. Le superfici solide a bassa energia sono costituite, invece, da specie atomiche tenute assieme da legami di tipo debole (interazioni fisiche del tipo legame di Van der Waals o legame idrogeno) e possono essere bagnate completamente o parzialmente a seconda del liquido impiegato per i test di bagnabilità.

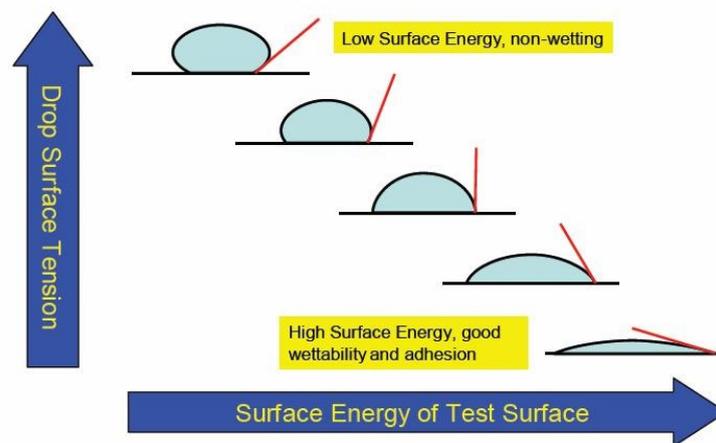


Figura 4.16 Relazione tra bagnabilità di una superficie solida e energia superficiale [126]

Dalle considerazioni appena esposte è intuibile come, nel caso di biomateriali solidi come il titanio, lo studio della bagnabilità e dell'energia superficiale sia di notevole importanza per prevedere l'interazione del biomateriale stesso con l'ambiente biologico. Le misure di angolo di contatto sono in grado di fornire utili spunti nel caso in cui si debba andare ad investigare il comportamento di superficie del titanio a contatto con soluzioni (di origine biologica) di diverso tipo. Nello studio dell'adsorbimento proteico, poi, la misura dell'angolo di contatto è l'esame preliminare più semplice ed economico con cui iniziare le analisi, per comprendere il comportamento delle superficie oggetto di studio.

Per eseguire le misure di angolo di contatto relative al presente lavoro di tesi, è utilizzato uno strumento specifico (KRÜSS DSA 100, KRÜSS GmbH, Amburgo, Germania). Le operazioni di misura sono eseguite a temperatura ambiente. Il campione è posizionato sul piatto orizzontale dell'apparecchio. L'apparato ottico del microscopio, posto frontalmente al campione, una volta impostato per avere una adeguata messa a fuoco dell'oggetto di indagine, permette di acquisire le immagini di ciascuna prova. La geometria dei campioni, a forma di disco del diametro di 10 mm,

---

non rende possibile effettuare molteplici misure sullo stesso campione. Le gocce di acqua iniettate sulla superficie, se troppo ravvicinate, possono infatti, per fenomeni chimico/fisici di coesione molecolare, coalescere ed unirsi, andando a rendere la misura irrealizzabile. Per questo motivo, per ciascun campione di ogni gruppo, data la limitata disponibilità di superficie su cui iniettare una (seppur limitata) quantità di acqua, sono state condotte una/due misure. Sulla superficie di ciascun campione, in sintesi, sono state depositate con l'ausilio di una micropipetta una/due goccioline di 5  $\mu$ l di acqua purificata e deionizzata Milli-Q ( $\gamma = 72$  mN/m); attenzione è stata prestata a fare in modo di depositare tali gocce ad una certa distanza di sicurezza l'una dall'altra. La forma di ciascuna goccia è registrata da una fotocamera. La misura dell'angolo di contatto è eseguita andando a sfruttare la capacità di uno specifico software dedicato all'elaborazione automatica di immagini. Ciò permette di determinare l'angolo di contatto statico per ciascun campione di interesse.

Nel presente lavoro di tesi la misura dell'angolo di contatto con l'acqua è stata eseguita su due gruppi di campioni, così suddivisi:

- un gruppo di campioni lisci lucidati a specchio (Ti6Al4V – MP);
- un gruppo di campioni sottoposti al trattamento chimico (Ti6Al4V – CT).

Una volta ottenuti i dati sperimentali è stata svolta una semplice analisi di tipo statistico, andando a determinare il valore medio e la deviazione standard dell'angolo di contatto misurato per ciascuno dei due gruppi di campioni oggetto di indagine.

Lo scopo di questa serie di esperimenti è quello di valutare se (e in che modo) la topografia superficiale del titanio ossidato influisce sull'adsorbimento proteico. L'angolo di contatto statico, in questo contesto, fornendo informazioni sulla bagnabilità superficiale è in grado di dare una prima indicazione utile alla comprensione degli effetti dell'adsorbimento superficiale. Il rationale dietro a questa serie di indagini è quello di andare a valutare come differenti tipologie di proteine vadano ad influire, ed eventualmente modificare, la bagnabilità superficiale delle superfici bioattive ingegnerizzate in titanio. Tutto ciò risulta importante alla luce di avere una cognizione più approfondita sul destino di tali superficie, una volta che esse sono impiantate in vivo.

Con il proposito di arricchire l'informazione relativa al comportamento dei campioni oggetto di studio a contatto con fluidi biologici, si è anche effettuata una misura di bagnabilità a contatto con

il sangue. Considerato il fatto che è il sangue il tessuto che entra per primo in contatto con il biomateriale impiantato, approfondire il grado di influenza reciproca tra fluido e biomateriale assume un interesse rilevante dal punto di vista ingegneristico. Per ragioni di sintesi, non si ritiene opportuno inserire nel presente paragrafo una breve descrizione delle principali funzioni, proprietà e caratteristiche del sangue ma si rimanda ad altri testi specifici sull'argomento.

Le prove di bagnabilità dei campioni a contatto con il sangue che sono esposte nel presente lavoro di tesi sono state eseguite presso il dipartimento di Scienze Matematiche e Informatiche, Scienze Fisiche e Scienze della Terra (MIFT) dell'Università degli Studi di Messina. Il sangue preso in considerazione per questo esperimento è sangue umano prelevato da un volontario sano. I campioni di sangue sono stati prelevati in un laboratorio di analisi cliniche e conservati in frigorifero (2 - 6 °C), nelle loro provette sterili originali (BD Vacutainer K3E, con 5,4 mg di acido etilendiamminotetracetico – EDTA). L'EDTA lega gli ioni di calcio, inibendo così la cascata della coagulazione. Le misurazioni degli angoli di contatto sono eseguite sui diversi campioni (sia lucidati a specchio, Ti6Al4V - MP, che sottoposti al trattamento chimico, Ti6Al4V – CT) entro 5 giorni dalla donazione, al fine di preservare il sangue da deterioramento. I valori principali dell'esame emocromocitometrico per la conta ematica del sangue impiegato per la sperimentazione sono riportati nella Tabella 4.3.

*Tabella 4.3 Caratteristiche emocromocitometriche del sangue utilizzato per la sperimentazione [127]*

<b>Gruppo sanguigno</b>	A1 Rh positivo, fenotipo Rh e Kell, CeDEe kk
<b>Emocromo</b>	Globuli bianchi (WB) = $6,7 \times 10^3$ /ml; Neutrofili (N) = 66,2%; Linfociti (L) = 25,1%; Monociti (M) = 7,9; Eosinofili (E) = 0,5%; Basofili (B) = 0,3%; Globuli rossi (RB) = $4,16 \times 10^6$ / $\mu$ l; Emoglobina (HB) = 13,4 g/dl; Ematocrito (Ht) = 39,3%; Piastrine = $214 \times 10^3$ / $\mu$ l
<b>Coagulazione</b>	Attività protrombinica INRI = 0,9; aPTTR = 0,86; Fibrinogeno = 380 mg/dl
<b>Biochimica</b>	Glucosio sanguigno = 91 mg/dl, Creatinina=0,7 mg/dl, Omocisteine=11,2 $\mu$ mol/l
<b>Proteine specifiche</b>	Albumina = 36 gr/l, Proteina C = 76%, Proteina totale S = 58%

La misurazione dell'angolo di contatto del sangue sulle due diverse superfici è eseguita con il metodo della goccia sessile. Una siringa calibrata (Hamilton 10  $\mu$ l) è utilizzata per depositare le gocce di sangue. Prima della misurazione dell'angolo di contatto, la provetta contenente il

---

campione di sangue è scossa per omogeneizzarne il contenuto fino a quando la temperatura del sangue raggiunge la temperatura ambiente. Le misurazioni della temperatura per questo studio sono ottenute utilizzando il termometro digitale Sika Electronic (TS 9180). Le gocce di sangue (1  $\mu$ l) sono deposte delicatamente dalla siringa calibrata sui campioni ( $T = 22$  °C, UR = 35% e  $P = 1$  atm). La misura dell'angolo di contatto è eseguita andando a sfruttare la capacità di uno specifico software dedicato all'elaborazione automatica di immagini.

Nel presente lavoro di tesi la misura dell'angolo di contatto con il sangue è stata eseguita su due gruppi di campioni, così suddivisi:

- un gruppo di campioni lisci lucidati a specchio (Ti6Al4V – MP);
- un gruppo di campioni sottoposti al trattamento chimico (Ti6Al4V – CT).

Una volta ottenuti i dati sperimentali è stata svolta una semplice analisi di tipo statistico, andando a determinare il valore medio e la deviazione standard dell'angolo di contatto misurato per ciascuno dei due gruppi di campioni oggetto di indagine.

#### **4.4.3 Potenziale zeta**

La definizione e la misura del potenziale  $\zeta$  è, tipicamente, legata all'ambito dei sistemi colloidali come le dispersioni di particelle o le emulsioni. Di rado si trovano riferimenti a questa proprietà dei sistemi al di fuori del contesto dell'analisi della stabilità dei colloidi. Nell'ambito del presente lavoro di tesi, al contrario, il potenziale  $\zeta$  viene utilizzato come parametro per l'analisi della superficie dei campioni solidi su cui si vuole valutare il fenomeno di adsorbimento proteico.

Sebbene le basi teoriche su cui viene definito il potenziale  $\zeta$  siano le stesse, indipendentemente dal fatto che la tecnica sia applicata per la caratterizzazione di colloidi o di superficie solide, è necessario un approccio diverso per comprendere il potenziale  $\zeta$  nel campo dell'analisi delle superficie solide. Per introdurre il concetto di potenziale  $\zeta$ , si ritiene comunque necessario, dapprima, darne una definizione più possibile chiara per le dispersioni, per poi andare nel dettaglio ad approfondire in cosa consiste la misura di potenziale  $\zeta$  per le superficie solide.

Per le dispersioni, si parte dall'assunto che una particella dispersa in un liquido elettrolitico generalmente presenta delle cariche elettrostatiche superficiali (per esempio, prodotte durante la polverizzazione) che determinano un campo elettrico responsabile della redistribuzione degli ioni

---

---

presenti nello spazio che circonda la particella stessa. Una distribuzione del genere comporta un aumento della concentrazione di controioni (ioni di carica opposta a quella della particella) in prossimità della superficie di interfaccia tra la particella ed il liquido che la circonda [128]. Lo strato di liquido con gli ioni che circonda la particella, in particolare, è caratterizzato dalla peculiarità di consentire la distinzione di due zone: una interna e più vicina alla superficie della particella, detta strato stazionario (di Stern), dove si raccolgono gli ioni che più fortemente subiscono l'influenza della carica superficiale della particella dispersa; una esterna, detta strato diffuso (di Gouy-Chapman), dove le interazioni sono più deboli e sono presenti gli ioni che subiscono un'influenza più debole da parte della particella carica. Le due zone costituiscono un doppio strato elettrico od elettrochimico (EDL) intorno a ciascuna particella. All'interno dello strato diffuso (di spessore molto maggiore rispetto allo strato di Stern) gli ioni formano strutture metastabili: quando la particella si muove nel liquido, gli ioni si muovono con essa; in particolare, gli ioni oltre il piano definito di taglio (*shear plane*) sostituiscono e sono continuamente sostituiti dagli ioni liberi presenti nel liquido in modo che le dimensioni dell'EDL, rimangano costanti [128]. Lo schema in Figura 4.17 mostra, per una generica particella carica, la variazione del potenziale elettrico in funzione della distanza dalla sua superficie: si può vedere come questo diminuisca rapidamente all'interno dello strato stazionario, più lentamente all'interno dello strato diffuso e poi ancora più lentamente, fino ad annullarsi, per definizione, all'infinito. A tale modello di comportamento delle cariche all'interfaccia solido-liquido si è soliti riferirsi con la terminologia di modello EDL. Considerazioni interessanti che discendono da questa teoria sono: il fatto che la carica intrinseca presente sulla superficie di una particella è schermata dalle cariche dello strato stazionario; il fatto che le interazioni fra particelle di una stessa dispersione sono regolate in funzione sia della carica superficiale delle particelle della dispersione sia della schermatura data dalla presenza dello strato stazionario. Altro aspetto importante da sottolineare, che discende dall'ipotesi di modello EDL, è la possibilità di introdurre il potenziale elettrocinetico o potenziale  $\zeta$ , una proprietà associata alle particelle studiate. Immaginando di allontanarsi gradatamente dalla superficie della particella oggetto di schematizzazione (Figura 4.17) lungo la curva in evidenza in rosso, si arriva ad un certo punto ad un piano definito piano di taglio *shear plane* in corrispondenza del quale si misura il potenziale  $\zeta$ . Tale valore di potenziale è molto importante per i sistemi dispersi, perché in grado di aiutare nel definirne il comportamento.

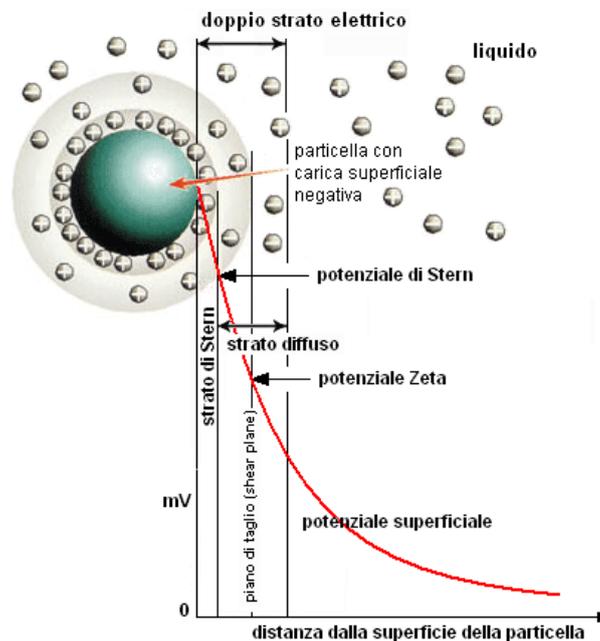


Figura 4.17 Definizione di potenziale  $\zeta$  per le particelle di una dispersione [128]

Per le superficie solide, il concetto di potenziale  $\zeta$  si ripropone in modo simile al caso delle dispersioni, anche se, in questo caso, tale valore è indicativo della carica superficiale che si forma sulla superficie di un materiale massivo posto in contatto con un sistema acquoso elettrolitico. Il comportamento delle cariche all'interfaccia solido-liquido di un materiale massivo viene anch'esso spiegato usando il modello EDL, secondo il quale, a causa della carica che il solido assume in ambiente acquoso, si formano nella fase liquida uno strato stazionario e uno strato mobile diffuso di controioni che compensano la carica superficiale [129]. Il potenziale  $\zeta$ , anche nel caso delle superficie solide, è definito in corrispondenza dello *shear plane*, il piano di taglio, ovvero la zona di scivolamento tra la fase liquida mobile e quella stazionaria fissa. Il concetto di EDL è illustrato schematicamente in maniera molto semplice da comprendere in Figura 4.18 per la situazione in cui una certa superficie possiede una carica uniformemente distribuita che è semplicemente bilanciata dalla carica opposta totale data dall'accumulo dei controioni nel doppio strato elettrico.

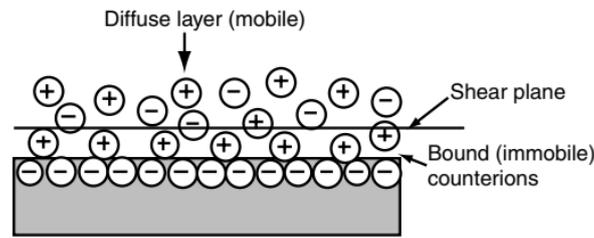


Figura 4.18 Definizione di potenziale  $\zeta$  per una superficie piana [129]

Sono diverse le teorie che permettono di dare una descrizione matematica dell'EDL: la più semplice, e ormai sorpassata, è la teoria di Helmholtz. Questa teoria, in seguito migliorata da Gouy-Chapman ha assunto la sua forma definitiva e più accurata grazie al contributo scientifico di Stern. L'illustrazione delle diverse teorie è presentata, in modo schematico, nella Figura 4.19.

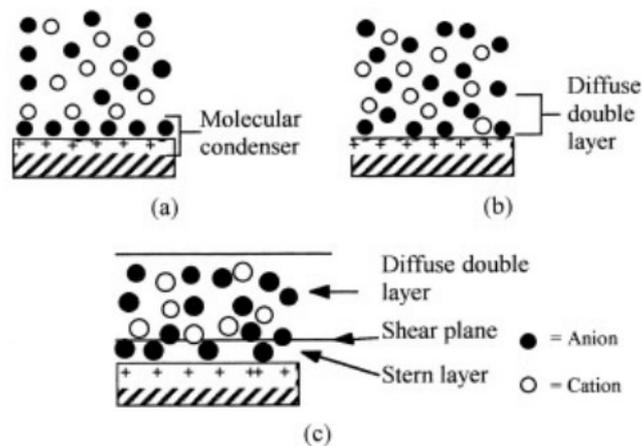


Figura 4.19 Modelli classici di interfaccia superficie piana-elettrolita. (a) modello di Helmholtz, (b) il modello Gouy-Chapman e (c) il modello di Stern [129]

L'idea dell'EDL è stata inizialmente proposta formalmente da Helmholtz, che ha sviluppato il concetto di un sistema con cariche disposte su due piani paralleli come illustrato nella Figura 4.19a. Il modello di Helmholtz, in sostanza, è una sorta di condensatore "molecolare" ed è relativamente facile da descrivere matematicamente. Nella realtà, naturalmente, il moto termico degli ioni in soluzione introduce un certo grado di caoticità che provoca la diffusione degli ioni nella regione della superficie caricata, per cui si assiste alla formazione del doppio strato diffuso. In tal caso, la descrizione matematica dell'ambiente elettronico vicino alla superficie è più complessa e richiede un'analisi più minuziosa. Per questo motivo è stato sviluppato il più accurato modello Gouy-Chapman del doppio strato (Figura 4.19b). Nell'approccio di questi autori, la superficie viene assimilata a un piano infinito sul quale è distribuita una carica elettrica continua a contatto con una

---

soluzione contenente ioni puntiformi di carica opposta. A distanza infinita dalla superficie il potenziale elettrico si identifica con quello della soluzione, mentre in prossimità della superficie esso varia gradualmente sino ad assumere il valore corrispondente alla superficie stessa. In una migliore approssimazione della realtà, poi, è necessario tenere conto che gli ioni occupano una quantità definita di spazio, per cui hanno determinati requisiti sterici. Quest'ultima considerazione porta all'ulteriore affinamento della teoria dell'EDL: il modello di Stern. Questo autore, attribuisce agli ioni un determinato volume, cosicché la distanza dei loro centri dalla superficie non possa essere inferiore al raggio; inoltre, Stern nella sua teoria tiene conto che a brevi distanze dalla superficie possono aver luogo delle interazioni chimiche, associate ai processi di adsorbimento, fra gli ioni e gli atomi della superficie stessa, interazioni che si manifestano quando gli ioni raggiungono una distanza dalla superficie confrontabile con le distanze di legame. In sostanza, il modello prevede l'esistenza dello strato di Stern, cioè un piccolo spazio che separa lo strato diffuso, dove i controioni sono debolmente attratti dalla superficie, dal "muro" sterico presente nello stato stazionario e formato dai controioni più fortemente trattenuti, per ragioni elettrostatiche, al piano carico (Figura 4.19c). Lo spessore dello strato di Stern, mostrato nella Figura 4.19c, è solitamente dell'ordine di pochi nanometri e riflette la dimensione di quei gruppi di ioni carichi trattenuti dalla superficie dotata di carica opposta. In altre parole, il piano di Stern divide in due parti separate l'EDL, localizzandosi ad una distanza circa uguale al raggio dello ione idratato più fortemente attratto dalla carica superficiale dell'oggetto studiato [129].

L'equazione matematica completa per la descrizione dell'EDL secondo il modello di Stern, data la complessità, non viene discussa nell'ambito di questa tesi. Allo scopo della misura della carica superficiale dei campioni prodotti per lo studio dell'adsorbimento proteico, però, è necessario avere ben chiare tutte le nozioni teoriche esposte. Per questo motivo, le ipotesi e le conseguenze correlate all'assunzione del modello di Stern vengono ulteriormente discusse di seguito. La conoscenza del potenziale  $\zeta$  discende infatti dalla misura di fenomeni elettrocinetici, rilevamento connesso a sua volta, come appena anticipato, alla determinazione della carica superficiale di un certo campione oggetto di indagine.

Importante conseguenza dell'esistenza di cariche elettriche (in una situazione statica di equilibrio) all'interfaccia tra solidi e liquidi elettrolitici, porta infatti ad introdurre le seguenti ulteriori considerazioni. Le cariche elettriche all'interfaccia tra solidi e liquidi elettrolitici mostrano

determinati fenomeni sotto l'influenza di un campo elettrico applicato correlato al movimento di parte dell'EDL. Questi fenomeni (illustrati schematicamente nella Figura 4.20, definiti collettivamente come fenomeni elettrocinetici, comprendono quattro classi principali: (a) elettroforesi; (b) elettroosmosi; (c) potenziale di flusso (*streaming potential*); (d) potenziale di sedimentazione (*sedimentation potential*).

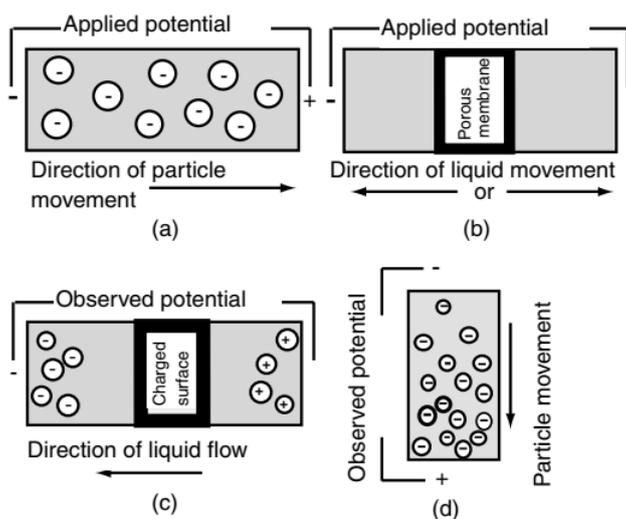


Figura 4.20 Schema delle quattro tipologie di fenomeni elettrocinetici [129]

I fenomeni elettrocinetici originano dal fatto che un liquido, muovendosi tangenzialmente a una superficie, non trascina con sé tutto il doppio strato; solo una parte è libera di muoversi con esso, mentre una parte resta ancorata al solido; si crea così una separazione di cariche parallela all'interfase che dà origine a una differenza di potenziale, come in Figura 4.20(c). Se, viceversa, si applica un campo elettrico, le cariche rispettivamente positive o negative che si sono create nella zona diffusa del doppio strato tendono a migrare verso gli elettrodi di segno opposto, come in Figura 4.20(d). Se il solido è fisso ha luogo uno spostamento della fase liquida, come avviene nella elettroosmosi, come in Figura 4.20(b). Se il solido è invece costituito da una dispersione di particelle, esse tendono a muoversi, come si verifica nella elettroforesi, come in Figura 4.20(a). La classificazione dei fenomeni elettrocinetici è riportata, sinteticamente, in Tabella 4.4.

Tabella 4.4 Classificazione dei fenomeni elettrocinetici [130]

Forze elettriche		Forze meccaniche	
solido fermo	solido in moto	solido fermo	solido in moto
elettroosmosi	elettroforesi	potenziale di flusso	potenziale di sedimentazione

---

Nel seguito della trattazione si concentra l'attenzione solo sulla tecnica del potenziale di flusso (*streaming potential*), in quanto metodo impiegato per la misura del potenziale  $\zeta$  dei campioni prodotti per gli esperimenti.

Quando una soluzione elettrolitica viene fatta scorrere attraverso un capillare per effetto di una differenza di pressione, si riscontra la presenza di una differenza di potenziale elettrico tra due elettrodi posti agli estremi del condotto. Se la soluzione elettrolitica scorre attraverso un capillare, è quindi possibile, a seconda dei casi, misurare una tensione continua o una corrente continua. Il capillare attraverso cui scorre la soluzione acquosa può essere di forma irregolare (come i vuoti tra le particelle di un letto di polvere o le fibre di una matrice fibrosa) oppure regolare (come il canale che si crea tra due superfici planari di un materiale). In ogni caso, quando la soluzione viene fatta scorrere nel capillare si generano delle forze di taglio sui controioni presenti nella parte mobile dell'EDL che si forma in prossimità della superficie del capillare; tali controioni cominciano a muoversi nella direzione del flusso. È così che si genera un potenziale di corrente; la sua origine è proprio questo fenomeno di trasporto, da parte della corrente fluida, degli ioni dell'EDL. In conseguenza di ciò, tra ingresso e uscita del capillare si genera una separazione di carica che crea una forza elettrica che si oppone al flusso. Grazie a due elettrodi posti ai capi del capillare si può così rilevare il potenziale di flusso associato.

Il fenomeno elettrocinetico definito potenziale di flusso si misura proprio in questo modo. Si parte dall'assunto che esista un moto relativo all'interfaccia tra una fase solida e una fase liquida. Quando una soluzione elettrolitica si sposta rispetto ad una superficie carica, infatti, gli effetti di viscosità impongono che solo una certa porzione del EDL (fino allo strato di Stern, circa) si muova. Come ribadito in precedenza, gli ioni nello strato di Stern rimangono relativamente fermi sulla superficie, perché trattenuti elettrostaticamente. Si delinea così la presenza del cosiddetto piano di taglio (*shear plane*), che consiste nella linea di demarcazione tra la zona dove si ha movimento degli ioni in soluzione e la zona dove si hanno invece ioni fissi e trattenuti dalla superficie carica [131].

Se lo strato di Stern viene assimilato a un condensatore di spessore  $\delta$ , la densità di carica alla superficie si può esprimere mediante la relazione

$$\sigma_0 = \frac{\varepsilon}{\delta} (\psi^0 - \psi_\delta) \quad (3)$$

dove  $\psi^0$  è il valore del potenziale in corrispondenza della superficie, mentre  $\psi_\delta$  è il valore di potenziale in corrispondenza della superficie di Stern, che decade verso zero nello strato diffuso, a mano a mano che ci si allontana dalla superficie carica (Figura 4.21), in accordo con una relazione di tipo esponenziale

$$\psi(z) = \psi^0 e^{-\chi z} \quad (4)$$

Il parametro  $\chi$  risulta espresso da

$$\chi^2 = \frac{8 \pi e^2}{\varepsilon k_B T} \sum_i C_i^0 Z_i^2 \quad (5)$$

dove  $e$  è la carica dell'elettrone,  $\varepsilon$  è la costante dielettrica del liquido,  $k_B$  la costante di Boltzmann,  $T$  la temperatura e dove  $C_i^0$  indica la concentrazione dello ione  $i$ -esimo nel cuore della soluzione mentre  $Z_i$  è la carica ad esso associata. L'Equazione (4) è una soluzione approssimata, che fornisce la dipendenza del potenziale dalla coordinata  $z$  secondo l'approssimazione di Debye-Hückel. In accordo con l'Equazione (4) il potenziale decresce quindi esponenzialmente, e il termine  $1/\chi$  ha le dimensioni di una lunghezza e rappresenta lo spessore nel quale è essenzialmente localizzato il doppio strato superficiale.

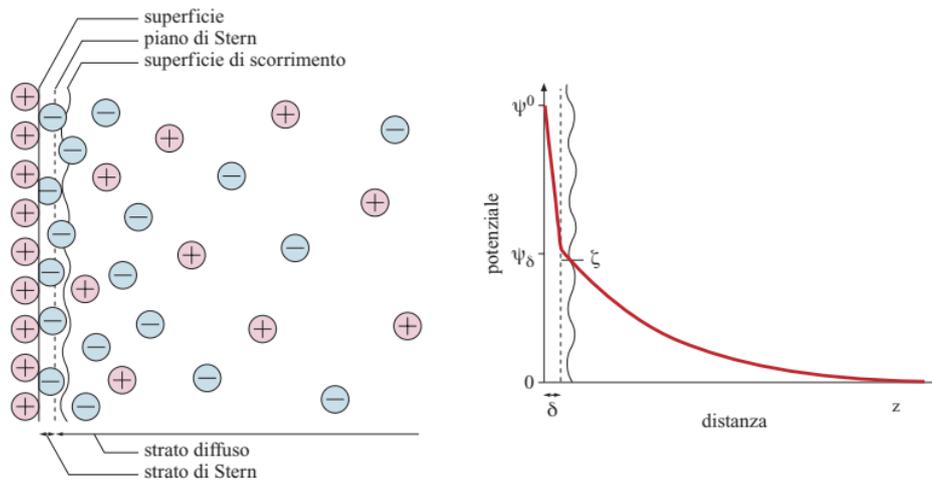


Figura 4.21 Rappresentazione schematica della formazione dell'EDL secondo la teoria di Stern, con il corrispondente andamento del potenziale elettrostatico [131]

Combinando l'equazione di Poisson

$$\frac{d^2\psi}{dz^2} = -\frac{4\pi\rho}{\varepsilon} \quad (6)$$

---

con l'Equazione (4) che descrive l'approssimazione di Debye-Hückel si ottiene la seguente espressione della densità di carica in funzione della coordinata  $z$ :

$$\varrho = -\frac{\varepsilon}{4\pi} \frac{d^2\psi}{dz^2} = -\frac{\varepsilon}{4\pi} \chi^2 \psi^0 e^{-\chi z} \quad (7)$$

dalla quale si ottiene, come valore di densità di carica elettrica superficiale (cioè riferita all'area unitaria)  $\sigma_0$  l'espressione

$$\begin{aligned} \sigma_0 &= -\int_0^\infty \varrho(z) dz = \int_0^\infty \frac{\varepsilon}{4\pi} \frac{d^2\psi}{dz^2} dz = \\ &= -\frac{\varepsilon}{4\pi} \left( \frac{d\psi}{dz} \right)_0 = \frac{\varepsilon \chi \psi^0}{4\pi} \end{aligned} \quad (8)$$

dalla quale si può osservare che il potenziale superficiale  $\psi^0$  è legato sia alla densità di carica superficiale che alla composizione ionica del mezzo. Per esempio, se  $\chi$  aumenta, il doppio strato risulta compresso e quindi o deve aumentare  $\sigma_0$  o deve diminuire  $\psi^0$ .

Nella realtà fisica, andare a misurare sperimentalmente direttamente il valore di  $\psi_\delta$  è impossibile; per farlo sarebbe necessario porre un elettrodo nel piano che passa attraverso il centro del primo strato di atomi adsorbiti. È tuttavia possibile determinare la quantità più prossima a  $\psi_\delta$ : il potenziale  $\zeta$ , mediante misure che coinvolgono il moto relativo della superficie solida rispetto al liquido, cioè misure di natura elettrocinetica. Se si considera una superficie piana lambita da una corrente fluida in moto laminare si può infatti definire un piano ideale a essa parallelo, dove è localizzata la sollecitazione di taglio e in corrispondenza del quale si manifesta una rapida variazione di viscosità. In realtà, la posizione esatta di questo piano, come già anticipato, non è nota, anche perché agli ioni superficiali si debbono aggiungere delle molecole di solvente. Si può però ragionevolmente assumere che tale piano sia posto a una distanza poco al di fuori del piano di Stern, per cui il potenziale  $\zeta$  risulta marginalmente inferiore a  $\psi_\delta$  (si veda ancora la Figura 4.21). Spesso si assume addirittura che i valori di  $\zeta$  e  $\psi_\delta$  si identifichino. La determinazione della posizione esatta del piano di taglio non è banale. Il piano di taglio, in realtà, è una regione molto sottile in cui gli effetti di viscosità cambiano rapidamente ed è dunque difficile da determinare per posizione. Gli errori più significativi, che possono accadere quando si misura il potenziale in corrispondenza del piano di taglio, possono essere dovuti a: potenziali elevati; alte concentrazioni di elettroliti; presenza di specie non ioniche voluminose adsorbite che ingombrano e fanno

---

---

spostare il piano di taglio più lontano dalla superficie. Di solito si presume che tale piano si trovi appena al di fuori dello strato di Stern e, in corrispondenza di esso, si cerca di misurare il potenziale  $\zeta$ .

In conclusione, per capire come nella pratica si risale alla misura del potenziale  $\zeta$  nel presente caso di studio, è necessario introdurre l'Equazione (9), che si rivela fondamentale per correlare il potenziale di flusso al potenziale  $\zeta$ :

$$\zeta = \frac{I_{str}}{\Delta p} \frac{\mu}{\varepsilon \varepsilon_0} \frac{l}{A} \quad (9)$$

L'Equazione (9), nota come equazione di Helmholtz-Smoluchowski, fornisce una relazione lineare fra la portata del liquido e il potenziale  $\zeta$  e gioca un ruolo importante nello studio dei fenomeni elettrocinetici. Poiché non contiene parametri geometrici caratteristici del sistema in esame, questa espressione offre uno strumento per risalire direttamente al valore del potenziale  $\zeta$  dai valori misurati [132]. La sua validità è stata confermata dai risultati sperimentali, i quali mostrano che l'intensità della corrente è proporzionale alla portata volumetrica. L'applicazione dell'equazione di Helmholtz-Smoluchowski richiede però una conoscenza esatta della geometria del canale di flusso (cioè la costante di cella  $l/A$ ). Per una cella rettangolare sottile, ad esempio, la lunghezza  $L$  e la larghezza  $W$  sono determinate dalla dimensione del campione solido. L'altezza della distanza  $H$  viene calcolata dalla portata del volume misurato del liquido che passa attraverso il canale di flusso e dalla pressione differenziale generata.

La misura di potenziale  $\zeta$  appena descritta in termini matematici nel modo più generico possibile, in sostanza, dipende da molti differenti parametri. Come riportato in Tabella 4.5 il potenziale  $\zeta$  all'interfaccia solido-liquido è influenzato da una serie di differenti proprietà sia del materiale solido che della fase liquida. Queste proprietà sono riassunte nella Tabella 4.5; la loro influenza sulla misura non viene approfondita nel dettaglio, ma verrà affrontato nel commento dei risultati degli esperimenti eseguiti.

Tabella 4.5 Proprietà solide, liquide e interfacciali che influenzano il potenziale zeta all'interfaccia solida liquida [130]

Proprietà del liquido	Proprietà del solido	Altro
Valore di pH	Dimensione	
Forza ionica	Porosità	Temperatura
	Conduttanza elettronica	
	Rugosità superficiale	

In aggiunta, poi, per le misure di potenziale di flusso assumono importanza particolare anche gli aspetti della portata volumetrica della soluzione e della dimensione del capillare utilizzato per le analisi.

Per quanto riguarda l'effetto della forza ionica dell'elettrolita sulla riproducibilità della misura di potenziale  $\zeta$  con il metodo del potenziale di corrente, non ci sono grandi incertezze. Gli esperimenti possono essere condotti andando ad utilizzare una soluzione acquosa di forza ionica nota. Tipicamente, si utilizza un elettrolita con rapporto di diluizione 1:1 (NaCl, KCl, KNO<sub>3</sub>) alla forza ionica di 0,001 mol/l. Per quanto riguarda gli altri parametri, il macchinario preposto alla misura del potenziale  $\zeta$  è pensato per avere controllo su ogni aspetto dell'indagine.

La configurazione minima di un apparato per la misura del potenziale di flusso richiede una cella di misura con un supporto del campione appropriato per i materiali solidi in esame, elettrodi per la misurazione del potenziale di flusso (tensione continua) e un voltmetro, nonché un contenitore con liquido di misurazione collegato alla cella di misura. L'intera apparecchiatura deve essere protetta da campi elettromagnetici esterni; questo, tipicamente, viene effettuato isolando la cella dai disturbi dati dalle interferenze esterne grazie alla realizzazione di una gabbia metallica collegata a terra. In sistemi semplici come questo la conducibilità elettrica e il pH della soluzione acquosa devono essere misurati separatamente rispetto al potenziale  $\zeta$ . Le apparecchiature più recenti e sofisticate per la misurazione del potenziale di flusso hanno un generatore di forza motrice integrata per mettere in moto la soluzione di misurazione (ad es. un collegamento con una pompa pneumatica a pistone) e dei trasduttori di pressione collegati a un manometro. Aggiungendo a questo insieme di elementi anche i sensori per la misura del pH e della conduttività, si ottiene un dispositivo completo per l'analisi del potenziale  $\zeta$ . Il pH, in particolare, è il più importante parametro della fase liquida che influenza la misura del potenziale  $\zeta$ ; i dati delle

---

misure di potenziale  $\zeta$ , infatti, sono riferiti al pH della soluzione acquosa utilizzata per l'analisi della carica superficiale dei campioni. La relazione tra pH e potenziale  $\zeta$  misurato in ciascun esperimento, a sua volta, rende possibile una stima del punto isoelettrico (*IsoElectric Point*, IEP) della superficie oggetto di indagine; in altre parole, diventa possibile individuare il valore di pH al quale la superficie analizzata presenta carica elettrica netta nulla, e dunque un equilibrio tra i gruppi superficiali carichi positivamente e negativamente. Questo valore, come si vedrà nel dettaglio nel Capitolo 5, è definibile andando ad individuare il valore di pH per il quale il potenziale  $\zeta$  misurato cambia di segno (dove, di fatto,  $\zeta$  assume il valore di 0 mV).

La configurazione dell'apparecchiatura utilizzata per eseguire le misure di potenziale  $\zeta$  nel presente lavoro di tesi è riportata in Figura 4.22 ed è relativa ad un macchinario SurPASS electrokinetic analyzer (Anton Paar, Graz, Austria). L'attrezzatura associata è costituita da una cella di misura con porta-campioni, due elettrodi, un voltmetro, un contenitore contenente il liquido di misura. La cella è schermata dall'ambiente esterno mediante una gabbia metallica messa a terra. A questa configurazione si aggiungono una pompa, dei trasduttori di pressione e delle sonde per la misura del pH e della conduttività della soluzione, come mostrato sempre in Figura 4.22.

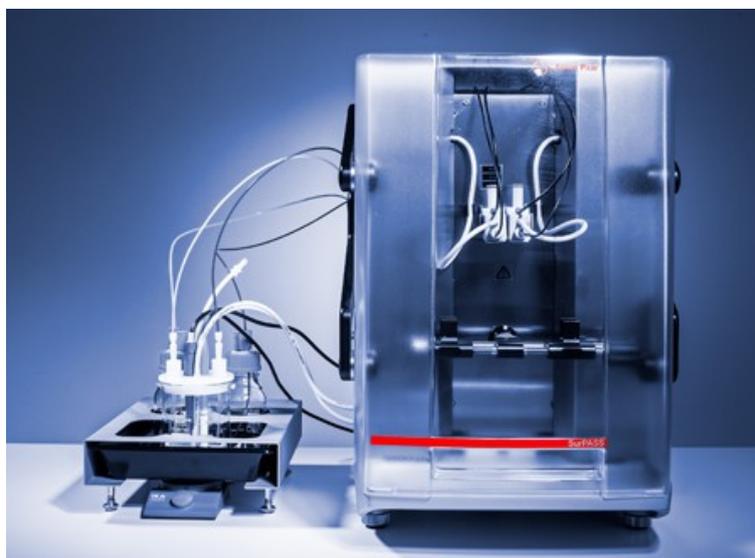


Figura 4.22 SurPASS electrokinetic analyzer per la misura del potenziale  $\zeta$  della superficie di solidi macroscopici [133]

La cella del SurPASS è dotata di un sistema *adjustable gap cell*, ovvero un sistema in cui la distanza tra i campioni all'interno della cella di misura (e dunque la distanza stessa disponibile per il passaggio del volume di flusso) è regolabile in modo automatizzato. Una cella di questo tipo, con

---

apertura regolabile, si rivela particolarmente conveniente per l'analisi del potenziale  $\zeta$  di piccoli campioni con una superficie planare.

Grazie a tale strumento è stato possibile indagare l'effetto dell'adsorbimento proteico sulla determinazione della carica superficiale dei campioni in lega di titanio oggetto di studio nel presente lavoro di tesi. L'analisi degli effetti del semplice adsorbimento/desorbimento di specie molecolari o macromolecolari su superfici solide è così pensabile da realizzare.

Allo scopo di rendere l'informazione derivante dagli esperimenti il più esaustiva possibile sono stati testati i gruppi di campioni riportati di seguito:

- Ti6Al4V – MP;
- Ti6Al4V – CT;
- Ti6Al4V – MP su cui è stata fatta adsorbire albumina (Ti6Al4V – MP + BSA);
- Ti6Al4V – MP su cui è stata fatta adsorbire fibronectina (Ti6Al4V – MP + BFN);
- Ti6Al4V – MP su cui è stato fatto adsorbire siero fetale bovino (Ti6Al4V – MP + FBS);
- Ti6Al4V – CT su cui è stata fatta adsorbire albumina (Ti6Al4V – CT + BSA);
- Ti6Al4V – CT su cui è stata fatta adsorbire fibronectina (Ti6Al4V – CT + BFN);
- Ti6Al4V – CT su cui è stato fatto adsorbire siero fetale bovino (Ti6Al4V – CT + FBS).

I diversi campioni sono stati analizzati in coppia. Per fare ciò, entrambi i campioni sono stati fissati ad appositi porta-campioni con uno speciale adesivo. I porta-campioni sono stati inseriti nella specifica collocazione prevista dalle istruzioni, in modo da assumere la corretta posizione ed essere ben sistemati all'interno della cella di misura (Figura 4.23).



Figura 4.23 Cella di misura dello strumento SurPASS electrokinetic analyzer [134]

---

L'intero sistema è realizzato in modo tale da lasciare un piccolo *gap*, una piccola distanza, tra le superficie dei campioni montati all'interno della cella. Tale distanza, fissata in un primo momento in modo empirico dall'operatore che esegue l'esperimento, viene in seguito regolata automaticamente dall'apparecchiatura al valore iniziale di 100  $\mu\text{m}$  nella fase preliminare di aggiustamento dei parametri di misura.

Prima di montare la cella, viene di prassi eseguito un lavaggio della conduttura interna dello strumento con acqua Milli-Q; in questa fase preparatoria, si interpone tra gli elettrodi della cella di misura una sorta di dotto conduttivo. A macchinario allestito debitamente per la misura, si cominciano le procedure per il riempimento a circuito chiuso del macchinario utilizzando come liquido elettrolitico una soluzione diluita di 0,045 mg di cloruro di potassio (KCl) in 500 ml di acqua Milli-Q. Segue una fase di controllo del flusso automatizzata; in tale passaggio, il software dello strumento restituisce un grafico del flusso (ml/min) in funzione della pressione (mbar), tracciando due curve, una relativa al flusso con direzione da sinistra a destra e l'altra relativa al flusso nella direzione opposta. La soluzione è infatti fatta circolare attraverso la cella di misura che contiene i campioni. La disposizione stessa dei campioni, come ribadito più volte in precedenza, rappresenta una sorta di resistenza meccanica e il flusso del liquido genera una pressione differenziale tra l'ingresso e l'uscita della cella di misura. Le cariche elettriche, che si accumulano all'interfaccia tra la superficie solida e il liquido circostante, in corrispondenza dello strato di Stern, slittano e si ha così un accumulo ad una estremità della cella di misura. La differenza di potenziale che si genera viene rilevata dagli elettrodi in argento/argento clorurato (Ag/AgCl). Rilievi di questo tipo permettono di individuare il valore della pressione differenziale da impostare per avere un flusso di 100 ml/min. Una volta impostato il macchinario in modo corretto, si procede con la misura vera e propria del potenziale  $\zeta$ . Si eseguono due serie di prove: una titolazione acida; una titolazione basica.

La titolazione acida si esegue facendo uso di una soluzione diluita di acido cloridrico in acqua (0,05 M). Tale soluzione viene aggiunta all'elettrolita di misura secondo quantità impostate dall'operatore in modo da consentire una titolazione punto per punto del range acido; ciò che risulta dall'esperimento, di fatto, è un insieme di valori utili a descrivere la carica superficiale dei campioni esaminati. Il software incorporato nella macchina, infatti, è in grado di restituire diversi parametri: il pH della soluzione che scorre nella cella, la conduttività della soluzione, la

---

---

temperatura della cella, la corrente di flusso misurata dagli elettrodi, la pressione differenziale ai lati della cella e il flusso all'interno della camera di misura. Per ciascun punto di pH analizzato, la macchina raccoglie quattro misure da cui è possibile stimare il valor medio. Terminata la titolazione acida, si lava accuratamente lo strumento; di prassi si eseguono due lavaggi con acqua Milli-Q, lasciando la cella montata. Una volta lavato lo strumento, è possibile procedere con la titolazione basica, che si svolge in modo quasi del tutto analogo a quanto descritto per la titolazione acida; la differenza sostanziale sta solamente nella soluzione impiegata per la sperimentazione, perché nella titolazione basica viene impiegata una soluzione diluita di idrossido di sodio (NaOH) 0,05 M che viene aggiunta all'elettrolita di misura secondo un programma definito dall'operatore per ottenere un numero significativo di punti pH nel range basico. Anche al termine della titolazione basica è buona prassi lavare con cura lo strumento eseguendo due lavaggi con acqua Milli-Q. Terminati i due cicli (acido e basico) è possibile smontare l'apparecchiatura.

