

Corso di Laurea Magistrale in Ingegneria Biomedica

Studio dell'adsorbimento di proteine da siero bovino, su superfici di titanio chimicamente modificate

Relatore:

Candidato:

Prof.ssa Spriano Silvia

Francesco Gallo

Co-relatori:

Prof.ssa Lucia Napione

Barberi Jacopo

Camilla Reggio

Abstract

Lo studio della risposta del corpo umano ai biomateriali impiantati è di fondamentale importanza nell'implantologia, per comprendere i fenomeni e le caratteristiche che portano al successo dell'impianto.

Negli ultimi anni, peculiare attenzione ha suscitato l'argomento dell'adsorbimento proteico da parte dei fluidi biologici. Per i biomateriali impiantati in vivo, non sono le cellule le prime ad interagire con la superficie del materiale ma, sono le proteine presenti nei fluidi biologici ad interagire con la superficie. Le proteine si adsorbono a partire dai primi secondi dell'impianto e generano un layer proteico che funge da interfaccia tra le cellule e il biomateriale, determinando l'attivazione di determinati pathway che possono portare al successo o all'insuccesso dell'impianto.

Tra i materiali più utilizzati, in abito ortopedico e dentale, per la sostituzione ossea è predominante il titanio e le sue leghe. Il titanio presenta delle ottime proprietà meccaniche e una notevole resistenza alla corrosione, dovuta alla sua capacità di auto-passivarsi e di generare sulla sua superficie un ossido che ne garantisce una elevata biocompatibilità.

Per questi motivi nel seguente lavoro di tesi si è proceduto a studiare il fenomeno dell'adsorbimento su superfici metalliche in lega di titanio (Ti-6Al-4V). In particolare, si è studiato l'adsorbimento proteico da soluzioni multicomponenti, quale il siero fetale bovino (FBS), al fine di simulare l'ambiente biologico, su due tipologie di superfici: lega Ti-6Al-4V liscia e lucidata (Ti64) e lega Ti-6Al-4V sottoposta ad un trattamento chimico brevettato (CT), al fine di generare una superficie multifunzionale micro-nano-strutturata bioattiva.

In particolare, si è indagato l'adsorbimento del FBS tramite differenti tecniche che permettono di valutare: la presenza della proteina (ATR-FTIR e misure in fluorescenza); il potenziale zeta (legato alla carica elettrica superficiale); la bagnabilità dei campioni (angolo di contatto statico); le interazioni delle proteine con le superfici (KPFM) e test biochimici (BCA e Hartree-Lowry).

Partendo dallo studio di base sull'adsorbimento proteico sopra descritto, è' stato, infine, fatto un passo per affrontare uno specifico medical need. L'adesione e la proliferazione batterica rimangono una delle principali conseguenze postoperatorie che portano al

fallimento degli impianti e dei dispositivi biomedici. Il pre-adsorbimento di proteine può essere utilizzato per modificare la superficie degli impianti e impartire loro specifiche proprietà. Alcune proteine, come l'albumina, hanno una forte affinità chimica per ioni/elementi antibatterici come l'argento e possono essere utili per una funzionalizzazione che limiti la citotossicità dei medesimi. È stato posto come obiettivo aggiuntivo la funzionalizzazione delle superfici in esame, Ti64 e CT, con albumina ed argento al fine di renderle antibatteriche rimanendo comunque citocompatibili. In particolare le superfici a seguito dell'adsorbimento in albumina sierica bovina (BSA) sono state funzionalizzate con soluzioni AgNO₃ a differenti concentrazioni. I campioni così trattati sono stati analizzati tramite differenti tecniche che permettono di valutare: la presenza dell'argento sulle superfici (ATR-FTIR), la composizione degli elementi sulla superficie (FESEM-EDS) e la dimensione delle nano-particelle di Ag (DLS) eventualmente formatesi in sospensione.

Indice

1			Siero fetale bovino	7
	1.1		Produzione del siero	7
	1.2		Funzioni e composizione del siero	9
	1.3		Applicazione del siero	11
	1.4		Problematiche del siero	12
	1.5		Albumina	14
	1.6		Fibronectina	17
2			Adsorbimento proteico sul titanio	19
-	2.1		Adsorbimento su superfici solide	19
	2.2		Parametri che influenzano l'adsorbimento proteico	20
		2.2.1	Forze motrici dell'adsorbimento proteico	21
		2.2.2	Influenza delle proprietà della superficie del substrato	21
		2.2.3	Influenza delle proprietà delle proteine	23
		2.2.4	Influenza dei parametri esterni	25
	2.3		Adsorbimento delle proteine su materiali in titanio	26
	_	2.3.1	Considerazioni generali	27
		2.3.2	Modifiche superficiali sul titanio	29
		2.3.3	Parametri esterni e la loro influenza	30
		2.3.4	Adsorbimento competitivo	31
	2.4		Rivestimento antimicrobico	33
3			Funzionalizzazione del titanio	37
	3.1		Modifiche superficiali del titanio	37
	3.2		Le fasi del processo termochimico	38
	3.3		Considerazioni	40
		3.3.1	Topografia superficiale	40
		3.3.2	Chimica superficiale	40
		3.3.3	Bagnabilità superficiale	41
		3.3.4	Bioattività in vitro	41
		3.3.5	Funzionalizzazione biologica	41
4			Materiali e metodi	43
	4.1		Preparazione dei campioni	44
		4.1.1	Taglio	44
		4.1.2	Lucidatura	45
		4.1.3	lavaggio	47
		4.1.4	Trattamento chimico	49
	4.2		Adsorbimento proteico	50
	4.2		Analisi biochimiche per la valutazione dell'adsorbimento	52
	4.3		proteico	
		4.3.1	Test BCA	53
		4.3.2	Protocollo Hartree-Lowry	56
	4.4		Misure con anticorpi fluorescenti	58
	4.5		Caratterizzazione superficiale	62
		4.5.1	ChemiDoc	62
		4.5.2	Microscopio a scansione confocale (LSCM)	63
		4.5.3	Misure in bagnabilità	67

	4.5.4		Potenziale zeta	68
	4.5.5		Kelvin Probe Force Microscopy (KPFM)	76
	150		Spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier a riflettanza	80
	4.5.6		totale attenuata (ATR-FTIR)	
4.6			Rivestimento antimicrobico	83
	4.6.1		Funzionalizzazione	83
	4.6.2		ATR-FTIR	84
	4.6.3		DLS	85
	4.6.4		FESEM-EDS	86
			Risultati	91
5.1			Analisi superficiali	91
	5.1.1		Microscopio a scansione confocale (LSCM)	92
		5.1.1.1	Ti64 vs CT	92
		5.1.1.2	CT vs CT-FBS	93
		3.1.1.3	Ti64 vs Ti-FBS	94
		5.1.1.4	Ti-FBS vs CT-FBS	95
	5.1.2		Bagnabilità	96
	5.1.3		Potenziale zeta	97
		5.1.3.1	pH 4 costante	97
		5.1.3.2	pH 7.4 costante	99
		5.1.3.3	Curve di titolazione del potenziale zeta	100
	5.1.4		Kelvin probe force microscopy (KPFM)	107
		5.1.4.1	Prima prova	108
		5.1.4.2	Seconda prova	110
	5.1.5		ATR-FTIR	114
5.2			Test di adsorbimento proteico	117
	5.2.1		BCA	117
	5.2.2		Protocollo Hartree-Lowry	118
	5.2.3		Misure con anticorpi fluorescenti	119
5.3			Test sulle superfici antimicrobiche	124
	5.3.1		ATR-FTIR	125
	5.3.2		DLS	127
	5.3.3		FESEM-EDS	128
		5.3.3.1	Ti64	128
		5.3.3.2	CT-BSA	129
		5.3.3.3	CT-BSA-C1	130
		5.3.3.4	CT-BSA-C2	131
		5.3.3.5	CT-BSA-C3	132
		5.3.3.6	Ti-BSA	133
		5.3.3.7	Ti-BSA-C1	134
		5.3.3.8	Ti-BSA-C2	135
		5.3.3.9	Ti-BSA-C3	136
			Conclusioni	137
			Bibliografia	141