Ai fini del presente studio, si deve sottolineare, però, che non sempre è stato possibile utilizzare la stessa coppia di campioni sia per la titolazione acida che per la titolazione basica. Per i campioni sui quali sono stati eseguiti gli esperimenti per la valutazione dell'adsorbimento proteico, infatti, si è ritenuto necessario andare a sostituire i campioni utilizzati tra una titolazione e l'altra per evitare artefatti legati alla reattività delle superfici a contatto con soluzioni acide o basiche. Nel capitolo 5, relativo ai risultati degli esperimenti per la determinazione del potenziale  $\zeta$ , questo aspetto verrà messo in evidenza in una maniera opportuna a dare un'indicazione precisa sulla modalità di svolgimento degli esperimenti.

Una volta rilevati ed elaborati i dati relativi ai due cicli (acido/basico) per ciascun gruppo di campioni è possibile andare a tracciare delle curve su di un piano bidimensionale dove: in ascissa viene riportato il pH della soluzione per la misura del potenziale di corrente; in ordinata si ha la misura del potenziale  $\zeta$  associata alla superficie studiata al determinato pH. Da questi grafici, come anticipato, è possibile stimare il punto isoelettrico (pI) della superficie analizzata, ed è possibile, di conseguenza, formulare ipotesi sulla carica superficiale che la superficie stessa mostra nei confronti dei fluidi che la lambiscono. Queste ipotesi possono costituire un valido punto di partenza nell'interpretazione del comportamento della superficie studiata in ambiente biologico, poiché è noto come la carica superficiale di un materiale vada ad influenzare le interazioni che il materiale può esprimere in vivo, una volta impiantato.

---

I risultati delle misure di potenziale  $\zeta$  per la valutazione dell'adsorbimento proteico, messi a confronto, sono presentati e commentati in dettaglio nella nel Capitolo 5.

---

---

# Capitolo 5

## 5 Risultati

In questo capitolo vengono riportati i risultati delle analisi eseguite sui campioni per la valutazione dell'adsorbimento proteico. La prima parte dei risultati è relativa alla caratterizzazione superficiale dei campioni oggetto di analisi, mentre la seconda parte è relativa alle analisi biochimiche, di citocompatibilità e di attività antibatterica effettuate sui campioni.

A giustificare l'utilizzo in parallelo di più metodiche di indagine per la caratterizzazione dei campioni è la necessità di comprendere il fenomeno di adsorbimento proteico nel suo insieme, da più punti di vista. Non risulterebbe possibile, mediante un'unica tecnica di analisi, ottenere dati di comprovata validità. Occorre invece effettuare misure attraverso metodi differenti, per poi andare ad incrociare e/o sovrapporre gli esiti. Si tratta dell'unica strategia disponibile per andare a stabilire se le osservazioni sperimentali, derivate da considerazioni teoriche, hanno un riscontro nei risultati generati nei mesi di lavoro svolto in laboratorio.

### 5.1 Risultati delle analisi di caratterizzazione superficiale

Facendo riferimento alla terminologia introdotta nel Capitolo 4, sono riportati nel seguito i risultati relativi alla caratterizzazione superficiale dei campioni.

#### 5.1.1 Spettroscopia fotoelettronica a raggi X (XPS/ESCA)

In questa sezione sono riportati i risultati relativi all'analisi XPS. L'XPS è impiegata per l'analisi della composizione chimica dello strato superficiale più esterno (4-5 nm) dei campioni Ti6Al4V – MP e Ti6Al4V – CT prima e dopo l'adsorbimento delle proteine. Sono riportati, per ciascuno dei campioni analizzati, lo spettro *survey* e gli spettri *high resolution* dei principali elementi di interesse.

##### 5.1.1.1 Ti6Al4V – MP e Ti6Al4V - CT

In primo luogo, è stata eseguita un'analisi delle superfici dei campioni Ti6Al4V – MP e Ti6Al4V – CT tal quali. I risultati dell'analisi XPS del campione Ti6Al4V – MP e del campione Ti6Al4V – CT

hanno portato ad acquisire gli spettri di *survey* riportati a confronto in Figura 5.1 e i risultati riportati in Tabella 5.1.

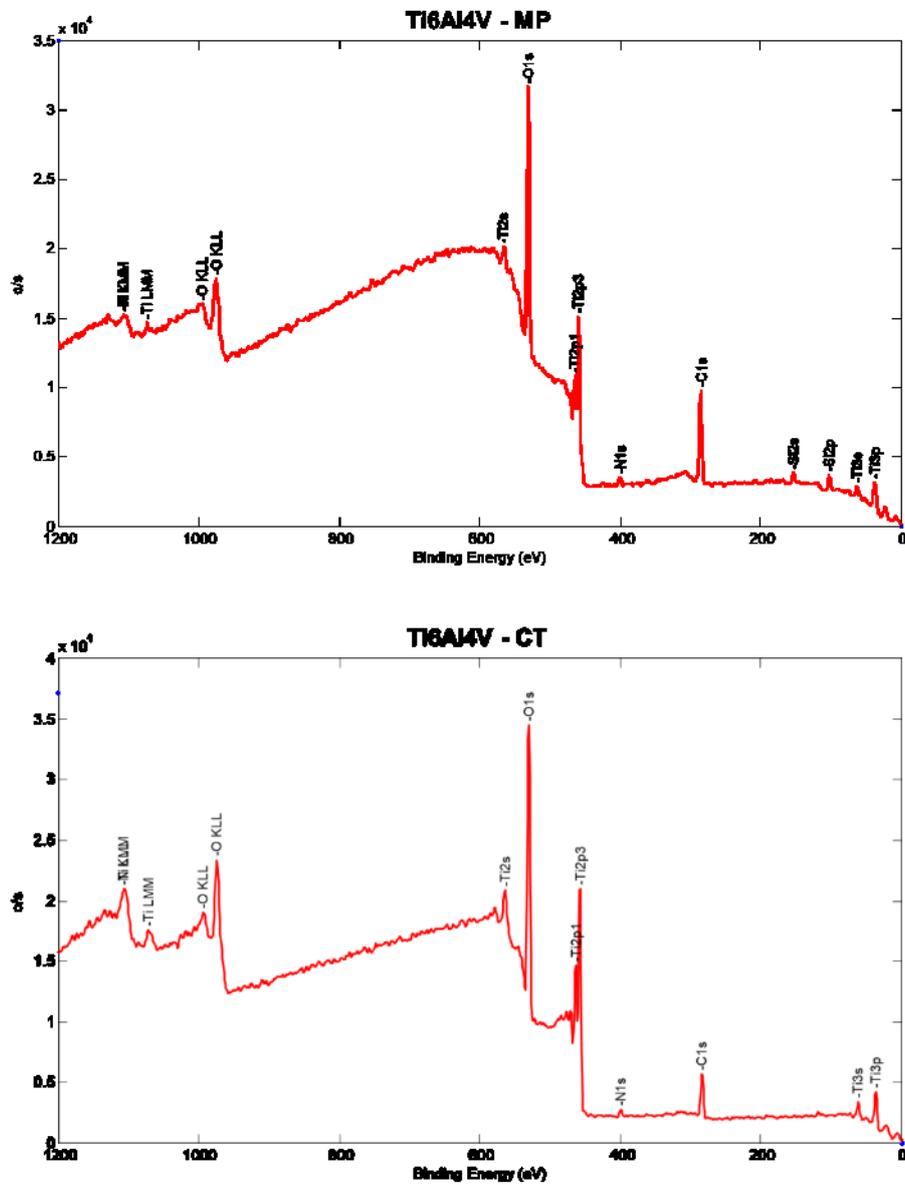


Figura 5.1 Spettri survey delle superfici Ti6Al4V – MP e Ti6Al4V – CT

Tabella 5.1 Composizione chimica superficiale delle superfici Ti6Al4V – MP e Ti6Al4V – CT

	Composizione chimica (% at)				
	O	C	Ti	Si	N
Ti-6Al-4V - MP	43,5	39,4	10,7	4,4	2,1
Ti-6Al-4V - CT	60,7	20,7	16,2		2,3

---

Ad una prima osservazione, si può già notare come vi sia una differenza rilevabile nella quantità di O presente sulla superficie dei campioni. La presenza di O sul campione Ti6Al4V – CT è superiore in confronto a quanto presente sul campione Ti6Al4V – MP. Anche la percentuale atomica di C è differente sul campione Ti6Al4V - MP rispetto al campione Ti6Al4V – CT. Va innanzitutto tenuto presente che, essendo il titanio un metallo molto reattivo, è normale trovarvi sulla superficie una significativa quantità di C in generale. Trovare una significativa presenza di C su entrambi i substrati all'analisi superficiale è dunque un risultato atteso, proprio per via dell'inevitabile adsorbimento da parte delle superfici di titanio degli idrocarburi contenuti nell'atmosfera. Tuttavia, nel caso della superficie del campione Ti6Al4V – MP oggetto di studio, il C è presente in maggior quantità rispetto a quanto riscontrabile sul campione Ti6Al4V – CT e ciò non si ritiene possa essere completamente spiegato con l'adsorbimento di contaminanti derivati da composti atmosferici. È molto più probabile, invece, che la presenza elevata di C sul campione Ti6Al4V – MP dipenda da una contaminazione da parte del fluido utilizzato in fase di lucidatura a specchio (silice colloidale), cosa che spiega anche l'origine della presenza di Si rilevata sul campione Ti6Al4V – MP, sempre attribuibile all'effetto di contaminazione conseguenza della lucidatura. Per quanto riguarda N, invece, si ha la presenza di un contributo minimo, ma comunque rilevabile, dell'elemento su entrambi i campioni e si pensa che la sua comparsa sia attribuibile, anche in questo caso, agli effetti della contaminazione atmosferica.

Gli spettri ad alta risoluzione acquisiti per il carbonio (C1s) e l'ossigeno (O1s) del campione Ti6Al4V – MP e del campione Ti6Al4V – CT sono discussi dettagliatamente nel seguito.

Per quanto riguarda gli spettri XPS C1s, quello che si osserva (Figura 5.2 e Figura 5.3) è la presenza, su entrambe le tipologie di campioni, di un picco di emissione intorno ad una energia di legame approssimativamente pari a 284,8 eV associato alla presenza di componenti idrocarburici del tipo C-C, C-O-C e O-C=O. La maggior parte dei campioni che sono stati esposti all'atmosfera, infatti, presenta tipicamente una quantità nettamente rilevabile di contaminazione da carbonio cosiddetto avventizio (in genere, con uno spessore di 1 o 2 nm). Le posizioni degli altri picchi presenti sugli spettri C1s sono invece caratteristiche di specie organiche ed idrocarburiche contenenti ossigeno.

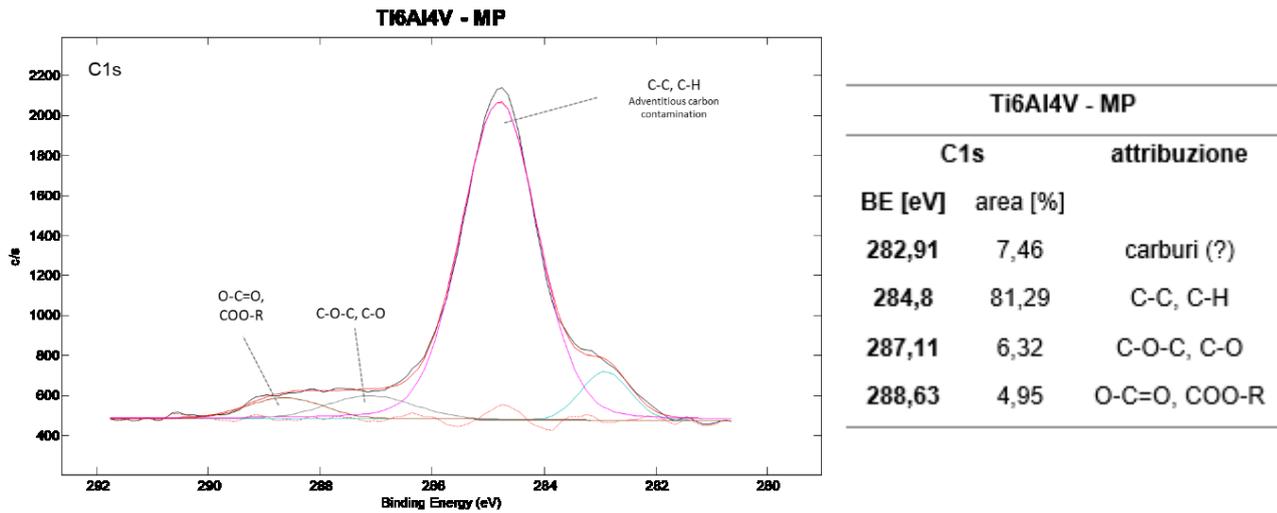


Figura 5.2 A sinistra, spettro XPS ad alta risoluzione di C1s del campione Ti6Al4V – MP. A destra riepilogo delle posizioni dei picchi e relative attribuzioni

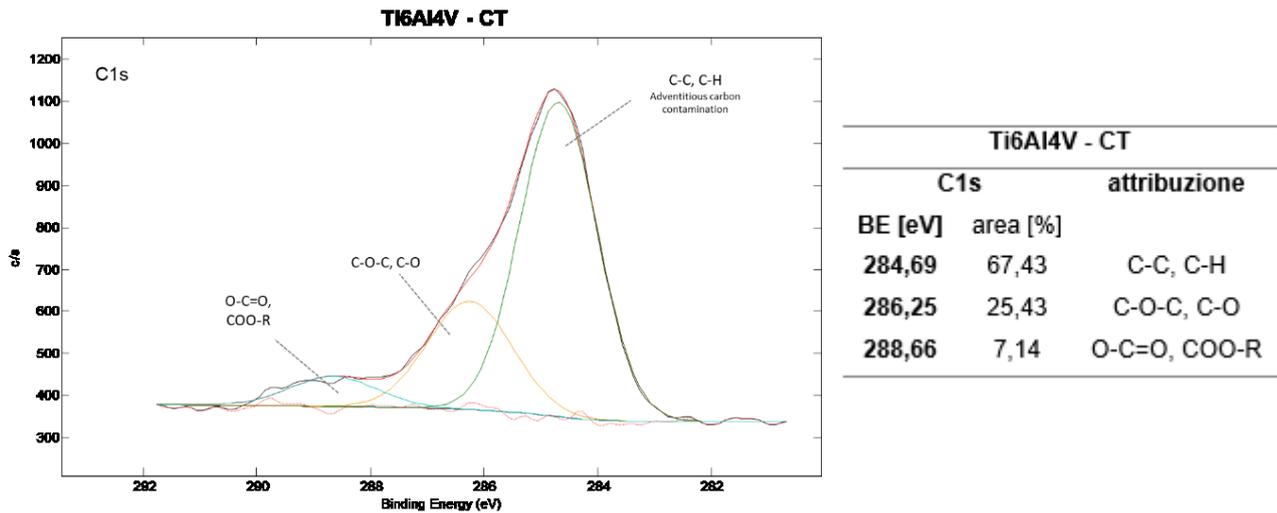


Figura 5.3 A sinistra, spettro XPS ad alta risoluzione di C1s del campione Ti6Al4V – CT. A destra riepilogo delle posizioni dei picchi e relative attribuzioni

Per quanto riguarda gli spettri XPS O1s, invece, è necessario approfondire e confrontare in dettaglio gli andamenti riportati nei due grafici di Figura 5.4 e Figura 5.5. Sia gli spettri Ti6Al4V – MP che Ti6Al4V – CT, infatti, presentano un valore del picco associato all'emissione di fotoelettroni O1s approssimativamente intorno ai 530,3 eV, tipico per l'ossido di titanio (TiO<sub>2</sub>). Nella gamma di energie di legame comprese tra i 532-534 eV si osservano, al contrario, generalmente specie contenenti ossigeno organico e ossidi di diversi altri metalli. In particolare, però, il confronto dettagliato della regione degli spettri O1s tra i 532-534 eV evidenzia un significativo aumento del segnale degli ossidrili (Ti-OH) sul campione Ti6Al4V – CT rispetto a quello Ti6Al4V – MP. Questo risultato è in accordo con i risultati degli esperimenti e delle

osservazioni eseguite in passato sulle superfici trattate chimicamente con il processo brevettato [119], perché sembra confermare la capacità del processo innovativo di garantire un alto grado di idrossilazione della superficie Ti6Al4V – CT rispetto alla controparte Ti6Al4V – MP.

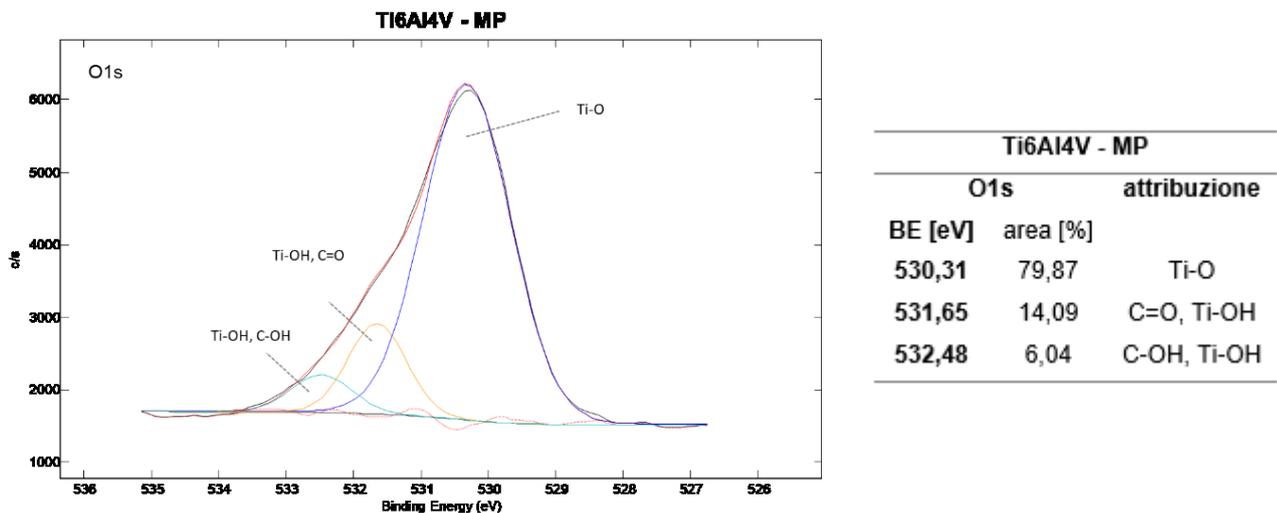


Figura 5.4 A sinistra, spettro XPS ad alta risoluzione di O1s del campione Ti6Al4V – MP. A destra riepilogo delle posizioni dei picchi e relative attribuzioni

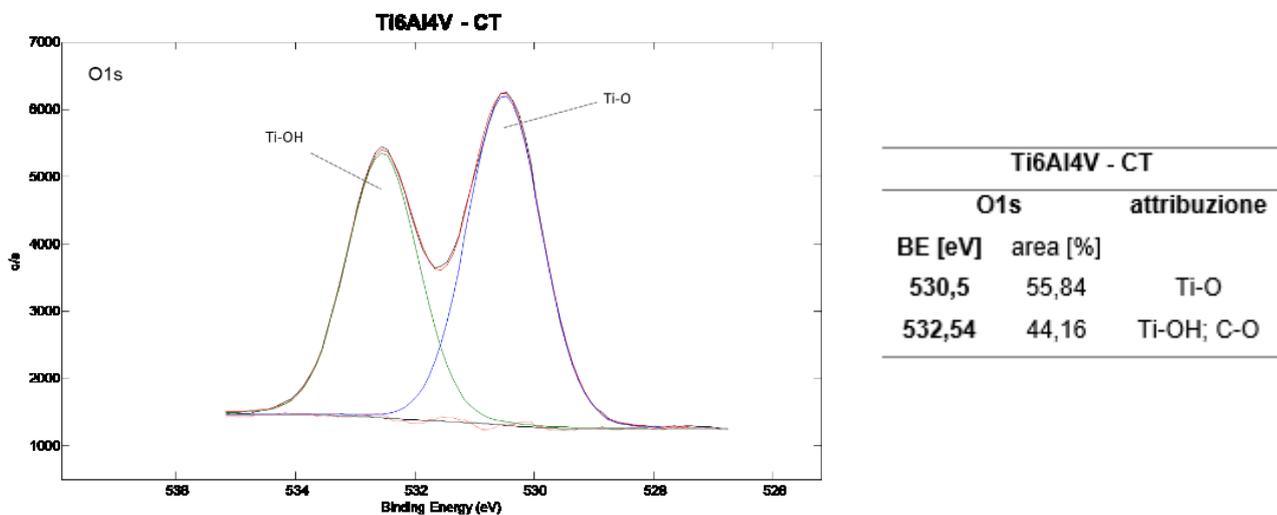


Figura 5.5 A sinistra, spettro XPS ad alta risoluzione di O1s del campione Ti6Al4V – CT. A destra riepilogo delle posizioni dei picchi e relative attribuzioni

Maggiore è la presenza di gruppi ossidrilici esposti sulla superficie, maggiore dovrebbe risultare la bagnabilità e la bioattività superficiale (e anche la potenziale predisposizione della superficie ad essere funzionalizzata con varie tipologie di molecole organiche). Anche questo risultato sembra essere confermato, in base ai risultati delle prove di bagnabilità e alle misure di potenziale  $\zeta$  che sono riportate nelle sezioni successive del presente capitolo.

Per quanto riguarda invece gli spettri XPS Ti2p quello che si può notare è la presenza, per entrambi i campioni Ti6Al4V – MP e al Ti6Al4V – CT, dei segnali associati all'ossido di titanio (in cui il titanio assume però diversi stati di valenza).

Il confronto tra gli spettri ad alta risoluzione relativi al Ti6Al4V – MP e al Ti6Al4V – CT è riportato in Figura 5.6.

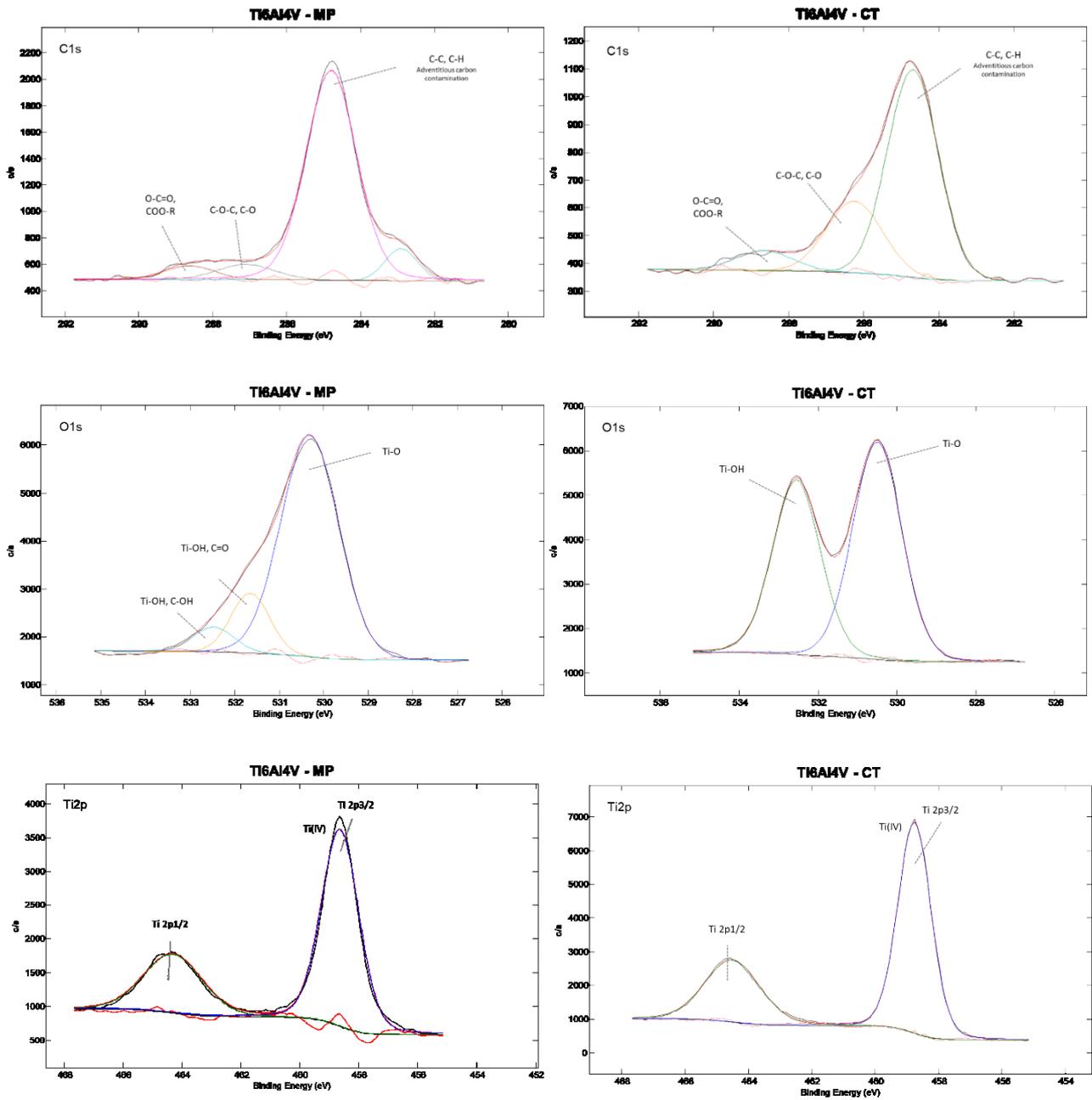


Figura 5.6 Presentazione schematica e riassuntiva degli spettri ad alta risoluzione (C1s, O1s e Ti2p) dei campioni Ti6Al4V – MP e Ti6Al4V – CT

---

In secondo luogo, sono state valutate le superfici dei campioni Ti6Al4V – MP e Ti6Al4V – CT soggette ad adsorbimento di proteine. Sono state testate le tre diverse soluzioni citate nel Capitolo 4: la soluzione di albumina, di fibronectina e il siero fetale bovino (abbreviate BSA, FBN e FBS rispettivamente).

Si è scelto di riportare, nell'ordine, prima i risultati relativi alle superficie Ti6Al4V – MP e poi quelli relativi alle superficie Ti6Al4V – CT per ciascun esperimento di adsorbimento portato a termine.

#### **1.1.1.1 Ti6Al4V - MP adsorbimento BSA**

I risultati dell'analisi XPS dei campioni Ti6Al4V – MP sui quali è stata adsorbita la BSA sono riportati schematicamente di seguito.

**Spettri survey Ti6Al4V - MP e Ti6Al4V - MP + BSA.** In Figura 5.7 ed in Tabella 5.2 compaiono, a confronto, gli spettri *survey* dei campioni Ti6Al4V – MP prima e dopo adsorbimento proteico con BSA.

Nel caso dei campioni Ti6Al4V – MP, ad un primo esame, si può già osservare come vi sia una differenza rilevabile nella quantità di O e C presenti sulla superficie dei campioni, con O prevalente sulla superficie Ti6Al4V – MP e in quantità inferiore sulla superficie Ti6Al4V – MP + BSA, mentre C viceversa. Tale risultato può essere interpretato come indice dell'avvenuto adsorbimento proteico. Il fatto che il segnale del Ti sia ridotto, sui campioni adsorbiti, può essere anch'esso interpretato come indice dell'avvenuto adsorbimento proteico. Una volta adsorbita, è infatti la BSA che costituisce il sottilissimo strato che viene rilevato dall'analisi XPS. Ecco spiegato come mai il Ti è ben rilevato sui campioni Ti6Al4V – MP mentre compare in modesta quantità sulla superficie Ti6Al4V – MP + BSA. La presenza di N, che si rileva in percentuale maggiore sul campione Ti6Al4V – MP + BSA e inferiore sul campione Ti6Al4V – MP, è da interpretarsi, per il campione Ti6Al4V - MP come attribuibile a contaminazione ambientale mentre per il campione Ti6Al4V – MP + BSA come attribuibile a due diversi contributi: uno, conseguenza della contaminazione ambientale e l'altro conseguenza dell'avvenuto adsorbimento proteico. La presenza di Si rilevata sul campione Ti6Al4V – MP, come già anticipato in precedenza, è anche in questo caso attribuibile ad un effetto di contaminazione derivante dalla lucidatura a specchio dei campioni.

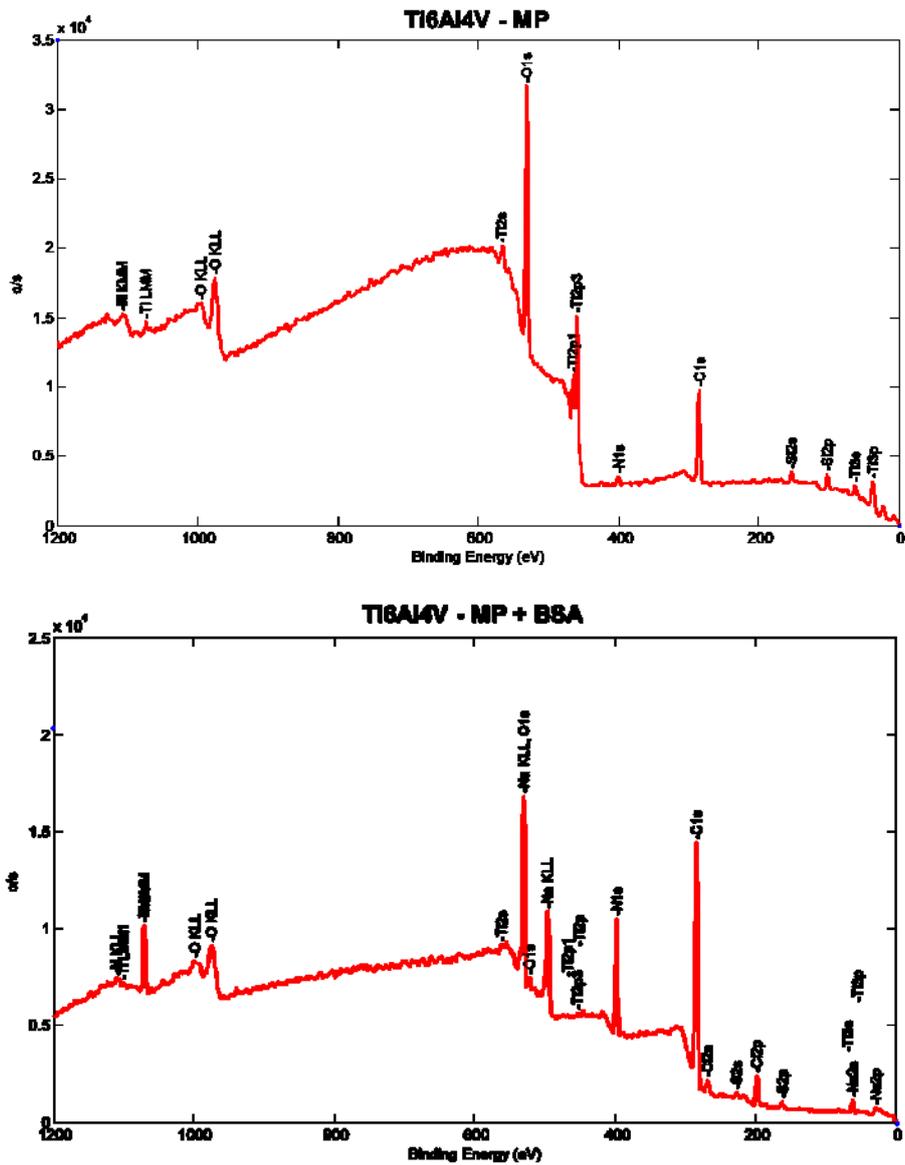


Figura 5.7 Spettri survey delle superfici Ti6Al4V – MP prima e dopo adsorbimento di BSA

Tabella 5.2 Composizione chimica superficiale delle superfici Ti6Al4V – MP e Ti6Al4V – MP + BSA

	Composizione chimica (% at)							
	O	C	Ti	Si	N	S	Na	Cl
Ti6Al4V - MP	43,5	39,4	10,7	4,4	2,1			
Ti6Al4V - MP + BSA	15,5	62,3	<0,1		15,6	0,7	4,0	1,9

La presenza di S sulla superficie del campione Ti6Al4V – MP + BSA è da interpretarsi di nuovo come indice dell'avvenuto adsorbimento proteico; S è un componente fondamentale della BSA la cui struttura amminoacidica è caratterizzata dalla presenza di ponti disolfuro. Le modeste quantità

di Na e Cl, infine, sono da attribuirsi agli effetti dell'adsorbimento di ioni della soluzione PBS da parte della superficie Ti6Al4V – MP.

**Spettri high resolution Ti6Al4V - MP e Ti6Al4V - MP + BSA.** I risultati dell'analisi XPS dei campioni Ti6Al4V – MP prima e dopo l'adsorbimento di BSA per quanto riguarda gli spettri ad alta risoluzione di C1s, O1s e N1s sono discussi in dettaglio. In particolare, l'analisi degli spettri ad alta risoluzione dei campioni Ti6Al4V – MP + BSA di C1s, O1s e N1s permette di fare le seguenti osservazioni.

Per quanto riguarda lo spettro XPS C1s, quello che si osserva, dopo l'adsorbimento di BSA, è la presenza di tre diversi picchi che danno un contributo a formare lo spettro C1s (Figura 5.8). Questi tre picchi corrispondono ad atomi di carbonio in differenti condizioni ambientali e di legame, per cui si può identificare: un picco associato alla presenza di legami idrocarburici saturi (-CH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>-) derivanti da contaminazione ambientale, con una BE approssimativamente pari a 284,67 eV; un picco, leggermente spostato, associato alla presenza di gruppi amminici (-C-NH-) con una BE di circa 285,44 eV; un picco associato alla presenza del legame peptidico (-C=O-NH-) con BE pari a 287,97 eV.

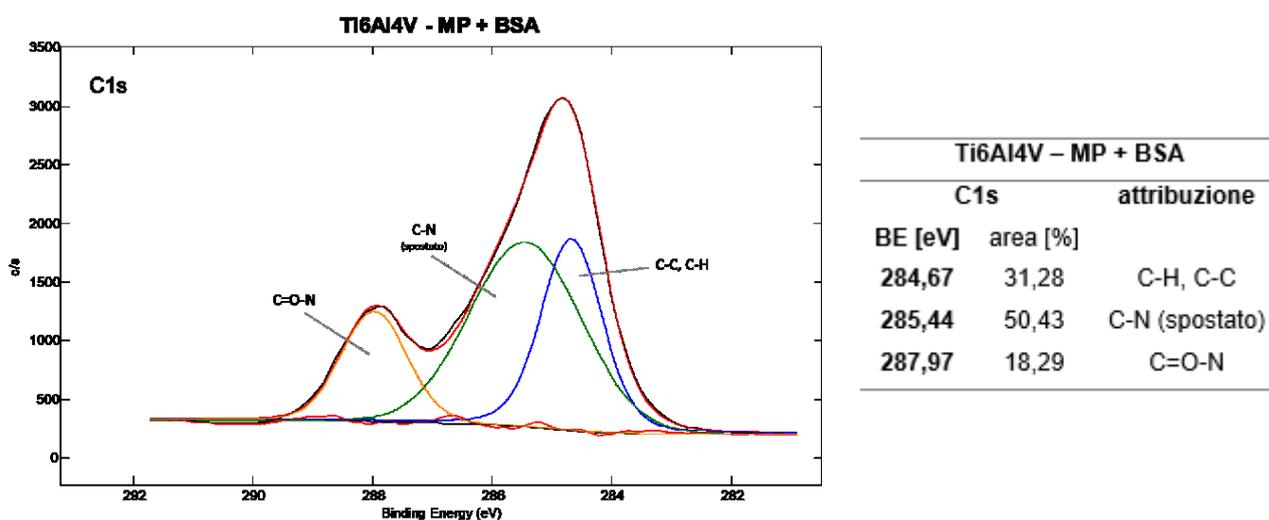
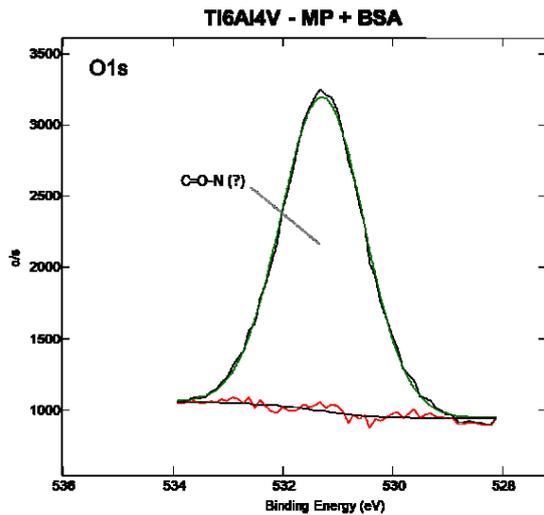


Figura 5.8 A sinistra, spettro XPS ad alta risoluzione di C1s del campione Ti6Al4V – MP + BSA. A destra riepilogo delle posizioni dei picchi e relative attribuzioni

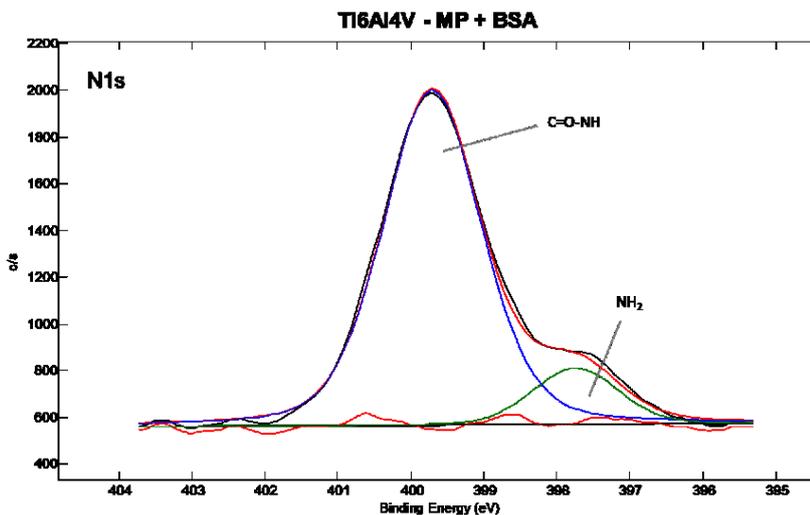
Per quanto riguarda lo spettro XPS O1s (Figura 5.9), quello che si osserva, dopo l'adsorbimento di BSA, è invece la presenza di un unico picco, ad una BE di 531,28 eV, che si può ipotizzare associabile alla presenza del legame peptidico (-C=O-NH-).



Ti6Al4V - MP + BSA		
O1s		attribuzione
BE [eV]	area [%]	
531,28	100	C=O-N (?)

Figura 5.9 A sinistra, spettro XPS ad alta risoluzione di O1s del campione Ti6Al4V – MP + BSA. A destra riepilogo delle posizioni dei picchi e relative attribuzioni

Per quanto riguarda, infine, lo spettro XPS N1s (Figura 5.10), quello che si osserva, dopo l'adsorbimento di BSA, è invece la presenza di due picchi che concorrono a formare lo spettro N1s. Il primo picco, ad una BE di 397,74 eV, è associabile alla presenza di gruppi amminici primari del tipo -NH<sub>2</sub>; il secondo picco, alla BE di 399,71 eV, al contrario, si pensa attribuibile alla presenza di legami peptidici del tipo -C=O-NH-.



Ti6Al4V - MP + BSA		
N1s		attribuzione
BE [eV]	area [%]	
397,74	12,3	NH <sub>2</sub>
399,71	87,7	C=O-N

Figura 5.10 A sinistra, spettro XPS ad alta risoluzione di N1s del campione Ti6Al4V – MP + BSA. A destra riepilogo delle posizioni dei picchi e relative attribuzioni

Il confronto tra gli spettri ad alta risoluzione relativi al Ti6Al4V – MP e al Ti6Al4V – MP + BSA è riportato in Figura 5.11.

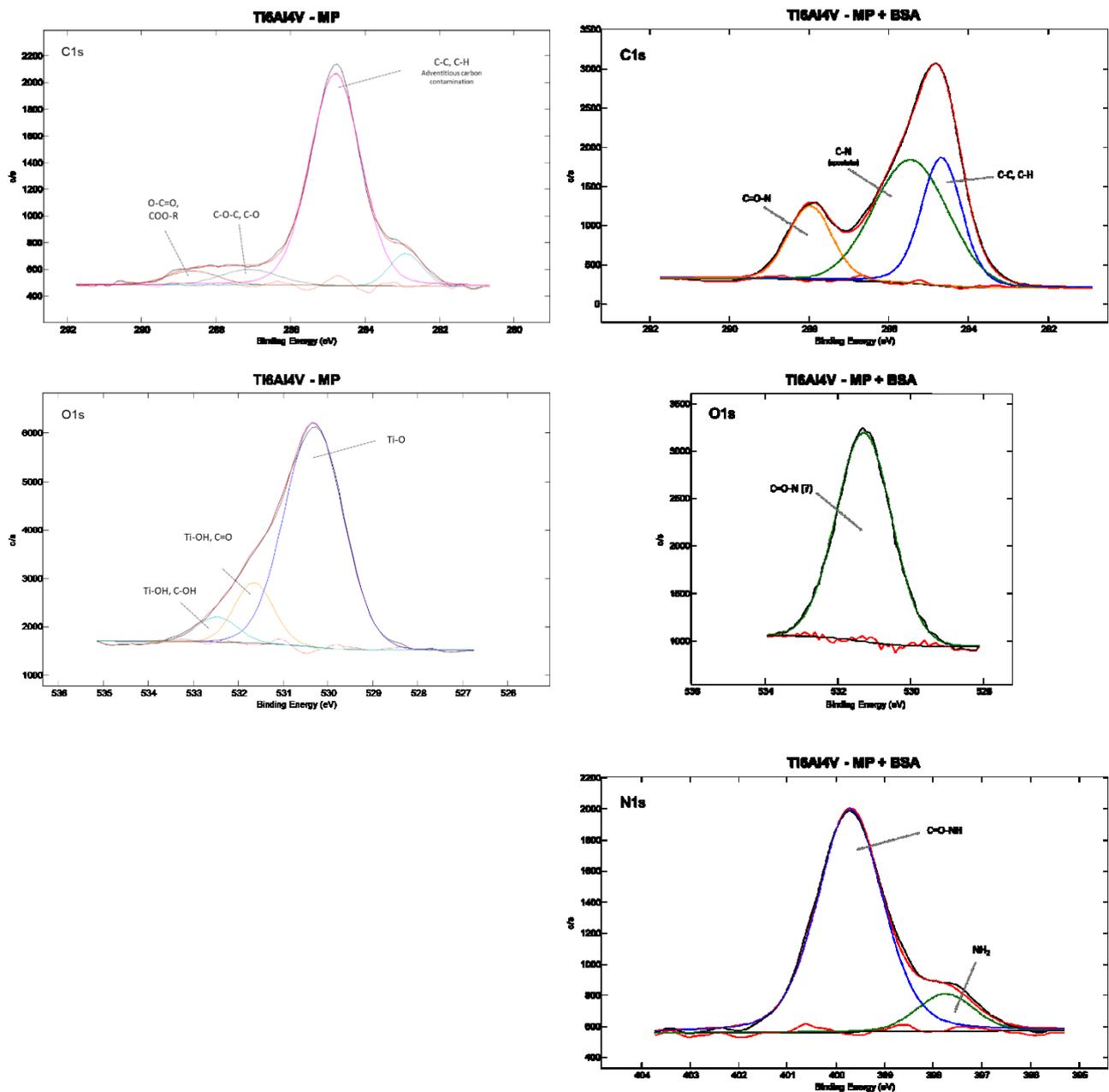


Figura 5.11 Presentazione degli spettri ad alta risoluzione (C1s, O1s e N1s) dei campioni Ti6Al4V - MP e Ti6Al4V - MP + BSA a confronto

### 1.1.1.2 Ti6Al4V - CT adsorbimento BSA

I risultati dell'analisi XPS dei campioni Ti6Al4V - CT sui quali è stata adsorbita la BSA sono riportati schematicamente di seguito.

**Spettri survey Ti6Al4V - CT e Ti6Al4V - CT + BSA.** In Figura 5.12 ed in Tabella 5.3 compaiono, a confronto, gli spettri di *survey* dei campioni Ti6Al4V - CT prima e dopo l'adsorbimento proteico con BSA.

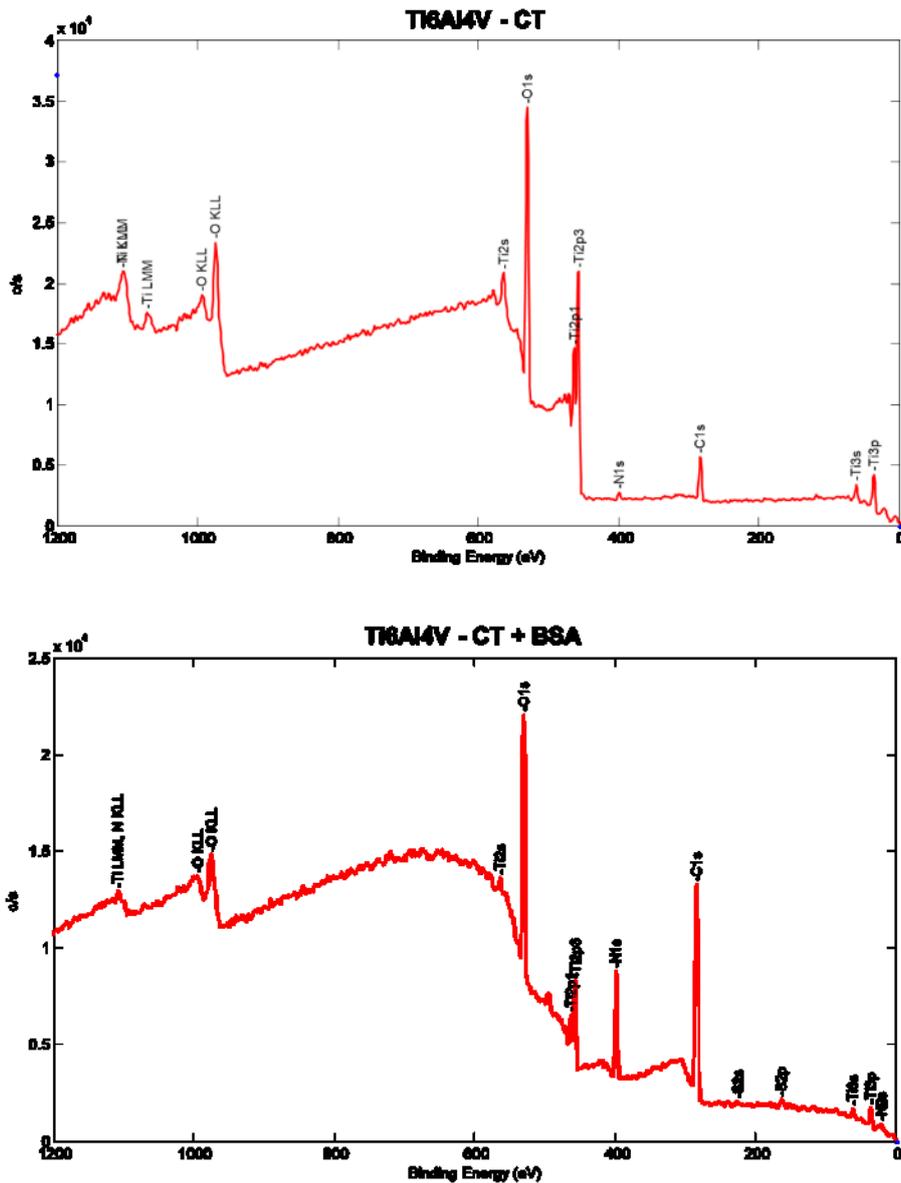


Figura 5.12 Spettri survey delle superfici Ti6Al4V – CT e Ti6Al4V – CT + BSA

Tabella 5.3 Composizione chimica superficiale delle superfici Ti6Al4V – CT e Ti6Al4V – CT + BSA

	Composizione chimica (% at)							
	O	C	Ti	Si	N	S	Na	Cl
Ti6Al4V - CT	60,7	20,7	16,2		2,3			
Ti6Al4V - CT + BSA	25,9	56,2	2,8		14,2	1		

Nel caso dei campioni Ti6Al4V – CT, ad un primo esame, si può di nuovo osservare, in modo analogo al caso immediatamente precedente, come vi sia una differenza rilevabile nella quantità di O e C presenti sulla superficie dei campioni, con O prevalente sulla superficie Ti6Al4V – CT e in

---

quantità inferiore sulla superficie Ti6Al4V – CT + BSA, mentre C viceversa. Tale risultato è nuovamente da interpretarsi come indice dell'avvenuto adsorbimento proteico. Il fatto che il segnale del Ti sia ridotto, sui campioni adsorbiti, può essere anch'esso interpretato come indice dell'avvenuto adsorbimento proteico. Una volta adsorbita, è infatti la BSA che costituisce il sottilissimo strato che viene rilevato dall'analisi XPS. Ecco spiegato come mai il Ti è ben rilevato sui campioni Ti6Al4V – CT mentre compare in modesta quantità sulla superficie Ti6Al4V – CT + BSA. La presenza di N, che si rileva in percentuale maggiore sul campione Ti6Al4V – CT + BSA e inferiore sul campione Ti6Al4V – CT, è da interpretarsi come attribuibile, per il campione Ti6Al4V – CT all'effetto della contaminazione ambientale, mentre per il campione Ti6Al4V – CT + BSA a due diversi contributi: uno, conseguenza della contaminazione ambientale e l'altro conseguenza dell'avvenuto adsorbimento proteico. La presenza di S sulla superficie del campione Ti6Al4V – CT + BSA è da interpretarsi, di nuovo, come indice dell'avvenuto adsorbimento proteico; S è un componente fondamentale della BSA la cui struttura amminoacidica è caratterizzata dalla presenza di ponti disolfuro.

**Spettri high resolution Ti6Al4V - CT e Ti6Al4V - CT + BSA.** I risultati dell'analisi XPS dei campioni Ti6Al4V – CT prima e dopo l'adsorbimento di BSA per quanto riguarda gli spettri ad alta risoluzione di C1s, O1s e N1s sono discussi in dettaglio. In particolare, analizzando nel dettaglio gli spettri ad alta risoluzione dei campioni Ti6Al4V – CT + BSA di C1s, O1s e N1s, sono ipotizzabili le attribuzioni dei picchi come riportato di seguito.

Per quanto riguarda lo spettro XPS C1s (Figura 5.13), quello che si osserva, dopo l'adsorbimento di BSA, è la presenza, anche in questo caso, di tre diversi picchi che danno un contributo a formare lo spettro C1s. In particolare, questi tre picchi corrispondono ad atomi di carbonio in differenti condizioni ambientali e di legame, per cui si può individuare: un picco associato alla presenza di legami idrocarburici saturi (-CH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>-) conseguenza della contaminazione ambientale con una BE approssimativamente pari a 284,44 eV; un picco, leggermente spostato, associato alla presenza di gruppi amminici (-C-NH-) con una BE di circa 285,36 eV; un picco associato alla presenza del legame peptidico (-C=O-NH-) con BE pari a 287,84 eV.

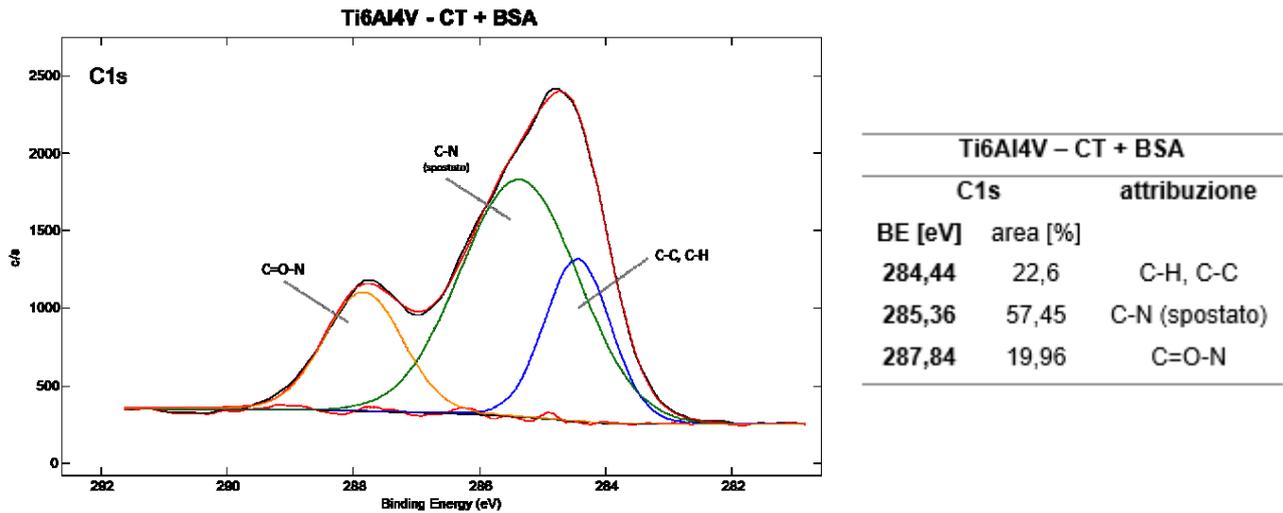


Figura 5.13 A sinistra, spettro XPS ad alta risoluzione di C1s del campione Ti6Al4V – CT + BSA. A destra riepilogo delle posizioni dei picchi e relative attribuzioni

Per quanto riguarda lo spettro XPS O1s (Figura 5.14), quello che si osserva, dopo l'adsorbimento di BSA, è il contributo relativo a tre picchi: un primo, ad una BE di 529,78 eV, associabile alla presenza di ossido di titanio (TiO<sub>2</sub>); un secondo, ad una BE di 531,28 eV, ipotizzato associabile alla presenza del legame peptidico (-C=O-NH-); un terzo picco, ad una BE di 532,42 eV, associabile invece alla presenza di ossidrili (Ti-OH) e di legami del tipo C-OH [135].

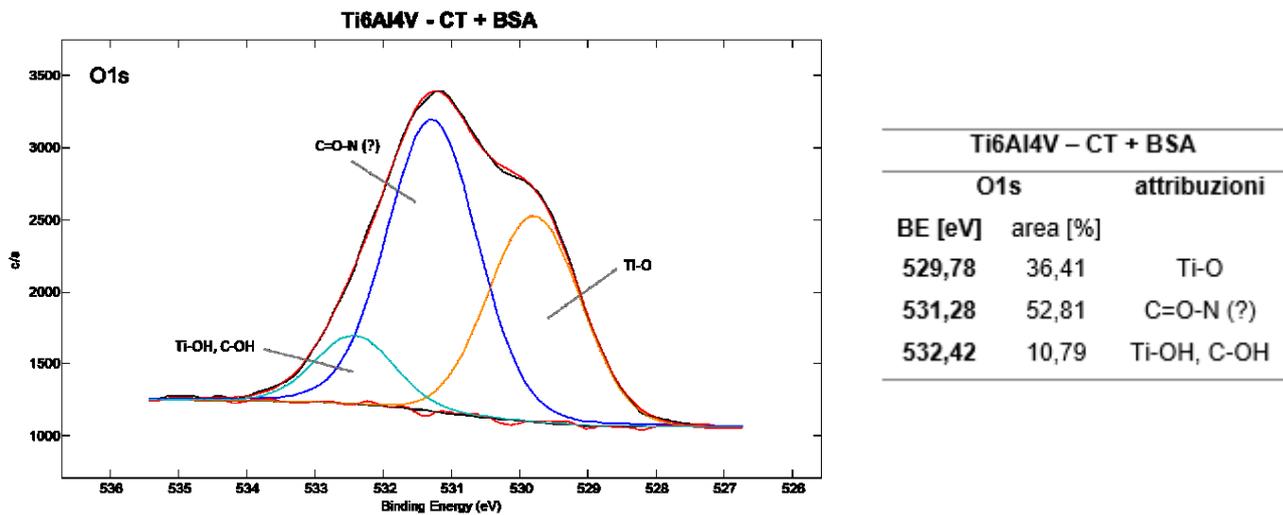


Figura 5.14 A sinistra, spettro XPS ad alta risoluzione di O1s del campione Ti6Al4V – CT + BSA. A destra riepilogo delle posizioni dei picchi e relative attribuzioni

Per quanto riguarda, infine, lo spettro XPS N1s (Figura 5.15), quello che si osserva, dopo l'adsorbimento di BSA, è la presenza di un unico picco, ad una BE di 399,66 eV, associabile alla presenza legami peptidici del tipo -C=O-NH-.

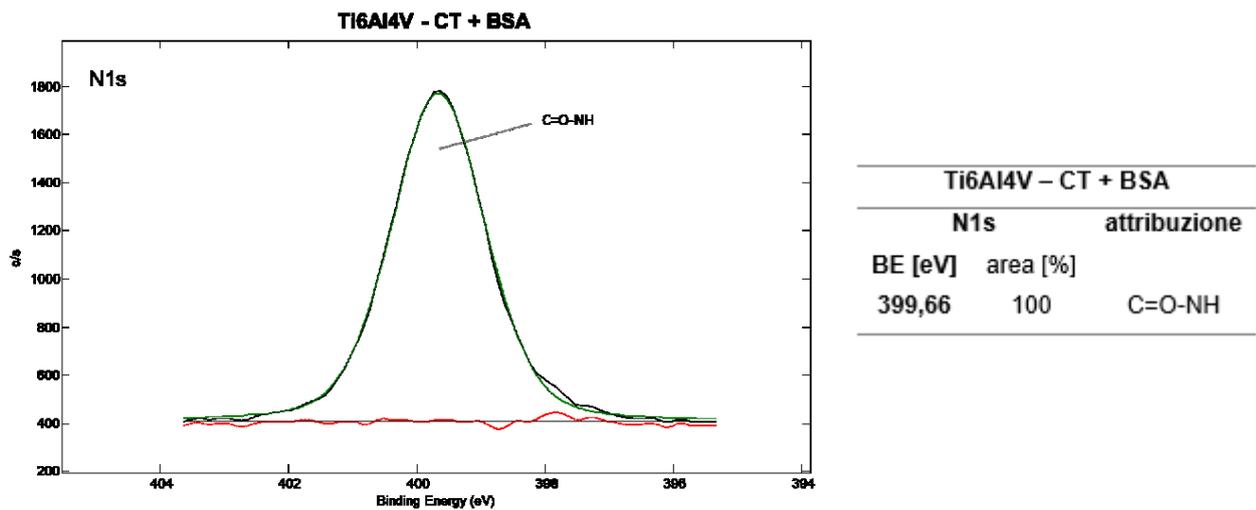
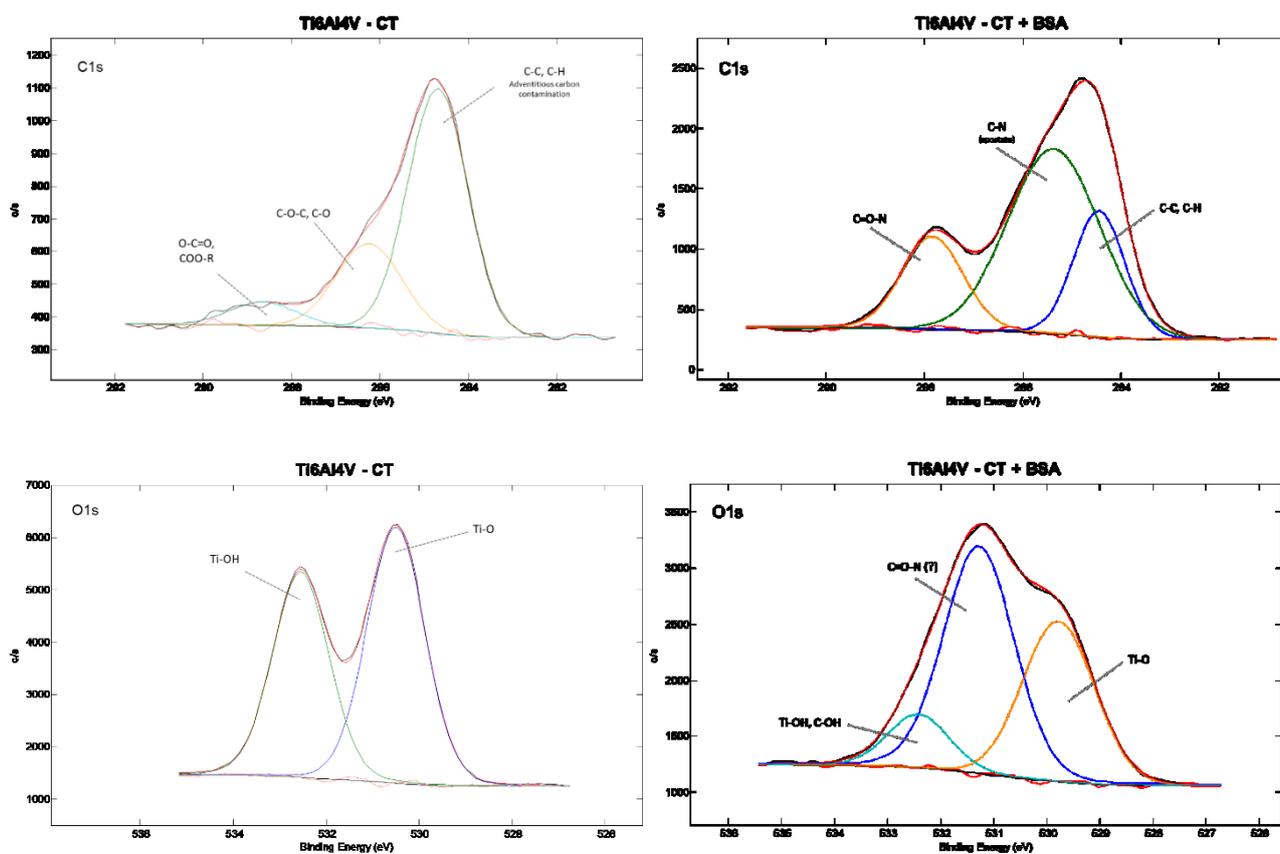


Figura 5.15 A sinistra, spettro XPS ad alta risoluzione di N1s del campione Ti6Al4V - CT + BSA. A destra riepilogo delle posizioni dei picchi e relative attribuzioni

Il confronto tra gli spettri ad alta risoluzione relativi al Ti6Al4V - CT e al Ti6Al4V - CT + BSA è riportato in Figura 5.16.



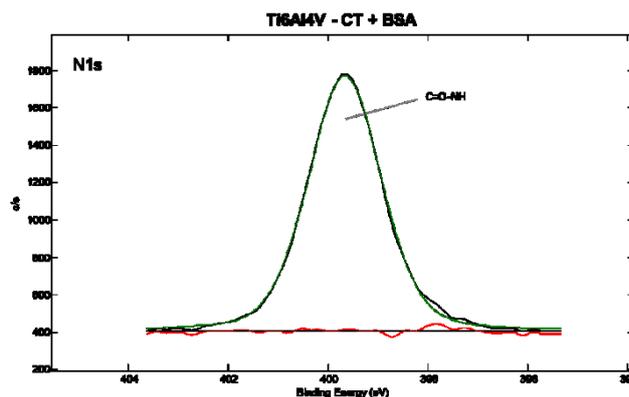


Figura 5.16 Presentazione degli spettri ad alta risoluzione (C1s, O1s e N1s) dei campioni Ti6Al4V – CT e Ti6Al4V – CT + BSA a confronto

### 1.1.1.3 Adsorbimento BSA a confronto

I risultati dell'analisi XPS dei campioni Ti6Al4V – MP e Ti6Al4V – CT, prima e dopo l'adsorbimento di BSA sono riportati in modo schematico e riassuntivo in Tabella 5.4 per dare la possibilità di confrontare i dati tra loro.

Tabella 5.4 Composizione chimica superficiale delle superfici in Ti6Al4V prima e dopo adsorbimento di BSA

	Composizione chimica (% at)							
	O	C	Ti	Si	N	S	Na	Cl
<b>Ti6Al4V- MP</b>	43,5	39,4	10,7	4,4	2,1			
<b>Ti6Al4V - MP + BSA</b>	15,5	62,3	<0,1		15,6	0,7	4	1,9
<b>Ti6Al4V - CT</b>	60,7	20,7	16,2		2,3			
<b>Ti6Al4V - CT + BSA</b>	25,9	56,2	2,8		14,2	1		

Dai risultati degli spettri *survey* è possibile osservare il dato seguente: esiste una certa differenza nella quantità di Ti rilevato dopo l'adsorbimento di BSA sul campione Ti6Al4V – MP rispetto a quello Ti6Al4V – CT. La percentuale atomica di Ti, inferiore sul campione Ti6Al4V – CT rispetto al campione Ti6Al4V – MP, si può ipotizzare attribuibile o ad un ricoprimento meno favorevole da parte della BSA sulla superficie campione trattato chimicamente, o, più in generale, ad una diversa distribuzione della BSA adsorbita sulla superficie del campione Ti6Al4V – CT rispetto al Ti6Al4V – MP.

#### 1.1.1.4 Ti6Al4V - MP adsorbimento BFN

I risultati dell'analisi XPS dei campioni Ti6Al4V - MP sui quali è stata adsorbita la BFN sono riportati schematicamente di seguito.

**Spettri survey Ti6Al4V - MP e Ti6Al4V - MP + BFN.** In Figura 5.17 ed in Tabella 5.5 compaiono, a confronto, gli spettri *survey* dei campioni Ti6Al4V - MP prima e dopo l'adsorbimento proteico con BFN.

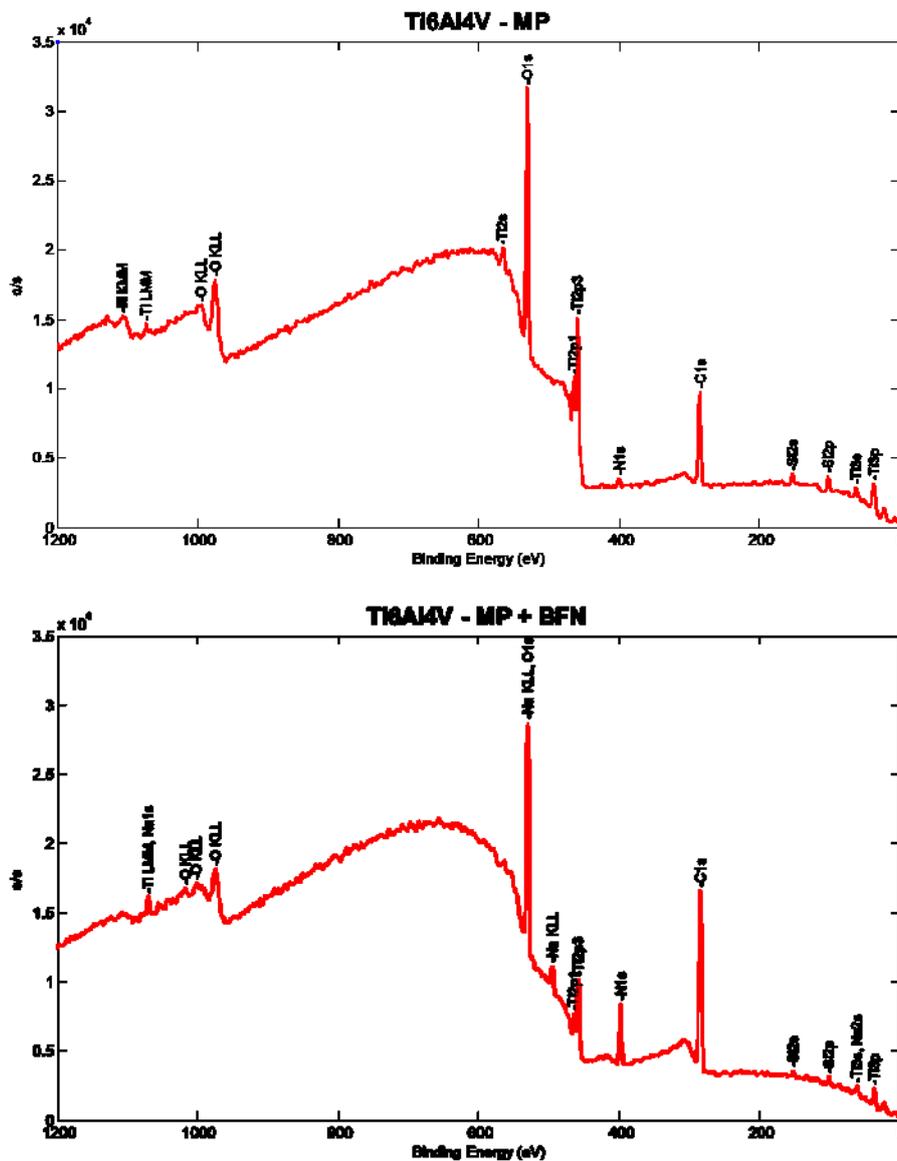


Figura 5.17 Spettri survey delle superfici Ti6Al4V - MP e Ti6Al4V - MP + BFN

Tabella 5.5 Composizione chimica superficiale delle superfici Ti6Al4V – MP e Ti6Al4V – MP + BFN

	Composizione chimica (% at)						
	O	C	Ti	Si	N	S	Na
Ti6Al4V - MP	43,5	39,4	10,7	4,4	2,1		
Ti6Al4V - MP + BFN	27,1	56,6	3,2	2,0	10,2		1,0

Nel caso dei campioni Ti6Al4V – MP, ad un primo esame, si può già osservare come vi sia una differenza rilevabile nella quantità di O e C presenti sulla superficie dei campioni, con O prevalente sulla superficie Ti6Al4V – MP e in quantità inferiore sulla superficie Ti6Al4V – MP + BFN, mentre C viceversa. Tale risultato è da interpretarsi come indice dell'avvenuto adsorbimento proteico. La BFN adsorbita sulla superficie viene rilevata dall'analisi XPS, e la sua stessa presenza è di ostacolo al raggio incidente a penetrare in profondità e rilevare gli elementi sottostanti, per questo non si rileva un'elevata presenza di Ti sul substrato Ti6Al4V – MP + BFN. La presenza di N, che si rileva in percentuale maggiore sul campione Ti6Al4V – MP + BFN e inferiore sul campione Ti6Al4V – MP, è da interpretarsi come attribuibile, per il campione Ti6Al4V – MP all'effetto della contaminazione ambientale mentre per il campione Ti6Al4V – MP + BFN a due diversi contributi: uno, conseguenza della contaminazione ambientale e l'altro conseguenza dell'avvenuto adsorbimento proteico. La presenza di Si rilevata sul campione MP, come già discusso più volte in precedenza, è attribuibile ad un effetto di contaminazione derivante dalla lucidatura a specchio dei campioni. La modesta quantità di Na rilevata, infine, è ipotizzabile essere associata agli effetti dell'adsorbimento di ioni della soluzione PBS da parte della superficie Ti6Al4V – MP.

**Spettri high resolution Ti6Al4V - MP e Ti6Al4V - MP + BFN.** I risultati dell'analisi XPS dei campioni Ti6Al4V – MP prima e dopo l'adsorbimento di BFN per quanto riguarda gli spettri ad alta risoluzione di C1s, O1s e N1s sono discussi in dettaglio. In particolare, l'analisi degli spettri ad alta risoluzione dei campioni Ti6Al4V – MP + BFN di C1s, O1s e N1s permette di fare le seguenti osservazioni.

Per quanto riguarda lo spettro XPS C1s (Figura 5.18), quello che si osserva, dopo l'adsorbimento di BFN, è la presenza di quattro diversi picchi che danno un contributo a formare lo spettro C1s. Questi quattro picchi, corrispondenti ad atomi di carbonio in differenti condizioni ambientali e di legame, si possono così classificare: il picco con la BE pari a 283,3 eV è ipotizzato associato alla

presenza di carburi; il picco alla BE di 284,78 è invece associabile alla presenza di legami idrocarburici saturi (-CH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>-) derivanti dall'effetto della contaminazione ambientale; il picco alla BE di circa 286,25 eV è ipotizzato invece riconducibile alla presenza di gruppi di tipo -C-NH-; infine, compare anche in questo caso un picco associato alla presenza del legame peptidico (-C=O-NH-) con BE pari a 287,88 eV.

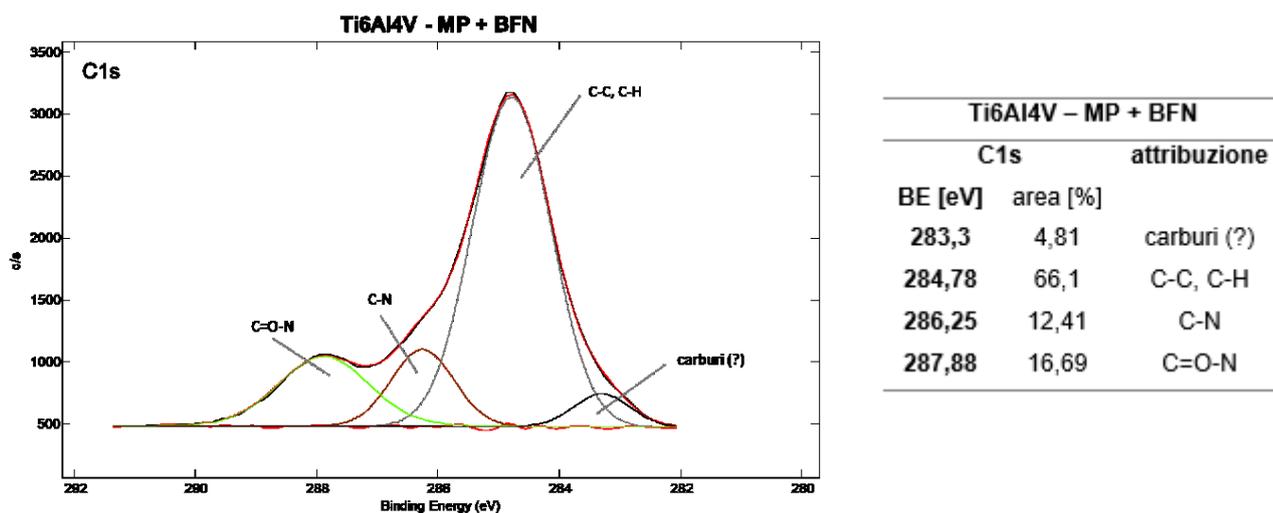


Figura 5.18 A sinistra, spettro XPS ad alta risoluzione di C1s del campione Ti6Al4V - MP + BFN. A destra riepilogo delle posizioni dei picchi e relative attribuzioni

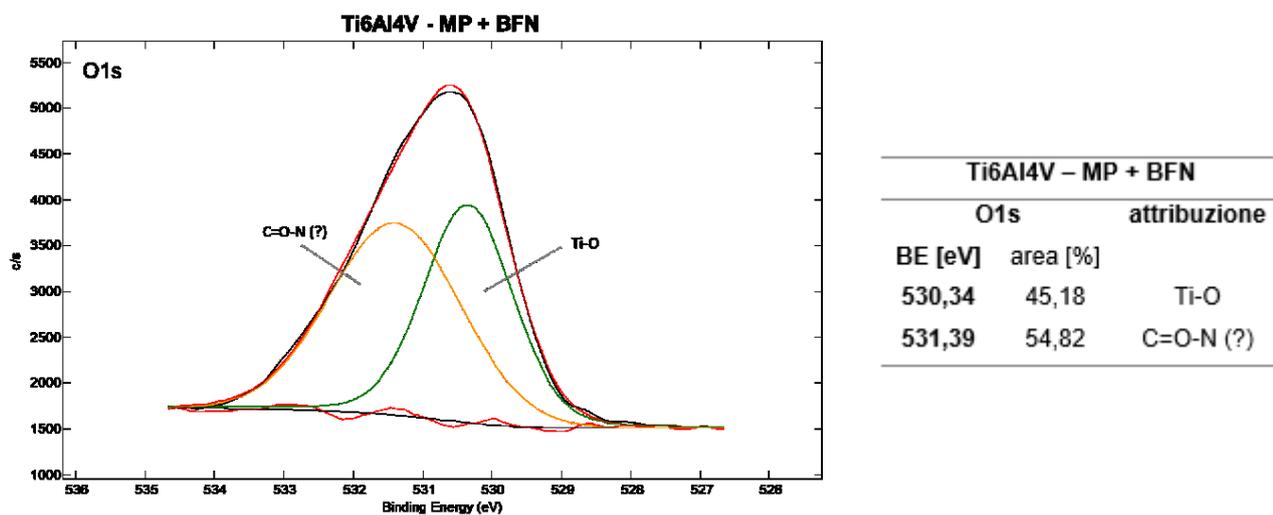


Figura 5.19 A sinistra, spettro XPS ad alta risoluzione di O1s del campione Ti6Al4V - MP + BFN. A destra riepilogo delle posizioni dei picchi e relative attribuzioni

Per quanto riguarda lo spettro XPS O1s (Figura 5.19), quello che si osserva, dopo l'adsorbimento di fibronectina, è il contributo relativo a due picchi: un primo ad una BE di 530,34 eV associabile alla

presenza di ossido di titanio ( $\text{TiO}_2$ ) e un secondo, ad una BE di 531,39 eV, ipotizzato essere associabile alla presenza di legami peptidici del tipo  $-\text{C}=\text{O}-\text{NH}-$ .

Per quanto riguarda, infine, lo spettro XPS N1s, quello che si osserva, dopo l'adsorbimento di BFN, è invece la presenza di due picchi che concorrono a formare il picco dello spettro N1s. Il primo picco, ad una BE di 398,44 eV è associabile alla presenza di gruppi amminici primari del tipo  $-\text{NH}_2$ ; il secondo picco, alla BE di 399,74 eV si può invece pensare attribuibile alla presenza di legami peptidici del tipo  $-\text{C}=\text{O}-\text{NH}-$ .

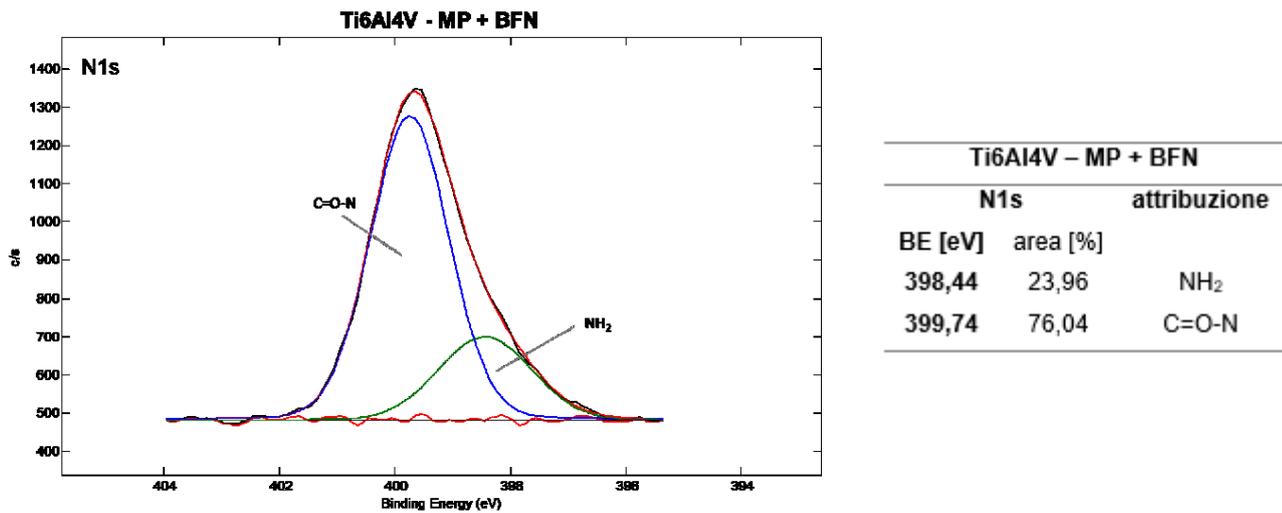
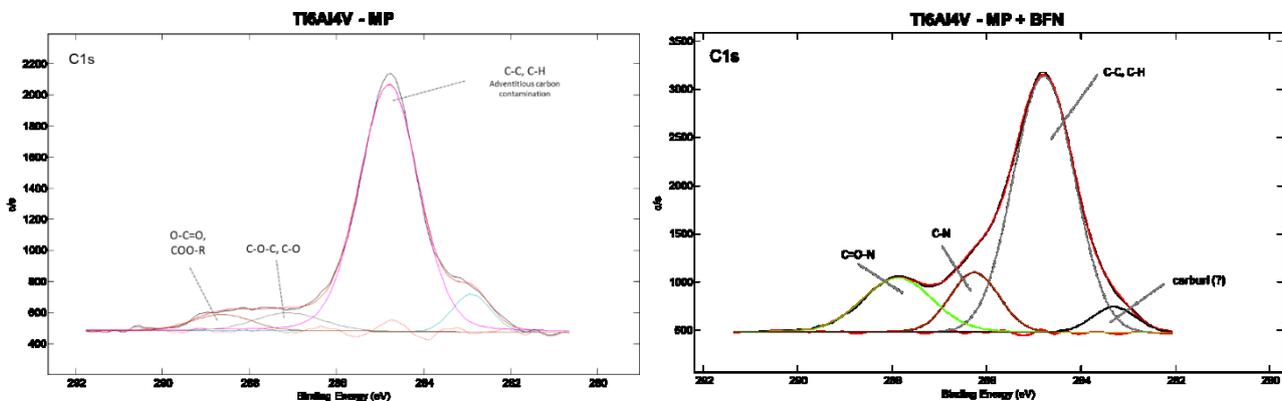


Figura 5.20 A sinistra, spettro XPS ad alta risoluzione di N1s del campione Ti6Al4V – MP + BFN. A destra riepilogo delle posizioni dei picchi e relative attribuzioni

Il confronto tra gli spettri ad alta risoluzione relativi al Ti6Al4V – MP e al Ti6Al4V – MP + BFN è riportato in Figura 5.21.



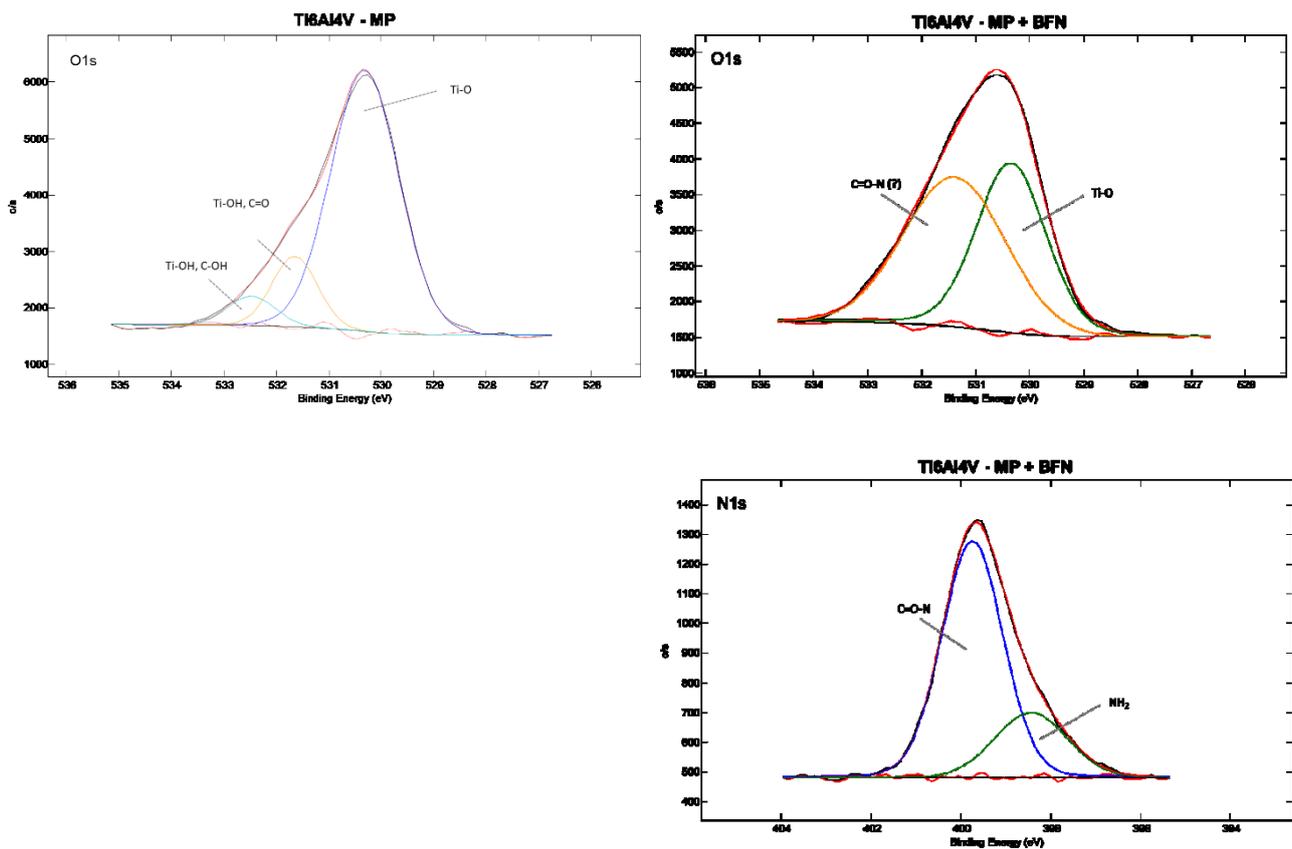


Figura 5.21 Presentazione degli spettri ad alta risoluzione (C1s, O1s e N1s) dei campioni Ti6Al4V – MP e Ti6Al4V – MP + BFN a confronto

#### 1.1.1.5 Ti6Al4V - CT adsorbimento BFN

I risultati dell'analisi XPS dei campioni Ti6Al4V – CT sui quali è stata adsorbita la BFN sono riportati schematicamente di seguito.

**Spettri survey Ti6Al4V - CT e Ti6Al4V - CT + BFN.** In Figura 5.22 ed in Tabella 5.6 compaiono, a confronto, gli spettri di *survey* dei campioni Ti6Al4V – CT prima e dopo l'adsorbimento proteico con BFN.

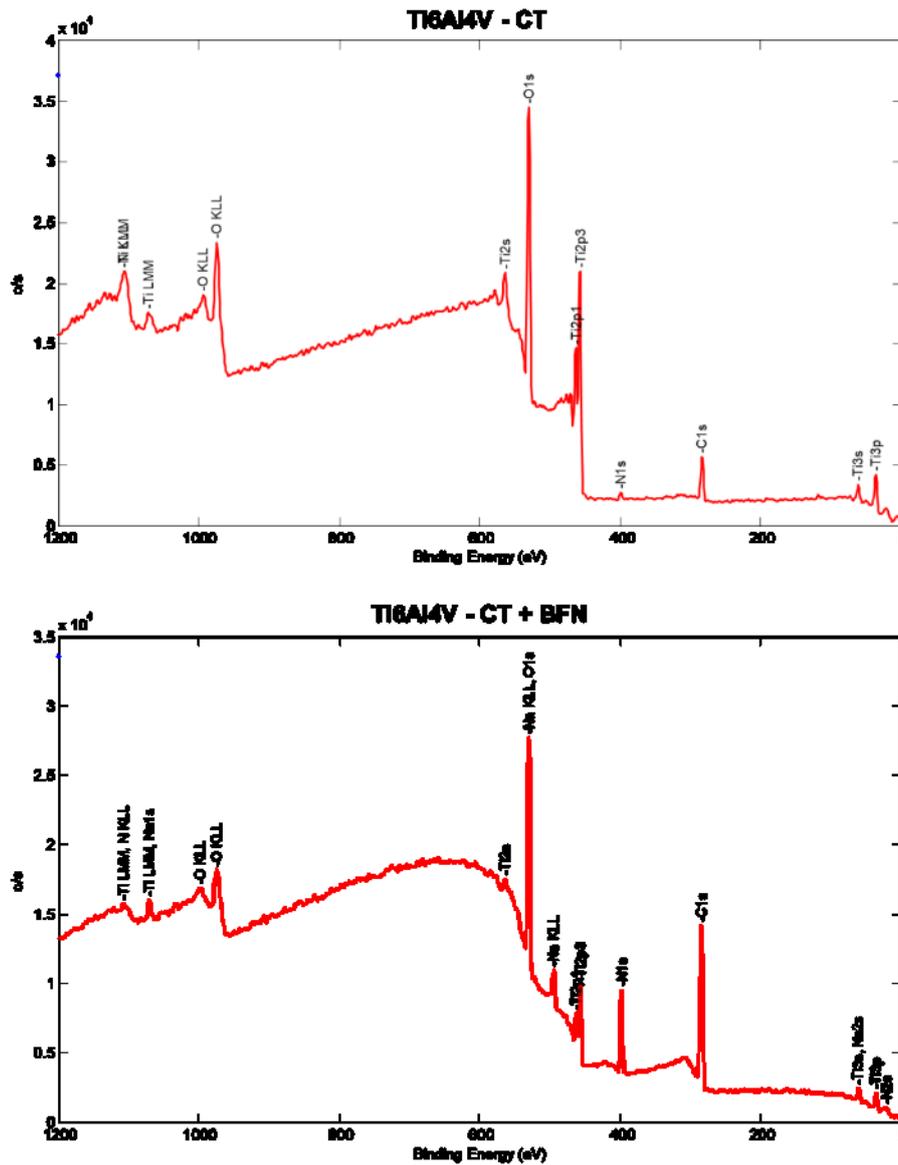


Figura 5.22 Spettri survey delle superfici Ti6Al4V – CT e Ti6Al4V – CT + BFN

Tabella 5.6 Composizione chimica superficiale delle superfici Ti6Al4V – CT e Ti6Al4V – CT + BFN

	Composizione chimica (% at)						
	O	C	Ti	Si	N	S	Na
Ti6Al4V - CT	60,7	20,7	16,2		2,3		
Ti6Al4V - CT + BFN	29,0	52,4	3,6		13,0		2,0

Nel caso dei campioni Ti6Al4V – CT, ad un primo esame, si può di nuovo osservare, in modo analogo a quanto fatto per il caso precedentemente illustrato, come vi sia una differenza rilevabile nella quantità di O e C presenti sulla superficie dei campioni, con O prevalente sulla superficie

---

Ti6Al4V – CT e in quantità inferiore sulla superficie Ti6Al4V – CT + BFN, mentre C viceversa. Tale risultato è indice dell'avvenuto adsorbimento proteico. La BFN adsorbita sulla superficie viene rilevata dall'analisi XPS, e la sua stessa presenza è di ostacolo al raggio incidente a penetrare in profondità e rilevare gli elementi sottostanti. Questo risultato è confermato anche alla luce della percentuale atomica di titanio rilevata, infatti Ti è ben rilevato sui campioni Ti6Al4V – CT mentre compare in modesta quantità sulla superficie Ti6Al4V – CT + BFN. La presenza di N, che si rileva in percentuale maggiore sul campione Ti6Al4V – CT + BFN e inferiore sul campione Ti6Al4V – CT, è da interpretarsi come attribuibile a due diversi contributi: uno, conseguenza della contaminazione ambientale e l'altro, relativamente al campione Ti6Al4V – CT + BFN, conseguenza dell'avvenuto adsorbimento proteico. La presenza di una piccola quantità di Na, infine, è ipotizzabile essere associata agli effetti dell'adsorbimento di ioni della soluzione PBS da parte della superficie Ti6Al4V – CT.