5

6

Capitolo 1

1 Siero fetale bovino

Il siero fetale bovino, FBS, (*Fetal Bovine Serum*) è un liquido costituito dalla frazione del plasma sanguigno che rimane dopo la coagulazione del sangue. L'FBS è stato utilizzato come integratore universale nei terreni di coltura per cellule eucariote e permette di simulare un ambiente fisiologico in differenti ambiti: nella ricerca, nella biotecnologia e nella produzione farmaceutica. [1]

Nel presente capitolo verrà presentata una descrizione della produzione, delle funzioni, della composizione dell'FBS e delle differenze con il siero umano HS (*Human Serum*). In quanto, solo possedendo una conoscenza approfondita dell'FBS è possibile comprendere appieno i test di adsorbimento proteico condotti in questa tesi.

1.1 Produzione del siero

L'FBS è il tipo di siero più comunemente impiegato nei laboratori di ricerca (a causa del suo alto contenuto di fattori di crescita embrionali e livelli inferiori di anticorpi rispetto al siero prelevato da un individuo adulto). Inoltre, è facilmente reperibile ed economico, perché è un prodotto secondario dell'industria della carne.

L'FBS viene raccolto dal sangue di vitelli non ancora nati (feti) in qualsiasi fase dello sviluppo degli ultimi due terzi della gestazione, che vengono per lo più scoperti accidentalmente durante la macellazione di vacche gravide. Nella prima fase di produzione il sangue viene prelevato dal feto, mediante una puntura cardiaca, inserendo l'ago tra le costole della gabbia toracica. Questa metodologia è stata sviluppata allo scopo di minimizzare il rischio di contaminazione del siero, per mezzo di microorganismi del feto in sé o ambientali[2].

Successivamente, il sangue viene lasciato coagulare, all'interno di un contenitore sterile. Il coagulo viene quindi rimosso centrifugandolo e la soluzione risultante, FBS, viene prelevata. Questa fase si presenta rilevante e di notevole importanza nella fase di produzione dell'FBS, in quanto serve a prevenire la contaminazione del siero con i prodotti dell'emolisi e in particolare della leucocitolisi, perché le proteasi e altre idrolasi rilasciate nel siero dai lisosomi leucocitari potrebbe agire sui componenti del siero sia per abbassarne il valore nutritivo sia per produrre prodotti tossici, come gli acidi grassi liberi.

A seguito di questa procedura l'FBS assume una tonalità giallo/arancio dovuta alla presenza di emoglobina residua.

Nel secondo stadio della lavorazione l'FBS consiste in un primo step di omogeneizzazione e in un secondo di filtrazione. Nella fase di omogeneizzazione, il siero viene raccolto in delle vasche (fino a 2001), dove viene versato il siero di differenti capi, così da ottenere un prodotto finale omogeneo ed evitare che ci sia una differenza di variabilità tra differenti lotti[3].

La fase di filtrazione, prevede l'applicazione di un filtro a membrana con pori del diametro di $0.1 \mu m$ (nel caso si vogliano rimuovere microplasmi si possono usare pori del diametro di $0.04 \mu m$). Al termine della filtrazione, il siero viene imbottigliato mediante un processo di riempimento asettico, al fine di assicurare la sterilità del prodotto finale[4].

A seguito dell'imbottigliamento, il siero viene congelato rapidamente, entro 5h dal prelievo, tra -5 e -20°C e tenuto sotto controllo fine al termine dei test di controllo di qualità. L'FBS deve essere necessariamente congelato per preservare la stabilità dei componenti ed evitarne alterazioni, e può essere scongelato in frigorifero ad una temperatura compresa tra 2 e 8°C. Per evitare più cicli di congelamento e scongelamento (che danneggiano il contenuto sieratico) è consigliabile aliquotare il siero in provette. È comune avere del precipitato dopo lo scongelamento, probabilmente dovuto alla denaturazione di alcune delle proteine del siero che può essere eliminato mediante una breve centrifugazione, questo generalmente non pregiudica la qualità del siero. [1], [5]

1.2 Funzioni e composizione del siero

L'FBS è generalmente riconosciuto a livello internazionale come l'integratore universale nei terreni di coltura per cellule eucariote, dove fornisce molti nutrienti essenziali e fattori di crescita che facilitano la sopravvivenza e la proliferazione cellulare, con lo scopo di simulare un ambiente fisiologico. Generalmente, nei protocolli di cultura cellulare viene utilizzato siero in concentrazioni medie tra il 5-15% in volume, in quanto la sua presenza nei mezzi di cultura cellulare è fondamentale per garantire il corretto apporto di: proteine, ormoni, vitamine, fattori di crescita, fattori di legame e fattori di attaccamento; in oltre è coinvolto in funzioni aggiuntive quali: tampone del pH, inibizione della proteasi, neutralizzazione e detossificazione di componenti tossici [6], [7].

Il siero bovino fetale contiene generalmente, rispetto al siero bovino prelevato da un soggetto adulto, più fattori di crescita e ha un contenuto di gammaglobuline (anticorpi) più basso (in quanto nei bovini non si verifica il trasferimento transplacentare di anticorpi materni). Tali caratteristiche sono molto importanti, perché i fattori di crescita facilitano la sopravvivenza e la proliferazione cellulare, mentre gli anticorpi potrebbero legarsi alle cellule in coltura portando a risposte immunitarie xenogeniche. Pertanto, in ambito di laboratorio è preferibile avere disponibilità di sieri privi di anticorpi. Il siero fetale contiene, inoltre, livelli inferiori di proteine del complemento (proteine che supportano l'organismo nelle risposte infiammatorie e immunitarie) rispetto a quelli degli adulti, che presentano effetti indesiderati quali la lisi delle cellule in coltura e dell'interferenza con i test immunologici.

L'FBS contiene, come più volte ribadito in questo capitolo, una moltitudine di componenti atte a favorire la sopravvivenza e la proliferazione delle cellule.

In particolare, le proteine del siero presentano e svolgono tutta una serie di funzioni diverse: il trasporto di lipidi, ormoni, vitamine e minerali nel sistema circolatorio, la regolazione dell'attività cellulare e il funzionamento del sistema immunitario. Altre proteine del siero agiscono come: enzimi, componenti del complemento, inibitori della proteasi e precursori della chinina.

Le proteine nel siero possiedono una concentrazione molta elevata e mostrano una distribuzione non omogenea in termini di composizione, infatti solo 22 proteine, in media, rappresentano il 99% di tutte le proteine del siero; tra queste le più ricorrenti sono l'albumina sierica, immunoglobuline e fibrinogeno. Il restante 1% delle proteine del siero

è composto da proteine secrete da cellule vive, apoptotiche e necrotiche e da proteine circolatorie a bassa abbondanza.

Nella seguente Tabella 1.1 vengono elencati i principali costituenti del siero con i loro rispettivi valor medi e range fisiologici.[8]

Component	Average	Range
Endotxins (ng/ml)	0.35	0.01 - 10.0
Glucose (mg/ml)	1.25	0.85 - 1.81
Protein (mg/ml)	38	32 - 70
Albumin (mg/ml)	23	20 - 36
Hemoglobine (µg/ml)	113	24 - 181
Bilirubin, total (µg/ml)	4	3 - 11
Bilirubin, direct (µg/ml)	2	0 - 5
Urea (µg/ml)	160	140 - 200
Urate (µg/ml)	29	13 - 41
Creatinin (µg/ml)	31	16 - 43
Insulin (µU/ml)	10	6 - 14
Cortisol (ng/ml)	0.5	0.1 - 23
Growth hormone (ng/ml)	39.0	18.7 - 51.6
Parathormone, PTH (ng/ml)	1.72	0.085 - 6.18
Triiodothyronine, T3 (ng/ml)	1.2	0.56 - 2.23
Thyroxine, T4 (ng/ml)	0.12	0.08 - 0.16
Thyroid-stimulating hormone, TSH (ng/ml)	1.22	0.2 - 4.5
Follicle-stimulating hormone, FSH (pg/ml)	95	20 - 338
Testosterone (pg/ml)	400	210 - 990
Progesterone, P4 (pg/ml)	80	3 - 360
Prolactin = Luteotropic hormone, LTH (pg/ml)	176	20 - 500
Luteinizing hormone, LH ?? (pg/ml)	8	1,2 - 18
Prostaglandin E (ng/ml)	5.9	0.5 - 30.5
Prostaglandin F (ng/ml)	12.3	3.8 - 42.0
Vitamine A (ng/ml)	90	10 - 350
Vitamine E (ng/ml)	1.1	1 - 4.2
Cholesterol (µg/ml)	310	120 - 630
Lactate-dehydrogenase, LDH (mU/ml)	864	260 - 1,215
Alkaline Phosphatase (mU/ml)	255	110 - 352
Aspartate-Aminotransferase, ASAT (mU/ml)	130	20 - 200
Sodium, Na ⁺ (µeq/ml)	137	125 - 143
Potassium, K ⁺ (µeq/ml)	11.2	10.0 - 14.0
Calcium, Ca ²⁺ (µeq/ml)	6.75	6.30 - 7.15
Chloride, Cl ⁻ (µeq/ml)	103	98 - 108
Phosphate, P _i (µg/ml)	98	43 - 114
Selen (µg/ml)	0.026	0.014 - 0.038
pH	7.40	7.20 - 7.60

Tabella 1.1: composizione del siero fetale bovino

La ricca varietà di proteine presenti nel siero, come già anticipato, è in grado di garantire e favorire la sopravvivenza di molte tipologie di linee cellulari. La scelta di utilizzare un supplemento di siero per applicazioni in biologia e biochimica, nell'ambito delle colture cellulari in vitro, dipende essenzialmente da tre fattori principali: definizione chimica del mezzo basale, tipo di cellula da coltivare e sistema di coltura impiegato. [1], [5], [6]

1.3 Applicazioni del siero

Le applicazioni del siero, nell'ambito della ricerca, si basano sulla capacità di questo di fornire un'ambiente ideale per la proliferazione cellulare. Inoltre, in ambito medico, la capacità del siero di fornire un ambiente simil-fisiologico permette di studiare tutti quei fenomeni che accadono all'interno del corpo, come a seguito dell'impianto di un materiale.

Generalmente vengono svolti test di adsorbimento proteico, usando il siero, allo scopo di analizzare: la quantità, le proporzioni e la distribuzione delle proteine adsorbite. Il processo di adsorbimento verrà trattato nel dettaglio nel capitolo 2, di seguito viene discusso in maniera sintetica il processo.

Il processo di adsorbimento delle proteine è un fenomeno complesso che dipende dalle caratteristiche della superficie (bagnabilità, topografia, carica e chimica superficiale), delle proteine (struttura, carica, dimensioni, idrofilia) e dell'ambiente (pH, temperatura, composizione). Inoltre, l'adsorbimento può essere promosso da differenti forze motrici, quali entropia, interazioni idrofobiche, elettrostatiche e di Van der Waals[9].

In particolare, quando si ha a che fare con miscele proteiche multicomponenti, come l'FBS, il processo di adsorbimento si complica ulteriormente, in quanto il siero è composto da proteine con caratteristiche chimo-fisiche differenti e le loro interazioni determinano l'adsorbimento proteico.

Generalmente, le molecole con dimensioni minori e ad alta concentrazione, tendono ad interagire più velocemente con il substrato, mentre le molecole con dimensioni maggiori e a bassa concentrazione presentano una velocità di diffusione minore, ma una affinità maggiore con la superficie del substrato. Per questo motivo, le molecole con dimensioni maggiori sostituiscono le molecole più piccole, per effetto Vroman [10].

Lo studio delle proteine adsorbite all'interfaccia tra la superficie del substrato e il siero, è di significativa importanza per la comprensione della loro funzione fisiologica, dell'affinità

con la superficie delle diverse componenti proteiche e del loro impatto con l'ambiente cellulare.

L'FBS, come già detto, è l'integratore universale nelle colture cellulari e le proteine al suo interno sono coinvolte nei fenomeni di adesione, proliferazione e differenziazione cellulare. In particolare, la maggior parte di queste proteine presenta un'attività biologica collegata all'omeostasi ossea, motivo del quale la ricerca si è spinta a studiare l'interazione degli osteoblasti con le superficie del substrato.

Uno dei materiali maggiormente utilizzati in ambito biomedico ed in particolare in ambito ortopedico e dentale, è il titanio. Per tale motivo è di fondamentale importanza un ottima interazione con gli osteoblasti per garantire il successo dell'impianto[11]. L'interazione tra la superficie dell'impianto e gli osteoblasti, viene mediata dalle proteine adsorbite che avviano una cascata di eventi: attaccamento, adesione, diffusione, migrazione, proliferazione e differenziazione cellulare.

Dallo studio dell'interazione tra gli osteoblasti e il siero, è stato possibile dedurre che l'adesione iniziale e la diffusione degli osteoblasti dipende principalmente dall'adsorbimento sulla superficie del substrato della vitronectina e dalla fibronectina[12], [13]. Mentre la proliferazione e la differenziazione degli osteoblasti dipendono dalla topografia e dalla chimica superficiale[14], [15].

Pertanto, l'adsorbimento di proteine da siero sulle superfici del materiale è di fondamentale importanza per l'adesione e l'attaccamento cellulare e quindi la buona riuscita dell'impianto.

1.4 Problematiche del siero

L'FBS non possiede una composizione uniforme, ma presenta una varietà composizionale intrinseca, dovuta al metodo di produzione. Durane la produzione l'FBS viene prelevato da una moltitudine di capi di bestiame che presenteranno una differente composizione, dovute a fattori ambientali e di alimentazione, pertanto la composizione risultate può variare molto da un lotto ad un altro. Dunque, il fatto che l'FBS non presenti una chiara e univoca composizione che può provocare differenze fenotipiche nelle colture cellulari, rappresenta la principale problematica del suo utilizzo come mezzo di coltura [6], [7]. Oltre a ciò, l'FBS presenta altre problematiche, legate alla biosicurezza e all'etica. Il siero può essere soggetto a contaminazioni biologiche (batteriche, virus ecc), motivo per il quale, il suo utilizzo è

sconsigliato per la produzione di medicinali biologici[16], [17]. Da un punto di vista etico, invece, la raccolta del siero provoca sofferenze all'animale[17].

Inoltre, bisogna ricordare che il siero è un materiale xenogenico, pertanto presenta delle differenze con l'ambiente biologico umano che possono portare a delle incompatibilità e interazioni non desiderate con il materiale biologico con cui interagisce, tra cui una risposta immunitaria xenogenica[18], [19].