**Spettri high resolution Ti6Al4V - CT e Ti6Al4V - CT + BFN.** I risultati dell'analisi XPS dei campioni Ti6Al4V – CT prima e dopo l'adsorbimento di BFN per quanto riguarda gli spettri ad alta risoluzione di C1s, O1s e N1s sono discussi in dettaglio. In particolare, l'analisi degli spettri ad alta risoluzione dei campioni Ti6Al4V – CT + BFN di C1s, O1s e N1s permette di fare le seguenti osservazioni.

Per quanto riguarda lo spettro XPS C1s (Figura 5.23), quello che si osserva, dopo l'adsorbimento di BFN, è la presenza di quattro diversi picchi che danno un contributo a formare lo spettro C1s. Questi quattro picchi, corrispondenti ad atomi di carbonio in differenti condizioni ambientali e di legame, si possono così classificare: il picco con la BE pari a 283,23 eV è ipotizzato associato alla presenza di carburi; il picco alla BE di 284,78 è invece associabile alla presenza di legami idrocarburici saturi (-CH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>-) derivanti dall'effetto della contaminazione ambientale; il picco alla BE di circa 286,1 eV è ipotizzato invece riconducibile alla presenza di gruppi di tipo -C-NH-; infine, compare anche in questo caso un picco associato alla presenza del legame peptidico (-C=O-NH-) con BE pari a 287,89 eV.

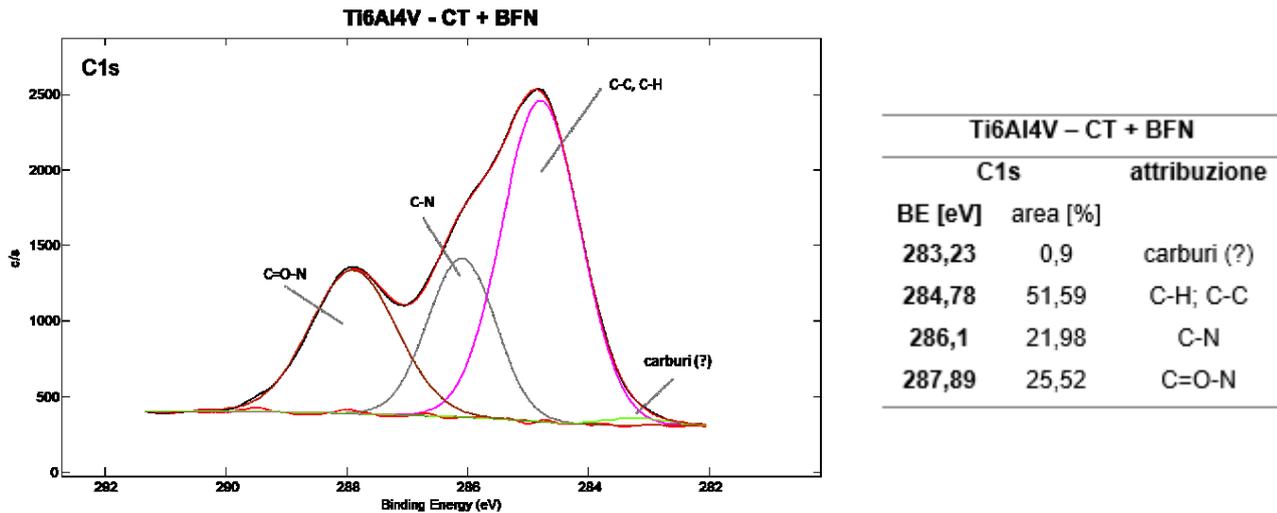


Figura 5.23 A sinistra, spettro XPS ad alta risoluzione di C1s del campione Ti6Al4V – CT + BFN. A destra riepilogo delle posizioni dei picchi e relative attribuzioni

Per quanto riguarda lo spettro XPS O1s (Figura 5.24), quello che si osserva, dopo l'adsorbimento di BFN, è il contributo relativo a tre picchi ben distinguibili: un primo ad una BE di 529,98 eV associabile alla presenza di ossido di titanio (TiO<sub>2</sub>); un secondo, ad una BE di 531,38 eV, ipotizzato essere associabile alla presenza di legami peptidici del tipo C=O-NH-; un terzo picco, ad una BE di 532,35 eV che è riconoscibile come segnale degli ossidrili (Ti-OH) e di legami del tipo C-OH [135].

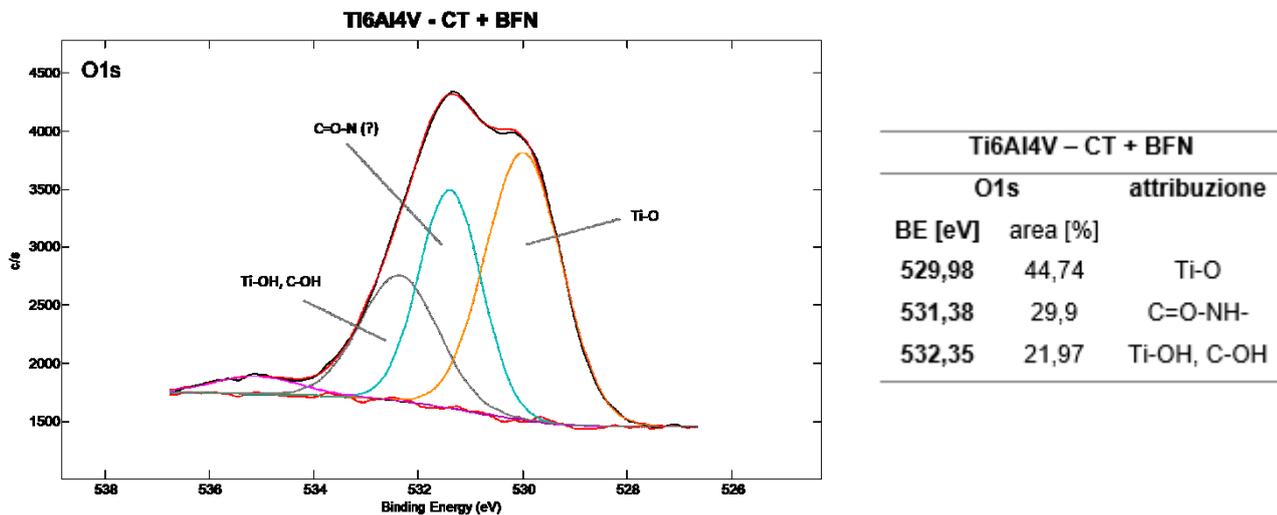


Figura 5.24 A sinistra, spettro XPS ad alta risoluzione di O1s del campione Ti6Al4V – CT + BFN. A destra riepilogo delle posizioni dei picchi e relative attribuzioni

Per quanto riguarda, infine, lo spettro XPS N1s (Figura 5.25), quello che si osserva, dopo l'adsorbimento di BFN, è la presenza di due picchi che concorrono a formare lo spettro N1s. Il primo picco, ad una BE di 397,69 eV è, anche se leggermente spostato, associabile alla presenza di

gruppi amminici primari del tipo  $-NH_2$ ; il secondo picco, alla BE di 399,79 eV si può invece pensare attribuibile alla presenza di legami peptidici del tipo  $-C=O-NH-$ .

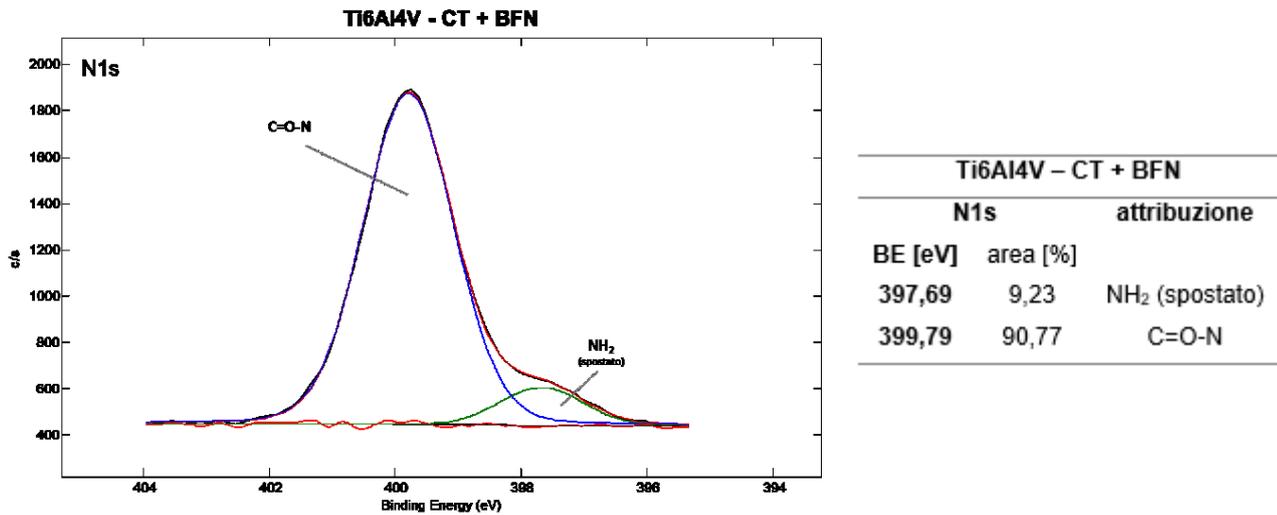
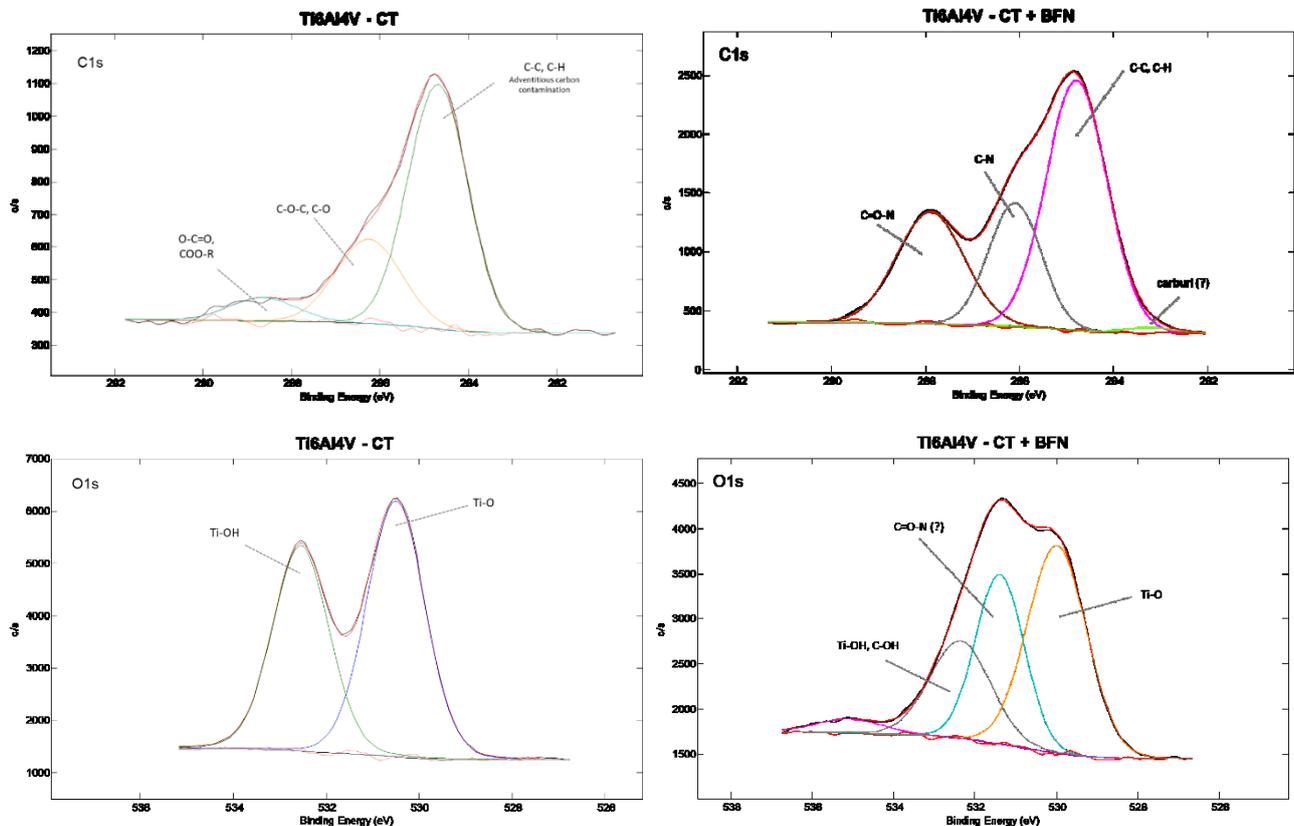


Figura 5.25 A sinistra, spettro XPS ad alta risoluzione di N1s del campione Ti6Al4V - CT + BFN. A destra riepilogo delle posizioni dei picchi e relative attribuzioni

Il confronto tra gli spettri ad alta risoluzione relativi al Ti6Al4V - CT e al Ti6Al4V - CT + BFN è riportato in Figura 5.26.



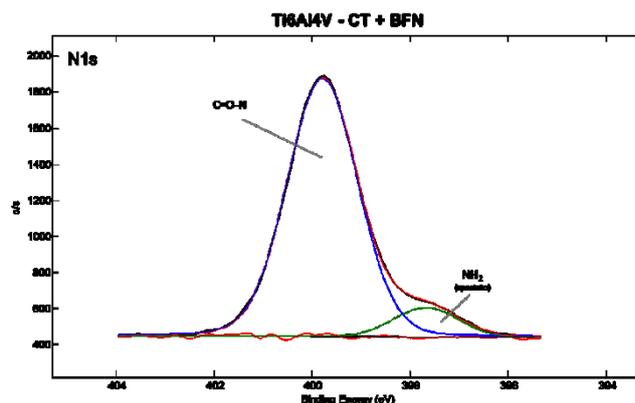


Figura 5.26 Presentazione degli spettri ad alta risoluzione (C1s, O1s e N1s) dei campioni Ti6Al4V – CT e Ti6Al4V – CT + BFN a confronto

### 1.1.1.6 Adsorbimento BFN a confronto

I risultati dell'analisi XPS dei campioni Ti6Al4V – MP e Ti6Al4V – CT, prima e dopo l'adsorbimento di BFN sono riportati in modo schematico e riassuntivo in Tabella 5.7 per dare la possibilità di confrontare i dati tra loro.

Tabella 5.7 Composizione chimica superficiale delle superfici in Ti6Al4V prima e dopo adsorbimento di BFN

	Composizione chimica (% at)						
	O	C	Ti	Si	N	S	Na
<b>Ti6Al4V - MP</b>	43,5	39,4	10,7	4,4	2,1		
<b>Ti6Al4V - MP + BFN</b>	27,1	56,6	3,2	2,0	10,2		1,0
<b>Ti6Al4V - CT</b>	60,7	20,7	16,2		2,3		
<b>Ti6Al4V - CT + BFN</b>	29,0	52,4	3,6		13,0		2,0

Dai risultati degli spettri *survey* è possibile osservare il dato seguente: non esiste una marcata differenza nel comportamento di adsorbimento di BFN sul campione Ti6Al4V – MP rispetto a quello Ti6Al4V – CT. Di fatto, la percentuale atomica di Ti su entrambi i campioni diminuisce quasi con lo stesso rapporto tra prima e dopo l'adsorbimento. La percentuale atomica di N, al contrario, aumenta in entrambi i casi così come si mantengono inalterati gli andamenti della percentuale atomica di O (che diminuisce) e C (che aumenta) se si confrontano i campioni prima e dopo l'adsorbimento di BFN. A parità di concentrazione di BFN utilizzata, pertanto, il risultato di questo esperimento non permette di osservare differenza sostanziale nell'adsorbimento della proteina. Non è possibile ipotizzare, in base ai dati ottenuti, che vi sia un ricoprimento più o meno abbondante in BFN per il campione Ti6Al4V – MP in confronto con il campione Ti6Al4V – CT.

### 1.1.1.7 Ti6Al4V - MP adsorbimento FBS

I risultati dell'analisi XPS dei campioni Ti6Al4V – MP sui quali è stata adsorbito il FBS sono riportati schematicamente di seguito.

**Spettri survey Ti6Al4V - MP e Ti6Al4V – MP + FBS.** In Figura 5.27 ed in Tabella Tabella 5.8 compaiono, a confronto, gli spettri *survey* dei campioni Ti6Al4V – MP prima e dopo l'adsorbimento proteico con FBS.

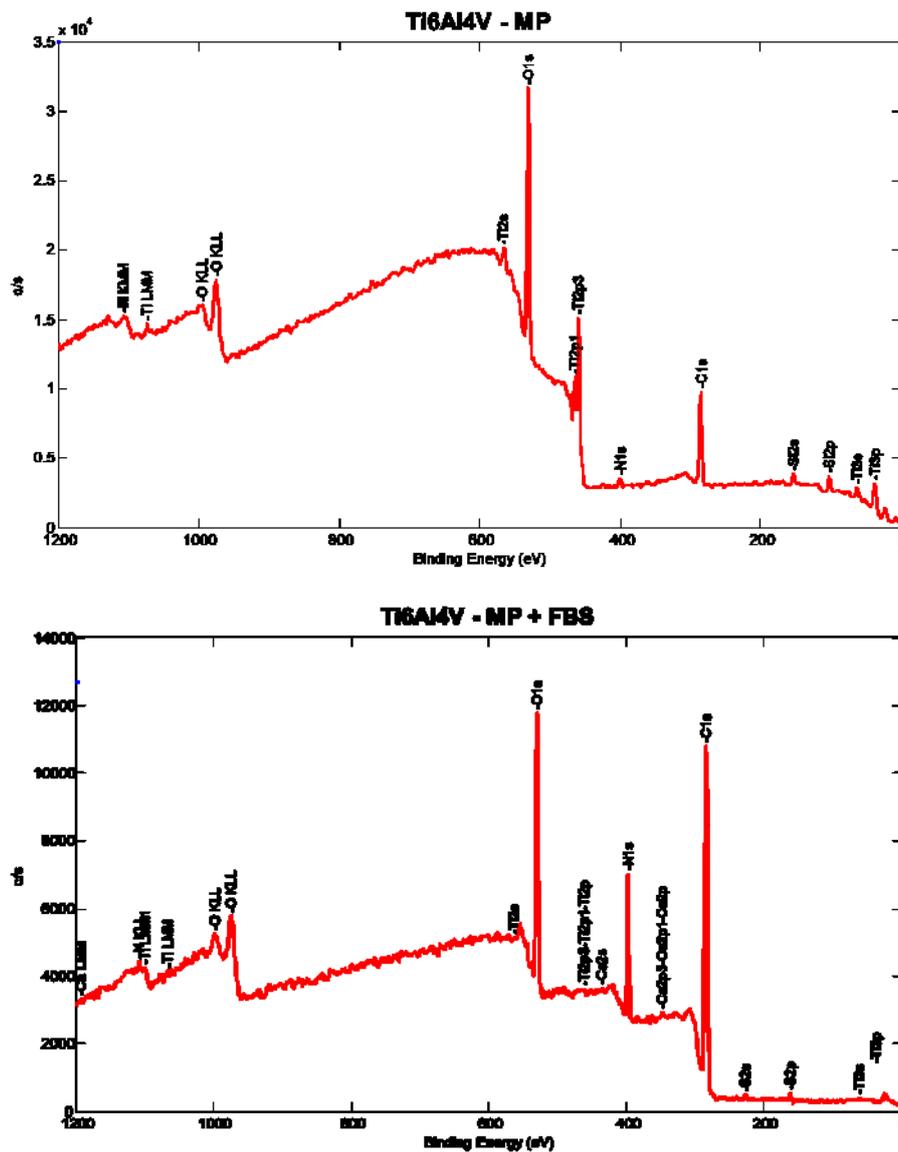


Figura 5.27 Spettri survey delle superfici Ti6Al4V – MP e Ti6Al4V – MP + FBS

Tabella 5.8 Composizione chimica superficiale delle superfici Ti6Al4V – MP e Ti6Al4V – MP + FBS

	Composizione (% at)									
	O	C	Ti	Si	N	S	Na	Cl	Ca	K
Ti6Al4V - MP	43,5	39,4	10,7	4,4	2,1					
Ti6Al4V - MP + FBS	18,9	65,8	0,1		14,4	0,5			0,3	

Nel caso dei campioni Ti6Al4V – MP, ad un primo esame, si può già osservare come vi sia una differenza rilevabile nella quantità di O e C presenti sulla superficie dei campioni, con O prevalente sulla superficie Ti6Al4V – MP e in quantità inferiore sulla superficie Ti6Al4V – MP + FBS, mentre C viceversa. Tale risultato può essere interpretato come indice dell'avvenuto adsorbimento proteico. Il fatto che il segnale del Ti sia grandemente ridotto, sui campioni adsorbiti, può essere anch'esso interpretato come indice dell'avvenuto adsorbimento proteico. A FBS adsorbito, infatti, si ha un sottilissimo strato proteico (che si può immaginare come eterogeneo, per composizione) il quale viene rilevato dall'analisi XPS. Ecco spiegato come mai il Ti è ben rilevato sui campioni Ti6Al4V - MP mentre compare in modesta quantità sulla superficie Ti6Al4V – MP + FBS. I componenti del siero vengono adsorbiti dalla superficie e vanno a mascherare la presenza del Ti al raggio X incidente che deve sondare il substrato. La presenza di N, che si rileva in percentuale nettamente maggiore sul campione Ti6Al4V – MP + FBS e inferiore sul campione Ti6Al4V – MP, è da interpretarsi, per il campione Ti6Al4V – MP come attribuibile a contaminazione ambientale mentre per il campione Ti6Al4V – MP + FBS come attribuibile a due diversi contributi: uno, conseguenza della contaminazione ambientale e l'altro conseguenza dell'avvenuto adsorbimento proteico. La presenza di S sulla superficie del campione Ti6Al4V – MP + FBS è da interpretarsi di nuovo come indice dell'avvenuto adsorbimento proteico; S è un componente fondamentale della struttura di quelle proteine caratterizzate dalla presenza di amminoacidi di cisteina (un amminoacido polare, in grado di formare ponti disolfuro). La modesta quantità di Ca rilevato, infine, è da attribuirsi o agli effetti dell'adsorbimento di ioni della soluzione PBS da parte della superficie Ti6Al4V – MP oppure dall'eventualità che sulla superficie Ti6Al4V – MP si depositino proteine cosiddette “*calcium binding*” ovvero in grado di legarsi al Ca presente in PBS.

**Spettri high resolution Ti6Al4V - MP e Ti6Al4V - MP + FBS.** I risultati dell'analisi XPS dei campioni Ti6Al4V – MP prima e dopo l'adsorbimento di FBS per quanto riguarda gli spettri ad alta risoluzione di C1s, O1s e N1s sono discussi in dettaglio. In particolare, l'analisi degli spettri ad alta risoluzione dei campioni Ti6Al4V – MP + FBS di C1s, O1s e N1s permette di fare le seguenti osservazioni.

Per quanto riguarda lo spettro XPS C1s (Figura 5.28), quello che si osserva, dopo l'adsorbimento di FBS, è la presenza di tre diversi picchi che concorrono a formare lo spettro C1s. Questi tre picchi, corrispondenti ad atomi di carbonio in differenti condizioni ambientali e di legame, si possono così classificare: un picco con la BE pari a 284,53 eV associabile alla presenza di legami idrocarburici saturi (-CH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>-) derivanti dall'effetto della contaminazione ambientale; un picco alla BE di circa 285,61 eV, ma ritenuto leggermente spostato, è ipotizzato invece riconducibile alla presenza di gruppi di tipo -C-NH-; un picco associato alla presenza del legame peptidico (-C=O-NH-) con BE pari a 287,96 eV. Di fatto, per il FBS si ha uno spettro ad alta risoluzione C1s molto simile, per forma, a quello rilevato per la BSA, e ciò porta ad ipotizzare che dalla superficie venga adsorbita in maggiore quantità la BSA rispetto ad altre tipologie di proteine. Questo risultato è ragionevole, in considerazione del fatto che la BSA è la proteina presente in maggior concentrazione all'interno del FBS.

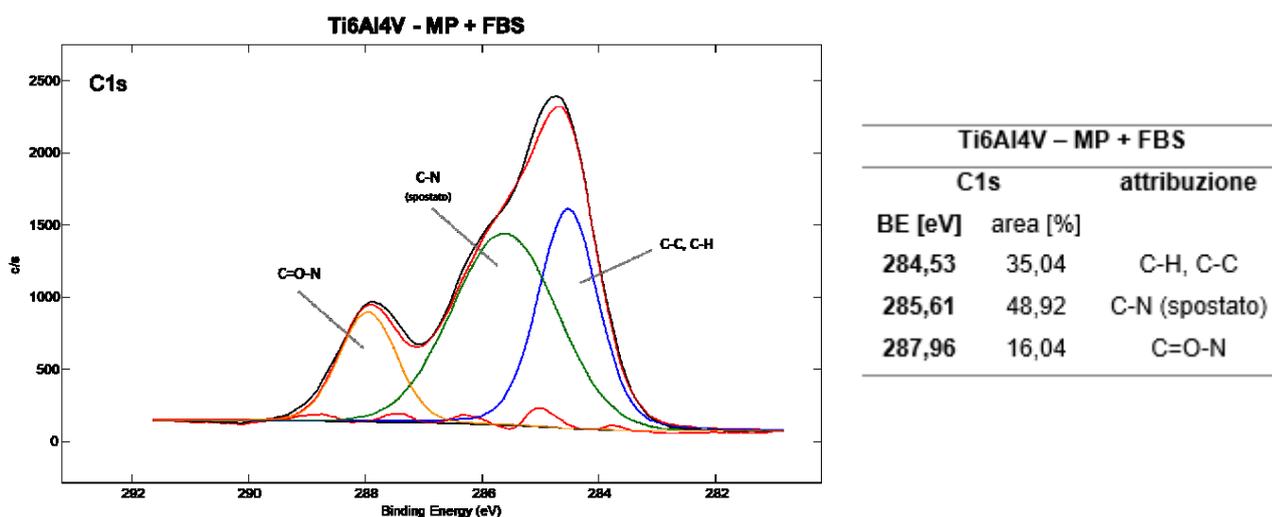
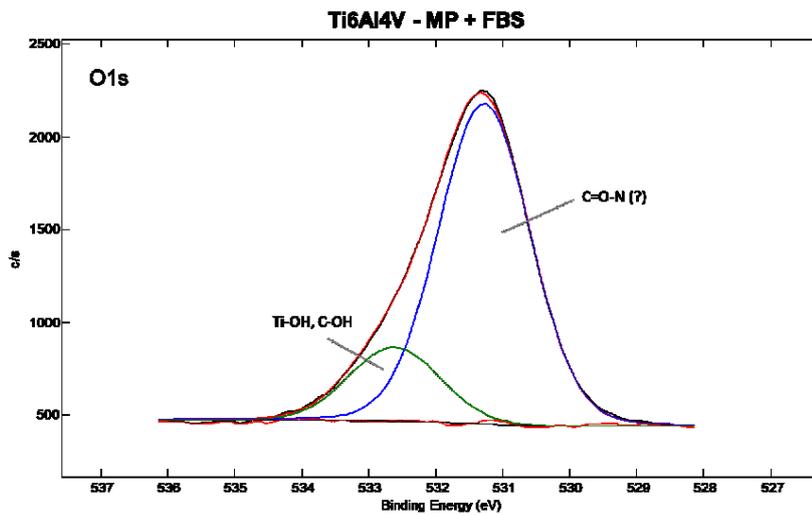


Figura 5.28 A sinistra, spettro XPS ad alta risoluzione di C1s del campione Ti6Al4V – MP + FBS. A destra riepilogo delle posizioni dei picchi e relative attribuzioni

Per quanto riguarda lo spettro XPS O1s (Figura 5.29), quello che si osserva, dopo l'adsorbimento di FBS, è il contributo relativo a due picchi: un primo picco ad una BE di 531,28 eV, ipotizzato essere

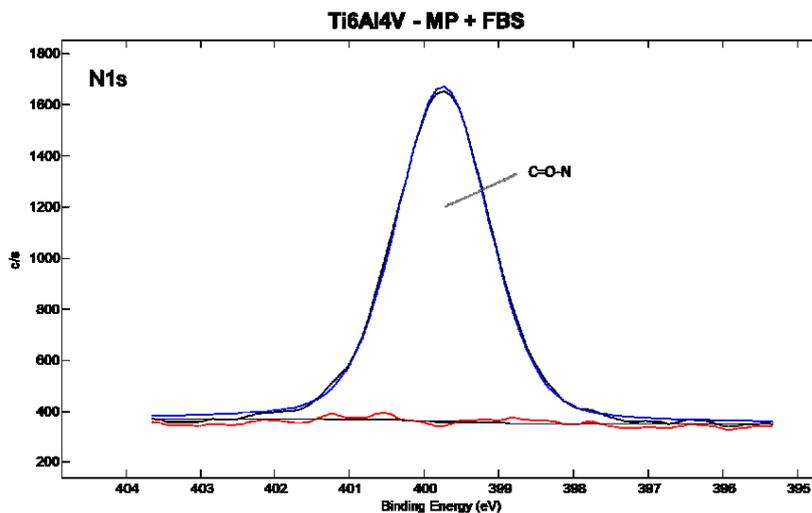
associabile alla presenza di legami peptidici del tipo C=O-NH-; un secondo picco, ad una BE di 532,62 eV che è riconoscibile come segnale degli ossidrili (Ti-OH o C-OH).



Ti6Al4V – MP + FBS		
O1s	attribuzione	
BE [eV]	area [%]	
531,28	81,82	C=O-N (?)
532,62	18,18	Ti-OH, C-OH

Figura 5.29 A sinistra, spettro XPS ad alta risoluzione di O1s del campione Ti6Al4V – MP + FBS. A destra riepilogo delle posizioni dei picchi e relative attribuzioni

Per quanto riguarda, infine, lo spettro XPS N1s (Figura 5.30), quello che si osserva, dopo l'adsorbimento di BFN, è la presenza di un unico picco, ad una BE di 399,75 eV, attribuibile alla presenza di legami peptidici del tipo -C=O-NH-.



Ti6Al4V – MP + FBS		
N1s	attribuzione	
BE [eV]	area [%]	
399,75	100,00	C=O-N

Figura 5.30 A sinistra, spettro XPS ad alta risoluzione di N1s del campione Ti6Al4V – MP + FBS. A destra riepilogo delle posizioni dei picchi e relative attribuzioni

Il confronto tra gli spettri ad alta risoluzione relativi al Ti6Al4V – MP e al Ti6Al4V – MP + FBS è riportato in Figura 5.31.

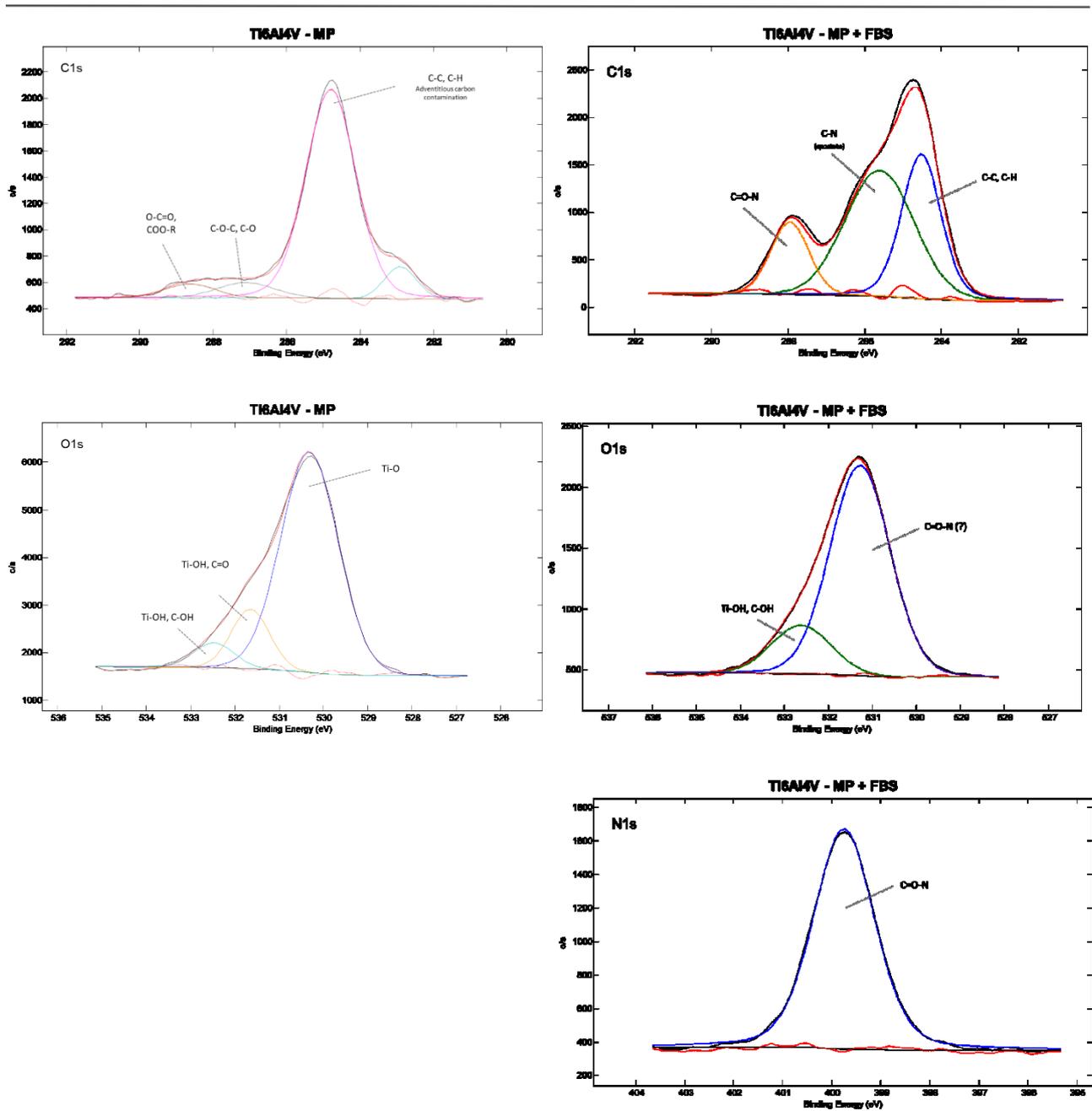


Figura 5.31 Presentazione degli spettri ad alta risoluzione (C1s, O1s e N1s) dei campioni Ti6Al4V – MP e Ti6Al4V – MP + FBS a confronto

### 1.1.1.8 Ti6Al4V - CT adsorbimento FBS

I risultati dell'analisi XPS dei campioni Ti6Al4V – CT sui quali è stata adsorbito il FBS sono riportati schematicamente di seguito.

**Spettri survey Ti6Al4V - CT e Ti6Al4V - CT + FBS.** In Figura 5.32 ed in Tabella 5.9 compaiono, a confronto, gli spettri di survey dei campioni Ti6Al4V – CT prima e dopo i test di adsorbimento proteico con FBS.

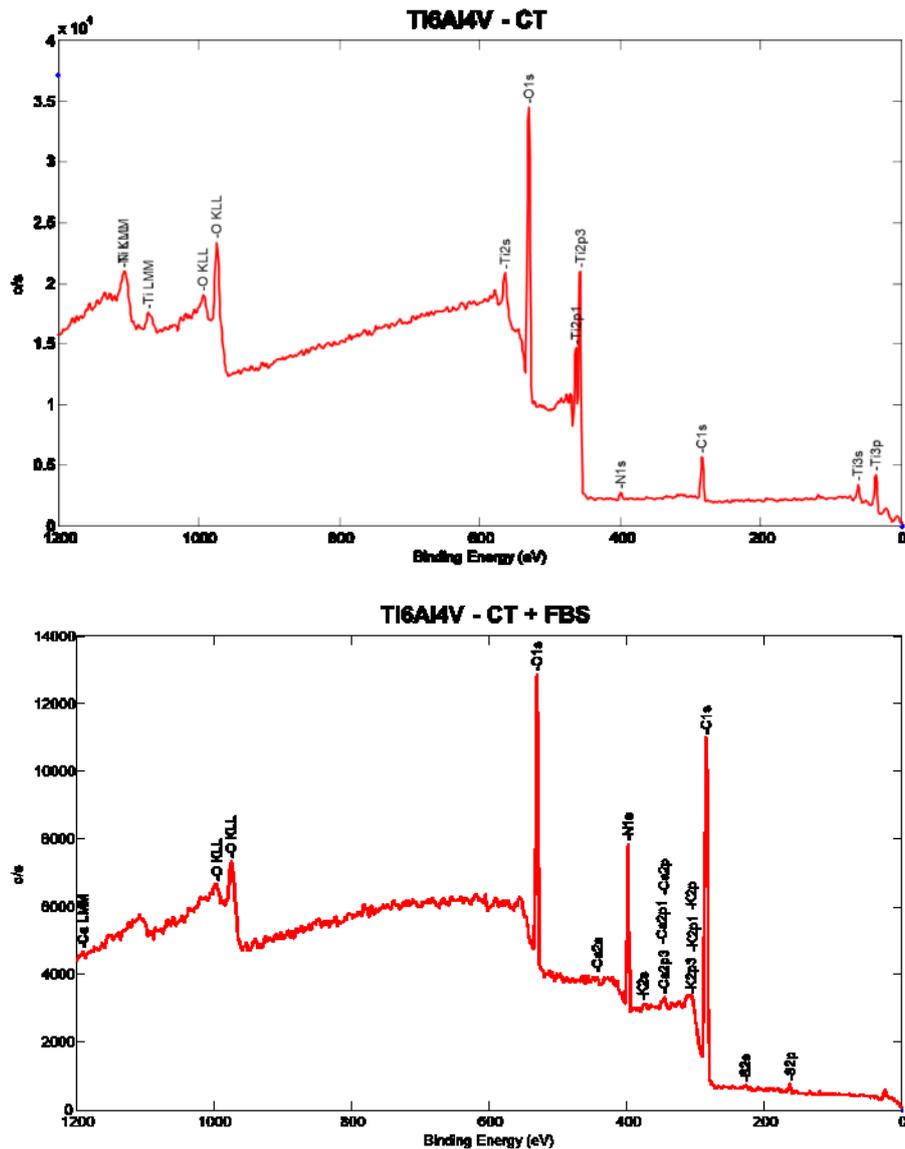


Figura 5.32 Spettri survey delle superfici Ti6Al4V – CT e Ti6Al4V – CT + FBS

Tabella 5.9 Composizione chimica superficiale delle superfici Ti6Al4V – CT e Ti6Al4V – CT + FBS

	Composizione chimica (% at)									
	O	C	Ti	Si	N	S	Na	Cl	Ca	K
Ti6Al4V - CT	60,7	20,7	16,2		2,3					
Ti6Al4V - CT + FBS	19,4	63,6			15,8	0,6			0,4	0,2

Nel caso dei campioni Ti6Al4V – CT, ad un primo esame, si può già osservare come vi sia una differenza rilevabile nella quantità di O e C presenti sulla superficie dei campioni, con O prevalente sulla superficie Ti6Al4V – CT e in quantità inferiore sulla superficie Ti6Al4V – MP + FBS, mentre C viceversa. Tale risultato può essere interpretato come indice dell'avvenuto

---

adsorbimento proteico. Il fatto che il segnale del Ti sia praticamente nullo sui campioni adsorbiti può essere anch'esso interpretato come indice dell'avvenuto adsorbimento proteico. In questo caso particolare, l'adsorbimento di proteine dal FBS risulta così spinto da andare a creare uno strato proteico superficiale in grado di mascherare completamente il substrato alla penetrazione del raggio X incidente. La presenza di N, che si rileva in percentuale nettamente maggiore sul campione Ti6Al4V - CT + FBS e inferiore sul campione Ti6Al4V - CT, è da interpretarsi, per il campione Ti6Al4V - CT come attribuibile a contaminazione ambientale mentre per il campione Ti6Al4V - CT + FBS come attribuibile a due diversi contributi: uno, conseguenza della contaminazione ambientale e l'altro conseguenza dell'avvenuto adsorbimento proteico. La presenza di S sulla superficie del campione Ti6Al4V - CT + FBS è, come nel caso precedente, da interpretarsi di nuovo come indice dell'avvenuto adsorbimento proteico; S è un componente fondamentale della struttura di quelle proteine caratterizzate dalla presenza di amminoacidi come la cisteina, in grado di formare ponti disolfuro. La modesta quantità di Ca rilevato, infine, è da attribuirsi o agli effetti dell'adsorbimento di ioni della soluzione PBS da parte della superficie oppure dall'eventualità che sulla superficie si depositino proteine cosiddette "*calcium binding*" ovvero in grado di legarsi al Ca presente in PBS. Anche la presenza di K, rilevato sulla superficie si può ricondurre o agli effetti dell'adsorbimento di ioni della soluzione PBS da parte della superficie oppure dall'eventualità che sulla superficie si depositino proteine in grado di legare il K presente in PBS.

**Spettri high resolution Ti6Al4V - CT e Ti6Al4V - CT + FBS.** I risultati dell'analisi XPS dei campioni Ti6Al4V - CT prima e dopo l'adsorbimento di FBS per quanto riguarda gli spettri ad alta risoluzione di C1s, O1s e N1s sono discussi in dettaglio. In particolare, l'analisi degli spettri ad alta risoluzione dei campioni Ti6Al4V - CT + FBS di C1s, O1s e N1s permette di fare le seguenti osservazioni.

Per quanto riguarda lo spettro XPS C1s (Figura 5.33), quello che si osserva, dopo l'adsorbimento di FBS, è la presenza di tre diversi picchi che concorrono a formare lo spettro C1s. Questi tre picchi, corrispondenti ad atomi di carbonio in differenti condizioni ambientali e di legame, si possono così classificare: il picco con la BE pari a 284,52 eV associabile alla presenza di legami idrocarburici saturi (-CH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>-) derivanti dall'effetto della contaminazione ambientale; il picco alla BE di circa 285,61 eV, ma ritenuto leggermente spostato, è ipotizzato invece riconducibile alla presenza di

gruppi di tipo -C-NH-; un picco associato alla presenza del legame peptidico (-C=O-NH-) con BE pari a 287,95 eV. Di fatto, per il FBS si ha uno spettro C1s molto simile, per forma, a quello rilevato per la BSA.

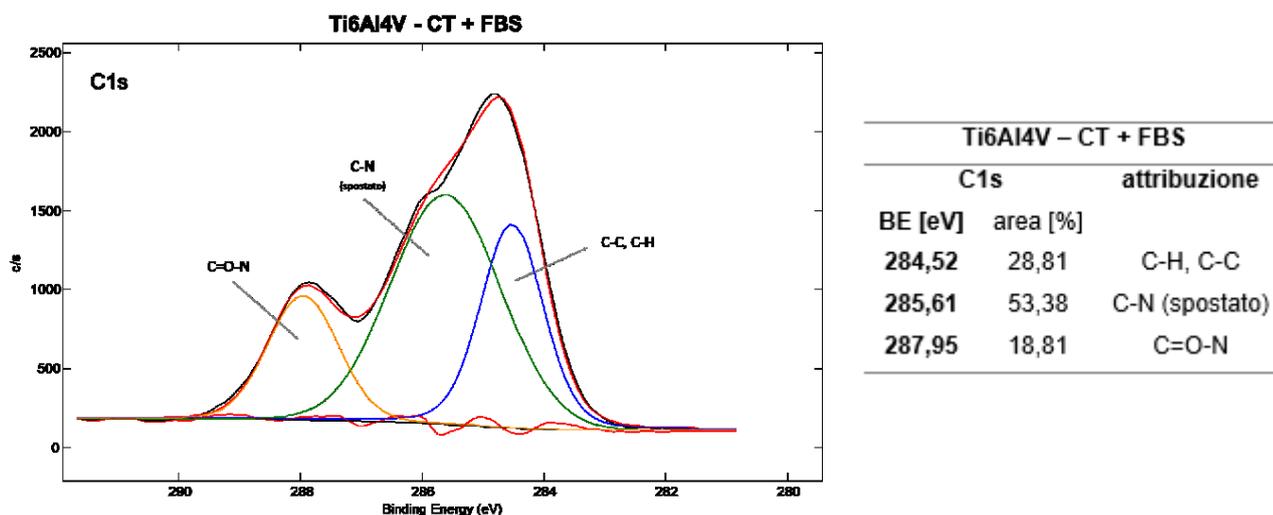


Figura 5.33 A sinistra, spettro XPS ad alta risoluzione di C1s del campione Ti6Al4V - CT + FBS. A destra riepilogo delle posizioni dei picchi e relative attribuzioni

Per quanto riguarda lo spettro XPS O1s (Figura 5.34), quello che si osserva, dopo l'adsorbimento di FBS, è il contributo relativo a due picchi: un primo ad una BE di 531,22 eV ed ipotizzato attribuibile alla presenza di un legame peptidico; un secondo picco, ad una BE di 532,35 eV, riconoscibile come segnale degli ossidrili (Ti-OH o C-OH).

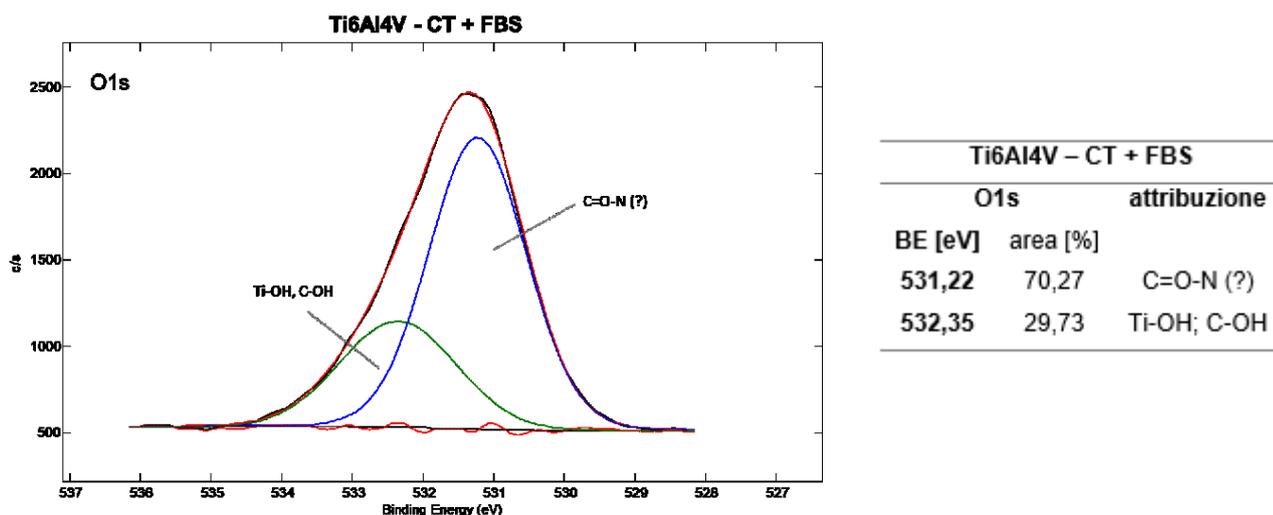


Figura 5.34 A sinistra, spettro XPS ad alta risoluzione di O1s del campione Ti6Al4V - CT + FBS. A destra riepilogo delle posizioni dei picchi e relative attribuzioni

Per quanto riguarda, infine, lo spettro XPS N1s (Figura 5.35), quello che si osserva, dopo l'adsorbimento di FBS, è la presenza di un unico picco ad una BE di 399,80 eV attribuibile alla presenza di legami peptidici del tipo -C=O-NH-.

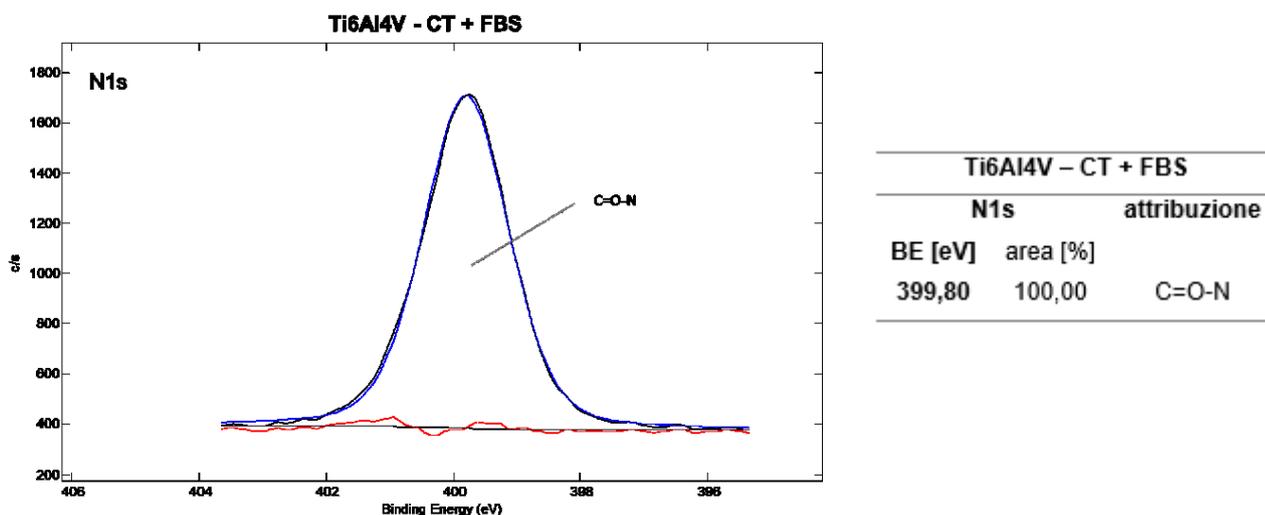


Figura 5.35 A sinistra, spettro XPS ad alta risoluzione di N1s del campione Ti6Al4V – CT + FBS. A destra riepilogo delle posizioni dei picchi e relative attribuzioni

Il confronto tra gli spettri ad alta risoluzione relativi al Ti6Al4V – CT e al Ti6Al4V – CT + FBS è riportato in Figura 5.36.

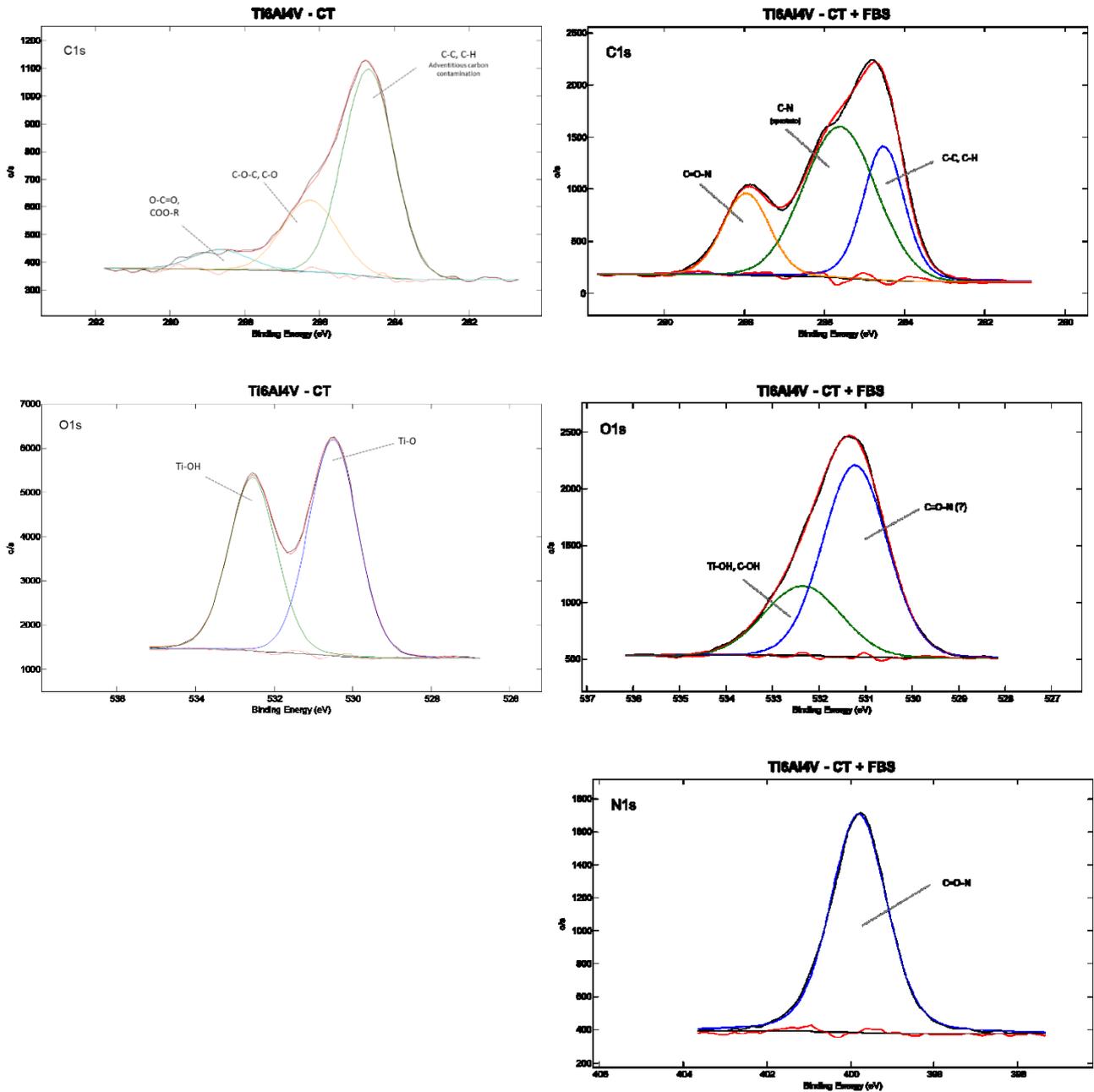


Figura 5.36 Presentazione degli spettri ad alta risoluzione (C1s, O1s e N1s) dei campioni Ti6Al4V – CT e Ti6Al4V – CT + FBS a confronto

### 1.1.1.9 Adsorbimento FBS a confronto

I risultati dell'analisi XPS dei campioni Ti6Al4V – MP e Ti6Al4V – CT, prima e dopo l'adsorbimento di FBS sono riportati in modo schematico e riassuntivo in Tabella 5.10 per dare la possibilità di confrontare i dati tra loro.

Tabella 5.10 Composizione chimica superficiale delle superfici in Ti6Al4V prima e dopo adsorbimento di FBS

	Composizione chimica (% at)									
	O	C	Ti	Si	N	S	Na	Cl	Ca	K
Ti6Al4V - MP	43,5	39,4	10,7	4,4	2,1					
Ti6Al4V - MP + FBS	18,9	65,8	0,1		14,4	0,5			0,3	
Ti6Al4V - CT	60,7	20,7	16,2		2,3					
Ti6Al4V - CT + FBS	19,4	63,6			15,8	0,6			0,4	0,2

Anche dai risultati degli spettri *survey* è possibile osservare il dato seguente: non esiste una marcata differenza nel comportamento di adsorbimento di FBS sul campione Ti6Al4V – MP rispetto a quello Ti6Al4V – CT. Di fatto, la percentuale atomica di Ti su entrambi i campioni diminuisce quasi con lo stesso rapporto tra prima e dopo l’adsorbimento. La percentuale atomica di N, al contrario, aumenta in entrambi i casi così come si mantengono inalterati gli andamenti della percentuale atomica di O (che diminuisce) e C (che aumenta) se si confrontano i campioni prima e dopo l’adsorbimento di FBS. A parità di soluzione FBS utilizzata, pertanto, il risultato di questo esperimento non permette di osservare differenza sostanziale nell’adsorbimento delle proteine dal FBS. Questo risultato, come si vedrà nelle sezioni successive, risulta confermato dai test di adsorbimento proteico eseguiti mediante saggio BCA. Non è dunque possibile ipotizzare, in base ai dati ottenuti, che vi sia un adsorbimento più o meno abbondante da parte delle proteine del FBS per il campione Ti6Al4V – MP in confronto con il campione Ti6Al4V – CT. Non è possibile, inoltre, in base ai dati ottenuti, fare ipotesi sulla tipologia di proteine che vengono adsorbite sul Ti6Al4V – MP e sul Ti6Al4V – CT a seguito dell’adsorbimento di FBS.

#### 1.1.1.10 Riassunto dei risultati

Considerando i risultati dell’analisi XPS per quanto concerne gli spettri *survey* (riassunti in Tabella 5.11) e ad alta risoluzione del Ti6Al4V – MP (si vedano le sezioni precedenti) è possibile ipotizzare che sui campioni vi sia, in generale, un adsorbimento proteico dagli effetti comparabili sia per quanto riguarda la BSA che per quanto riguarda il FBS. Questo risultato può derivare dalle seguenti considerazioni. Dal momento che la BSA è stata utilizzata, come soluzione singola, in concentrazione comparabile a quella che si ritrova nel FBS, probabilmente essa è stata adsorbita in modo uguale. A questo si pensa associato il contributo simile nella percentuale atomica dei vari elementi dello spettro XPS per entrambi i casi cioè: sia testando i substrati a contatto con la

---

soluzione a singola proteina; sia con la soluzione multicomponente. In entrambi i casi è probabile che si adsorba una quantità simile di BSA e dia un contributo rilevante alla formazione dello spettro. Per ciò che riguarda la BFN, invece, il discorso è differente. La BFN non appare essersi adsorbita al substrato lucido in maniera abbondante come nel caso della BSA, infatti parte del substrato espone ancora il metallo sottostante. Questo risultato è attribuibile, in parte, al fatto che la BFN è stata utilizzata in concentrazione inferiore per gli esperimenti ed in parte attribuibile ad una scarsa propensione intrinseca al metallo lucido ad adsorbire BFN. Si potrebbe ipotizzare un ruolo, della superficie del substrato lucido, nello sfavorire l'adsorbimento di BFN rispetto alla BSA. In generale, infatti, i dati sembrerebbero provare una propensione del metallo lucido ad adsorbire BSA piuttosto che BFN, ma non si possono avanzare ipotesi così certe sull'efficienza dell'adsorbimento proteico di BFN in confronto alla BSA, proprio perché le concentrazioni utilizzate per gli esperimenti sono differenti. Si può dire che, dai dati osservati, utilizzando la soluzione di BFN in concentrazione minore si è rilevato comunque un certo grado di adsorbimento; un certo adsorbimento è stato rilevato, però, utilizzando la soluzione di BSA in concentrazione maggiore e un adsorbimento simile è rilevabile anche nel caso dell'FBS. Si ricorda che, nel caso dell'FBS potrebbe intervenire un effetto di adsorbimento competitivo tra proteine della soluzione (effetto Vroman).

Considerando, invece, i risultati dell'analisi XPS per quanto concerne gli spettri *survey* (riassunti sempre in Tabella 5.11) e ad alta risoluzione del Ti6Al4V – CT (si vedano le sezioni precedenti), è possibile notare come sui campioni vi sia, in generale, un adsorbimento proteico dagli effetti differenti per il caso di BSA, BFN e FBS. Dal momento che la BSA è stata utilizzata, come soluzione singola, in concentrazione comparabile a quella che si ritrova nel FBS, probabilmente essa viene adsorbita in modo quasi uguale ed in quantità rilevante. Per ciò che riguarda la BFN, però, in questo caso le cose cambiano. La BFN pare adsorbirsi al substrato ossidato in maniera relativamente abbondante, se in rapporto alla BSA (e alla luce del fatto che la concentrazione di BFN utilizzata per gli esperimenti è minore di quella utilizzata per la BSA). Parte del substrato ossidato, in realtà, sia nel caso della BSA che nel caso della BFN espone ancora il metallo sottostante. Da momento che la BFN è stata utilizzata in concentrazione inferiore per gli esperimenti, quest'ultimo risultato poteva essere ipotizzato a priori. Non altrettanto prevedibile è invece il dato relativo all'adsorbimento di BSA che, utilizzata in concentrazione maggiore, sembra

non essere riuscita ad adsorbirsi in abbondanza sul substrato ossidato. In generale, i dati analizzati sembrerebbero provare una propensione del metallo ossidato ad adsorbire BFN piuttosto che BSA, ma non si possono avanzare ipotesi così certe sull'efficienza dell'adsorbimento proteico di BFN in confronto alla BSA, di nuovo perché le concentrazioni utilizzate per gli esperimenti sono differenti. Si può dire che, dai dati osservati, utilizzando la soluzione di BFN in concentrazione minore si è rilevato comunque un certo adsorbimento; adsorbimento che non è sembrato dare un risultato altrettanto buono utilizzando la soluzione di BSA in concentrazione maggiore. Per quanto riguarda, infine, il caso dell'FBS si ricorda anche in questo contesto come sia possibile che si verifichi un fenomeno di adsorbimento competitivo tra proteine della soluzione (effetto Vroman).

In entrambi i casi, cioè sia per il Ti6Al4V – MP che per il Ti6Al4V – CT, i risultati relativi all'adsorbimento di FBS risultano di più difficile interpretazione. Test biochimici come il *western blot* potrebbero dare maggiori informazioni in merito alla quantità e alla tipologia di proteine adsorbite dal FBS.

Tabella 5.11 Riassunto dei dati sulla composizione chimica superficiale delle superfici Ti6Al4V – MP e Ti6Al4V – CT

	Composizione chimica (% at)									
	O	C	Ti	Si	N	S	Na	Cl	Ca	K
<b>Ti6Al4V - MP</b>	43,5	39,4	10,7	4,4	2,1					
<b>Ti6Al4V - MP + BSA</b>	15,5	62,3	<0.1		15,6	0,7	4,0	1,9		
<b>Ti6Al4V - MP + BFN</b>	27,1	56,6	3,2	2,0	10,2		1,0			
<b>Ti6Al4V - MP + FBS</b>	18,9	65,8	0,1		14,4	0,5			0,3	
<b>Ti6Al4V - CT</b>	60,7	20,7	16,2		2,3					
<b>Ti6Al4V - CT + BSA</b>	25,9	56,2	2,8		14,2	1,0				
<b>Ti6Al4V - CT + BFN</b>	29,0	52,4	3,6		13,0		2,0			
<b>Ti6Al4V - CT + FBS</b>	19,4	63,6			15,8	0,6			0,4	0,2

### 5.1.2 Bagnabilità

In questa sezione sono riportati i risultati relativi alle prove di bagnabilità eseguite per la determinazione delle caratteristiche superficiali dei campioni Ti6Al4V – MP e Ti6Al4V – CT. La bagnabilità è stata valutata nei confronti di due fluidi diversi: acqua purificata e deionizzata (Milli-Q) e sangue umano prelevato da volontario sano.

### 5.1.2.1 Bagnabilità nei confronti dell'acqua

I risultati delle prove di bagnabilità dei campioni a contatto con acqua per i campioni Ti6Al4V – MP e per i campioni Ti6Al4V - CT sono riportati in Figura 5.37. Per i campioni in Ti6Al4V – MP sono state eseguite sei misure mentre per i campioni in Ti6Al4V – CT sono state eseguite otto misure. In base ai valori delle misure ottenute sono state calcolate sia la media che la deviazione standard dell'angolo di contatto statico, come riportato in Figura 5.37.

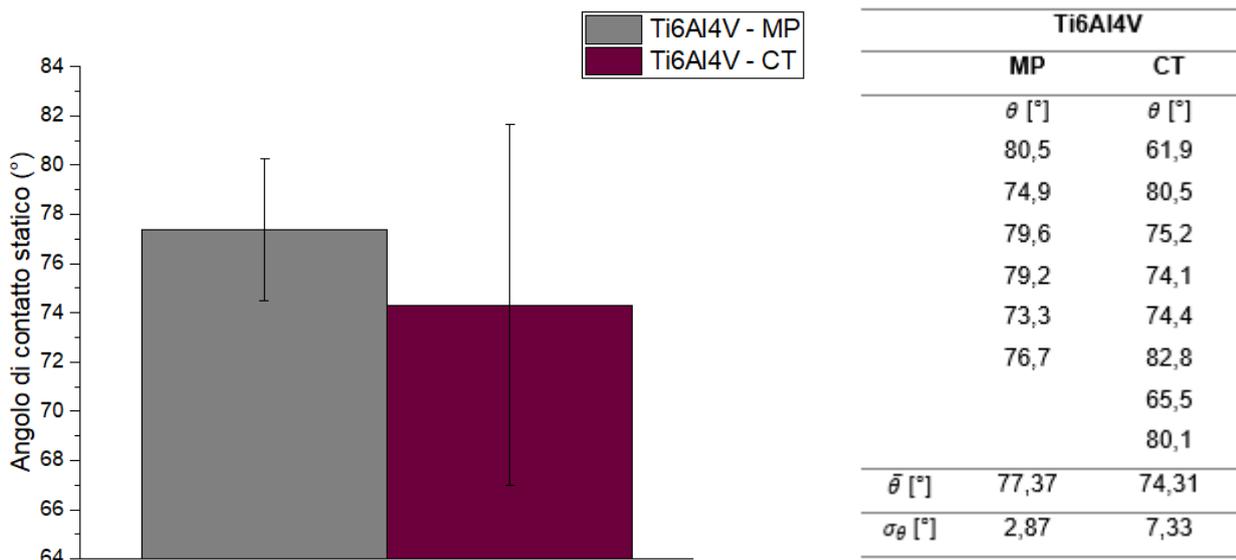


Figura 5.37 Risultati delle misure di bagnabilità con acqua per i campioni Ti6Al4V – MP e Ti6Al4V – CT

In entrambi i casi, come messo in evidenza dalla Figura 5.37, le superficie sono debolmente idrofile. L'angolo di contatto statico dell'acqua misurato sui campioni Ti6Al4V – MP risulta pari a  $77,37 \pm 2,87^\circ$  mentre la stessa misura, sui campioni Ti6Al4V – CT dà come risultato  $74,31 \pm 7,33^\circ$ . Questo a confermare come il processo di modifica superficiale per ottenere una superficie multifunzionale nano strutturata sia in grado di aumentare leggermente la bagnabilità della superficie, grazie al fatto che il trattamento è in grado di modificare la superficie del substrato per via dell'aumento di densità di gruppi OH che induce (cosa che, di conseguenza, si riflette in una aumentata bagnabilità).

### 5.1.2.2 Bagnabilità nei confronti del sangue

I risultati delle prove di bagnabilità dei campioni a contatto con il sangue per i campioni Ti6Al4V – MP e per i campioni sottoposti a trattamento chimico di modifica superficiale Ti6Al4V – CT sono riportati in Figura 5.38. Come anticipato nel Capitolo 4, le prove di bagnabilità dei campioni a

contatto con il sangue sono state eseguite presso il dipartimento di Scienze Matematiche e Informatiche, Scienze Fisiche e Scienze della Terra (MIFT) dell'Università degli Studi di Messina. In dettaglio, per i campioni in Ti6Al4V – MP sono state eseguite undici misure mentre per i campioni in Ti6Al4V – CT sono state eseguite dieci misure. In base ai valori delle misure ottenute sono state calcolate sia la media che la deviazione standard.

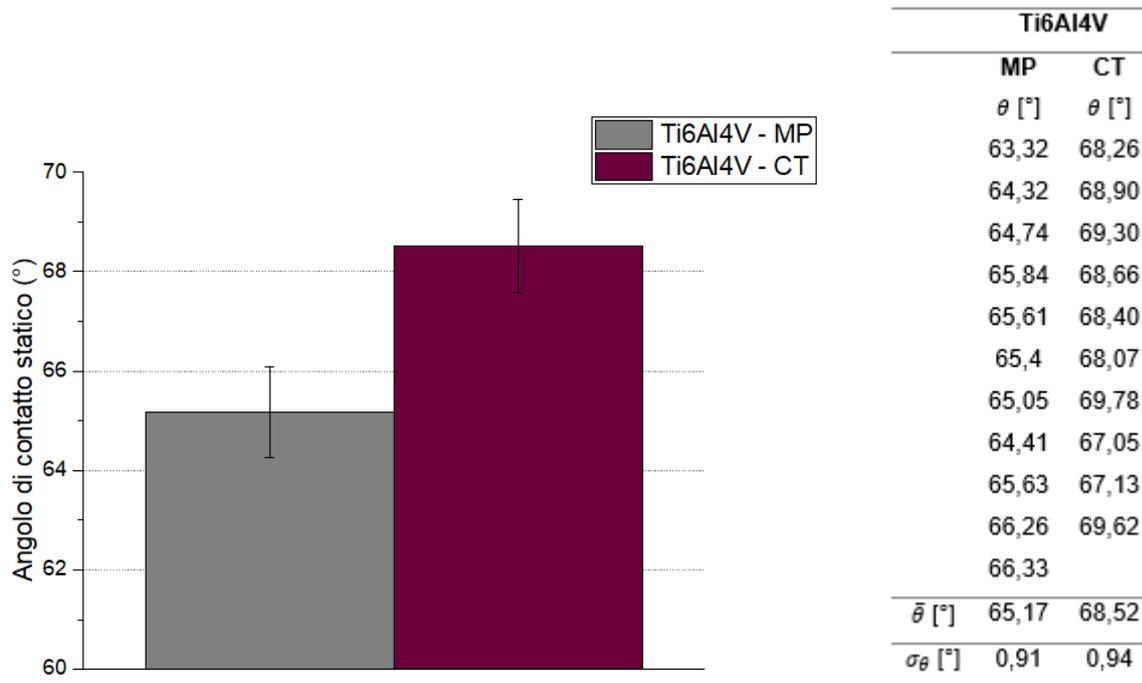


Figura 5.38 Risultati delle misure di bagnabilità con sangue per i campioni Ti6Al4V – MP e Ti6Al4V – CT

In Figura 5.39 sono invece in mostra due immagini di esempio relative agli esperimenti eseguiti dove è possibile notare la differenza tra il risultato relativo al Ti6Al4V – MP e quello relativo al Ti6Al4V – CT.

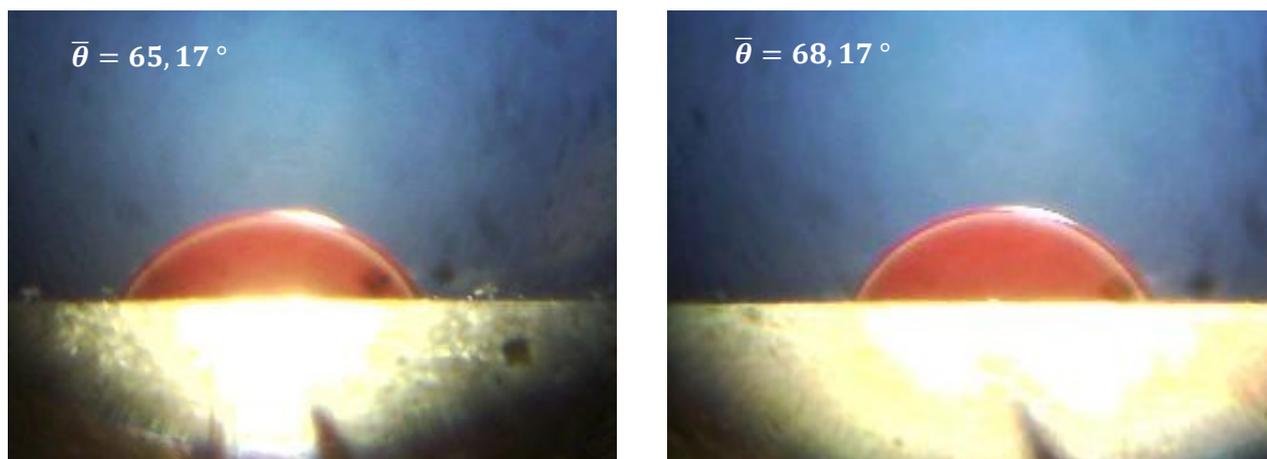


Figura 5.39 Immagini di esempio relative alle prove di bagnabilità con il sangue eseguite presso l'Università degli Studi di Messina

L'angolo statico di contatto con il sangue su campioni Ti6Al4V – MP è risultato di  $65,17 \pm 0,91^\circ$ , mentre su campioni Ti6Al4V – CT è risultato pari a  $68,52 \pm 0,94^\circ$ . La superficie, in entrambi i casi, si dimostra debolmente idrofila e bagnabile nei confronti del sangue. Sembra però che il processo di modifica superficiale vada a diminuire leggermente la bagnabilità della superficie Ti6Al4V – CT nei confronti del sangue, rispetto a quanto si verifica per la superficie Ti6Al4V – MP. Diverse sono le ipotesi che possono spiegare questo comportamento. Una può essere giustificata dal fatto che, probabilmente, la bagnabilità diminuisce a causa del fatto che il trattamento in sé aumenta la superficie esposta al fluido. Si ricorda infatti come, ad un aumento della ruvidità della superficie, sia associata una variazione della bagnabilità macroscopica nella direzione di aumentare la tensione superficiale critica, riducendo così al contempo il valore dell'angolo di contatto statico. Altra ipotesi può essere il fatto che il sangue stesso, sia più disponibile a bagnare la superficie Ti6Al4V – CT per qualche motivo legato alla sua composizione, dal momento che contiene una moltitudine di diverse biomolecole e contiene anche cellule.

Nello schema riportato in Figura 5.40 sono messi a confronto tra loro i risultati delle prove di bagnabilità con acqua e sangue. Come evidente, le misure di angolo di contatto con l'acqua e con il sangue hanno prodotto esiti differenti tra loro. In particolare, il fatto che entrambe le superfici Ti6Al4V – MP e Ti6Al4V – CT risultino più bagnabili nei confronti del sangue rispetto all'acqua è un fatto importante, alla luce dell'applicazione della lega di titanio in vivo. È infatti il sangue il fluido con cui il biomateriale si interfaccia nei primi momenti successivi all'impianto. Una buona bagnabilità della superficie da parte del sangue potrebbe essere un indice della buona capacità del biomateriale di interfacciarsi con i tessuti biologici e i fluidi biologici e, eventualmente, adsorbire

---

da essi componenti organici od inorganici (i.e. proteine o ioni) in grado di mediare una risposta favorevole tra substrato e cellule circostanti.

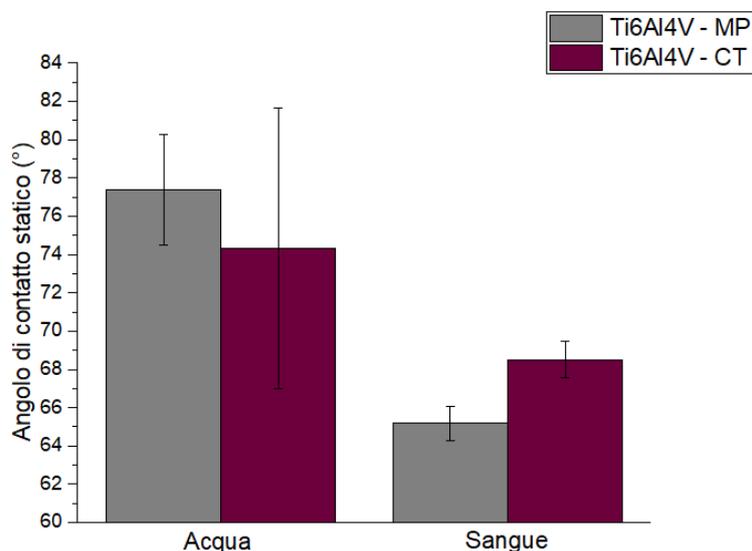


Figura 5.40 Confronto tra i risultati di bagnabilità a contatto con sangue ed acqua per i campioni Ti6Al4V – MP e Ti6Al4V – CT

Un risultato del genere, pertanto, si dimostra promettente in vista di future applicazioni in campo biomedico, nei settori ortopedico e dentale. Ulteriori approfondite indagini sulla bagnabilità, la carica e l'energia superficiale delle superfici Ti6Al4V – MP e Ti6Al4V – CT potrebbero rivelarsi utili ad analizzare meglio la condizione appena discussa e rilevata nel presente lavoro di tesi.

### 5.1.3 Potenziale zeta

Il potenziale  $\zeta$  è stato utilizzato come parametro per l'analisi della superficie dei campioni su cui si è valutato il fenomeno di adsorbimento proteico.

La formazione di carica all'interfaccia solido-liquido è guidata da vari processi, tra cui i più importanti sono le reazioni acido-base tra i gruppi funzionali in superficie e l'acqua e l'adsorbimento fisico di ioni acquosi. Poiché questi processi dipendono fortemente dal pH della soluzione acquosa, il pH è il più importante parametro della fase liquida che influenza il potenziale  $\zeta$ . I dati del potenziale  $\zeta$  devono allora riferirsi al pH della soluzione acquosa usata per l'analisi. La titolazione ha come obiettivo principale la stima del punto isoelettrico (pI), che è il pH a cui il potenziale zeta cambia segno assumendo il valore di 0 mV. Ciò equivale ad una carica elettrocinetica netta di 0 C/m<sup>2</sup> e quindi ad un equilibrio tra i gruppi superficiali carichi positivamente e negativamente (oppure ad una assenza di carica superficiale).

---

Il primo gruppo di misure di potenziale  $\zeta$  è stato condotto sui campioni Ti6Al4V – MP e Ti6Al4V – CT tal quali. In questo caso, utilizzando campioni senza componenti organici adsorbiti, è stato utilizzato lo stesso insieme di campioni sia per la titolazione nel range basico che per la titolazione nel range acido. I campioni su cui sono state fatte adsorbire le proteine, al contrario, sono stati sostituiti e dunque è stato impiegato un certo insieme di campioni per la titolazione acida ed un differente insieme per la titolazione basica.

Per realizzare i grafici presentati di seguito è stato utilizzato il software OriginLab Pro®. I grafici di pH in funzione del potenziale  $\zeta$  sono stati tracciati utilizzando lo strumento di creazione guidata dei “Plot”, scegliendo di utilizzare le funzionalità “Line+Symbol”→“Spline Connected”. Per disegnare la curva di *fitting* dei dati è stata utilizzata una equazione parametrica del tipo “Modified Bézier”. L'equazione proposta contiene parametri per sagomare la curva che meglio si adatta alla connessione dei punti in modo da regolare al più adeguatamente possibile la forma della curva stessa.

#### 5.1.3.1 Confronto Ti6Al4V - MP e Ti6Al4V - CT

Il primo esperimento ha portato ad ottenere i seguenti grafici relativi alle misure di potenziale  $\zeta$  per i campioni Ti6Al4V – MP e quelli Ti6Al4V – CT ha dato i risultati riportati in confronto in Figura 5.41. In particolare, il risultato relativo al Ti6Al4V – MP ha suscitato incertezze nell'interpretazione. Il plateau in regione basica approssimativamente intorno ai -70 mV è risultato infatti in accordo con i risultati di altri studi che prevedono il titanio carico negativamente a pH basici, ma non è stato altrettanto facile chiarire la presenza del pI ad un valore di pH di 3,4. Si è ipotizzato, per spiegare questo valore di pI (basso e differente dai valori che normalmente sono riscontrabili in altri lavori di letteratura) una contaminazione superficiale data dall'utilizzo, in fase di lucidatura a specchio di silice colloidale (si ricordi che il pI della silice tipicamente si assesta in un range compreso tra 1,7 e 3,5 [136]).

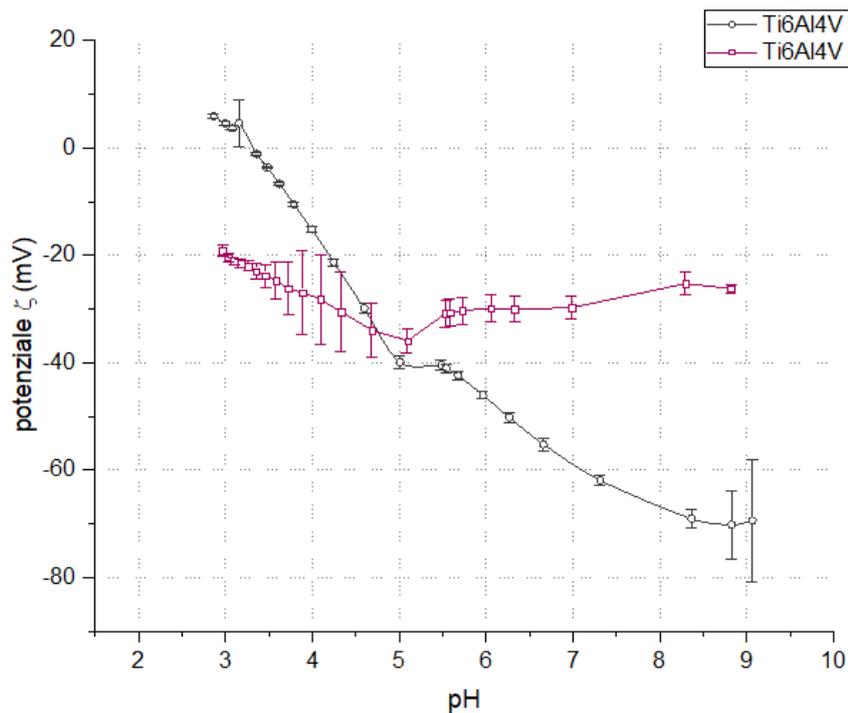


Figura 5.41 Curve di potenziale  $\zeta$  per il Ti6Al4V - MP e per il Ti6Al4V - CT

È per questo che le misure sono state confrontate con misure precedenti, sempre relative a campioni dello stesso tipo, cioè Ti6Al4V - MP e Ti6Al4V - CT, come mostrato in Figura 5.42. Come possibile notare, le misure relative a Ti6Al4V - CT I e Ti6Al4V - CT II non mostrano nette differenze se non nel plateau che si forma nel range basico, ad un potenziale  $\zeta$  leggermente superiore (di una decina di mV) nel caso di Ti6Al4V - CT I rispetto a Ti6Al4V - CT II. Le misure relative a Ti6Al4V - MP I e Ti6Al4V - MP II, al contrario, sembrano in accordo se si osserva l'andamento nel range basico, ma nel range acido il comportamento tra i due campioni testati si discosta di molto, specialmente per quanto riguarda il valore dove si può individuare il pI.

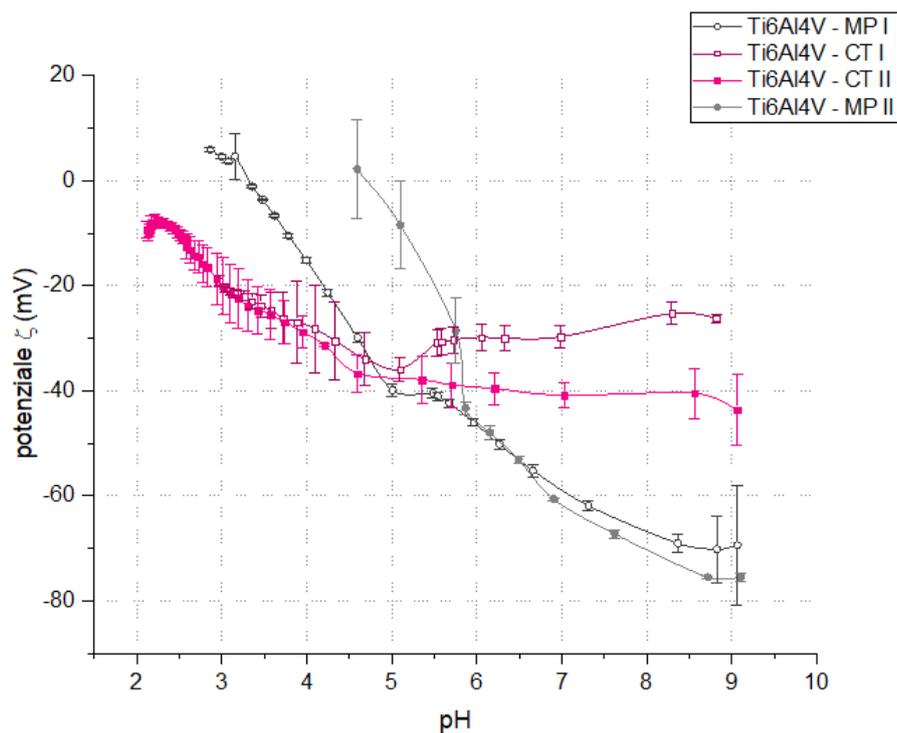


Figura 5.42 Curve di potenziale  $\zeta$  per il Ti6Al4V – MP e il Ti6Al4V – CT. Risultati di due diversi esperimenti a confronto

Come anticipato anche in precedenza, è pensabile che il gruppo di campioni Ti6Al4V – CT I abbia subito o si sia portato con sé contaminazioni occorse in fase di lucidatura. Per questo motivo si è ritenuto di andare ad utilizzare, per i confronti che sono presentati nel seguito del presente lavoro di tesi, i risultati relativi alle misure dei campioni Ti6Al4V – MP II e Ti6Al4V – CT II. Con lo scopo di alleggerire la trattazione e renderla più scorrevole, si farà da ora in avanti nel testo riferimento ai campioni Ti6Al4V – MP II e Ti6Al4V – CT II genericamente con la sigla Ti6Al4V – CT e Ti6Al4V – MP. I dati relativi ai campioni ora definiti come Ti6Al4V – CT e Ti6Al4V – MP, da questo punto in avanti, saranno confrontati con quelli dei campioni su cui si andrà a valutare l'effetto dell'adsorbimento proteico. Un grafico che riporta le curve relative a Ti6Al4V – CT e Ti6Al4V – MP così come sopra definite è riportato in Figura 5.43. Tali curve sono quelle che verranno confrontate con gli altri risultati nel seguito dell'esposizione.

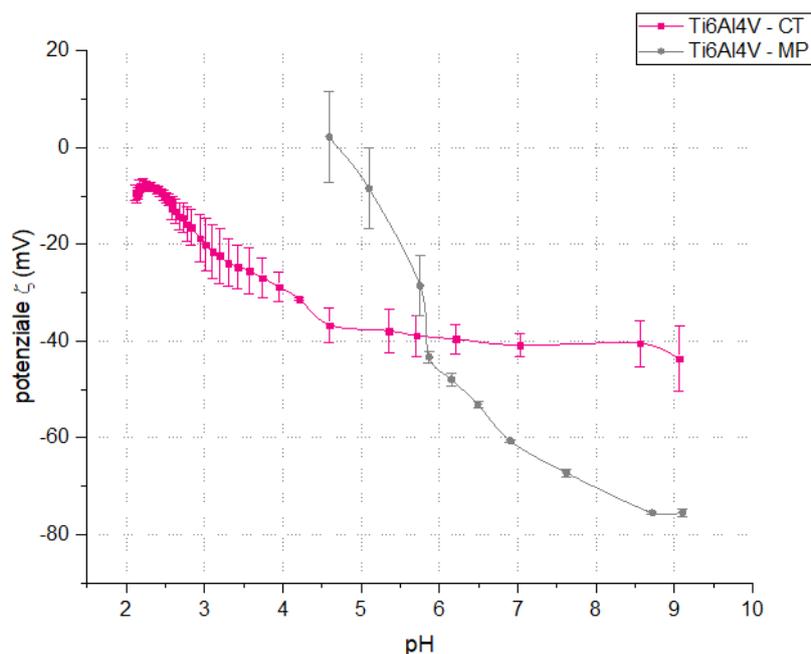


Figura 5.43 Curve di potenziale  $\zeta$  di riferimento per il Ti6Al4V - MP e il Ti6Al4V - CT

Si osserva, per la superficie Ti6Al4V - MP un pI nell'intorno al di 4,7 in accordo con i valori riportati in letteratura per le superficie in titanio. Al contrario, per la superficie Ti6Al4V - CT si rileva un significativo spostamento del pI verso valori di pH bassi, acidi. Non risulta possibile, in questo caso, determinare il valore preciso del pI considerato il fatto che la regione dove esso è stimato è di natura acidica, siccome lì possono essere presenti artefatti che potrebbero andare ad inficiare l'esatta determinazione del valore di pI. Quest'ultimo risultato osservato per il Ti6Al4V - CT, però, insieme con la comparsa di un definito plateau nella regione basica (tra pH 7 e 9), come messo in evidenza dalla Figura 5.44 porta ad ipotizzare che vi sia una notevole densità superficiale di gruppi OH. Anche questo risultato sembra in accordo con quanto osservato tramite analisi XPS.