Per questi motivi, prima della messa in commercio, il siero deve essere soggetto a stringenti controlli di qualità, al termine dei quali verrà rilasciato un certificato di analisi[5] con informazioni riguardanti:

- origine e lavorazione;
- composizione (peso specifico, proteine totali, γ-globulina, emoglobina, deidrogenasi lattica, lipidi totali, lipidi neutri, fosfolipidi, colesterolo, acidi grassi liberi);
- presenza di contaminanti (virus bovini, microplasma, batteri e funghi);
- capacità di supporto alla crescita cellulare (vengono utilizzate cellule polmonari fetali umane e attraverso la conta cellulare dopo 30 e 72 ore, di impianti cellulari da 10.000 a 20.000 cellule per cm²).

I controlli di qualità del siero, non presentano uno standard internazionale su cui basarsi, ma vengono effettuati in maniera differente da paese a paese, ciò comporta che la qualità del siero può variare anche di molto tra uno stato e un altro.

Per tali motivi negli ultimi anni si sono concentrati gli sforzi sullo sviluppo e sulla ricerca di alternative al siero, così da stilare un protocollo di coltura cellulare più ripetibile e univoco, come auspicabile dalle norme generali di buone prassi di laboratorio. In tal senso, sono stati proposti differenti sostituti all'FBS, tra cui vari derivati del plasma umano e mezzi di coltura privi di siero [6].

I mezzi di coltura privi di siero, permetterebbero di ridurre la dipendenza dal siero animale, evitando inutili sofferenze a questi e generando mezzi di coltura dalla composizione definita e stabile. Tuttora, tali mezzi non costituiscono un supporto adeguato alla proliferazione delle cellule, senza l'aggiunta di fattori di crescita esogeni.

I mezzi di coltura derivati dal plasma umano, permettono di risolvere le problematiche della natura xenogenica e quindi si evitano risposte immunitarie derivate dall'uso di proteine e di fattori di crescita di origine animale. In particolare, i supplementi sviluppati includono siero umano (HS) autologo o allogenico, lisati piastrinici umani e i loro fattori di rilascio[20].

L'utilizzo del HS, in particolare quello autologo, fornisce benefici nella proliferazione e nel mantenimento delle culture cellulari. Tali risultati sono da attribuire alla natura del HS che evita risposte immunitarie xenogeniche e in particolare il siero autologo garantisce un ottimo grado di biocompatibilità in quanto derivato dal sangue del paziente sulle cui cellule si andrà ad effettuare la coltura [7], [20].

Il siero autologo può essere difficilmente reperibile o presentare una qualità alterata, soprattutto nei casi in cui deve essere raccolto da determinate popolazioni di pazienti, come bambini, adulti e adolescenti, anziani, persone anemiche e persone con processi infiammatori in corso [8]. In questi casi, il siero umano allogenico, proveniente da donatori di sangue AB sani, può essere un'alternativa più appropriata al siero autologo[21].

L'HS e l'FBS oltre a presentare una differente origine, bovina ed umana, presentano una differente concentrazione di proteine al loro interno. Generalmente, l'HS presenta: un maggior quantitativo di proteine totali, 6.6g% rispetto al 3-4.5g% dell'FBS, una concentrazione di albumina superiore, 4.1g% contro 1.7g% dell'FBS e una concentrazione di estradiolo superiore, 101.7pmol/l rispetto al 27.9pmol/l dell'FBS. La maggiore concentrazione di albumina ed estradiolo influenza la crescita e la differenziazione delle cellule. Queste differenze di proteine totali e di concentrazione non sono da prendere come dato preciso, in quanto queste informazioni vengono tipicamente date come range e i produttori non garantiscono l'esatta composizione dei sieri. Pertanto, le differenze tra i due sieri possono essere dovute alla variabilità dei lotti.

In conclusione, sebbene ci siano comprovati svantaggi nell'uso dell'FBS come mezzo di coltura e le alternative mostrino risultati favorevoli, l'FBS rimane il mezzo di coltura cellulare principale.

1.5 ALBUMINA

L'albumina è la più abbondante proteina ematica dei mammiferi. Le proteine che fanno parte di questa famiglia sono caratterizzate da un elevato peso molecolare, che oscilla tra i 60 ed i 70 kDa. Nell'uomo, in particolare, costituiscono fino al 60% di tutte le proteine plasmatiche[22].

In ambito di laboratorio, l'albumina, utilizzata come reagente nei vari processi biochimici, si presenta nella forma di sieroalbumina (SA) (proteina globulare), ovvero l'albumina presente nella frazione del sangue dei vertebrati detta siero.

In particolare, le sieroalbumine di maggior interesse nel lavoro di questa tesi sono l'albumina del siero umano (HSA) e l'albumina del siero bovino (BSA).



Immagine 1.1: A) struttura del HSA; B) struttura del BSA[23]

FUNZIONI

Una delle principali funzioni dell'albumina all'interno del siero è quella di regolare la pressione osmotica, indispensabile per la distribuzione dei liquidi corporei nei vasi e nei tessuti. Essa è inoltre in grado di svolgere la funzione di "carrier", ossia di agire come veicolo di trasporto di ormoni, acidi grassi e di molti farmaci. Infine essa può anche agire come sistema tampone per la regolazione del pH sanguigno ed è in grado di legarsi con gli ioni Ca^{2+.}

BSA

L'albumina del siero bovino è costituita da 583 amminoacidi con un peso molecolare di 66kDa. La BSA è una la proteina maggiormente contenuta all'interno del siero bovino con una concentrazione tra i 20 e i 36mg/ml[24].

La BSA presenta una forma ellissoidale costituita da 9 ripiegamenti creati da 17 legami disolfuro ed è organizzata in tre domini globulari (I, II e III) simili tra di loro, ciascuno dei quali contenente due sotto domini (A e B). Ciò conferisce alla proteina una notevole stabilità nella circolazione del sangue. Dall'analisi della struttura cristallina della BSA è possibile individuare i due siti preferenziali di legame, detti sito I e II, presenti in cavità idrofobiche dei sottodomini IIA e IIIA. Il sito I presenta un'affinità di legame mediante

interazioni idrofobiche, mentre il sito II presenta un'affinità di legame mediante interazioni idrofobiche, legami idrogeno e interazioni elettrostatiche [25].



Immagine 1.2: struttura della BSA[25]

La BSA presenta un punto isoelettrico compreso tra 4.7 e 4.9, indicando come a pH fisiologico (7.4) presenti una carica negativa[26].

HSA

L'albumina del siero umano è costituita da 585 amminoacidi con un peso molecolare di 66kDa. La HSA è una la proteina maggiormente contenuta all'interno del siero umano (60/70 %) con una concentrazione tra 35 e 50 mg/ml. La HSA è composta da 17 ponti disolfuro, un triptofano (Trp 214) e un tiolo libero (Cys 34) ed è organizzata in tre domini (DI, DII e DIII), ciascuno dei quali contenente due sotto domini (A e B)[27].



Immagine 1.3: struttura della HSA[28]

La HSA presenta un punto isoelettrico di 4.7, indicando come a pH fisiologico (7.4) presenti una carica negativa.

In generale, la HSA e la BSA presentano un livello di omologia della sequenza amminoacidica paria al 76%, nonostante la tale differenza amminoacidica solo pochi di essi sono sufficientemente esposti sulla superficie della biomolecola per consentirne il riconoscimento e il legame specifico di altre molecole. Vista l'elevata somiglianza tra le due proteine è ampiamente accettata l'utilizzo della BSA nell'ambito della ricerca [29].



Immagine 1.4: a) struttura dell'albumina; b) omologia tra la sequenza di BSA e HSA [29]

1.6 FIBRONECTINA

La fibronectina (FN) è una delle principali proteine del sangue ed è in grado di legarsi alle integrine (proteine recettoriali di membrana delle cellule) e a differenti componenti della matrice cellulare (collagene, fibrina). La FN è in grado di mediare l'adesione, la migrazione, la crescita e la differenziazione cellulare, inoltre svolge un ruolo importante nella guarigione delle ferite, nei processi infiammatori e nello sviluppo embrionale [30].

La FN è una glicoproteina dimerica ad alto peso molecolare 440kDa, composto da 2265 residui ed è costituita da due subunità (circa 250 kDa) legate covalentemente da ponti

disolfuro. Le due subunità sono costituite dalla combinazione di tre moduli (12 F1, 2 F2 e 15 F3) [31].



Immagine 1.5: struttura di una subunità della FN[30]

La principale funzione del modulo F3 è la mediazione proteina-proteine, attraverso la sequenza RGD (Arg-Gly-Asp)(10 F3), che consente l'identificazione e il legame con le integrine.



Immagine 1.6: interazione tra la sequenza RGD e le integrine[32]

La FN presenta un punto isoelettrico di circa 5, indicando come a pH fisiologico (7.4) presenti una carica negativa.

La fibronectina bovina (BFN) e la fibronectina umana (HFN) presentano un'omologia del 93%, differendo per 146 residui[33]. HFN presenta una concentrazione di 0,3 mg/ml nel siero umano, mentre il BFN presenta una concentrazione nel siero di 0,2mg/ml[34].

Capitolo 2

2 ADSORBIMENTO PROTEICO SUL TITANIO

Quando un biomateriale viene impiantato all'interno dell'organismo la zona di interfaccia che si viene a generare tra il corpo e il biomateriale ha un impatto significativo sulla risposta del corpo al materiale estraneo; in particolare, ciò che caratterizza principalmente questa interfaccia sono le proteine provenienti dal sangue e da altri fluidi biologici che si adsorbono rapidamente dopo l'inserimento dell'impianto. Nel seguente capitolo verrà affrontato e descritto il fenomeno dell'adsorbimento proteico su superfici solide, l'attenzione verrà focalizzata sulle superfici realizzate in titanio o in leghe di titanio, come i campioni usati nel corso del presente lavoro di tesi (Ti-6Al-4V) e sull'utilizzo di soluzioni proteiche complesse come il siero fetale bovino (FBS), che è stato ampiamente trattato nel capitolo 1.

2.1 Adsorbimento su superfici solide

Il termine " adsorbimento proteico " si riferisce al processo mediante il quale delle proteine in soluzione, una volta entrate in contatto con la superficie di substrati solidi, tendono aderire in maniera più o meno stabile a seconda delle caratteristiche della proteina o delle proteine presenti, della soluzione e del substrato. L'adsorbimento è quindi un fenomeno superficiale, in contrasto con l'assorbimento, dove la diffusione considera anche gli strati interni del substrato[9]. Il processo inizia non appena avviene il contatto tra le soluzioni proteiche e la superficie del substrato (es. quando un impianto viene inserito all'interno di un organismo, questo entra immediatamente in contatto con il sangue e i fluidi biologici dell'organismo in questione) e possiede una natura dinamica, poiché la quantità di proteine può variare nel tempo sia a causa di cambiamenti strutturali che si verificano nell'interazione di quest'ultime con il substrato sia a causa di fenomeni che portano alla graduale sostituzione di proteine pre-assorbite con proteine successive che possono presentare una maggiore affinità con la superficie del substrato, fenomeno tipico nelle soluzioni multicomponenti.

Questo fenomeno è stato ampiamente studiato e caratterizzato per molti anni, con l'obiettivo di identificare i meccanismi che lo controllano. La comprensione di questo fenomeno è di fondamentale importanza per comprendere una moltitudine di aspetti come la risposta di un organismo a un corpo estraneo, l'efficacia di test diagnostici basati su specifici legami tra molecole e recettori, l'integrazione di un impianto[2].

2.2 Parametri che influenzano l'adsorbimento proteico

I parametri che influenzano e regolano l'adsorbimento proteico su superfici solide sono molteplici e dipendono dalle caratteristiche della superficie (bagnabilità, topografia, carica e chimica superficiale), delle proteine (struttura, carica, dimensioni, idrofilia) e dell'ambiente (pH, temperatura, composizione). Inoltre, l'adsorbimento può essere promosso da differenti forze motrici, quali entropia, interazioni idrofobiche, elettrostatiche e di Van der Waals (Immagine 2.1).



Immagine 2.1: Fattori che influenzano l'adsorbimento proteico [35]

2.2.1 Forze motrici dell'adsorbimento proteico

L'adsorbimento proteico è un processo esotermico (avviene un rilascio spontaneo di calore). Si consideri la Formula 1:

$$\Delta G = \Delta H - T \Delta S \tag{1}$$

Dove ΔG è la variazione di energia libera di Gibbs, ΔH descrive la variazione di entalpia (generazione o rottura di legami), T è la temperatura, ΔS è la variazione di entropia. Nella maggior parte dei casi una delle forze motrici che guida il seguente processo è la variazione di entropia, dovuto ad un riarrangiamento strutturale delle proteine che entrano in contatto con un substrato[36], [37].

Il cambiamento della conformazione strutturale delle proteine durante il processo di adsorbimento è da attribuire alla rottura dell'equilibrio delle interazioni idrofobiche intraproteine e proteina-solvente. Le interazioni idrofobiche sono fondamentali per il mantenimento della struttura terziaria delle proteine e quindi della loro conformazione tridimensionale. Le proteine, se immerse in una soluzione polare, subiscono un riarrangiamento, dove i residui amminoacidici polari vengono esposti all'esterno delle proteine mentre i residui apolari interagiscono tra loro all'interno delle proteine in modo da limitare le interazioni con il solvente[9], [38].

Quando una proteina si adsorbe ad una superficie idrofobica libera molecola d'acqua ed espone sulla superficie i suoi residui idrofobici, portando ad un riarrangiamento strutturale della proteina e ad un aumento dell'entropia. Diversamente, in caso di interazione su substrati idrofili e carichi, le interazioni che guidano l'adsorbimento proteico sono le interazioni elettrostatiche e di Van der Waals, poiché le proteine possiedono, al loro interno diversi domini con cariche differenti e nel loro insieme forniscono, una carica complessiva che quindi interagirà fortemente con superfici di carica opposta.

2.2.2 Influenza delle proprietà della superficie del substrato

Le proprietà della superficie di un materiale influenzano i meccanismi di adsorbimento delle proteine sul substrato, in quanto la superficie funge da interfaccia tra il materiale e l'ambiente biologico.

Quando un materiale entra in contatto con l'ambiente biologico, viene immediatamente ricoperto da uno strato di molecole d'acqua e solo successivamente entra in contatto con le proteine. A seconda della bagnabilità del materiale il processo di adsorbimento proteico può variare sensibilmente. Nel caso di materiale idrofobico, le molecole d'acqua, presenti nel "guscio" adsorbito sulla superficie del materiale, interagiscano principalmente tra di loro e poco con la superficie idrofobica. Questo guscio presenta una struttura ordinata con un basso livello di entropia, pertanto quando delle proteine si avvicinano al guscio, i residui idrofobici delle proteine spostano le molecole d'acqua, rompendo il guscio e causando un aumento dell'entropia, rendendo quindi il fenomeno energeticamente favorevole. Diversamente, le molecole d'acqua possono formare dei legami idrogeno con le superfici idrofile. Pertanto si viene a generare una competizione tra le molecole d'acqua e le proteine che si traduce in una diminuzione dell'adsorbimento delle proteine. Quindi in generale le superfici idrofobiche tendono ad adsorbire un maggior quantitativo di proteine rispetto a quelle idrofiliche [37], [39], [40]. Questa regola generale viene però ampiamente disattesa quando le proteine possono stabilire una forte interazione chimica con superfici idrofiliche e modificare la propria struttura terziaria esponendo verso la superficie i domini polari.