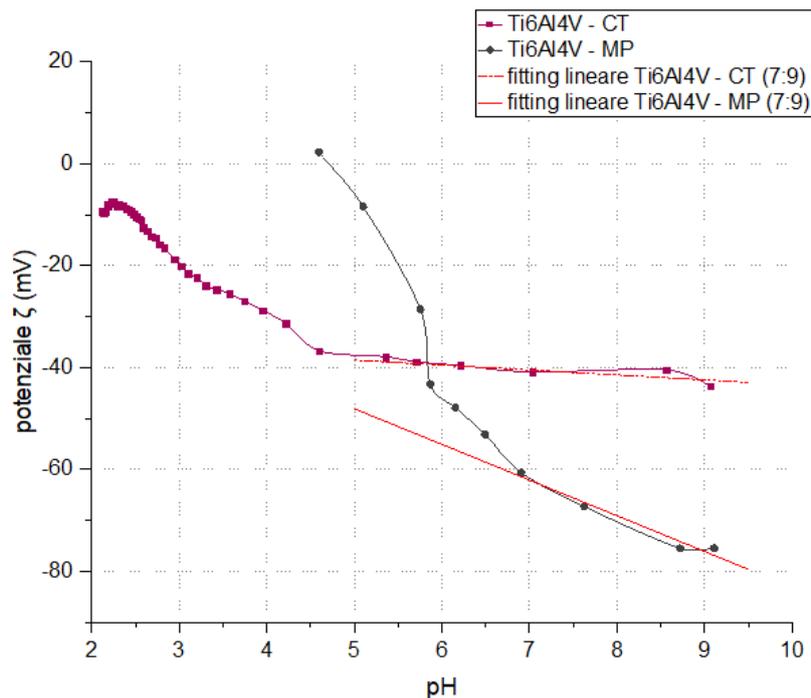


Figura 5.44 Dettaglio della pendenza delle curve di potenziale  $\zeta$  nel range di pH compreso tra 7 e 9

A pH fisiologico (pH = 7,4) entrambi i due materiali considerati sono caricati negativamente. Il potenziale  $\zeta$  a pH fisiologico nei due casi, però, è differente per valore, dal momento che il valore di  $\zeta$  per i campioni Ti6Al4V – MP è inferiore di quello Ti6Al4V – CT (-65,2 mV e -40,8 mV circa, rispettivamente). Poiché i valori differenti del potenziale  $\zeta$  a pH fissato riflettono la differente carica della superficie del materiale, è possibile supporre che entrambe le superfici considerate, in questo caso, mostrino una carica netta negativa complessiva a contatto con i fluidi a pH fisiologico. La principale differenza a pH fisiologico tra le due superfici può essere spiegata come segue: la superficie Ti6Al4V - MP ha una carica superficiale fortemente negativa (a causa della sua natura idrofoba) e le molecole di acqua adsorbita sono facilmente sostituibili dai gruppi  $\text{OH}^-$  provenienti dalla soluzione in un intervallo debolmente basico, senza la presenza di un qualsiasi gruppo funzionale attivo. Al contrario, la superficie Ti6Al4V - CT ha una carica superficiale negativa perché mostra gruppi funzionali  $\text{OH}^-$  completamente deprotonati a pH fisiologico che sono in grado di attrarre e creare legami chimici con particelle caricate positivamente o gruppi funzionali di biomolecole dalla soluzione.

Altra osservazione interessante è possibile andando ad analizzare la pendenza delle curve Ti6Al4V - MP e Ti6Al4V - CT nell'intervallo di pH tra 5 e 6 (Figura 5.45). La pendenza della curva del grafico pH-potenziale  $\zeta$ , infatti, può dare un'indicazione della idrofilicità/idrofobicità superficiale

di un substrato. In particolare, una pendenza più elevata può essere associata ad un comportamento più idrofobo, poiché la superficie lega debolmente l'acqua che si scambia facilmente con gli ioni dalla soluzione. Da queste considerazioni, si può notare che il campione Ti6Al4V - CT è dotato di un comportamento più idrofilo rispetto alla controparte Ti6Al4V - MP. Specificatamente, il comportamento idrofilo del Ti6Al4V - CT è in conformità con l'elevato grado di idrossilazione superficiale (confermato anche dai risultati XPS) e ciò può essere pensato come dimostrazione della migliore bagnabilità che il Ti6Al4V - CT possiede in confronto al Ti6Al4V - MP.

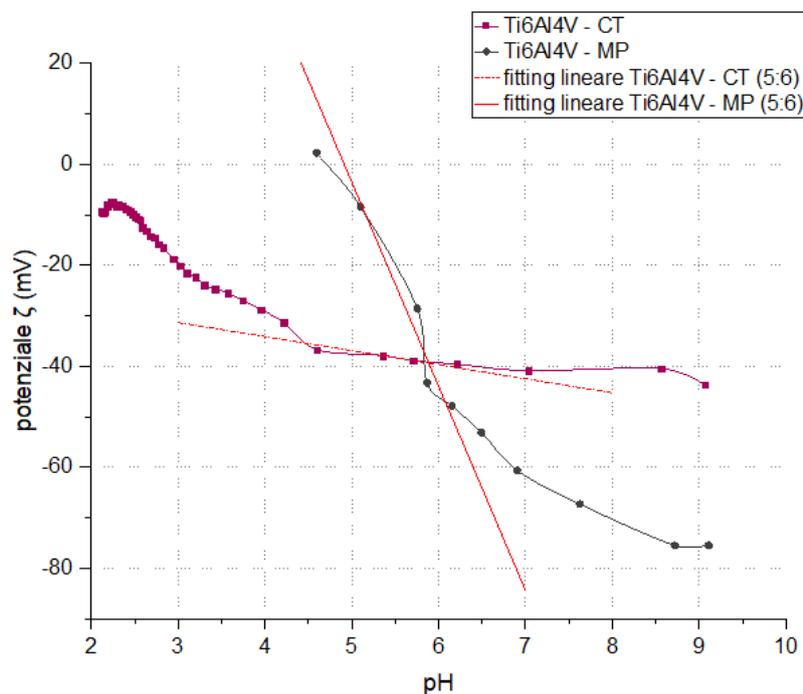


Figura 5.45 Dettaglio della pendenza delle curve di potenziale  $\zeta$  nel range di pH compreso tra 5 e 6

### 5.1.3.2 Adsorbimento BSA

In questo paragrafo sono illustrati i grafici relativi alle misure di potenziale  $\zeta$  in caso di adsorbimento di BSA. Sono messi in mostra vari confronti: (i) Ti6Al4V - MP e Ti6Al4V - MP + BSA; (ii) Ti6Al4V - CT e Ti6Al4V - CT + BSA; (iii) Ti6Al4V - MP + BSA, Ti6Al4V - CT + BSA e BSA in soluzione.

**Ti6Al4V - MP e Ti6Al4V - MP + BSA.** Per quanto riguarda il confronto Ti6Al4V - MP e Ti6Al4V - MP + BSA, mostrato in Figura 5.46, è possibile fare le seguenti considerazioni. L'adsorbimento di BSA non sembra andare a spostare il valore del pI della superficie, infatti il pI di entrambi i

substrati sembra quasi coincidere per valore (cade nell'intorno del valore 4,7 in entrambi i casi). A pH fisiologico, poi, anche i valori di  $\zeta$  risultano confrontabili, dal momento che si ha un valore di -65,2 mV per il Ti6Al4V - MP e un valore di -65,7 mV per il Ti6Al4V - MP + BSA. Anche la pendenza delle curve nel range di pH compreso tra 5 e 6 non sembra sostanzialmente variare in modo significativo. In regione basica, ovvero per valori di pH superiori a 7, è possibile invece evidenziare la presenza di un plateau piuttosto netto per la curva Ti6Al4V - MP + BSA ed un accenno di plateau per la curva Ti6Al4V - MP. Di fatto, è possibile ipotizzare che vi sia un qualche fenomeno per cui l'adsorbimento di BSA non va ad alterare le proprietà macroscopiche di carica superficiale dei campioni Ti6Al4V - MP rispetto ai campioni Ti6Al4V - MP + BSA.

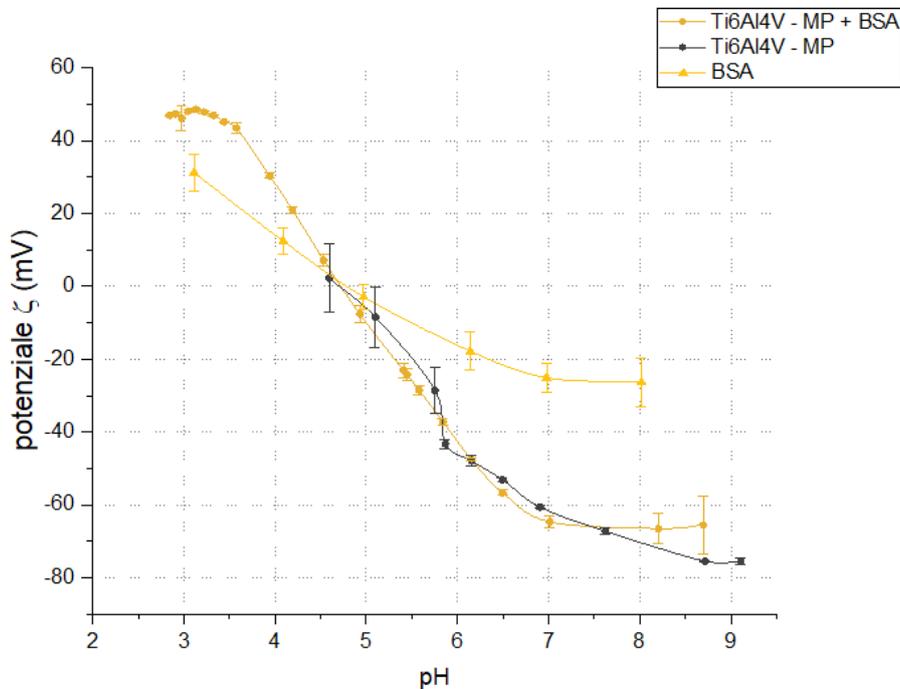


Figura 5.46 Curve di potenziale  $\zeta$  per Ti6Al4V - MP + BSA, Ti6Al4V - MP e BSA

L'ipotesi più probabile, in grado di spiegare il comportamento osservato in regione basica, è che la BSA venga adsorbita dai campioni lisci e dunque vada a scalzare dalla superficie stessa gli OH<sup>-</sup> precedentemente adsorbiti dalla soluzione PBS. È infatti ipotizzabile che il substrato liscio a contatto con la soluzione sia in grado di adsorbire gruppi OH<sup>-</sup> e dunque anche esso sia caricato negativamente a pH fisiologico. Quando il substrato viene esposto alla soluzione di BSA, probabilmente la biomolecola è in grado di competere nell'adsorbimento con i gruppi OH<sup>-</sup> che sono debolmente legati al substrato. Dal momento che però non si osserva una netta differenza nel comportamento a pH basico, è possibile ipotizzare che la BSA venga adsorbita (perché lo

---

dimostrano anche i risultati XPS) e assuma orientamento o una conformazione che in generale non sono prevedibili, ma che sono tali da comportare l'esposizione in superficie da parte della BSA di una certa quantità di gruppi che a pH basico esprimono una carica negativa. Si potrebbe, ad esempio, trattare di gruppi carbossilici (-COOH) che a pH basico si deprotonano facilmente (-COO<sup>-</sup>). È questa la spiegazione che giustifica che la misura di  $\zeta$  a pH 7,4 (e, più in generale, nella regione basica) si assesti nell'intorno di -65 mV. Si ricorda infatti, come gruppi acidi (come acido carbossilico o gruppi ossidrilici) si dissociano in acqua e rimangono carichi negativamente e, in particolare, ad un pH elevato aumenta il loro tasso di dissociazione mentre, al contrario, viene limitata la protonazione dei gruppi basici. Ecco perché a pH basico si misura una carica superficiale negativa. Relativamente al comportamento nella regione acida, invece, si può osservare, dal grafico, la presenza di un accenno di plateau per valori al di sotto del pH 3,5. In quella regione del grafico, il valore di  $\zeta$  si assesta in un range compreso tra i +46 e i +50 mV e si pensa che tale valore sia giustificato dalla presenza di gruppi basici della BSA (come gruppi di ammine primarie, secondarie e terziarie) che vengono protonati e assumono una carica positiva. A bassi valori di pH, infatti, aumenta il tasso di protonazione dei gruppi basici, mentre, al contrario, viene limitata la dissociazione dei gruppi acidi, pertanto ecco spiegato il valore di  $\zeta$  positivo che si rileva. Questi sono i risultati più rilevanti ricavabili dall'analisi delle curve in Figura 5.46. Non è possibile, però, dai dati ottenuti, fare ipotesi su come la BSA interagisce e viene adsorbita al substrato liscio.

**Ti6Al4V – CT e Ti6Al4V – CT + BSA.** Per quanto riguarda il confronto Ti6Al4V - CT e Ti6Al4V - CT + BSA, mostrato in Figura 5.47, è invece possibile fare le seguenti considerazioni. In questo caso è immediatamente evidente come l'adsorbimento di BSA vada a modificare il valore di pI che si riscontra nei due casi. Per il Ti6Al4V - CT + BSA il pI si trova ad un valore di pH di 4,6 mentre invece per il Ti6Al4V - CT non risulta misurabile. Questo risultato fa ipotizzare, in accordo con i dati XPS, che sulla superficie del titanio ossidato venga adsorbita BSA e il fenomeno di adsorbimento sposti il pI della superficie. Lo strato di BSA adsorbito, attraverso la misura di potenziale  $\zeta$ , mostra un comportamento nettamente diverso dal substrato tal quale. In dettaglio, come mostrato in Figura 5.47, si osserva, innanzitutto una piccola variazione nella pendenza delle due curve nella regione compresa tra pH 4 e 6. Come anticipato, la pendenza delle curve è legata ad una maggiore idrofilicità/idrofobicità della superficie oggetto di analisi, perciò è possibile

riscontrare un comportamento più idrofilico della superficie Ti6Al4V - CT e un comportamento più idrofobico della superficie Ti6Al4V - CT + BSA.

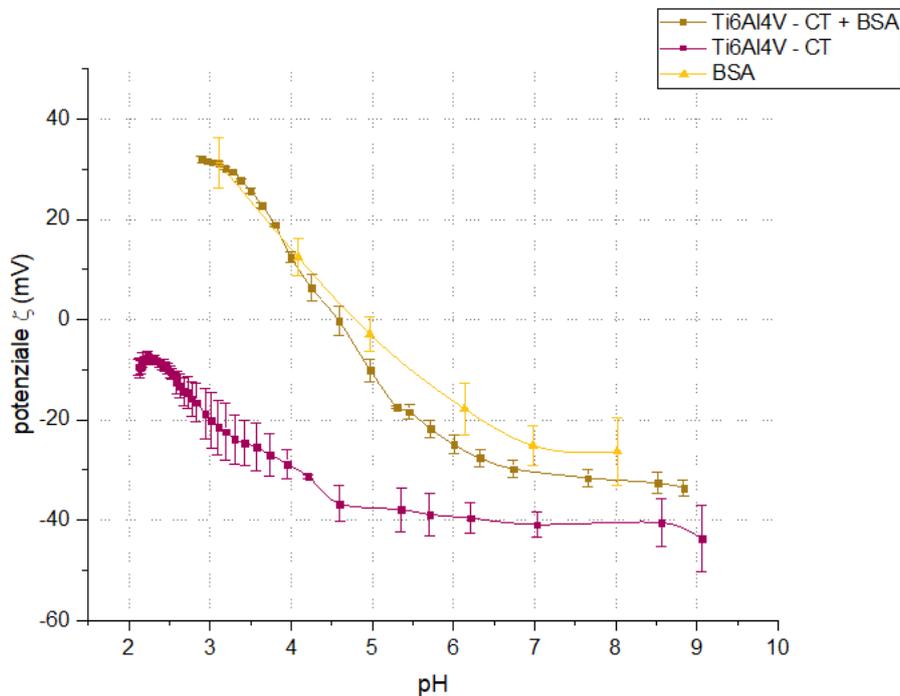


Figura 5.47 Curve di potenziale  $\zeta$  per Ti6Al4V - CT + BSA, Ti6Al4V - CT e BSA

Non è semplice dare spiegazione di questa variazione in idrofobicità/idrofilicità delle superficie prima e dopo adsorbimento. Una ipotesi potrebbe essere che la BSA adsorbita sul titanio ossidato assuma una conformazione tale da rendere complessivamente più idrofobico il substrato rispetto a quanto si riscontra per il Ti6Al4V - CT. Tutto ciò potrebbe avvenire, ad esempio, attraverso riarrangiamenti nella struttura secondaria della proteina adsorbita, modifiche (di orientamento o conformazione) tali da esporre gruppi apolari verso la superficie libera e gruppi polari verso il substrato in titanio. È possibile infatti notare, in Figura 5.47, come la BSA in soluzione, a pH fisiologico, sia complessivamente dotata di una carica negativa; a pH fisiologico, infatti, la BSA è all'inizio del suo plateau e i gruppi carbossilici contenuti nella sua sequenza amminoacidica si ritiene si trovino dissociati (ovvero come  $-\text{COO}^-$ ). A pH fisiologico anche la superficie del Ti6Al4V - CT risulta carica negativamente per via dei suoi gruppi ossidrilici superficiali completamente dissociati ( $-\text{O}^-$ ). È possibile ipotizzare che questi gruppi  $-\text{O}^-$  superficiali esposti dal titanio ossidato e carichi negativamente a pH fisiologico: (i) possano interagire con i gruppi amminici della BSA in modo elettrostatico a formare legami in grado di rendere efficace l'adsorbimento proteico al

---

substrato; (ii) possano respingere, elettrostaticamente, i gruppi carbossilici della BSA dotati di carica negativa. È questo, sostanzialmente, il meccanismo con cui si ritiene di poter spiegare come l'adsorbimento di BSA sulla superficie ossidata si verifica. È questo anche il meccanismo che spiega il motivo per cui su entrambi i substrati si rileva, a pH fisiologico, una carica negativa. Nel caso del Ti6Al4V - CT tale carica è dovuta alla presenza di gruppi ossidrilici che si deprotonano a contatto con il mezzo acquoso. Nel caso del Ti6Al4V - CT + BSA, invece, si ritiene che la carica negativa sia conseguenza della disposizione che la proteina adsorbita assume sul substrato in titanio.

**Ti6Al4V – MP + BSA, Ti6Al4V – CT + BSA, BSA.** Il confronto tra Ti6Al4V - MP + BSA, Ti6Al4V - CT + BSA e soluzione di BSA (Figura 5.48 e Tabella 5.12), invece, permette le ulteriori considerazioni finali. Sostanzialmente, sia considerando la proteina in soluzione che considerando le superficie dove si ha adsorbimento, non si ha un cambiamento nel valore di pI che si riscontra. In tutti e tre i casi considerati il pI si aggira intorno al valore di 4,7 che è il valore di pI che si evidenzia anche in letteratura per la BSA. Per quanto riguarda la pendenza delle curve per valori compresi tra 4 e 6, si riscontrano invece differenze concrete. Sembra che il comportamento più idrofobico caratterizzi la superficie Ti6Al4V - MP + BSA; segue, nell'ordine, la superficie Ti6Al4V - CT + BSA. Di fatto, entrambe le superficie senza BSA adsorbita hanno una tendenza più o meno idrofilica/idrofobica, tendenza che viene mantenuta anche quando si ha adsorbimento di BSA. Anche per quanto riguarda i plateau in regione acida e basica si osservano differenze tra le due curve. Nella regione basica: per i campioni Ti6Al4V – MP + BSA si evidenzia un plateau che ha origine ad un pH di circa 7 e si mantiene ad un valore di  $\zeta$  di -66 mV circa all'aumentare del pH; per i campioni Ti6Al4V – CT + BSA, al contrario, il plateau ha origine ad un pH di 6,5 circa e in quel tratto  $\zeta$  si mantiene ad un valore di -32 mV circa. Nella regione acida: per i campioni Ti6Al4V – MP + BSA si evidenzia un plateau che ha origine ad un pH di circa 3,2 e si mantiene ad un valore di  $\zeta$  nell'intorno di +48 mV al diminuire del pH; per i campioni Ti6Al4V – CT + BSA, al contrario, il plateau origina ad un pH di 3 circa verso valori inferiori e invece  $\zeta$  si mantiene ad un valore di +32 mV circa.

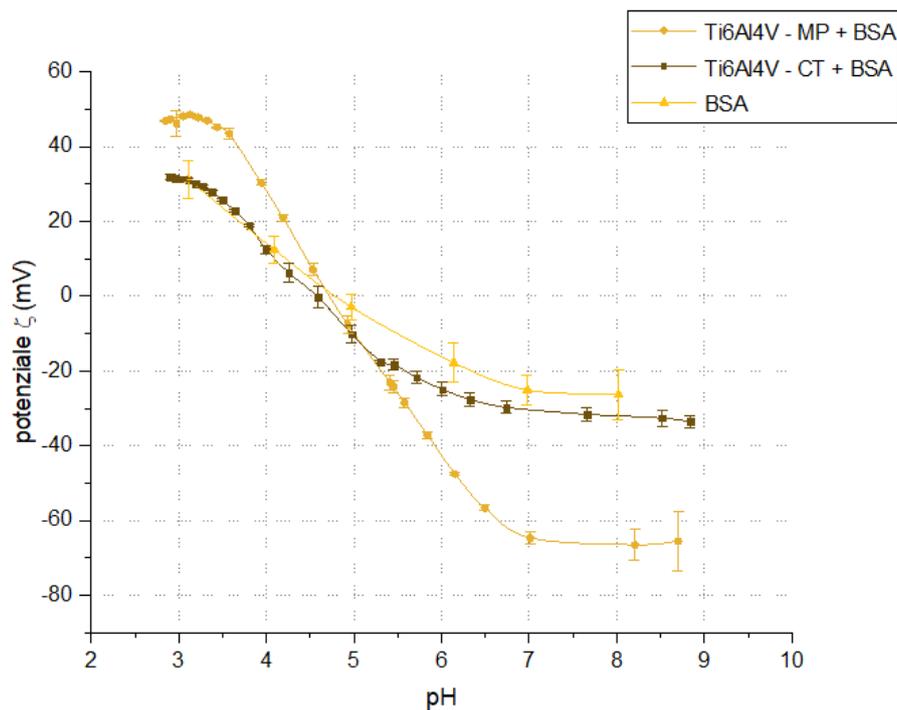


Figura 5.48 Curve di potenziale  $\zeta$  per Ti6Al4V - MP + BSA, Ti6Al4V - CT + BSA e BSA

Tabella 5.12 Valori di pI e  $\zeta$  a pH fisiologico per Ti6Al4V - MP + BSA, Ti6Al4V - CT + BSA e BSA

	Ti6Al4V - MP + BSA	Ti6Al4V - CT + BSA	BSA
<b>pI</b>	4,7	4,6	4,8
<b><math>\zeta</math> a pH 7,4 (mV)</b>	-65,7	-31,6	-25,9

È chiaro, dalle curve riportate nel grafico in Figura 5.48 come vi sia una certa somiglianza nell'andamento della curva BSA e Ti6Al4V - CT mentre la curva Ti6Al4V - MP e BSA siano piuttosto differenti. Questa considerazione porta a pensare che la BSA, adsorbita sulle superficie in lega di titanio, si orienti o assuma conformazione diversa a seconda del tipo di substrato con il quale si interfaccia. In particolare, dai risultati anche esposti in precedenza, vi sembrerebbe una tendenza a confermare che la BSA venga saldamente adsorbita in modo elettrostatico in una conformazione più ordinata e biologicamente simile alla forma con cui essa esiste in soluzione sulla superficie Ti6Al4V - CT. Al contrario, sulla superficie Ti6Al4V - MP la BSA sembra adsorbirsi con orientazione casuale e non prevedibile, in una forma meno simile a quella con cui essa si ritrova libera in soluzione. Interessante sarebbe poter andare ad investigare meglio come questa differenza in conformazione/orientazione della BSA adsorbita possa riflettersi sull'interazione tra cellule e substrato. È noto come la BSA sia una proteina con un generale effetto antiadesivo sulle

---

cellule. Se la BSA venisse adsorbita in una forma biologicamente attiva sulle superficie e fosse in grado di svolgere il suo ruolo efficacemente, potrebbe portare ad una ridotta adesione cellulare. Il fatto che la BSA si disponga ordinatamente e in maniera più vicina a quella con cui si ritrova in soluzione sulla superficie del Ti6Al4V - CT e non sulla superficie del Ti6Al4V - MP, se confermato, potrebbe presentare una prospettiva interessante. La superficie ossidata, infatti, potrebbe ritenersi adatta ad adsorbire BSA in modalità adatte a respingere, ad esempio, cellule batteriche, e ciò potrebbe essere un aspetto molto interessante da valutare per un possibile impiego del Ti6Al4V - CT nei bioimpianti.

### 5.1.3.3 Adsorbimento BFN

In questo paragrafo sono illustrati i grafici relativi alle misure di potenziale  $\zeta$  in caso di adsorbimento di BFN. Sono messi in mostra vari confronti: (i) Ti6Al4V - MP e Ti6Al4V - MP + BFN; (ii) Ti6Al4V - CT e Ti6Al4V - CT + BFN; (iii) Ti6Al4V - MP + BFN, Ti6Al4V - CT + BFN e BFN in soluzione.

**Ti6Al4V - MP e Ti6Al4V - MP + BFN.** Per quanto riguarda il confronto Ti6Al4V - MP e Ti6Al4V - MP + BFN, mostrato in Figura 5.49, è possibile fare le seguenti considerazioni. L'adsorbimento di BFN non sembra andare a spostare di molto il valore del pI della superficie, infatti il pI della superficie in Ti6Al4V - MP cade nell'intorno del valore 4,7 mentre per la superficie Ti6Al4V - MP + BFN il pI è situato approssimativamente a pH 4,5. A pH fisiologico, i valori di  $\zeta$  non risultano facilmente paragonabili, dal momento che si ha un valore di -65,2 mV per il Ti6Al4V - MP e un valore di -44,2 mV per il Ti6Al4V - MP + BFN. La pendenza delle curve nel range di pH compreso tra 5 e 6 non sembra invece sostanzialmente variare in modo significativo per le due superfici considerate. In regione basica, ovvero per valori di pH superiori a 7, è possibile evidenziare la presenza di un plateau piuttosto netto per la curva Ti6Al4V - MP + BFN ed un accenno di plateau per la curva Ti6Al4V - MP. Di fatto, è possibile ipotizzare che vi sia un qualche fenomeno per cui l'adsorbimento di BFN vada ad alterare le proprietà macroscopiche di carica superficiale dei campioni Ti6Al4V - MP rispetto ai campioni Ti6Al4V - MP + BFN. Questo fenomeno si ritiene associato a come la BFN viene adsorbita sulla superficie Ti6Al4V - MP. Si ricorda infatti che la fibronectina è una proteina dimerica di grandi dimensioni, le cui due sub unità sono costituite a loro volta da più sottodomini formati da lunghe catene amminoacidiche. È probabile che l'adsorbimento della BFN comporti una modifica conformazionale nella struttura della BFN, tale

per cui, al variare del pH, la proteina stessa espone in direzione opposta al substrato cariche di tipo debolmente negativo.

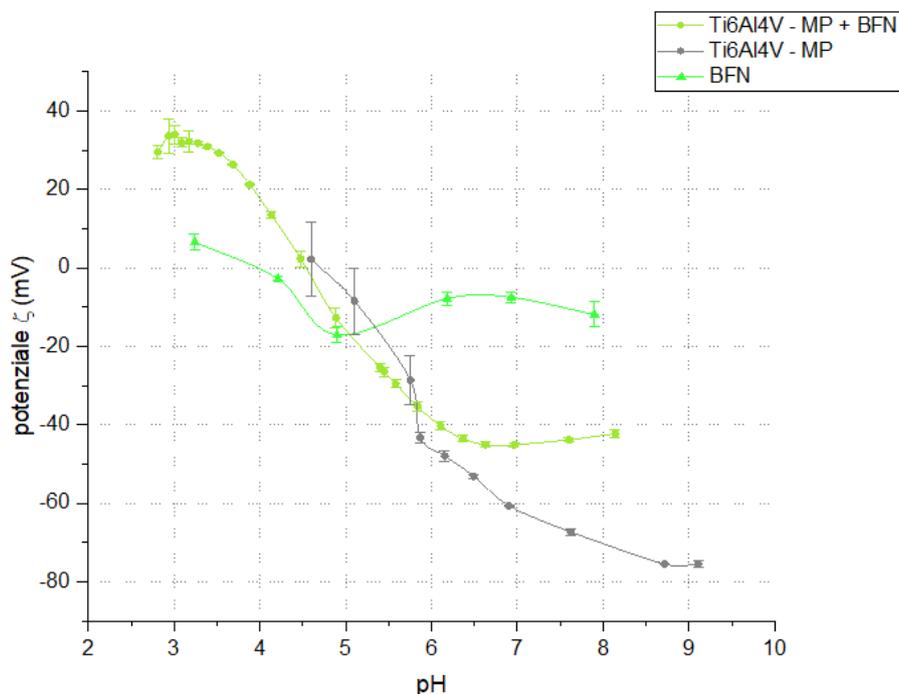


Figura 5.49 Curve di potenziale  $\zeta$  per Ti6Al4V - MP + BFN, Ti6Al4V - MP e BFN

L'ipotesi più probabile, in grado di spiegare il comportamento osservato in regione basica, è che anche la BFN venga adsorbita dai campioni lisci e dunque vada a scalzare dalla superficie stessa gli  $\text{OH}^-$  precedentemente adsorbiti dalla soluzione PBS. È infatti ipotizzabile il substrato liscio a contatto con la soluzione sia in grado di adsorbire gruppi  $\text{OH}^-$  e dunque anche esso sia caricato negativamente a pH fisiologico. Quando il substrato viene esposto alla soluzione di BFN, probabilmente la biomolecola è in grado di competere nell'adsorbimento con i gruppi  $\text{OH}^-$  che sono debolmente legati al substrato. Dal momento che si osserva una certa differenza nel comportamento a pH basico, è possibile ipotizzare che la BFN venga adsorbita (perché lo dimostrano anche i risultati XPS) e assuma orientamento o una conformazione che in generale è ordinato e uniforme, tale comportare l'esposizione in superficie da parte della BFN di una certa quantità di gruppi che a pH basico esprimono una carica debolmente negativa. Si potrebbe, ad esempio, trattare di gruppi carbossilici ( $-\text{COOH}$ ) che a pH basico si deprotonano facilmente ( $-\text{COO}^-$ ). È questa la spiegazione che giustifica che la misura di  $\zeta$  a pH 7,4 (e, più in generale, nella regione basica) si assesti nell'intorno di -44 mV. Relativamente al comportamento nella regione acida, invece, si può osservare, dal grafico, la presenza di un accenno di plateau per valori al di sotto del

---

pH 3,5. In quella regione del grafico, il valore di  $\zeta$  si assesta in un range compreso tra i +33 e i +37 mV e si pensa che tale valore sia giustificato dalla presenza di gruppi basici della BFN (come gruppi di ammine primarie, secondarie e terziarie) che vengono protonati e assumono una carica positiva. A bassi valori di pH, infatti, aumenta il tasso di protonazione dei gruppi basici, mentre, al contrario, viene limitata dissociazione dei gruppi acidi, pertanto ecco spiegato il valore di  $\zeta$  positivo che si rileva. Questi sono i risultati più rilevanti ricavabili dall'analisi delle curve in Figura 5.49. Se è possibile ipotizzare che la BFN però, dai dati ottenuti, fare ipotesi su come la BFN interagisce e viene adsorbita al substrato liscio.

**Ti6Al4V – CT e Ti6Al4V – CT + BFN.** Per quanto riguarda il confronto Ti6Al4V - CT e Ti6Al4V - CT + BFN, mostrato in Figura 5.50, è invece possibile fare le seguenti considerazioni. In questo caso è immediatamente evidente come l'adsorbimento di BFN vada a modificare il valore di pI che si riscontra nei due casi. Per il Ti6Al4V - CT + BFN il pI si trova ad un valore di pH di 4,2 mentre invece per il Ti6Al4V - CT non risulta misurabile. Questo risultato fa ipotizzare, in accordo con i dati XPS, che sulla superficie del titanio ossidato venga adsorbita BFN e il fenomeno di adsorbimento sposti il pI della superficie. Lo strato di BFN adsorbito, attraverso la misura di potenziale  $\zeta$ , mostra un comportamento nettamente diverso dal substrato tal quale. In dettaglio, come mostrato in Figura 5.50, si osserva, innanzitutto una netta variazione nella pendenza delle due curve nella regione compresa tra pH 4 e 6. Come anticipato, la pendenza delle curve è legata ad una maggiore idrofilicità/idrofobicità della superficie oggetto di analisi, perciò è possibile riscontrare un comportamento più idrofilico della superficie Ti6Al4V - CT e un comportamento più idrofobico della superficie Ti6Al4V - CT + BFN.

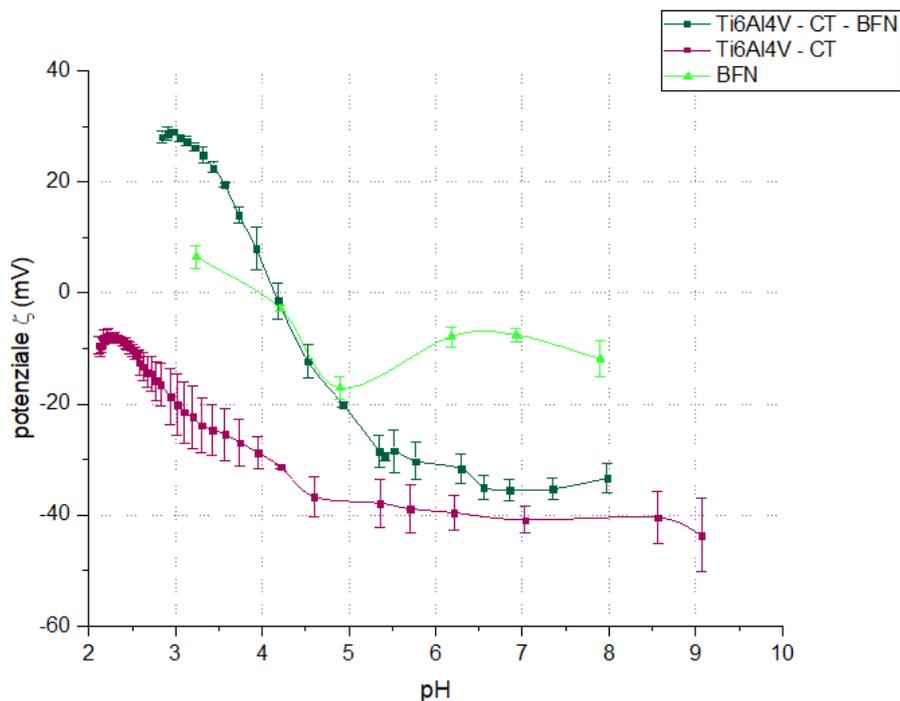


Figura 5.50 Curve di potenziale  $\zeta$  per Ti6Al4V - CT + BFN, Ti6Al4V - CT e BFN

Anche in questo caso, non è semplice dare spiegazione di questa variazione in idrofobicità/idrofilicità delle superficie prima e dopo adsorbimento. Una ipotesi potrebbe essere che la BFN adsorbita sul titanio ossidato assuma una conformazione tale da rendere complessivamente più idrofobico il substrato rispetto a quanto si ha per il Ti6Al4V - CT. Tutto ciò potrebbe avvenire, ad esempio, attraverso riarrangiamenti nella struttura secondaria della proteina adsorbita, modifiche (di orientamento o conformazione) tali da esporre gruppi apolari verso la superficie libera e gruppi polari verso il substrato in titanio. È possibile infatti notare, in Figura 5.50, come la BFN in soluzione, a pH fisiologico, sia complessivamente dotata di una carica debolmente negativa (-9,7 mV). Nell'intorno del valore di pH fisiologico, però, come si può notare la BFN non ha un plateau netto e ben distinguibile; ha piuttosto una curva ondeggiante, fatto che porta ad immaginare che la struttura stessa della proteina subisca variazioni conformazionali rilevanti anche per piccoli valori di variazione del pH. Tutto ciò rende l'interpretazione dei dati abbastanza difficoltosa. A pH fisiologico la superficie del Ti6Al4V - CT risulta carica negativamente per via dei suoi gruppi ossidrilici superficiali completamente dissociati (-O<sup>-</sup>) e questo è dato per certo. È possibile ipotizzare che questi gruppi -O<sup>-</sup> superficiali esposti dal titanio ossidato e carichi negativamente a pH fisiologico: (i) possano interagire con i gruppi amminici della BFN in modo elettrostatico a formare legami in grado di rendere efficace l'adsorbimento

---

proteico al substrato; (ii) possano respingere, elettrostaticamente, i gruppi carbossilici della BFN dotati di carica negativa. È questo, sostanzialmente, il meccanismo con cui si ritiene di poter spiegare come l'adsorbimento di BFN sulla superficie ossidata si verifica. Si deve tenere in conto, però, per quanto riguarda la BFN, il fatto che essa è una proteina dalla grande dimensioni, e che a pH fisiologico è dotata di una carica debolmente negativa. In questo senso, l'ipotesi di interazione elettrostatica con il substrato ossidato può risultare lo stesso valida nel caso della BFN (così come per la BSA) anche se è necessario considerare in questo caso che le forze elettrostatiche repulsive tra substrato e BFN potrebbero essere di entità minore (sempre in rapporto a quanto si pensa possa accadere per la BSA). È questo anche il meccanismo che spiega il motivo per cui su entrambi i substrati si rileva, a pH fisiologico, una carica negativa, debole in valore ma comunque negativa. Nel caso del Ti6Al4V - CT tale carica è dovuta alla presenza di gruppi ossidrilici che si deprotonano a contatto con il mezzo acquoso. Nel caso del Ti6Al4V - CT + BFN, invece, è possibile ipotizzare che la carica negativa sia conseguenza della disposizione che la proteina adsorbita assume sul substrato in titanio.

**Ti6Al4V – MP + BFN, Ti6Al4V – CT + BFN, BFN.** Il confronto tra Ti6Al4V - MP + BFN, Ti6Al4V - CT + BFN e soluzione di BFN (Figura 5.51), invece, permette le ulteriori considerazioni finali. Sostanzialmente, considerando la curva della proteina in soluzione a confronto con le superfici dove si ha adsorbimento, si ha una leggera variazione nel valore di pI che si riscontra. In tutti e tre i casi considerati il pI si aggira comunque in un intervallo di valori (tra 4,0 e 4,5) che sono valori di pI abbastanza vicini a quelli che vengono misurati in letteratura per la BFN (anche se, a rigore, si tratta di valori leggermente spostati verso il range acido). Per quanto riguarda la pendenza delle curve per valori compresi tra 4 e 6, non riscontrano differenze rilevanti. Sembra che la superficie Ti6Al4V - MP + BFN, la superficie Ti6Al4V - CT + BFN e la BFN in soluzione, in quel determinato range, mostrino la stessa bagnabilità e si presentino con una certa propensione a mostrare una natura tendenzialmente idrofobica. Quello di interessante che si osserva riguarda i plateau che si osservano in regione acida e basica per i tre soggetti testati. In particolare, per quanto riguarda i plateau in regione basica si osservano differenze nette tra le curve della soluzione BFN rispetto alle curve dei campioni su cui si è verificato adsorbimento. Più in dettaglio, nella regione basica: per i campioni Ti6Al4V – MP + BFN si evidenzia un plateau che ha origine ad un pH di circa 6,5 e si mantiene ad un valore di  $\zeta$  compreso tra i -42 e i -44 mV circa all'aumentare del pH; per i campioni

Ti6Al4V – CT + BFN, al contrario, il plateau ha origine ad un pH di 5,2 circa e in quel tratto  $\zeta$  si mantiene ad un valore di -35 mV circa, anche se si presenta piuttosto irregolare per andamento. Il plateau della curva associata alla BFN in soluzione, invece, mostra un andamento peculiare, oscillante, e sembra avere origine ad un pH pari a 5 (anche se poi, all'aumentare del pH, non si mantiene costante con un valore pari a -19 mV circa e, invece, subisce una variazione del valore di  $\zeta$  di un certo peso). Nella regione acida: per i campioni Ti6Al4V – MP + BFN si evidenzia un plateau che ha origine ad un pH di circa 3,4 e si mantiene ad un valore di  $\zeta$  nell'intorno di +33 mV al diminuire del pH; per i campioni Ti6Al4V – CT + BFN, al contrario, il plateau origina ad un pH di 3,1 circa verso valori inferiori e lì il valore di  $\zeta$  si mantiene ad un valore di +30 mV circa.

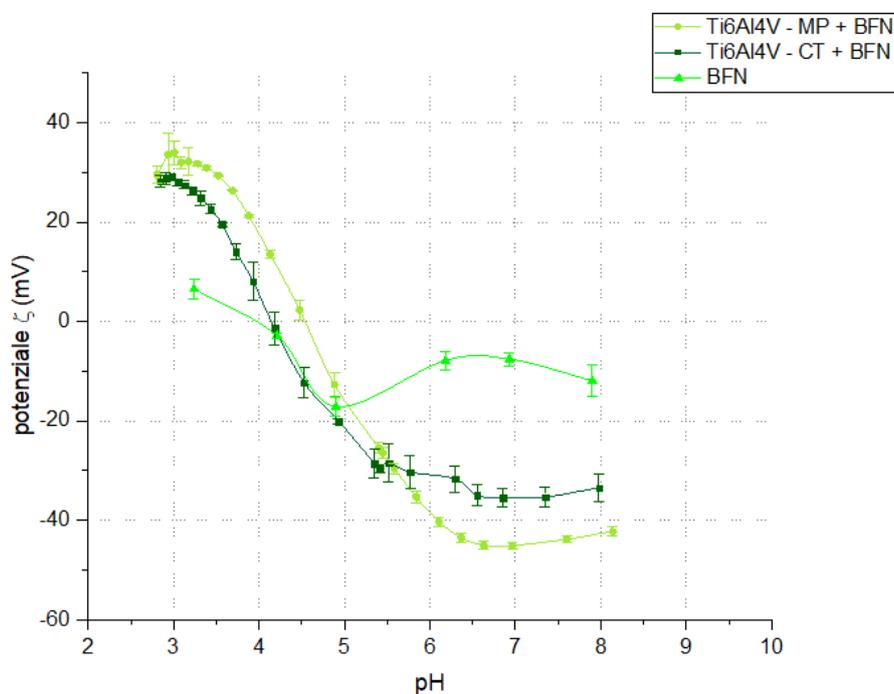


Figura 5.51 Curve di potenziale  $\zeta$  per Ti6Al4V – MP + BFN, Ti6Al4V – CT + BFN e BFN

Tabella 5.13 Valori di pI e  $\zeta$  a pH fisiologico per Ti6Al4V – MP + BFN, Ti6Al4V – CT + BFN e BFN

	Ti6Al4V – MP + BFN	Ti6Al4V – CT + BFN	BFN
<b>pI</b>	4,5	4,1	4,0
<b><math>\zeta</math> a pH 7,4 (mV)</b>	-44,2	-35,2	-9,7

È chiaro, dalle curve riportate nel grafico in Figura 5.51 come non vi siano somiglianze nette nell'andamento della curva BFN con quello delle curve Ti6Al4V – CT + BFN e Ti6Al4V - MP + BFN. Questa considerazione porta a pensare che la BFN, adsorbita sulle superficie in lega di

---

titanio, si orienti o assuma conformazione molto diversa se in soluzione e se adsorbita. Si pensa che questa variazione di comportamento sia attribuibile, in parte, alla variazione di pH che la BFN subisce durante la titolazione e, in parte, attribuibile alle differenze nel tipo di substrato con il quale la BFN si interfaccia. In particolare, dai risultati anche esposti in precedenza, vi sembrerebbe una tendenza a confermare che la BFN venga adsorbita dalle superfici in titanio in modo elettrostatico in una conformazione ordinata ma probabilmente dissimile dalla forma con cui essa esiste in soluzione. Interessante sarebbe poter andare ad investigare meglio come questa differenza in conformazione/orientazione della BFN adsorbita possa riflettersi sull'interazione tra cellule e substrato. È noto come la BFN sia una proteina in grado di mediare l'adesione cellulare grazie alla presenza del tripeptide RGD contenuto nella sua sequenza amminoacidica. Sarebbe interessante capire come la BFN viene adsorbita e se essa viene adsorbita in una forma biologicamente attiva sulle superfici e sia o meno in grado di svolgere il suo ruolo efficacemente; in tal modo, infatti, l'adsorbimento di BFN potrebbe garantire alle superfici stesse una buona capacità di interfacciarsi con le cellule (e, potenzialmente, in un contesto in vivo, di integrarsi bene con i tessuti circostanti). Il fatto che la BFN si disponga ordinatamente e con una conformazione attiva, non denaturata, sulla superficie del Ti6Al4V - CT e del Ti6Al4V - MP, se confermato, anche in questo caso potrebbe presentare una prospettiva interessante nello studio di materiali bioattivi. Se le superfici in titanio fossero in grado di adsorbire BFN con una conformazione adatte ad attirare le cellule (come, ad esempio, gli osteoblasti) si aprirebbe la possibilità di poterle ingegnerizzare e sfruttare in tutta una serie di applicazioni biomediche.

#### **5.1.3.4 Adsorbimento FBS**

In questo paragrafo sono illustrati i grafici relativi alle misure di potenziale  $\zeta$  in caso di adsorbimento di FBS. Sono messi in mostra vari confronti: (i) Ti6Al4V – MP e Ti6Al4V – MP + FBS; (ii) Ti6Al4V – CT e Ti6Al4V – CT + FBS; (iii) Ti6Al4V – MP + FBS, Ti6Al4V – CT + FBS e FBS puro.

**Ti6Al4V – MP e Ti6Al4V – MP + FBS.** Per quanto riguarda il confronto Ti6Al4V – MP e Ti6Al4V – MP + FBS, mostrato in Figura 5.52, è possibile fare le seguenti considerazioni. L'adsorbimento di FBS sembra andare a spostare lievemente il valore del pI della superficie verso valori di pH più alti. Il pI del Ti6Al4V – MP è infatti situato a 4,7 mentre il pI del Ti6Al4V – MP + FBS è spostato al valore di 4,9. Questo leggero spostamento del valore del pI era atteso e ragionevole da aspettarsi, dal momento che il FBS è un fluido dalla composizione molto varia, con un contenuto di proteine,

fattori di crescita, ormoni e nutrienti che, se adsorbiti possono effettivamente alterare le proprietà chimico-fisiche di superficie del substrato. La pendenza delle curve nel range di pH compreso tra 4 e 6 non sembra sostanzialmente variare in modo significativo per i due casi considerati, anche se è da sottolineare come l'analisi del FBS renda l'interpretazione delle curve più difficoltosa rispetto a quanto accade per le soluzioni di proteina singola.

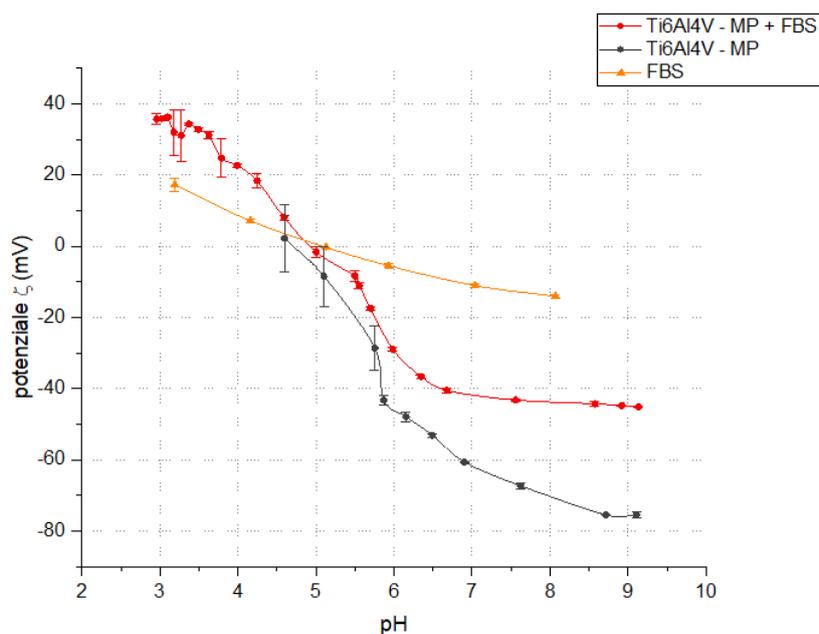


Figura 5.52 Curve di potenziale  $\zeta$  per Ti6Al4V - MP + FBS, Ti6Al4V - MP e FBS

Come messo in evidenza dalla Figura 5.52, infatti, la curva del Ti6Al4V - MP + FBS (specialmente tra valori di pH compresi tra 4 e 6) non presenta un andamento "pulito", netto e regolare, ma presenta invece un aspetto caratterizzato da ondulazioni, alternanza di rilievi. Tutto ciò rende perciò l'individuazione della pendenza associata alla curva Ti6Al4V - MP + FBS non semplice. In particolare, nel caso di Ti6Al4V - MP + FBS si potrebbe pensare che al variare del pH le varie proteine adsorbite sul substrato assumano conformazioni o orientamenti diversi inducendo un mutamento misurabile nel comportamento idrofilico/idrofobico della superficie. Probabilmente, tutto dipende dal bilanciamento di gruppi polari/apolari esposti dalle proteine adsorbite. Quello che si può osservare, nel caso presente, è un passaggio da un comportamento più idrofilico ad uno più idrofobico all'aumentare del pH (con il pH riferito al range tra 4 e 6). In regione basica, ovvero per valori di pH superiori a 7, è possibile evidenziare la presenza di un plateau piuttosto netto a  $\zeta$  di circa -43 mV per la curva Ti6Al4V - MP + FBS ed un accenno di plateau per la curva Ti6Al4V - MP. Da ciò è possibile concludere come l'adsorbimento di FBS sia in grado di alterare le proprietà

---

macroscopiche di carica superficiale dei campioni Ti6Al4V – MP rispetto ai campioni Ti6Al4V – MP + FBS. È probabile che le proteine adsorbite dal siero, nella regione basica, espongano residui amminocidici di vario tipo, con una prevalenza di gruppi acidi che in quel particolare range di pH si deprotonano ed assumono carica negativa. A pH fisiologico, infine, è possibile misurare un valore di  $\zeta$  che per il Ti6Al4V – MP è di circa -65,2 mV mentre è pari a -42,7 mV per il Ti6Al4V – MP + FBS. Relativamente al comportamento nella regione acida, invece, si può osservare, dal grafico in Figura 5.52, la presenza di nuovo, come per la BSA, di un accenno di plateau per valori al di sotto del pH 3,5. In quella regione del grafico, però, in questo caso, il valore di  $\zeta$  si assesta in un range compreso tra i +33 e i +35 mV e si pensa che tale valore sia giustificato dal contributo della presenza di gruppi basici presenti nelle sequenze amminoacidiche delle proteine adsorbite dal siero che vengono protonati e assumono una carica positiva. A bassi valori di pH, infatti, aumenta il tasso di protonazione dei gruppi basici, mentre, al contrario, viene limitata dissociazione dei gruppi acidi, pertanto ecco spiegato il valore di  $\zeta$  positivo che si rileva. Questi sono i risultati più rilevanti ricavabili dall'analisi delle curve in Figura 5.52. Date le premesse appena esposte, si capisce come non sia possibile, però, dai dati ottenuti, fare ipotesi su come le proteine presenti nel FBS interagiscano e vengano adsorbite al substrato liscio. Metodi di indagine di tipo biochimico potrebbero essere accoppiati alle analisi di carica superficiale con la tecnica del potenziale  $\zeta$  per cercare di indagare meglio questi aspetti appena illustrati.

**Ti6Al4V – CT e Ti6Al4V – CT + FBS.** Per quanto riguarda il confronto Ti6Al4V – CT e Ti6Al4V – CT + FBS, mostrato in Figura 5.53, è possibile fare le seguenti considerazioni. L'adsorbimento di FBS sembra porta il valore del pI della superficie a 4,8. Questo spostamento molto importante del valore del pI era atteso e ragionevole da aspettarsi anche in questo caso, alla luce del fatto che vengono adsorbite diverse biomolecole del siero sulla superficie Ti6Al4V – CT. Anche in questo caso, l'interpretazione delle pendenze delle curve relative al campione su cui è stato adsorbito il siero è difficoltosa. Considerando il range di pH compreso tra 4 e 6, infatti, mentre per la superficie Ti6Al4V – CT si ha un evidente comportamento idrofilico, non si può dire altrettanto per il caso del Ti6Al4V – CT + FBS. La curva associata al substrato Ti6Al4V – CT + FBS, infatti, si presenta anche essa caratterizzata dalla presenza di irregolarità, ondulazioni. Anche in questo caso si è portati a pensare che queste variazioni nella pendenza della curva Ti6Al4V – CT + FBS siano da attribuirsi ad una variazione nell'orientazione e nella conformazione delle proteine adsorbite dal siero al

variare del pH e, in particolare, alla presenza più o meno abbondante di gruppi polari/apolari nel lato dello strato proteico non esposto verso il substrato. Questi fenomeni si ritengono responsabili di indurre variazioni misurabili (ma difficilmente interpretabili distintamente) nel comportamento idrofilico/idrofobico della superficie.

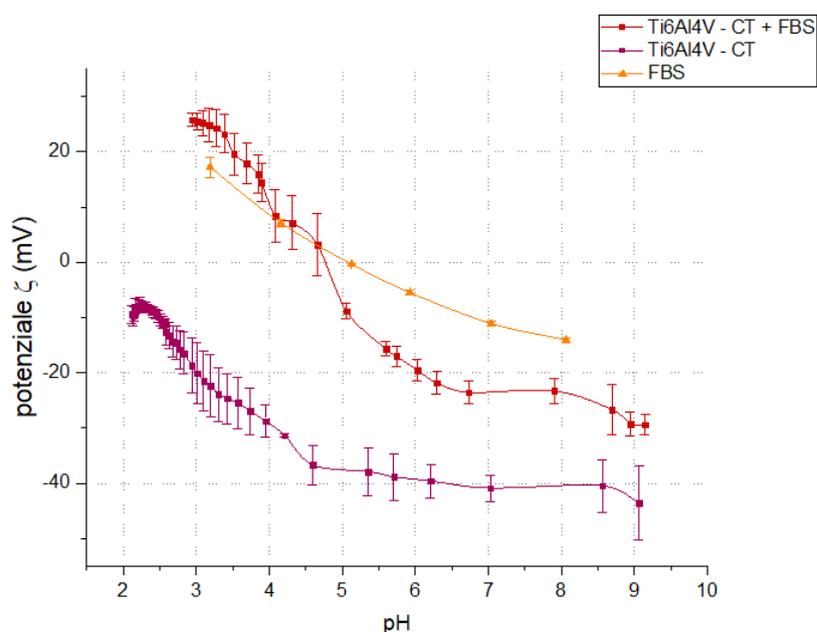


Figura 5.53 Curve di potenziale  $\zeta$  per Ti6Al4V - CT + FBS, Ti6Al4V - CT e FBS

In riferimento alle zone del grafico a pH acido e a pH basico, in questo caso, si possono osservare gli aspetti seguenti. In regione basica, ovvero per valori di pH superiori a 7, è possibile evidenziare la probabile presenza di un plateau a  $\zeta$  di circa -23 mV per la curva Ti6Al4V - CT + FBS (anche se, come mostrato in Figura 5.53 il potenziale sembra scendere ulteriormente per valori di pH prossimi al 9, e questo è un aspetto che sarebbe da approfondire eventualmente comparando i risultati con quelli di altre misure analoghe). Per il campione Ti6Al4V - CT, al contrario, si ha la presenza di un plateau molto netto in regione basica, plateau che ha inizio molto prima del pH 7, che significa che a pH fisiologico esso possiede tutti i gruppi acidi superficiali deprotonati. Proprio a pH fisiologico, infine, è possibile misurare un valore di  $\zeta$  che per il Ti6Al4V - CT è di circa -40,8 mV mentre è pari a -23,4 mV per il Ti6Al4V - CT + FBS. Relativamente al comportamento nella regione acida, invece, si può osservare, dal grafico in Figura 5.53, la presenza di nuovo, come per la BSA, di un accenno di plateau per valori al di sotto del pH 3,5. In quella regione del grafico, però, in questo caso, il valore di  $\zeta$  si assesta intorno ai +25 mV. Si pensa, anche in questo caso, che tale valore sia giustificato dal contributo della presenza di gruppi basici

---

presenti nelle sequenze amminoacidiche delle proteine adsorbite dal siero che vengono protonati e assumono una carica positiva.

**Ti6Al4V – MP + FBS, Ti6Al4V – CT + FBS, FBS.** Il confronto tra Ti6Al4V - MP + FBS, Ti6Al4V – CT + FBS e FBS puro (Figura 5.54), invece, permette le ulteriori considerazioni finali. Sostanzialmente, sia considerando il FBS come soluzione che considerando le superficie dove si ha adsorbimento, non si ha un notevole cambiamento nel valore di pI che si riscontra. Nei tre casi, il pI aumenta leggermente secondo questo ordine: Ti6Al4V – CT + FBS, Ti6Al4V – MP + FBS, FBS. Il pI delle superficie, comunque, è ravvicinato a quello della soluzione di FBS. Piccoli scostamenti dal valore di 5,1 si ritengono attribuibili ad un adsorbimento che avviene con modalità diverse sui due differenti substrati (per tipologia e quantità di proteine adsorbite, ovviamente). Per quanto riguarda la pendenza delle curve per valori compresi tra 4 e 6, se per la soluzione di FBS si osserva un andamento netto e ben definito, per le superficie la situazione è più complessa e difficile da commentare. Sia nel caso di Ti6Al4V - CT + FBS che nel caso di Ti6Al4V – MP + FBS, infatti, le curve del pH in funzione del potenziale presentano delle ondulazioni, delle irregolarità, che rendono la pendenza delle curve complicata da misurare. Sembra si possa intravedere una leggera tendenza del Ti6Al4V – CT + FBS ad esprimere una idrofilicità maggiore rispetto al Ti6Al4V – MP + FBS. Questo effetto è da imputare alla disposizione e all'orientazione con cui le proteine adsorbite dal siero si interfacciano con l'elettrolita di misura del potenziale  $\zeta$ . Per quanto riguarda i plateau in regione acida e basica si osservano delle piccole differenze tra le due curve. Nella regione basica: per i campioni Ti6Al4V – MP + FBS si evidenzia un plateau, anche se non definito in modo netto, che ha origine ad un pH approssimativamente di 7 e si mantiene tra valore di  $\zeta$  di -23 e -25 mV circa all'aumentare del pH. Per i campioni Ti6Al4V – CT + FBS, al contrario, il plateau è ben definito, origina sempre nella zona vicina al pH 7, e in quel tratto  $\zeta$  si mantiene ad un valore indicativo di -43 mV. Nella regione acida, viceversa: per i campioni Ti6Al4V – MP + FBS si evidenzia un impercettibile plateau ad un pH molto acido, circa 3,2 dove  $\zeta$  è compreso nell'intorno di +36 mV; per i campioni Ti6Al4V – CT + BSA, al contrario, il plateau origina sempre ad un pH molto acido, di 3 circa, e invece  $\zeta$  si mantiene ad un valore di +25 mV circa.

Quello di importante che deve essere tenuto in conto, analizzando il caso di adsorbimento di FBS è che un esperimento del genere è un modello che realmente può essere considerato vicino ad un caso reale. Pertanto, anche se nel presente lavoro di tesi non è stato possibile estrarre informazione

utile a spiegare gli effetti dell'adsorbimento di FBS, si deve comunque osservare che, semplicemente attraverso una misura di potenziale  $\zeta$  è stato possibile. (i) percepire una differenza nell'adsorbimento di FBS tra i due campioni oggetto di indagine; (ii) attribuire in modo evidente questa differenza ad un soggetto, le proteine del siero, che vengono adsorbite in modo competitivo dal FBS e subiscono riarrangiamenti di struttura, conformazione e orientazione che si traducono in una variazione misurabile del potenziale  $\zeta$  rilevato dagli strumenti.

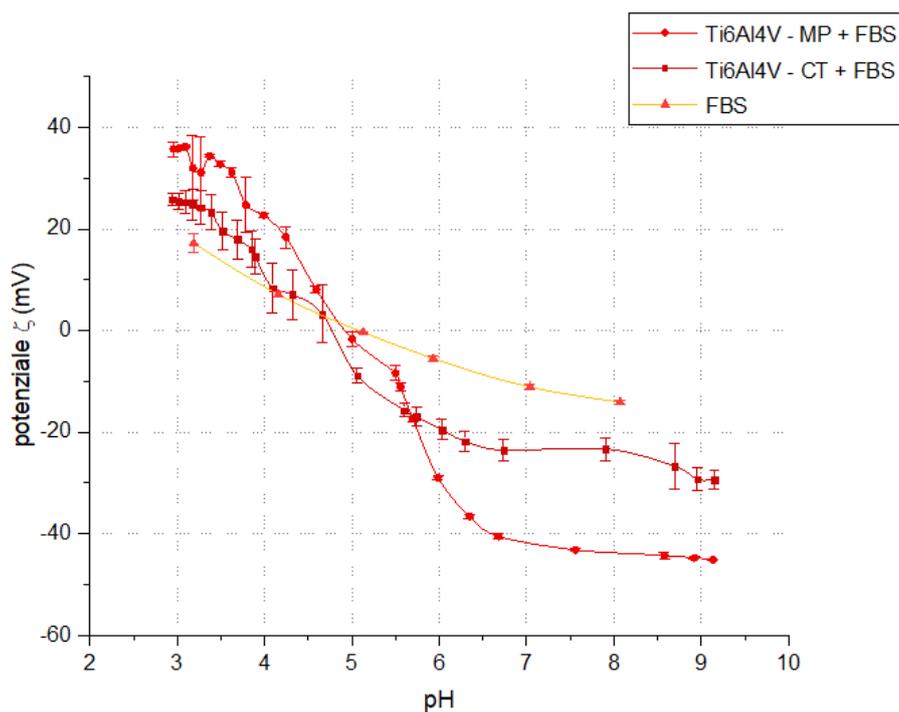


Figura 5.54 Curve di potenziale  $\zeta$  per Ti6Al4V – MP + FBS, Ti6Al4V – CT + FBS e FBS

Tabella 5.14 Valori di pI e  $\zeta$  a pH fisiologico per Ti6Al4V – MP + FBS, Ti6Al4V – CT + FBS e FBS

	Ti6Al4V – MP + FBS	Ti6Al4V – CT + FBS	FBS
<b>pI</b>	4,9	4,7	5,1
<b><math>\zeta</math> a pH 7,4 (mV)</b>	-42,7	-23,4	-12,1

### 5.1.3.5 Confronto Ti6Al4V - MP post adsorbimento proteico

In Figura 5.55 sono riassunti i risultati presentati in precedenza per il campione Ti6Al4V – MP. Interessante, in questo caso, è andare a confrontare soprattutto i valori di pI e i valori assunti dalle superficie a pH fisiologico (Tabella 5.15). Quello che si nota a prima vista è come, a pH fisiologico, cambino effettivamente le cose tra il campione prima e dopo adsorbimento. L'adsorbimento di BSA sembra far variare di poco il potenziale  $\zeta$  della superficie Ti6Al4V – MP sia al pH 7,4 che più

in generale nel range basico. Una differenza nel comportamento del Ti6Al4V – MP con adsorbimento di BFN e FBS è invece riscontrabile, specialmente se si confrontano le cariche assunte dalle superficie dopo l'adsorbimento con quella della superficie liscia tal quale. Nel caso di adsorbimento di BFN e FBS infatti la superficie assume una carica più debolmente negativa rispetto al caso di adsorbimento di BSA o al campione tal quale. La giustificazione a questo comportamento è sempre da attribuire alle differenti caratteristiche conformazionali e di orientazione delle biomolecole che la superficie adsorbe.

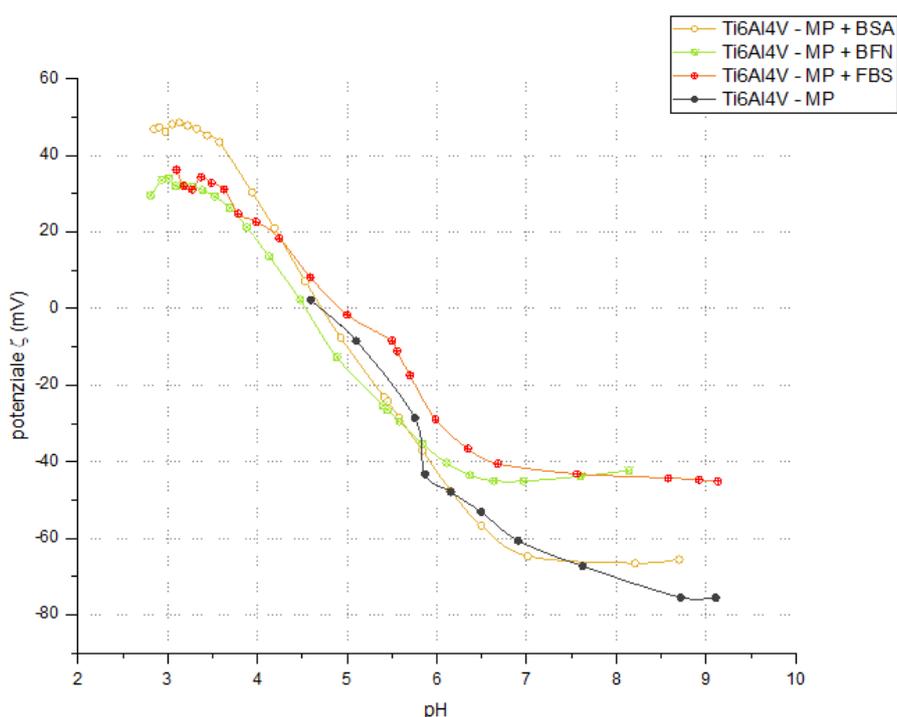


Figura 5.55 Curve di potenziale  $\zeta$  a confronto per il Ti6Al4V – MP prima e dopo adsorbimento proteico

Tabella 5.15 Valori di  $\zeta$  a pH fisiologico per il Ti6Al4V – MP prima e dopo adsorbimento proteico

	$\zeta$ a pH 7,4 (mV)
<b>Ti6Al4V – MP</b>	-65,7
<b>Ti6Al4V – MP + BSA</b>	-65,2
<b>Ti6Al4V – MP + BFN</b>	-44,2
<b>Ti6Al4V – MP + FBS</b>	-42,7

### 5.1.3.6 Confronto Ti6Al4V - CT post adsorbimento proteico

In Figura 5.56 sono riassunti i risultati presentati in precedenza per il campione Ti6Al4V – CT. Importante, anche in questo caso, è andare a confrontare in dettaglio soprattutto i valori di pI e i

---

valori assunti dalle superficie a pH fisiologico (Tabella 5.16). Quello che si nota a prima vista è come, a pH fisiologico, cambino effettivamente le cose tra il campione prima e dopo adsorbimento, e cambino in maniera più marcata rispetto al caso del campione liscio. In questo caso, infatti, seppur di poco gli adsorbimenti di tutte le soluzioni testate vanno a far variare l'andamento del potenziale  $\zeta$  della superficie Ti6Al4V – CT. A pH 7,4 e più in generale nel range basico, si individuano i plateau associati alle varie curve e quello che sembra riscontrarsi è una generale tendenza delle superficie a diminuire il valore di  $\zeta$  dal basso verso l'alto e presentare un plateau con inizio spostato più verso pH basici leggendo le curve da sinistra verso destra. In particolare, i punti della regione basica in cui i plateau si formano (ovvero dove le cariche superficiali dei gruppi acidi sono tutte dissociate) possono essere ordinati, secondo pH crescente, nel seguente ordine di campioni: Ti6Al4V – CT, Ti6Al4V – CT + BFN, Ti6Al4V – CT + BSA, Ti6Al4V – CT + FBS. I valori di  $\zeta$  intorno ai quali i plateau sopra citati si assestano sono tutti quanti compresi nel range che va tra i - 20 e i - 40 mV, ad indicare che a seguito dell'adsorbimento tutti i campioni continuano ad esporre una carica netta superficiale negativa. Tale carica risulta differente a seconda della soluzione proteica testata in realtà, infatti si ha un diverso valore di  $\zeta$  a pH di 7,4 per i quattro casi presi in esame (Tabella 5.16). In relazione ai plateau nella regione acida, al contrario non si osserva una differenza significativa tra i vari casi analizzati. Per quanto riguarda la pendenza delle curve, infine, indice di una più spiccata idrofilicità/idrofobicità superficiale, quello che si riscontra, in questo caso, è un comportamento differente tra le varie superficie testate, anch'esso ipotizzabile come conseguenza di una differente modalità con cui proteine differenti sono adsorbite ai substrati. Questo risultato risulta particolarmente affascinante, proprio perché riscontrato sulla superficie Ti6Al4V – CT innovativa. Ulteriori studi dovrebbero essere pianificati e condotti per cercare di chiarire l'effetto della superficie ossidata sull'adsorbimento di BSA e BFN considerate singolarmente e anche sull'adsorbimento di FBS, che è noto svolgersi come un adsorbimento proteico di tipo competitivo.

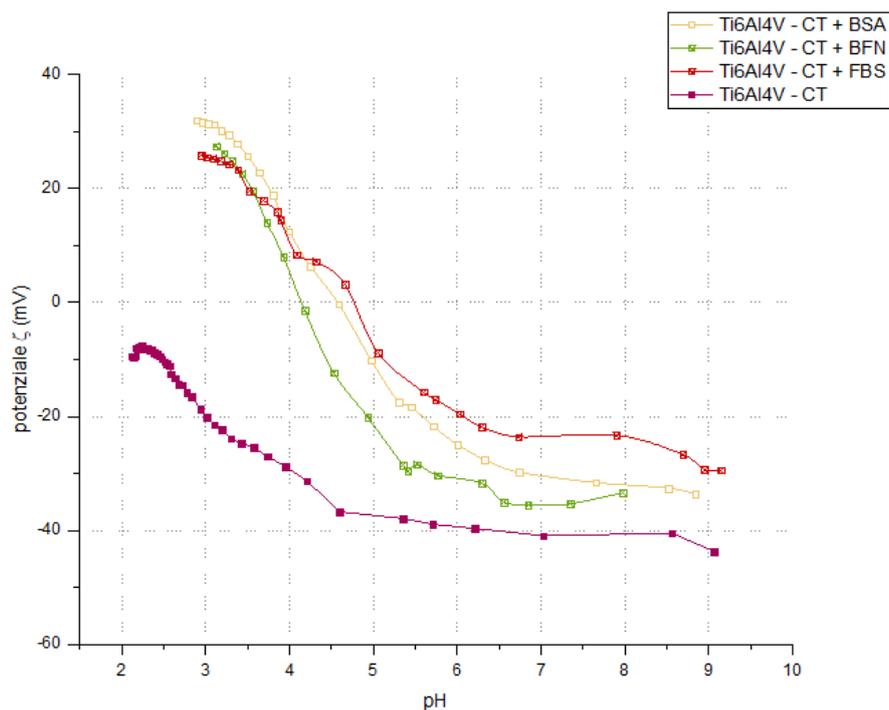


Figura 5.56 Curve di potenziale  $\zeta$  a confronto per il Ti6Al4V – CT prima e dopo adsorbimento proteico

Tabella 5.16 Valori di  $\zeta$  a pH fisiologico per il Ti6Al4V – MP prima e dopo adsorbimento proteico

	$\zeta$ a pH 7,4 (mV)
Ti6Al4V – CT	-40,8
Ti6Al4V – MP + BSA	-31,1
Ti6Al4V – CT + BFN	-35,2
Ti6Al4V – CT + FBS	-23,4

## 5.2 Risultati dei test di adsorbimento proteico

I risultati del test di adsorbimento proteico (BCA *assay*) condotti nei laboratori del Dipartimento di Scienze della Salute (DISS) dell'Università del Piemonte Orientale Amedeo Avogadro di Novara sono presentati nel seguito della presente sezione in Figura 5.57 e in Figura 5.58.

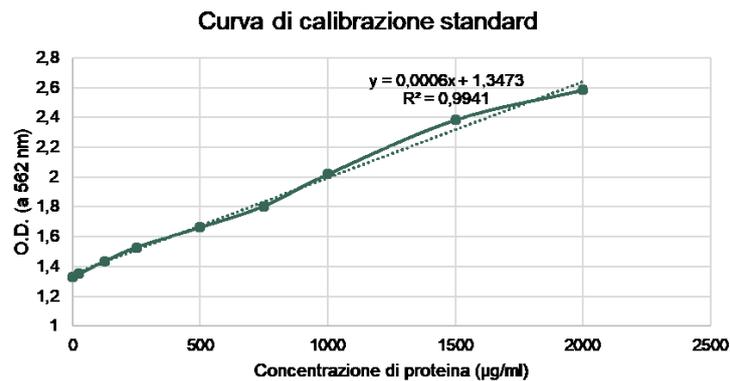


Figura 5.57 Curva di calibrazione standard per il saggio BCA

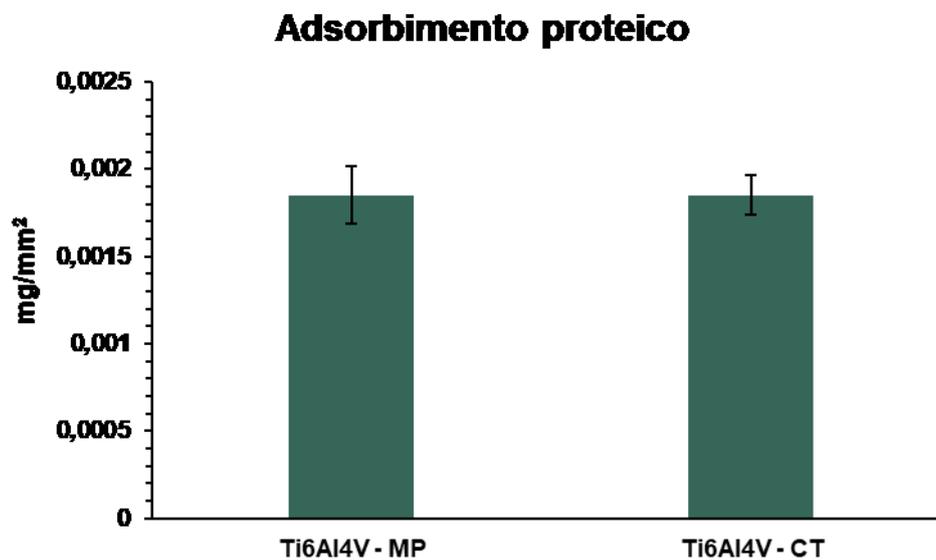


Figura 5.58 risultati del saggio BCA sui campioni Ti6Al4V - MP e Ti6Al4V - CT

Dai risultati del test di adsorbimento proteico BCA *assay* non è rilevabile una differenza statisticamente significativa nella quantità di proteina adsorbita dai campioni Ti6Al4V – MP rispetto ai campioni Ti6Al4V – CT. Analisi biochimiche più approfondite, attraverso la tecnica *western blot*, sono attualmente in corso presso l'Università del Piemonte Orientale per indagare il fenomeno dell'adsorbimento proteico sulle superfici Ti6Al4V – MP e Ti6Al4V – CT e non sono riportate in questo lavoro di tesi. Attraverso il saggio BCA è infatti possibile solo andare a fare una stima della quantità di proteine totali adsorbite sui campioni. L'analisi *western blot*, al contrario, può permettere di distinguere la tipologia di proteine adsorbite sui campioni. Prospettiva molto interessante per lavori futuri sullo studio dell'adsorbimento proteico su superficie Ti6Al4V – MP e Ti6Al4V – MP sarebbe proprio quella di andare a confrontare ed incrociare i risultati dell'analisi

biochimica *western blot* con quelli XPS e potenziale  $\zeta$  per andare a verificare le quantità di BSA e BFN che vengono adsorbite dai campioni. Un risultato del genere potrebbe permettere di mettere in relazione una determinata superficie ad un comportamento più o meno favorevole verso l'adsorbimento di una determinata proteina.

### 5.3 Risultati dei test cellulari

I risultati dei test di citocompatibilità condotti nei laboratori del Dipartimento di Scienze della Salute (DISS) dell'Università del Piemonte Orientale Amedeo Avogadro di Novara sono presentati nel seguito della presente sezione.

Nelle fasi sperimentali sono testati sia i campioni Ti6Al4V - MP che i campioni Ti6Al4V - CT.

#### 5.3.1 Test cellulari di citocompatibilità

Per i test cellulari di citocompatibilità sono utilizzate cellule hFOB, capaci di differenziarsi in osteoblasti maturi. La tossicità dei campioni analizzati è stata valutata rispetto a queste cellule progenitrici di osteoblasti umani dopo 24, 48 e 72 h di semina diretta. I risultati sono riportati in Figura 5.59. Le barre rappresentano medie e deviazioni standard rispettivamente.

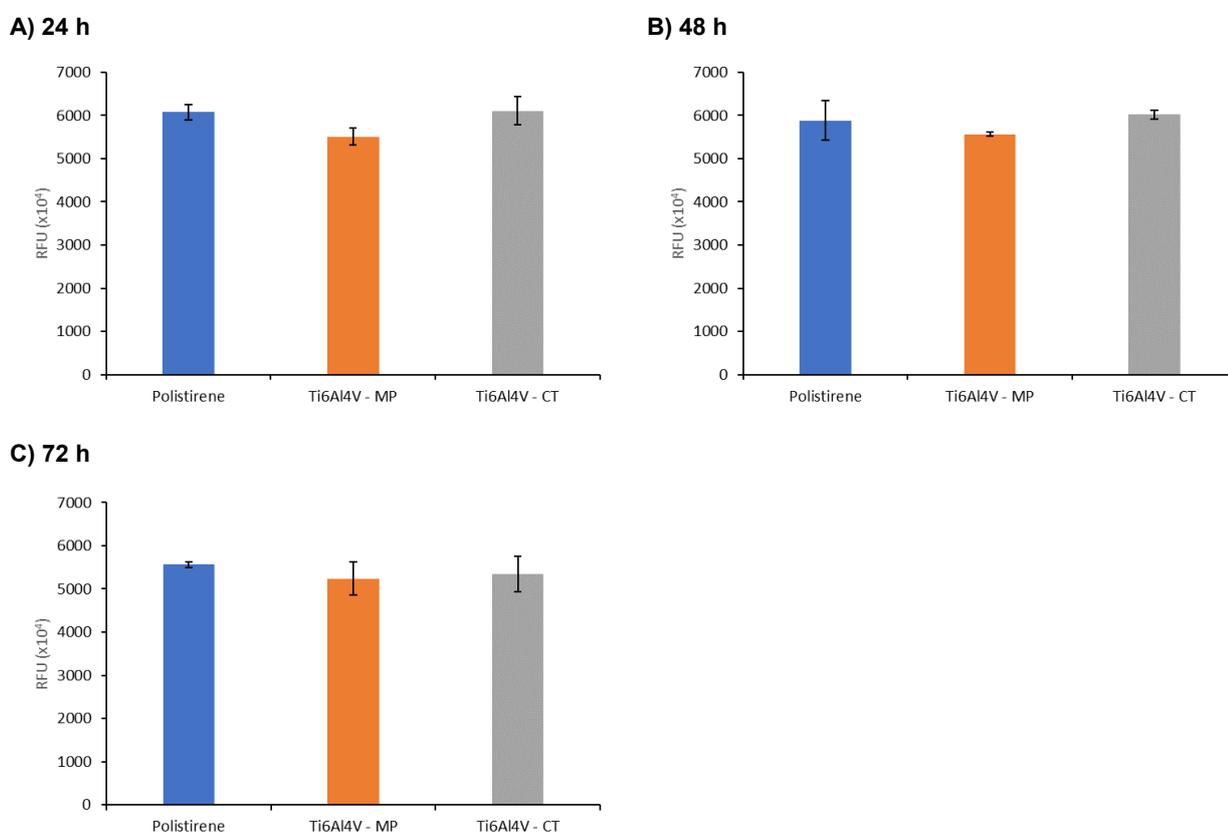


Figura 5.59 Vitalità cellulare delle cellule hFOB. RFU a A) 24, B) 48, C) 72 h dalla semina

Il sommario dei risultati ottenuti è presentato di seguito in Figura 5.60. Nel complesso, non si rileva alcun effetto tossico dei campioni Ti6Al4V – MP e Ti6Al4V – CT. Sui campioni Ti6Al4V – MP la vitalità cellulare sembra essere leggermente inferiore a quella che si rileva sui campioni Ti6Al4V – CT e sul polistirene (che viene utilizzato come controllo positivo). Al confronto, le cellule di tipo osteoblastico, dunque, non sembrano essere in grado di aderire ed esprimere una buona vitalità cellulare su superficie Ti6Al4V – MP; al contrario, sulle superficie Ti6Al4V – CT le cellule aderiscono meglio e sono più vitali. Questo risultato è in accordo con i precedenti lavori di letteratura che sono stati anche citati nel Capitolo 3 relativo al FBS. Superficie in lega di titanio idrofiliche e caratterizzate da una certa rugosità superficiale, come sono in effetti le superficie Ti6Al4V – CT favoriscono l’adesione cellulare e permettono alle cellule di disporsi sui substrati in modo favorevole a proliferare e differenziarsi, o comunque permettono di esprimere un fenotipo osteoblastico. La stessa cosa non si osserva, in generale, per cellule coltivate su substrati lisci come potrebbe essere, ad esempio, il Ti6Al4V – MP utilizzato nel presente lavoro di tesi.

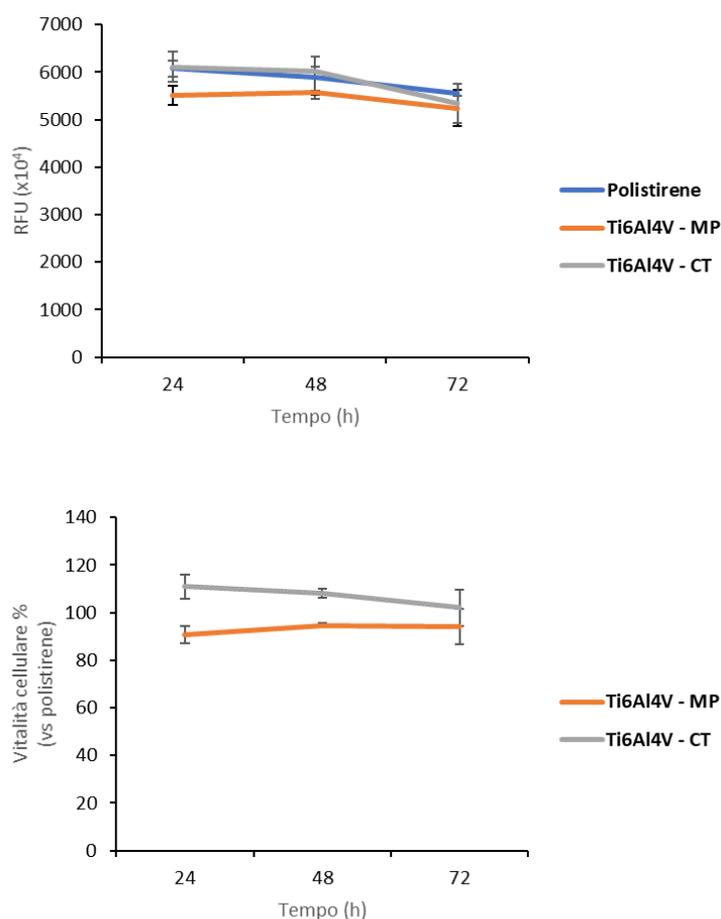


Figura 5.60 Sommario dei risultati dei test di vitalità cellulare

### 5.3.2 Test cellulari di attività antibatterica

Per quanto riguarda la formazione di biofilm, i risultati dopo incubazione in piastra di coltura a 37 °C, in agitazione continua a 120 giri/min, per 2, 4, 6, 24, 48 e 92 h a 37 °C sono presentati in Figura 5.61, dove è riportata la vitalità delle cellule di *Staphylococcus aureus* formanti biofilm dopo A) 2 h, B) 4 h, C) 6 h, D) 24 h, E) 48 h e F) 96 h di incubazione. Le barre rappresentano medie e deviazioni standard rispettivamente.

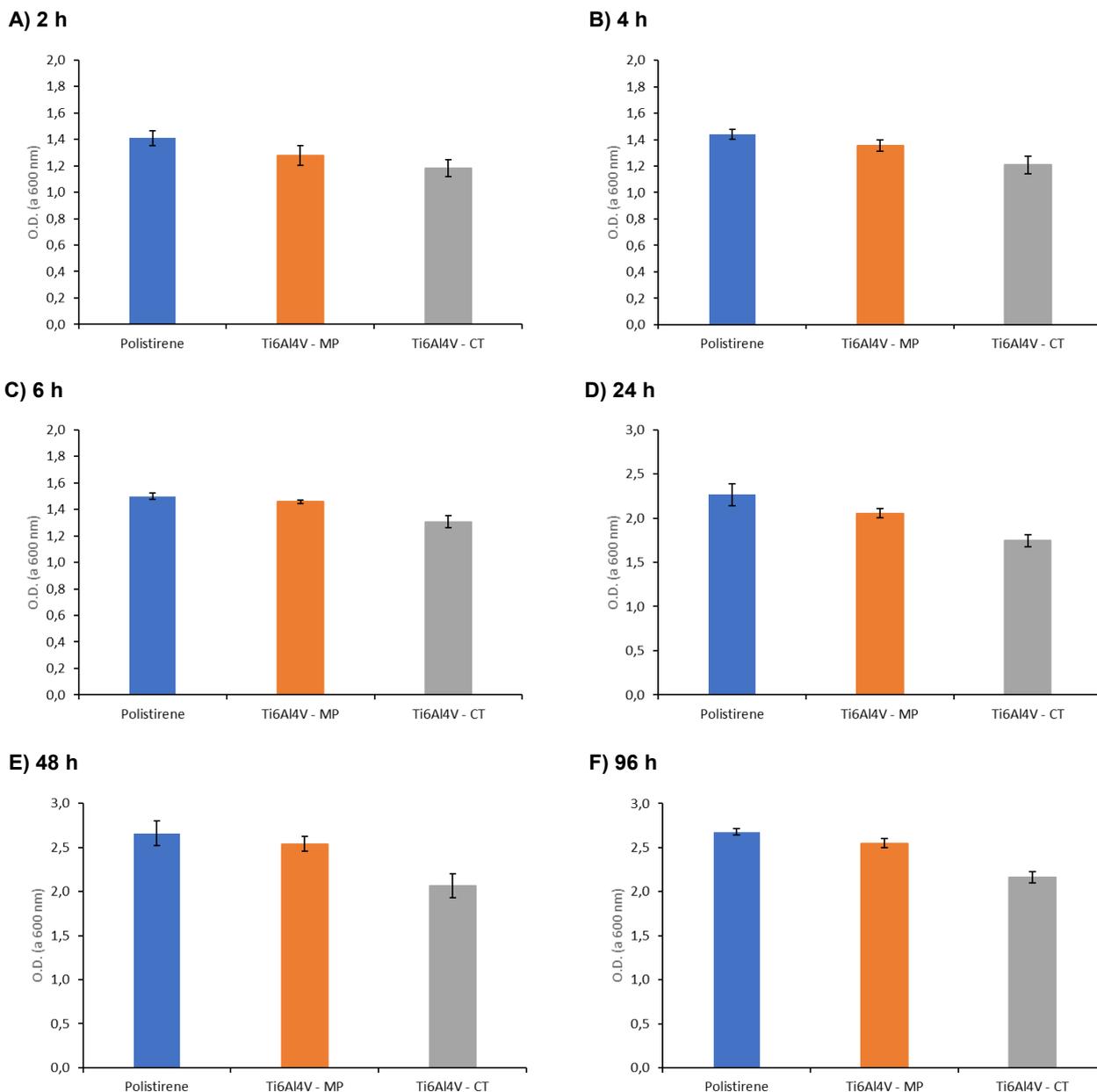


Figura 5.61 Attività antibatterica – cellule formanti biofilm. O.D. a 600 nm per batteri del ceppo *Staphylococcus aureus* a A) 2 h, B) 4 h, C) 6 h, D) 24 h, E) 48 h e F) 96 h di incubazione

I risultati sono riassunti in due diagrammi, presentati in Figura 5.62, che riportano la densità ottica (O.D.) a 600 nm in funzione del tempo e la vitalità cellulare % rispetto ai controlli in polistirene in funzione del tempo.

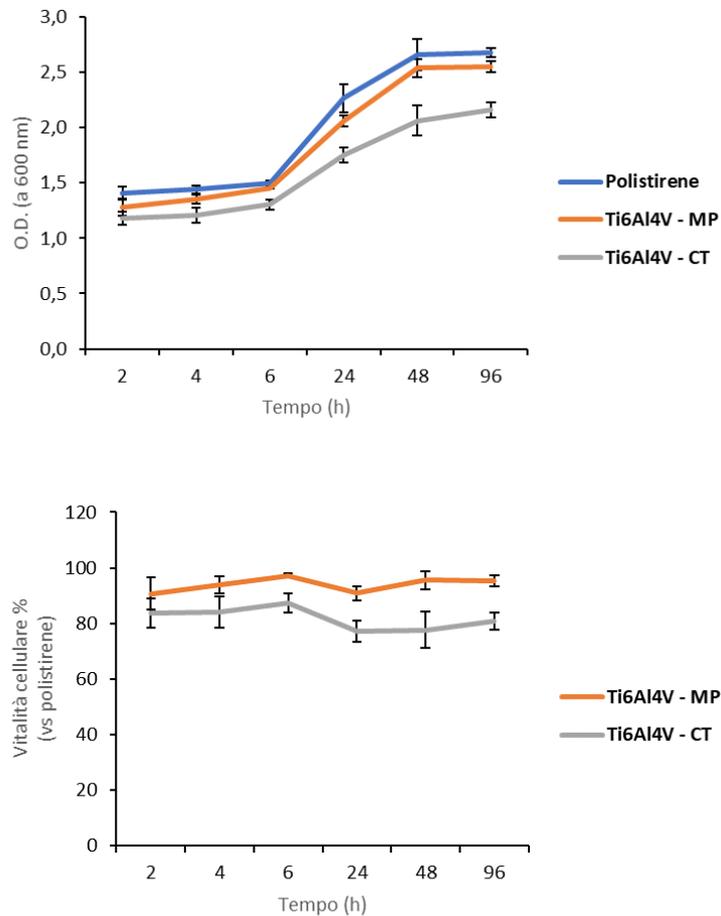


Figura 5.62 Sommario dei risultati dei test di attività antibatterica – cellule formanti biofilm

Complessivamente, è stato riscontrato come sia i campioni Ti6Al4V – MP e Ti6Al4V - CT non siano stati di grande efficacia nel ridurre la vitalità dei batteri formanti biofilm. Ciononostante, ad un confronto più dettagliato, sui campioni Ti6Al4V – MP la vitalità del ceppo batterico sembra essere leggermente superiore a quella che si rileva campioni Ti6Al4V – CT. La vitalità dello *Staphylococcus aureus* sul polistirene (che viene utilizzato come controllo positivo) è comparabile a quella che si riscontra sul Ti6Al4V – MP e superiore a quella rilevabile per il Ti6Al4V – CT. Al confronto, pertanto, le cellule formanti colonie del ceppo batterico considerato non sembrano essere in grado di aderire ed esprimere una buona vitalità cellulare su superficie Ti6Al4V – CT rispetto a quanto si riscontra per le superfici Ti6Al4V – MP.