Inoltre le superfici possono presentare una carica superficiale. Generalmente, i materiali idrofobi-sono apolari e non presentano una carica superficiale netta, mentre quelli idrofili sono polari e presentano una distribuzione di carica. Dunque, si possono generare tra proteine e superfici, delle interazioni elettrostatiche attrattive o repulsive che promuovono o ostacolano l'adsorbimento proteico. In particolare, le proteine, oltre a possedere una carica complessiva, presentano una serie di residui con differenti cariche. Pertanto, una proteina che presenta una determinata carica complessiva, può adsorbire su superfici che presentano la stessa carica, sfruttando i domini di carica opposta[37].

Le caratteristiche topografiche possono influenzare fortemente l'adsorbimento proteico. Superfici con una maggiore rugosità forniscono un'area maggiore per l'adsorbimento proteico, che quindi può portare ad un aumento dell'adsorbimento delle proteine rispetto a superfici meno rugose. Inoltre, la presenza sulla superficie di pori e valli, di dimensioni confrontabili con quelle delle proteine, favoriscono l'infiltrazione delle proteine e promuovono la formazione di aggregati proteici[41], [42].

Infine, l'adsorbimento delle proteine può essere influenzato dalle proprietà chimiche della superficie di un materiale. Ad esempio mediante funzionalizzazioni della superficie con gruppi funzionali, proteine, polimeri [9][43].

2.2.3 Influenza delle proprietà delle proteine

Quando le proteine vengono adsorbite sulla superficie di un materiale esse subiscono un processo di denaturazione, che comporta un loro cambiamento strutturale, dovute alle caratteristiche delle proteine stesse e del substrato. Questo processo è guidato da un aumento di entropia che porta ad una massimizzazione dell'area di contatto nel tempo tra proteine e superficie. Pertanto, l'affinità con la superficie varia durante il processo di adsorbimento, portando a layer proteici sempre più legati con la superficie. Le proteine non sono tutte uguali e vengono classificate a seconda della loro stabilità strutturale in proteine morbide, ovvero proteine meno stabili e più inclini al cambiamento conformazionale e in proteine dure, ovvero proteine più stabili e meno soggette a denaturazione[44]. Generalmente, le proteine morbide vengono adsorbite in quantità maggiori rispetto a quelle dure. (Immagine 2.2) in quanto il loro adsorbimento comporta un guadagno in termini entropici.



Immagine 2.2: Stabilità strutturale delle proteine morbide e dure[44]

Le proteine, come già ribadito, presentano una carica elettrica complessiva, data dai contributi dei residui amminoacidici carichi all'interno della struttura proteica, che può guidare l'adsorbimento proteico mediante le interazioni elettrostatiche con una superficie carica. La carica netta complessiva delle proteine è influenzata dal pH dell'ambiente in cui si trova. Quando il pH è uguale al punto isoelettrico di una proteina il numero di cariche positive e negative sono bilanciate risultando in una molecola neutra, per valori di pH inferiori al punto isoelettrico la carica netta è positiva mentre per valori di pH maggiori del punto isoelettrico la carica netta negativa. Le cariche proteiche inoltre determinano anche la natura delle interazioni proteina-proteina, poiché in condizione del punto isoelettrico l'interazione elettrostatica intramolecolare è attraente e provoca il restringimento della molecola, mentre in condizione di proteine con carica netta, la repulsione elettrostatica intra e intermolecolare si traduce in molecole più espanse. Quindi, in caso di adsorbimento da una soluzione che abbia il pH del punto isoelettrico delle proteine, le proteine tendono a compattarsi in uno strato denso, a cause delle interazioni intramolecolari attraenti, mentre a partire da una soluzione i cui le proteine hanno una carica netta, le proteine tendono ad essere più espanse, a cause delle interazioni intramolecolari repulsive. Pertanto, in condizione di punto isoelettrico, si nota un aumento della quantità di proteine adsorbite[9], [44].



Immagine 2.3: Proteine adsorbite. (a) Condizione del punto isoelettrico, le proteine presentano una struttura compatta. (b) Valori di pH lontani dal punto isoelettrico, le proteine presentano una struttura più espansa.[44]

Infine, la dimensione e il peso molecolare delle proteine giocano un ruolo fondamentale nell'adsorbimento proteico. Queste caratteristiche permettono di determinare il coefficiente di diffusione, che definisce il tempo necessario alle proteine per raggiunge la superficie[41]. Durante l'adsorbimento le proteine devono spostare le molecole d'acqua presenti nell'intorno della superficie del materiale. Pertanto, le proteine più grandi incontrano un maggiore ostacolo che rallenta la velocità con cui si muovono nel mezzo rispetto a quelle più piccole. Le proteine più piccole raggiungono più velocemente la superficie, adsorbendosi in una quantità inizialmente maggiore. Successivamente arrivano le proteine più grandi, le quali però interagiscono maggiormente con le superfici; quindi,

possono spostare e sostituire le proteine più piccole. Questo comportamento dinamico è conosciuto come effetto Vroman [9], [10].

2.2.4 Influenza dei parametri esterni

Generalmente il processo di adsorbimento proteico è favorito da un aumento della temperatura; in quanto consente un maggior grado di mobilità delle proteine, nella soluzione, verso la superficie del materiale. Questo processo, comunque, influenza in maniera differente a seconda del caso in esame[45], [46].

Il pH, come discusso precedentemente, consente di influenzare sia la carica netta complessiva della proteina sia le interazioni elettrostatiche intra-proteine, permettendo di agevolare l'adesione proteina-superficie, di regolare l'impacchettamento proteico e quindi il quantitativo di proteine adese alla superficie[9].

Nell'ambiente biologico in cui avviene l'interazione con il materiale, oltre alla presenza delle molecole d'acqua e delle proteine, sono presenti tipicamente degli ioni differenti che possono influenzare l'adsorbimento proteico. Questi ioni possono entrare in competizione con le proteine nell'adsorbimento sulle superfici per interazione elettrostatica. Inoltre, la forza ionica, espressa come la concentrazione di ioni disciolti nella soluzione, influenza la distanza alla quale avvengono le interazioni elettrostatiche. Pertanto in condizione di elevata forza ionica, l'adesione proteica in presenza di proteine e superfici con cariche opposte è limitata, mentre l'adsorbimento in presenza di proteine e superfici con cariche simili presenta un effetto repulsivo minore[47].

Infine, l'aumento della concentrazione iniziale di proteine in soluzione si traduce in una maggiore quantità di proteine adsorbite. La concentrazione proteica influisce sulla forza di adesione delle proteine sulla superficie del substrato. Se la concentrazione non è elevata, le proteine possono subire una serie di riarrangiamenti, atti a rafforzare il legame proteina superficie, se invece la concentrazione è elevata, le interazioni tra le proteine ostacolano i cambiamenti conformazionali e di orientamento delle proteine che permettono di rafforzare il legame proteina superficie[9].

Infine nella seguente Tabella 2.1[48], vengono elencati e raggruppati i principali parametri che influenzano l'adsorbimento proteico sulle superfici.