Per quanto riguarda la vitalità delle cellule planctoniche, i risultati dopo incubazione in piastra di coltura a 37 °C, in agitazione continua a 120 giri/min, per 2, 4, 6, 24, 48 e 96 h a 37 °C sono presentati in Figura 5.63.

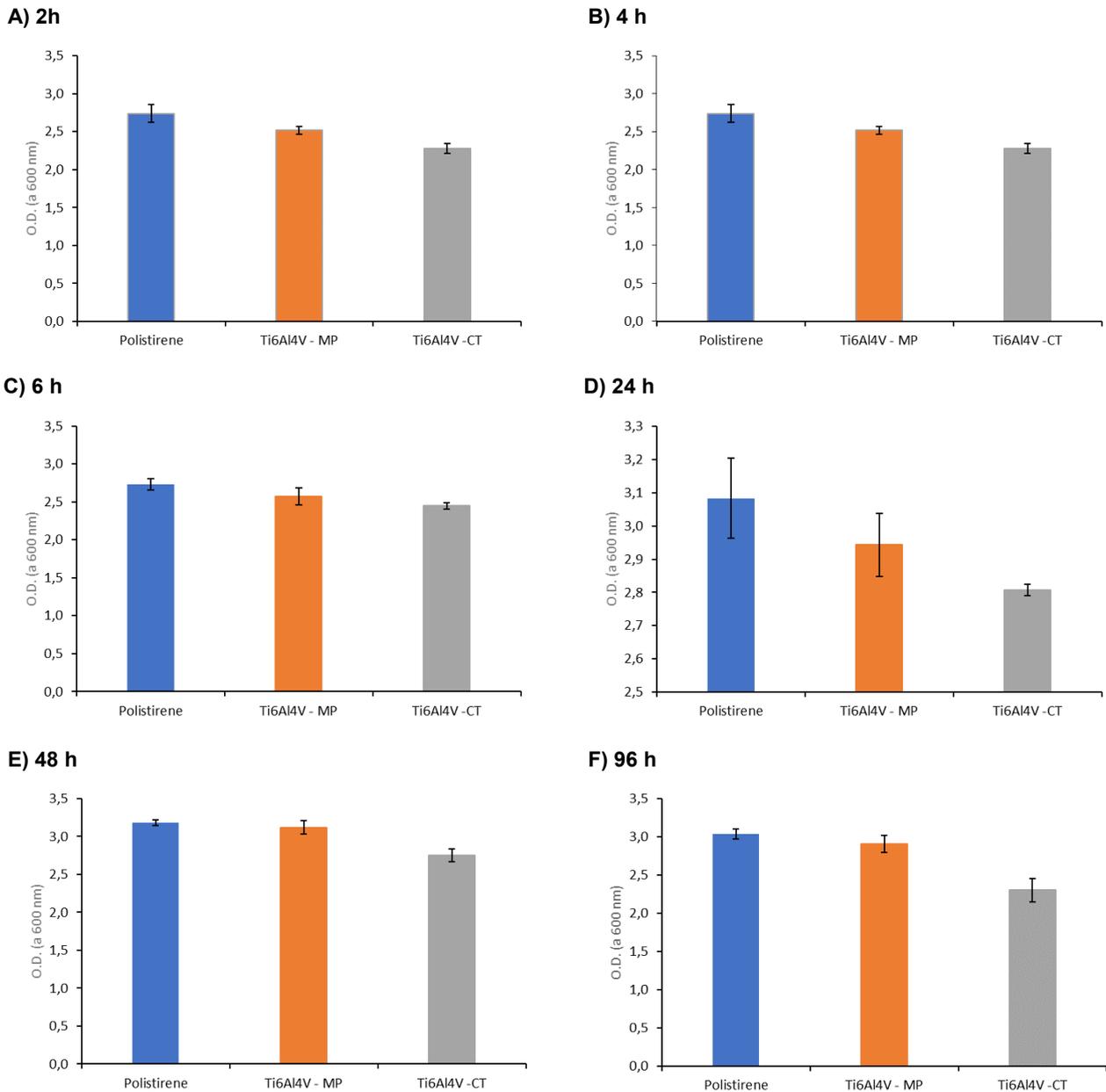


Figura 5.63 Attività antibatterica – cellule planctoniche. O.D. a 600 nm per batteri del ceppo *Staphylococcus aureus* a A) 2 h, B) 4 h, C) 6 h, D) 24 h, E) 48 h e F) 96 h di incubazione

Il sommario dei risultati ottenuti è presentato in Figura 5.64, dove si riportano la densità ottica (O.D.) a 600 nm in funzione del tempo e la vitalità cellulare % rispetto ai controlli in polistirene.

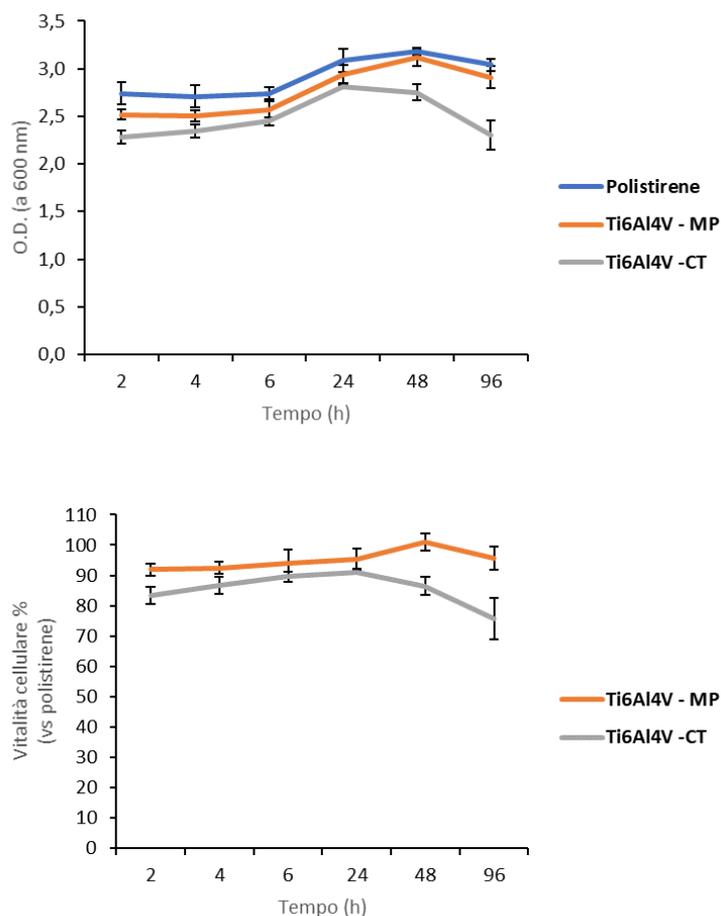


Figura 5.64 Sommario dei risultati dei test di attività antibatterica – cellule planctoniche

Nessun risultato significativo è stato ottenuto valutando la vitalità delle cellule planctoniche nei confronti del Ti6Al4V - CT, poiché i risultati sono stati simili a quelli ottenuti per il Ti6Al4V - MP controlli di polistirene non trattati. Ad un'analisi più dettagliata dei risultati in Figura 5.64, anche in questo caso, è possibile riscontrare una vitalità cellulare leggermente più accentuata sui campioni in Ti6Al4V - MP rispetto ai campioni Ti6Al4V - CT. Quello che si osserva, in particolare, è una differenza percepibile in modo abbastanza chiaro nel comportamento delle cellule planctoniche a tempi di incubazione lunghi (48 e 96 h). Al confronto diretto, pertanto, le cellule planctoniche del ceppo batterico di *Staphylococcus aureus* sembrano essere in grado di esprimere una vitalità cellulare inferiore nei confronti delle Ti6Al4V - CT rispetto a quanto si ha per le superfici Ti6Al4V - MP.

---

## Conclusioni

Dagli esperimenti condotti per il presente lavoro di tesi è stato possibile dimostrare che l'adsorbimento proteico avviene in modalità differenti a seconda della superficie testata e della soluzione proteica che si impiega per gli esperimenti di adsorbimento proteico. Quello che è stato riscontrato, in generale, è un adsorbimento proteico che ha avuto luogo su entrambe le tipologie di campioni testate (Ti6Al4V – MP e Ti6Al4V – CT), e ciò è stato anche confermato dai risultati dei test biochimici e delle analisi XPS. Dai risultati è sembrato inoltre emergere come l'adsorbimento di BSA sia preferenziale sulle superficie lisce (Ti6Al4V – MP), mentre l'adsorbimento di BFN sia preferenziale sulle superficie ossidate e dotate di una nano strutturazione superficiale (Ti6Al4V – CT). I risultati dell'adsorbimento di FBS non hanno invece permesso di riscontrare differenze statisticamente significative nell'adsorbimento proteico da parte delle superfici lisce (Ti6Al4V – MP) rispetto a quelle ossidate e dotate di una superficie nano strutturata (Ti6Al4V – CT).

Non è stato possibile determinare con precisione né orientamento né conformazione delle proteine adsorbite sui substrati tramite XPS e misure di angolo di contatto statico, ma è stato invece possibile dedurre, grazie a misure di potenziale  $\zeta$ , come sia riscontrabile (in particolar modo sulla superficie Ti6Al4V – CT) una differenza rilevabile tra i risultati di adsorbimento di BSA, BFN e FBS. Questa osservazione porta a far pensare che ciascuna proteina assuma una disposizione, un orientamento, una conformazione specifica preferenziale sul substrato Ti6Al4V – CT. Questo fatto, si ipotizza essere conseguenza delle proprietà chimico-fisiche del substrato stesso, proprietà che in qualche modo (per ora ancora sconosciuto) sono in grado di regolare e guidare il fenomeno dell'adsorbimento proteico sui substrati.

Per quanto riguarda i test cellulari, infine, quello che si è osservato è una maggiore vitalità cellulare di cellule di tipo osteoblastico sulle superfici in Ti6Al4V – CT rispetto alle superfici Ti6Al4V – MP. È stato ipotizzato che sia un effetto combinato delle proprietà chimico fisiche superficiali e della topografia superficiale della superficie Ti6Al4V – CT a determinare e guidare il comportamento cellulare sulla superficie del materiale testato.

Per quanto riguarda i test di attività antibatterica, al contrario, non sono state rilevate differenze statisticamente significative nel comportamento del ceppo di *Staphylococcus aureus* nei confronti del Ti6Al4V – MP e del Ti6Al4V – CT. Sia per quanto riguarda la formazione di biofilm che per

---

quanto riguarda le cellule planctoniche, è stata osservata una debole tendenza all'inibizione batterica delle superfici Ti6Al4V – CT rispetto alle superfici Ti6Al4V – MP. Si ritiene che l'indagine sull'attività antibatterica della superficie ossidata e nano strutturata (Ti6Al4V – CT) sia meritevole di ulteriore approfondimento da parte di studi successivi.

Le domande relative allo studio del Ti6Al4V – CT che rimangono aperte a questo punto sono ancora molte. È stato infatti ipotizzato come la superficie Ti6Al4V – CT sia effettivamente in grado di far adsorbire in modo preferenziale la BFN rispetto alla BSA, ma non è stato chiarito in che misura e non sono stati indagati approfonditamente gli effetti che tutto ciò potrebbe comportare sull'adesione cellulare. Posto che la superficie Ti6Al4V – CT è in grado di influire sulle modalità con cui l'adsorbimento di biomolecole avviene, è possibile pensare che la superficie ossidata induca le proteine ad adsorbirsi e disporsi secondo precise e determinate regole? Se sì, è possibile mettere in relazione le caratteristiche della superficie ossidata e la conformazione/orientamento con cui le proteine vengono adsorbite? La possibilità di predire la disposizione, la conformazione e l'orientamento con cui si adsorbono le proteine ad un substrato, note le proprietà chimico-fisiche del substrato stesso, è concreta?

Dai risultati XPS e dalle misure di bagnabilità non è possibile trarre conclusioni generali. I risultati XPS e di bagnabilità, però, possono essere confrontati con quelli di potenziale  $\zeta$  per cercare di fare luce sui meccanismi di adsorbimento proteico dal punto di vista della variazione di carica superficiale delle superfici testate. I risultati delle misure di potenziale  $\zeta$  riportati nel presente lavoro di tesi, in particolare, sembrano confermare la possibilità di dedurre un principio generale che spieghi come si svolge il fenomeno dell'adsorbimento proteico, cioè sembrano confermare che sia possibile mettere in relazione il tipo di superficie con le modalità con cui le proteine si adsorbono su di essa. Sta agli studi successivi di altri ricercatori trovare l'anello di congiunzione, la regola in grado di poter descrivere e predire questo meccanismo. In tal modo sarebbe idealmente possibile, note sia la proteina che le caratteristiche fisico-chimiche del substrato, determinare la conformazione e la struttura della biomolecola adsorbita. Tutto ciò aprirebbe uno scenario molto interessante nel campo della funzionalizzazione dei biomateriali. Potrebbe diventare possibile andare a determinare esattamente come una certa biomolecola si adsorbe ad un certo substrato, a patto di essere ovviamente in grado di regolare finemente le proprietà chimico-fisiche alla nano scala del substrato stesso. La nano scala è la stessa scala nella quale avvengono i fenomeni che

---

sono relativi all'adsorbimento proteico, per cui avere un controllo delle reazioni a quel determinato livello potrebbe garantire: sia di poter regolare a piacimento l'adsorbimento proteico; sia, come conseguenza, di poter regolare a piacimento la risposta cellulare al biomateriale.

Lo studio della carica superficiale dei biomateriali in ambiente acquoso, seppure complicato, è ad oggi la frontiera più significativa verso la quale è necessario spingere gli sforzi della ricerca per avere una comprensione più completa dei fenomeni che avvengono all'interfaccia tra biomateriali e fluidi biologici. L'adsorbimento proteico può essere studiato sotto questo punto di vista in modo dettagliato. Le prospettive dello studio dell'interazione tra fluidi biologici e biomateriali attraverso la tecnica del potenziale  $\zeta$  si rivelano dunque molto promettenti. In questo senso, andare a combinare con i risultati di altre tecniche analitiche chimiche e biochimiche (XPS, SIMS, AFM, radiolabelling, ...ecc), le misure di potenziale  $\zeta$  (come si è cercato di fare proprio in questo lavoro di tesi) potrebbero apportare in futuro un significativo aiuto nell'incrementare le conoscenze di quei fenomeni che, all'interfaccia tra biomateriale e fluidi biologici, permettono una buona integrazione del materiale in vivo.

---

## Bibliografia

- [1] «Albumina», *Wikipedia*. 28-ott-2017.
- [2] P. R. Foster, «Plasma Fractionation», in *Transfusion Medicine: Quo Vadis? What Has Been Achieved, What Is to Be Expected*, Springer, Boston, MA, 2001, pagg. 87–101.
- [3] R. M. Lawn *et al.*, «The sequence of human serum albumin cDNA and its expression in *E. coli*», *Nucleic Acids Res.*, vol. 9, n. 22, pagg. 6103–6114, 1981.
- [4] C. B. Anfinsen, J. T. Edsall, F. M. Richards, e L. M. Gierasch, A c. di, *Serum Albumin*. Orlando: Academic Press, 1985.
- [5] M. A. Rothschild, M. Oratz, e S. S. Schreiber, «Serum albumin», *Hepatology*, vol. 8, n. 2, pagg. 385–401, mar. 1988.
- [6] D. C. Carter e J. X. Ho, «Structure of serum albumin», *Adv. Protein Chem.*, vol. 45, pagg. 153–203, 1994.
- [7] X. Zhang *et al.*, «Investigation of the Interaction of Naringin Palmitate with Bovine Serum Albumin: Spectroscopic Analysis and Molecular Docking», *PLoS One*, vol. 8, pag. e59106, mar. 2013.
- [8] D. M. Brunette, P. Tengvall, M. Textor, e P. Thomsen, *Titanium in medicine: material science, surface science, engineering, biological responses and medical applications*. Springer Science & Business Media, 2012.
- [9] T. Lindl, «Composition of FBS.pdf», in *Zell- und Gewebekultur*, 2002.
- [10] «Bovine serum albumin», *Wikipedia*. 28-ago-2017.
- [11] H.-H. Cai, X. Zhong, P.-H. Yang, W. Wei, J. Chen, e J. Cai, «Probing site-selective binding of rhodamine B to bovine serum albumin», *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.*, vol. 372, n. 1, pagg. 35–40, dic. 2010.
- [12] «BSA\_Product\_Information\_Sheet.pdf». .
- [13] J. D. Bronzino, A c. di, *The biomedical engineering handbook*, 2nd ed. Boca Raton, FL: CRC Press, 2000.
- [14] B. X. Huang, H.-Y. Kim, e C. Dass, «Probing three-dimensional structure of bovine serum albumin by chemical cross-linking and mass spectrometry», *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, vol. 15, n. 8, pagg. 1237–1247, ago. 2004.
- [15] «HSA\_Product\_Information\_Sheet». [In linea]. Available at: <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Datasheet/10/05420dat.pdf>. [Consultato: 08-mar-2018].
- [16] S. M. Slack e T. A. Horbett, «Physicochemical and biochemical aspects of fibrinogen adsorption from plasma and binary protein solutions onto polyethylene and glass», *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 124, n. 2, pagg. 535–551, ago. 1988.
- [17] D. J. Fabrizius-Homan e S. L. Cooper, «A comparison of the adsorption of three adhesive proteins to biomaterial surfaces», *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, vol. 3, n. 1, pagg. 27–47, 1991.
- [18] B. D. Ratner, A c. di, *Biomaterials science: an introduction to materials in medicine*. San Diego: Academic Press, 1996.
- [19] B. A. Ivarsson, P.-O. Hegg, K. I. Lundström, e U. Jönsson, «Adsorption of proteins on metal surfaces studied by ellipsometric and capacitance measurements», *Colloids Surf.*, vol. 13, pagg. 169–192, 1985.
- [20] R. L. Williams e D. F. Williams, «Albumin adsorption on metal surfaces», *Biomaterials*, vol. 9, n. 3, pagg. 206–212, 1988.
- [21] S. Margel, E. A. Vogler, L. Firment, T. Watt, S. Haynie, e D. Y. Sogah, «Peptide, protein, and cellular interactions with self-assembled monolayer model surfaces», *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 27, n. 12, pagg. 1463–1476, dic. 1993.
-

- 
- [22] E. A. Vogler, «Structure and reactivity of water at biomaterial surfaces», *Adv. Colloid Interface Sci.*, vol. 74, n. 1, pagg. 69–117, feb. 1998.
- [23] L. Vroman, A. L. Adams, G. C. Fischer, e P. C. Munoz, «Interaction of high molecular weight kininogen, factor XII, and fibrinogen in plasma at interfaces», *Blood*, vol. 55, n. 1, pagg. 156–159, gen. 1980.
- [24] T. Arai e W. Norde, «The behavior of some model proteins at solid-liquid interfaces 1. Adsorption from single protein solutions», *Colloids Surf.*, vol. 51, pagg. 1–15, gen. 1990.
- [25] T. A. Horbett e J. L. Brash, «Proteins at Interfaces: Current Issues and Future Prospects», in *Proteins at Interfaces*, vol. 343, 0 vol., American Chemical Society, 1987, pagg. 1–33.
- [26] J. L. Ong, E. G. Bess, e K. Bessho, «Osteoblast Progenitor Cell Responses to Characterized Titanium Surfaces in the Presence of Bone Morphogenetic Protein–Atelopeptide Type I Collagen IN VITRO», *J. Oral Implantol.*, vol. 25, n. 2, pagg. 95–100, apr. 1999.
- [27] A. P. V. Serro, A. C. Fernandes, e B. de J. Vieira Saramago, «Dynamic interfacial behaviour of bovine serum albumin solutions on titanium surfaces», *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.*, vol. 125, n. 2, pagg. 209–219, giu. 1997.
- [28] L. Vroman e A. L. Adams, «Adsorption of proteins out of plasma and solutions in narrow spaces», *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 111, n. 2, pagg. 391–402, giu. 1986.
- [29] B. Wälivaara, B. O. Aronsson, M. Rodahl, J. Lausmaa, e P. Tengvall, «Titanium with different oxides: in vitro studies of protein adsorption and contact activation», *Biomaterials*, vol. 15, n. 10, pagg. 827–834, ago. 1994.
- [30] L. Fangyan, Z. Meiyang, e Z. Feng, «<sup>125</sup>I labelling of human serum albumin and fibrinogen and a study of protein adsorption properties on the surface of titanium oxide film», *Appl. Radiat. Isot.*, vol. 49, n. 1–2, pagg. 67–72, 1998.
- [31] S. Fukuzaki, H. Urano, e K. Nagata, «Adsorption of bovine serum albumin onto metal oxide surfaces», *J. Ferment. Bioeng.*, vol. 81, n. 2, pagg. 163–167, 1996.
- [32] D. T. H. Wassell e G. Embery, «Adsorption of bovine serum albumin on to titanium powder», *Biomaterials*, vol. 17, n. 9, pagg. 859–864, 1996.
- [33] A. Klinger, D. Steinberg, D. Kohavi, e M. N. Sela, «Mechanism of adsorption of human albumin to titanium in vitro», *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 36, n. 3, pagg. 387–392, set. 1997.
- [34] C. E. Giacomelli, M. J. Avena, e C. P. De Pauli, «Adsorption of Bovine Serum Albumin onto TiO<sub>2</sub> Particles», *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 188, n. 2, pagg. 387–395, 1997.
- [35] H. Zeng, K. K. Chittur, e W. R. Lacefield, «Analysis of bovine serum albumin adsorption on calcium phosphate and titanium surfaces», *Biomaterials*, vol. 20, n. 4, pagg. 377–384, feb. 1999.
- [36] D. D. Deligianni, N. Katsala, S. Ladas, D. Sotiropoulou, J. Amedee, e Y. F. Missirlis, «Effect of surface roughness of the titanium alloy Ti–6Al–4V on human bone marrow cell response and on protein adsorption», *Biomaterials*, vol. 22, n. 11, pagg. 1241–1251, giu. 2001.
- [37] C. D. Tidwell *et al.*, «Static time-of-flight secondary ion mass spectrometry and x-ray photoelectron spectroscopy characterization of adsorbed albumin and fibronectin films», *Surf. Interface Anal.*, vol. 31, n. 8, pagg. 724–733, ago. 2001.
- [38] S. R. Sousa, P. Moradas-Ferreira, B. Saramago, L. Viseu Melo, e M. A. Barbosa, «Human Serum Albumin Adsorption on TiO<sub>2</sub> from Single Protein Solutions and from Plasma», *Langmuir*, vol. 20, n. 22, pagg. 9745–9754, ott. 2004.
- [39] K. Cai, J. Bossert, e K. D. Jandt, «Does the nanometre scale topography of titanium influence protein adsorption and cell proliferation?», *Colloids Surf. B Biointerfaces*, vol. 49, n. 2, pagg. 136–144, mag. 2006.
- [40] K. Cai, M. Frant, J. Bossert, G. Hildebrand, K. Liefeth, e K. D. Jandt, «Surface functionalized titanium thin films: Zeta-potential, protein adsorption and cell proliferation», *Colloids Surf. B Biointerfaces*, vol. 50, n. 1, pagg. 1–8, giu. 2006.
-

- 
- [41] «Effect of Surface Wettability on the Adsorption of Proteins and Detergents - Journal of the American Chemical Society (ACS Publications)». [In linea]. Available at: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ja970819l>. [Consultato: 13-mar-2018].
- [42] T. Kopac, K. Bozgeyik, e J. Yener, «Effect of pH and temperature on the adsorption of bovine serum albumin onto titanium dioxide», *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.*, vol. 322, n. 1–3, pagg. 19–28, giu. 2008.
- [43] P. Silva-Bermudez, S. E. Rodil, e S. Muhl, «Albumin adsorption on oxide thin films studied by spectroscopic ellipsometry», *Appl. Surf. Sci.*, vol. 258, n. 5, pagg. 1711–1718, dic. 2011.
- [44] X. N. Hu e B. C. Yang, «Conformation change of bovine serum albumin induced by bioactive titanium metals and its effects on cell behaviors: Conformation Change of Bovine Serum Albumin», *J. Biomed. Mater. Res. A*, vol. 102, n. 4, pagg. 1053–1062, apr. 2014.
- [45] G. Raffaini e F. Ganazzoli, «Molecular modelling of protein adsorption on the surface of titanium dioxide polymorphs», *Philos. Trans. R. Soc. Math. Phys. Eng. Sci.*, vol. 370, n. 1963, pagg. 1444–1462, mar. 2012.
- [46] R. A. Latour, «Biomaterials: protein-surface interactions», *Encycl. Biomater. Biomed. Eng.*, vol. 1, pagg. 270–278, 2005.
- [47] R. A. Latour, «Molecular simulation of protein-surface interactions: Benefits, problems, solutions, and future directions (Review)», *Biointerphases*, vol. 3, n. 3, pagg. FC2–FC12, set. 2008.
- [48] Y. Yang, R. Cavin, e J. L. Ong, «Protein adsorption on titanium surfaces and their effect on osteoblast attachment», *J. Biomed. Mater. Res. A*, vol. 67, n. 1, pagg. 344–349, 2003.
- [49] S. R. Sousa, M. Lamghari, P. Sampaio, P. Moradas-Ferreira, e M. A. Barbosa, «Osteoblast adhesion and morphology on TiO<sub>2</sub> depends on the competitive preadsorption of albumin and fibronectin», *J. Biomed. Mater. Res. A*, vol. 84A, n. 2, pagg. 281–290, feb. 2008.
- [50] Y. H. An e R. J. Friedman, «Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterial surfaces», *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 43, n. 3, pagg. 338–348, 1998.
- [51] A. G. Gristina, «Biomaterial-centered infection: microbial adhesion versus tissue integration», *Science*, vol. 237, n. 4822, pagg. 1588–1595, 1987.
- [52] Y. H. An, R. J. Friedman, R. A. Draughn, E. A. Smith, J. H. Nicholson, e J. F. John, «Rapid quantification of staphylococci adhered to titanium surfaces using image analyzed epifluorescence microscopy», *J. Microbiol. Methods*, vol. 24, n. 1, pagg. 29–40, nov. 1995.
- [53] T. J. Kinnari, L. I. Peltonen, P. Kuusela, J. Kivilahti, M. Könönen, e J. Jero, «Bacterial adherence to titanium surface coated with human serum albumin», *Otol. Neurotol.*, vol. 26, n. 3, pagg. 380–384, 2005.
- [54] F. Grinnell, «Distribution of fibronectin during wound healing in vivo», 1981.
- [55] F. Grinnell, «Fibronectin adsorption on material surfaces», *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 516, n. 1, pagg. 280–290, 1987.
- [56] D. F. Mosher, «Physiology of fibronectin», *Annu. Rev. Med.*, vol. 35, pagg. 561–575, 1984.
- [57] «Fibronectin», *Wikipedia*. 05-mar-2018.
- [58] R. A. Clark, «Fibronectin: Edited by D. F. Mosher. San Diego: Academic Press. (1989). 474 pp. \$95.00», *Cell*, vol. 59, n. 5, pagg. 775–776, dic. 1989.
- [59] R. O. Hynes, «Integrins: Versatility, modulation, and signaling in cell adhesion», *Cell*, vol. 69, n. 1, pagg. 11–25, apr. 1992.
- [60] R. Pankov, «Fibronectin at a glance», *J. Cell Sci.*, vol. 115, n. 20, pagg. 3861–3863, ott. 2002.
- [61] S. M. R. Freitas, «Albumin and fibronectin adsorption and osteoblast adhesion on titanium oxides», 2007.
- [62] C. M. Williams, A. J. Engler, R. D. Slone, L. L. Galante, e J. E. Schwarzbauer, «Fibronectin expression modulates mammary epithelial cell proliferation during acinar differentiation», *Cancer Res.*, vol. 68, n. 9, pagg. 3185–3192, mag. 2008.
-

- 
- [63] M. K. Magnusson e D. F. Mosher, «Fibronectin», *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 18, n. 9, pagg. 1363–1370, 1998.
- [64] D. Kabaso *et al.*, «Mechanics and electrostatics of the interactions between osteoblasts and titanium surface», *Comput. Methods Biomech. Biomed. Engin.*, vol. 14, n. 5, pagg. 469–482, mag. 2011.
- [65] T. E. Creighton, *Encyclopedia of molecular biology*. New York: John Wiley, 1999.
- [66] E. Pearlstein, L. I. Gold, e A. Garcia-Pardo, «Fibronectin: a review of its structure and biological activity», *Mol. Cell. Biochem.*, vol. 29, n. 2, pagg. 103–128, 1980.
- [67] D. Ericson e G. Tynelius-Bratthall, «Absorption of fibronectin from human saliva by strains of oral streptococci», *Scand. J. Dent. Res.*, vol. 94, n. 4, pagg. 377–379, ago. 1986.
- [68] J. Kanehisa, S. Doi, T. Yamanaka, e H. Takeuchi, «Salivary fibronectin in man: an immunoblotting, radioimmunoassay and immunohistochemical study», *Arch. Oral Biol.*, vol. 36, n. 4, pagg. 265–272, 1991.
- [69] «Cell and Molecular Biology: Concepts and Experiments, 8th Edition», *Wiley.com*. [In linea]. Available at: <https://www.wiley.com/en-us/Cell+and+Molecular+Biology%3A+Concepts+and+Experiments%2C+8th+Edition-p-9781118886144>. [Consultato: 13-mar-2018].
- [70] V. E. KOTLIANSKY *et al.*, «A study of the structure of fibronectin», *FEBS J.*, vol. 119, n. 3, pagg. 619–624, 1981.
- [71] «Unfolding fibronectin type III modules». [In linea]. Available at: <http://www.ks.uiuc.edu/Research/fibronectin/index.old.html>. [Consultato: 08-mar-2018].
- [72] «Springer Handbook of Nanotechnology | Bharat Bhushan | Springer». [In linea]. Available at: <http://www.springer.com/gp/book/9783642025259>. [Consultato: 15-mar-2018].
- [73] F. Grinnell e M. K. Feld, «Adsorption characteristics of plasma fibronectin in relationship to biological activity», *J. Biomed. Mater. Res. A*, vol. 15, n. 3, pagg. 363–381, 1981.
- [74] R. M. Shelton, A. C. Rasmussen, e J. E. Davies, «Protein adsorption at the interface between charged polymer substrata and migrating osteoblasts», *Biomaterials*, vol. 9, n. 1, pagg. 24–29, gen. 1988.
- [75] J. G. Steele, B. A. Dalton, G. Johnson, e P. A. Underwood, «Adsorption of fibronectin and vitronectin onto Primaria<sup>TM</sup> and tissue culture polystyrene and relationship to the mechanism of initial attachment of human vein endothelial cells and BHK-21 fibroblasts», *Biomaterials*, vol. 16, n. 14, pagg. 1057–1067, set. 1995.
- [76] D. MacDonald, N. Deo, B. Markovic, M. Stranick, e P. Somasundaran, «Adsorption and dissolution behavior of human plasma fibronectin on thermally and chemically modified titanium dioxide particles», *Biomaterials*, vol. 23, n. 4, pagg. 1269–1279, feb. 2002.
- [77] M. A. Strehle *et al.*, «A Raman spectroscopic study of the adsorption of fibronectin and fibrinogen on titanium dioxide nanoparticles», *Phys Chem Chem Phys*, vol. 6, n. 22, pagg. 5232–5236, 2004.
- [78] S. R. Sousa, P. Moradas-Ferreira, e M. A. Barbosa, «TiO<sub>2</sub> type influences fibronectin adsorption», *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 16, n. 12, pagg. 1173–1178, dic. 2005.
- [79] C. D. McFarland, C. H. Thomas, C. DeFilippis, J. G. Steele, e K. E. Healy, «Protein adsorption and cell attachment to patterned surfaces», *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 49, n. 2, pagg. 200–210, feb. 2000.
- [80] B. G. Keselowsky, D. M. Collard, e A. J. García, «Surface chemistry modulates fibronectin conformation and directs integrin binding and specificity to control cell adhesion: Surface Chemistry Alters Integrin Binding», *J. Biomed. Mater. Res. A*, vol. 66A, n. 2, pagg. 247–259, ago. 2003.
-

- 
- [81] J. Protivínský, M. Appleford, J. Strnad, A. Helebrant, e J. L. Ong, «Effect of chemically modified titanium surfaces on protein adsorption and osteoblast precursor cell behavior», *Int. J. Oral Maxillofac. Implants*, vol. 22, n. 4, pagg. 542–550, ago. 2007.
- [82] B. E. Rapuano e D. E. MacDonald, «Surface Oxide Net Charge of a Titanium Alloy; Modulation of Fibronectin-Activated Attachment and Spreading of Osteogenic Cells», *Colloids Surf. B Biointerfaces*, vol. 82, n. 1, pagg. 95–103, gen. 2011.
- [83] D. M. Rivera-Chacon *et al.*, «Fibronectin and Vitronectin Promote Human Fetal Osteoblast Cell Attachment and Proliferation on Nanoporous Titanium Surfaces», *J. Biomed. Nanotechnol.*, vol. 9, n. 6, pagg. 1092–1097, giu. 2013.
- [84] L. Lv, K. Li, Y. Xie, Y. Cao, e X. Zheng, «Enhanced osteogenic activity of anatase TiO<sub>2</sub> film: Surface hydroxyl groups induce conformational changes in fibronectin», *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 78, pagg. 96–104, set. 2017.
- [85] R. A. Proctor, «Fibronectin: a brief overview of its structure, function, and physiology», *Rev. Infect. Dis.*, vol. 9, n. Supplement\_4, pagg. S317–S321, 1987.
- [86] M. Herrmann *et al.*, «Fibronectin, fibrinogen, and laminin act as mediators of adherence of clinical staphylococcal isolates to foreign material», *J. Infect. Dis.*, vol. 158, n. 4, pagg. 693–701, ott. 1988.
- [87] P. Vaudaux, R. Suzuki, F. A. Waldvogel, J. J. Morgenthaler, e U. E. Nydegger, «Foreign body infection: role of fibronectin as a ligand for the adherence of *Staphylococcus aureus*», *J. Infect. Dis.*, vol. 150, n. 4, pagg. 546–553, ott. 1984.
- [88] M. Taborelli *et al.*, «Influence of surface treatments developed for oral implants on the physical and biological properties of titanium. (I) Surface characterization», *Clin. Oral Implants Res.*, vol. 8, n. 3, pagg. 208–216, giu. 1997.
- [89] P. François, P. Vaudaux, M. Taborelli, M. Tonetti, D. P. Lew, e P. Descouts, «Influence of surface treatments developed for oral implants on the physical and biological properties of titanium. (II) Adsorption isotherms and biological activity of immobilized fibronectin», *Clin. Oral Implants Res.*, vol. 8, n. 3, pagg. 217–225, giu. 1997.
- [90] S. D. Puckett, E. Taylor, T. Raimondo, e T. J. Webster, «The relationship between the nanostructure of titanium surfaces and bacterial attachment», *Biomaterials*, vol. 31, n. 4, pagg. 706–713, feb. 2010.
- [91] C. W. Boone, N. Mantel, T. D. Caruso, E. Kazam, e R. E. Stevenson, «Quality control studies on fetal bovine serum used in tissue culture», *Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant*, vol. 7, n. 3, pagg. 174–189, 1971.
- [92] M. Mhlanga, «Technology and Fetal Bovine Serum Purification: A Sysiphean Task?», *Nat. Biotechnol.*, vol. 13, n. 4, pagg. 334–334, apr. 1995.
- [93] *Animal Cell Culture: A Practical Approach*, Third Edition. Oxford, New York: Oxford University Press, 2000.
- [94] «Serum Protein Components». [In linea]. Available at: <https://rockland-inc.com/Serum-Protein-Components.aspx>. [Consultato: 16-mar-2018].
- [95] M. Rabe, D. Verdes, e S. Seeger, «Understanding protein adsorption phenomena at solid surfaces», *Adv. Colloid Interface Sci.*, vol. 162, n. 1–2, pagg. 87–106, feb. 2011.
- [96] B. Wälivaara, I. Lundström, e P. Tengvall, «An in-vitro study of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treated titanium surfaces in contact with blood plasma and a simulated body fluid», *Clin. Mater.*, vol. 12, n. 3, pagg. 141–148, 1993.
- [97] K. Imamura, M. Shimomura, S. Nagai, M. Akamatsu, e K. Nakanishi, «Adsorption characteristics of various proteins to a titanium surface», *J. Biosci. Bioeng.*, vol. 106, n. 3, pagg. 273–278, set. 2008.
-

- 
- [98] K. Imamura, Y. Kawasaki, T. Nagayasu, T. Sakiyama, e K. Nakanishi, «Adsorption characteristics of oligopeptides composed of acidic and basic amino acids on titanium surface», *J. Biosci. Bioeng.*, vol. 103, n. 1, pagg. 7–12, gen. 2007.
- [99] M. N. Sela, L. Badihi, G. Rosen, D. Steinberg, e D. Kohavi, «Adsorption of human plasma proteins to modified titanium surfaces», *Clin. Oral Implants Res.*, vol. 18, n. 5, pagg. 630–638, ott. 2007.
- [100] E. M. C. X. Lima, H. Koo, A. M. Vacca Smith, P. L. Rosalen, e A. A. Del Bel Cury, «Adsorption of salivary and serum proteins, and bacterial adherence on titanium and zirconia ceramic surfaces», *Clin. Oral Implants Res.*, vol. 19, n. 8, pagg. 780–785, ago. 2008.
- [101] C. G. Dodo, P. M. Senna, W. Custodio, A. F. Paes Leme, e A. A. Del Bel Cury, «Proteome analysis of the plasma protein layer adsorbed to a rough titanium surface», *Biofouling*, vol. 29, n. 5, pagg. 549–557, mag. 2013.
- [102] F. Romero-Gavilán *et al.*, «Proteome analysis of human serum proteins adsorbed onto different titanium surfaces used in dental implants», *Biofouling*, vol. 33, n. 1, pagg. 98–111, gen. 2017.
- [103] J. Pei, H. Hall, e N. D. Spencer, «The role of plasma proteins in cell adhesion to PEG surface-density-gradient-modified titanium oxide», *Biomaterials*, vol. 32, n. 34, pagg. 8968–8978, dic. 2011.
- [104] H. Noh e E. A. Vogler, «Volumetric interpretation of protein adsorption: competition from mixtures and the Vroman effect», *Biomaterials*, vol. 28, n. 3, pagg. 405–422, gen. 2007.
- [105] Y. Tie, C. Calonder, e P. R. Van Tassel, «Protein adsorption: Kinetics and history dependence», *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 268, n. 1, pagg. 1–11, dic. 2003.
- [106] B. Feng, J. Weng, B. C. Yang, S. X. Qu, e X. D. Zhang, «Characterization of surface oxide films on titanium and adhesion of osteoblast», *Biomaterials*, vol. 24, n. 25, pagg. 4663–4670, nov. 2003.
- [107] «Surface Roughness and Contact Angle. - The Journal of Physical Chemistry (ACS Publications)». [In linea]. Available at: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/j150474a015?journalCode=jpchax.1>. [Consultato: 15-mar-2018].
- [108] X. Liu, P. Chu, e C. Ding, «Surface modification of titanium, titanium alloys, and related materials for biomedical applications», *Mater. Sci. Eng. R Rep.*, vol. 47, n. 3–4, pagg. 49–121, dic. 2004.
- [109] K. Wang, C. Zhou, Y. Hong, e X. Zhang, «A review of protein adsorption on bioceramics», *Interface Focus*, vol. 2, n. 3, pagg. 259–277, giu. 2012.
- [110] B. D. Boyan, T. W. Hummert, D. D. Dean, e Z. Schwartz, «Role of material surfaces in regulating bone and cartilage cell response», *Biomaterials*, vol. 17, n. 2, pagg. 137–146, gen. 1996.
- [111] G. Zhao, A. L. Raines, M. Wieland, Z. Schwartz, e B. D. Boyan, «Requirement for Both Micron and Submicron Scale Structure for Synergistic Responses of Osteoblasts to Substrate Surface Energy and Topography», *Biomaterials*, vol. 28, n. 18, pagg. 2821–2829, giu. 2007.
- [112] C. R. Howlett, M. D. M. Evans, W. R. Walsh, G. Johnson, e J. G. Steele, «Mechanism of initial attachment of cells derived from human bone to commonly used prosthetic materials during cell culture», *Biomaterials*, vol. 15, n. 3, pagg. 213–222, feb. 1994.
- [113] K. L. Kilpadi, P. L. Chang, e S. L. Bellis, «Hydroxylapatite binds more serum proteins, purified integrins, and osteoblast precursor cells than titanium or steel», *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 57, n. 2, pagg. 258–267, nov. 2001.
- [114] «Metallographic Precision Cut Off Saw 8" Diamond | Brillant BR220 | ATM|Mager». [In linea]. Available at: <http://magersci.com/atmmetallographiccequipment/products.php?p=628>. [Consultato: 15-mar-2018].
-

- 
- [115] R. M. Duncan, B. H. Hanson, B. S. Institution, D. Council, e C. of E. Institutions, *The selection and use of titanium*. Oxford: Oxford University Press for the Design Council, the British Standards Institution and the Council of Engineering Institutions, 1980.
- [116] «MACHINES- priniotakis.gr». [In linea]. Available at: [http://www.priniotakis.gr/catalog2/product\\_info.php?language=en&products\\_id=54](http://www.priniotakis.gr/catalog2/product_info.php?language=en&products_id=54). [Consultato: 15-mar-2018].
- [117] «Sandpaper», *Wikipedia*. 02-lug-2017.
- [118] «Lavatrice ad ultrasuoni 2200 S3». [In linea]. Available at: <https://www.soltec.eu/it/lavatrici-ad-ultrasuoni-serie-standard/8-lavatrice-ad-ultrasuoni-2200-s3.html>. [Consultato: 15-mar-2018].
- [119] S. Spriano, E. Verne', e S. Ferraris, «Multifunctional titanium surfaces for bone integration», EP2214732 B1, 15-mag-2013.
- [120] S. Ferraris *et al.*, «Multifunctional commercially pure titanium for the improvement of bone integration: Multiscale topography, wettability, corrosion resistance and biological functionalization», *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 60, pagg. 384–393, mar. 2016.
- [121] S. Ferraris *et al.*, «Surface modification of Ti–6Al–4V alloy for biomineralization and specific biological response: Part I, inorganic modification», *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 22, n. 3, pagg. 533–545, mar. 2011.
- [122] S. Spriano, S. Ferraris, G. Pan, C. Cassinelli, e E. Vernè, «MULTIFUNCTIONAL TITANIUM: SURFACE MODIFICATION PROCESS AND BIOLOGICAL RESPONSE», *J. Mech. Med. Biol.*, vol. 15, n. 02, pag. 1540001, apr. 2015.
- [123] J. C. Vickerman e I. S. Gilmore, A c. di, *Surface analysis: the principal techniques*, 2nd ed. Chichester, U.K.: Wiley, 2009.
- [124] «ramé-hart Contact Angle». [In linea]. Available at: <http://www.ramehart.com/contactangle.htm>. [Consultato: 15-mar-2018].
- [125] «Contact Angle & Surface Tension – SIMC». .
- [126] «TOGWT: Surface Energy». [In linea]. Available at: <http://togwt1980.blogspot.it/2015/06/surface-energy.html>. [Consultato: 01-feb-2018].
- [127] S. Spriano *et al.*, «How do wettability, zeta potential and hydroxylation degree affect the biological response of biomaterials?», *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 74, pagg. 542–555, mag. 2017.
- [128] «tecnologia farmaceutica: sospensioni». [In linea]. Available at: <http://dctf.uniroma1.it/galenotech/potzeta.htm>. [Consultato: 30-gen-2018].
- [129] «Surfaces, Interfaces, and Colloids: Principles and Applications, 2nd Edition», *Wiley.com*. [In linea]. Available at: <https://www.wiley.com/en-us/Surfaces%2C+Interfaces%2C+and+Colloids%3A+Principles+and+Applications%2C+2nd+Edition-p-9780471330608>. [Consultato: 16-mar-2018].
- [130] «The ZETA Guide :: Anton-Paar.com», *Anton Paar*. [In linea]. Available at: <https://www.anton-paar.com/it-it/the-zeta-guide/>. [Consultato: 19-mar-2018].
- [131] «Fenomeni elettrocinetici.pdf», *Enciclopedia Treccani*, vol. 5. .
- [132] A. M. Gallardo-Moreno, V. Vadiello-Rodríguez, J. Perera-Núñez, J. M. Bruque, e M. L. González-Martín, «The zeta potential of extended dielectrics and conductors in terms of streaming potential and streaming current measurements», *Phys. Chem. Chem. Phys.*, vol. 14, n. 27, pag. 9758, 2012.
- [133] «Labs». [In linea]. Available at: <http://seqe.mx/seqe/laboratorio.html>. [Consultato: 19-mar-2018].
- [134] «MediaGallery :: Anton-Paar.com», *Anton Paar*. [In linea]. Available at: <https://www.anton-paar.com/at-de/fusszeile/mediagallery/>. [Consultato: 19-mar-2018].
-

- 
- [135] A. Majumdar, G. Das, N. Patel, P. Mishra, D. Ghose, e R. Hippler, «Microstructural and Chemical Evolution of  $-\text{CH}_3$ -Incorporated (Low-k) SiCO(H) Films Prepared by Dielectric Barrier Discharge Plasma», *J. Electrochem. Soc.*, vol. 155, n. 1, pag. D22, 2008.
- [136] «Isoelectric point», *Wikipedia*. 14-mar-2018.