	Parameters	General Rules of Thumb
	Topography/roughness	$Higher \ surface \ roughness \geq higher \ amount \ of \ adsorbed \ proteins$
Surface	Hydrophobicity (non-polar surfaces) Hydrophilicity (polar surfaces, with a net surface charge)-	Higher hydrophobicity ≥ higher amount of adsorbed proteins and denaturation degree; hydrophobic interaction as adsorption mechanism Different mechanisms of adsorption on hydrophilic surfaces: electrostatic, van der Waals, dipole-dipole; adsorbed water must be removed for adsorption
	Chemistry (functional groups, metal ions)	Influence on the surface charge
	Amino acid chain	Affects structural stability
	Hydrophilicity/hydrophobicity	Surface charges and non-polar residues are always present; they can be differently arranged according to the environment; hydrophobic residues interact with hydrophobic surfaces
	Charge	Higher amount of adsorbed proteins at IEP
Protein	Molecular weight	Small proteins adsorb quicker Large proteins replace the smaller ones and make stronger bonds with the hydrophobic surfaces
	Structural stability	Soft proteins change easier configuration and adsorb larger on hydrophilic surfaces; denaturation can enhance or reduce biological activity
	pH	Affects surface charge of both proteins and surfaces
	Ionic strength	Adsorbed ions reduce repulsive effects among proteins; some ions compete with proteins for adsorption
Solution	Protein concentration	Higher protein concentration higher amount of adsorption
	Protein mixture(single, binary or more complex)	Vroman effect
	Temperature	Higher temperature \geq faster kinetics of adsorption

Tabella 2.1: Principali parametri che influenzano l'adsorbimento proteico sulle superfici[48]

2.3 Adsorbimento delle proteine sul titanio e le sue leghe

Il titanio e le sue leghe, in particolare la lega Ti-6Al-4V, sono fra i biomateriali più utilizzati negli impianti in abito ortopedico e dentale. Questo è dovuto alla capacità di osteointegrazione, biocompatibilità con i tessuti e proprietà meccaniche adatte del titanio. Un'altra caratteristica che lo rende un biomateriale così performante in questa tipologia di impianti è la sua capacità di passivarsi a contatto con l'ossigeno, portando alla formazione, sulla sua superficie, di uno strato di ossido (TiO₂) amorfo dello spessore di circa 3-7nm, conferendole un'elevata resistenza alla corrosione e una inerzia biologica[49].

2.3.1 Considerazioni generali

Come già detto nel presente capitolo, l'interfaccia tra la superficie del biomateriale e l'ambiente biologico è di fondamentale importanza per la risposta cellulare e l'osteointegrazione del dispositivo implantare; motivo del quale bisogna studiare come le superfici in titanio interagiscono con l'ambiente biologico. Il titanio non interagisce direttamente con l'ambiente biologico ma sfrutta il suo strato di passivazione anfotero e quindi in grado di comportarsi sia da acido che da base a secondo della sostanza con cui reagisce. L'ossido di passivazione, una volta entrato a contatto con l'ambiente biologico, interagisce con le molecole d'acqua, portando alla formazione di differenti gruppi ossidrili (OH), a seconda del comportamento acido o basico, generando così una carica superficiale negativa a pH fisiologico con un punto isoelettrico intorno a 5[50].

Deprotonazione OH acida: Ti-OH + $H_2O \leftrightarrow [Ti-O]^- + H_3O^+$

Protonazione OH basica: Ti-OH + $H_2O \iff [Ti-OH_2]^+ + OH^-$



Immagine 2.4: Idrossilazione della superficie del titanio e generazione della carica superficiale a seguito del contatto con l'acqua[48]

La presenza di questi gruppi idrossilici guida l'adsorbimento proteico e sono stati proposti differenti meccanismi di interazione. Imamura e collaboratori studiarono l'adsorbimento proteico di differenti proteine su substrati in titanio a differenti valori di pH e a temperatura fissa, deducendo un adsorbimento pseudo-irreversibile delle proteine dovuto alle interazioni elettrostatiche tra il gruppo COO⁻ e i gruppi OH_2^+ (basici) sulla superficie del titanio. Inoltre, è stata riscontrata la capacità dei gruppi COO^- di indurre la protonazione

dei gruppi OH della superficie nell'intorno del punto isoelettrico del titanio[51]. Invece, Camàra e collaboratori hanno proposto un meccanismo di interazione leggermente differente con gli OH basici, dove le proteine (albumina sierica umana) influenzano in loco il valore del pH e l'adsorbimento segue due fasi: un primo legame con l'idrogeno e un successivo trasferimento protonico (Immagine 2.5)[52].



Immagine 2.5: Meccanismo di interazione proposto da Camàra[48]

I gruppi OH acidi sulla superficie del titanio generano una carica debolmente negativa a pH fisiologico che influenza le interazioni elettrostatiche con le proteine, che possono essere attrattive o repulsive che promuovono o ostacolano l'adsorbimento proteico. Anche delle proteine cariche negativamente (albumina e fibronectina a pH fisiologico) si legano alla superficie del titanio sfruttando domini di carica opposta o la presenza di cationi che fungono da ponti salini. Ad esempio, la presenza di cationi bivalenti, come il calcio e il magnesio, influenzano l'adsorbimento dell'albumina, carica negativamente a pH fisiologico, con l'ossido del titanio, fungendo da ponti[53].

La bagnabilità delle superfici influenza fortemente l'adsorbimento delle proteine ed è altamente correlata con le interazioni elettrostatiche. Generalmente le proteine preferiscono adsorbire su superfici idrofobiche (apolari), in quanto presentano delle interazioni minori con le molecole d'acqua e quindi vengono spostate facilmente permettendo l'interazione con le proteine, mentre le superfici idrofiliche (polari) presentano una maggiore interazione con le molecole d'acqua che ostacolano le interazioni con le proteine. Le superfici in titanio sono costituite da domini idrofobici e idrofilici, con un rapporto medio polare/ apolare di $0.21\pm0.07[54]$. Pertanto, in presenza di superfici idrofobiche con una bassa carica superficiale vi sarà un maggior adsorbimento proteico. D'altra parte, le superfici idrofile presentano una maggiore densità di gruppi OH, sia acidi che basici, portano ad una forte interazione con i gruppi NH₃⁺ e COO⁻ delle proteine, rendendo l'adsorbimento su superfici bagnabili favorevole andando contro la regola generale[55].

La rugosità dei substrati in titanio è un altro parametro di interesse in grado di influenzare l'adsorbimento proteico, il comportamento cellulare e la bagnabilità del materiale. In particolare, a livello nanometrico la rugosità ha pochi effetti sulla quantità e qualità delle proteine assorbite. A livello micrometrico la rugosità migliora l'adsorbimento proteico, in quanto presenta una superficie più ampia e di conseguenza una maggiore energia libera superficiale[56]. La rugosità è anche in grado di influenzare i meccanismi di adsorbimento, passando dalla formazione di monostrati proteici alla formazione di multistrati proteici. Oltre alla presenza di picchi e valli, la presenza di pori sulla superficie influenza l'adsorbimento proteico. I pori, con una dimensione maggiore del raggio idrodinamico delle proteine, possono risultare punti di adsorbimento proteico[57]. Infine, la rugosità modifica la bagnabilità delle superfici, infatti le superfici rugose presentano un angolo di contatto minore ed un'energia libera superficiale maggiore rispetto alle superfici lisce.

2.3.2 Modifiche superficiali sul titanio

Il titanio e le sue leghe sono tra i materiali più comunemente utilizzati per la sostituzione dei tessuti duri grazie alle loro buone proprietà meccaniche e chimiche; tuttavia sono considerati materiali bioinerti. Motivo per il quale, diverse tecniche sono state utilizzate per modificarne le superfici mediante funzionalizzazioni o coating al fine migliorarne la biocompatibilità. I parametri principalmente modificati mediante funzionalizzazione superficiale riguardano la rugosità, la bagnabilità e la chimica superficiale.

Modifiche superficiali al fine di aumentare la rugosità superficiale dei campioni come sabbiatura e attacco chimico si sono dimostrate efficaci nell'aumentare la biocompatibilità delle superfici migliorando l'adesione delle cellule osteoblastiche[58]. La SLA (Sand Blasting and Acid Etching) è una delle tecniche più utilizzate in implantologia in grado di influenzare la rugosità e la bagnabilità dei materiali, parametri significativi nell'adsorbimento delle proteine. Diversi studi concordano che le superfici SLA-modificate permettono di migliorare la biocompatibilità del titanio, in quanto tale trattamento comporta un aumento della rugosità della superficie[59], [60]. Le superfici trattate diventano più idrofiliche favorendo l'adsorbimento di determinate proteine, come la fibronectina. Non sono state comunque ritrovate differenze nell'adsorbimento da FBS su campioni in titanio SLA-modificato e lucidato.

L'attacco acido è un trattamento chimico in grado di modificare la superficie del titanio al fine di migliorarne la risposta biologica, influenzando l'adsorbimento proteico, in quanto sono in grado di generare sulla superficie del campione delle cavità di dimensioni nanometriche, aumentando la superficie disponibile, che possono fungere da siti di ancoraggio per le proteine poiché in grado di intrappolare proteine di piccola taglia al loro interno, es BSA[61], [62].

I trattamenti idrotermici sono delle tecniche che permettono di ottenere superfici più citocompatibili. Il perossido di idrogeno è uno dei reagenti più comuni nella modifica idrotermica del titanio ed è in grado di aumentare la rugosità superficiale, quindi l'energia libera superficiale aumenta, di generare dei gruppi OH sulle superfici che interagiscono con le proteine medianti ponti idrogeno, aumento così l'adsorbimento proteico[63], [64].

Vista l'utilità delle modifiche superficiali al fine di migliorare la biocompatibilità del titanio nel seguente lavoro di tesi, è stato adoperato un trattamento chimico sui campioni in lega di titanio Ti-6Al-4V sottoposti a lucidatura. Tale trattamento chimico è coperto da un brevetto (EP2214732, 2013[65]) e prevede dapprima un attacco acido in acido fluoridrico (HF) diluito, seguita da una fase di ossidazione con il perossido di idrogeno (H₂O₂) con lo scopo di creare gruppi ossidrile (OH) sulla superficie del campione; inoltre tale trattamento provoca un cambiamento della morfologia superficiale, rendendola nanostrutturata e nanoporosa. Tale superficie è in grado di migliorare la risposta biologica e di creare una superficie bioattiva. La presenza dei gruppi OH non solo influenza l'idrofilicità del substrato e la sua bioattività, ma permette di interagire con le proteine sfruttando i ponti idrogeno aumentando l'adsorbimento proteico[66].

2.3.3 Parametri esterni e la loro influenza

Come espresso nel paragrafo 2.2.4 la soluzione proteica con la quale entra in contatto la superficie del titanio è in grado di influenzare l'adsorbimento proteico a secondo del suo valore del pH, della temperatura e della concentrazione ionica.

Per pH intono a 4, al di sotto del punto isoelettrico del titanio (circa 5 in ambiente biologico), i gruppi acidi COO⁻delle proteine sono attratti dai gruppi Ti-OH₂⁺ della superficie del titanio; mentre per pH superiori al punto isoelettrico del titanio i gruppi sulla superficie del titanio si caricano negativamente (Ti-O⁻) e interagiscono con i gruppi

amminici $-NH_2^+/-NH=NH_2^+$ delle proteine. Infine, è stato riscontrato che lo strato proteico varia il suo spessore in base alla variazione di pH[67].

Nell'ambiente biologico in cui avviene l'interazione con il materiale, oltre alla presenza delle molecole d'acqua e delle proteine, sono presenti tipicamente degli ioni differenti che possono influenzare l'adsorbimento proteico. Questi ioni, possono o entrare in competizione con le proteine o incentivare l'adsorbimento sulle superfici per interazione elettrostatica. I cationi mono e bivalenti vengono attratti elettrostaticamente sulla superficie del titanio. Gli ioni monovalenti (es K⁺ e Na⁺) entrano in competizione con le proteine ed una volta adese sulla superficie non sono più in grado di interagire elettrostaticamente con le proteine [68]. Gli ioni bivalenti (es Ca²⁺ e Mg²⁺) coadiuvano l'adsorbimento proteico fungendo da ponti tra le proteine e la superficie del titanio sfruttando la loro doppia carica positiva[69]. È stato osservato come gli ioni bivalenti migliorino l'adsorbimento della fibronectina e dell'albumina su superfici in Ti-6Al-4V[70], [71].

In particolare, bisogna sottolineare come l'interazione tra il pH e gli ioni disciolti nella soluzione influenza le interazioni elettrostatiche tra le proteine e la superficie del titanio. È stato riscontrato come a pH fisiologico (circa 7) gli ioni bivalenti incrementano l'adsorbimento proteico, in quanto in tali condizioni sia il titanio che l'albumina possiedono una carica negativa. A pH 3, al di sotto del punto isoelettrico del titanio e delle proteine, gli ioni bivalenti non influiscono sul quantitativo di proteine adsorbite[72].

2.3.4 Adsorbimento competitivo

I fluidi biologici, specialmente il sangue, rappresentano interfaccia iniziale con cui i biomateriali (dispositivi) devono interagire e a seconda del comportamento possono determinare il successo o l'insuccesso dell'impianto; motivo per il quale nell'ambito della ricerca si sono svolti studi al fine di studiare l'interazione tra i biomateriali e le proteine. Generalmente, in ambito di laboratorio, si tendono ad utilizzare delle soluzioni monocomponenti, che possono essere utili alla comprensione preliminare di come tali proteine interagiscono con la superficie di differenti materiali. Tali soluzioni però non rappresentano un ambiente di simulazione adeguato all'ambiente biologico, costituito da un'elevata varietà e concentrazione di proteine. Per tali motivi, in ricerca si adottano una miscela di proteine binarie o un doppio adsorbimento, al fine di ampliare la conoscenza dell'adsorbimento delle proteine su biomateriali a base di titanio. Le proteine prevalentemente impiegate sono state l'albumina, fibronectina, fibrinogeno, collagene e lisina[73]. Come concetto generale, la prima proteina ad adsorbire sulla superficie può inibire l'adsorbimento sequenziale delle proteine successive, ma una maggiore affinità con la superficie può provocare lo spostamento e la sostituzione delle proteine,

È stato riscontrato che le superfici idrofile di titanio promuovono l'adsorbimento della fibronectina rispetto all'albumina in soluzioni binarie, anche in presenza di un rapporto biologico albumina:fibronectina di 100:1[74]. Altri studi hanno riscontrato come la presenza della fibronectina e del collagene ostacolino l'adsorbimento dell'albumina su superfici di Ti-6Al-4V per mezzo della loro elevata massa e lo spostamento e la sostituzione dell'albumina se adsorbite in secondariamente[75]. Differentemente su superfici in TiO₂ (pezzi massivi di ossido di titanio) l'adsorbimento dell'albumina è favorito rispetto a quello della fibronectina o del fibrinogeno. È stata osservata la capacità da parte dell'albumina di spostare la fibronectina e il fibrinogeno se adsorbite su uno strato di albumina, non la sposteranno ma genereranno uno strato aggiuntivo sul preesistente[76].

Le soluzioni binarie non permettono di rappresentare la complessità dei fluidi biologici, motivo per il quale si sono utilizzate soluzioni multicomponenti (es. siero fetale bovino) così da cercare di comprendere i meccanismi di adsorbimento delle proteine sulla superficie. La composizione dello strato proteico adsorbito sul titanio a contatto con il siero o il plasma (bovino o umano) non è del tutto chiara, a causa della moltitudine di variabili che possono influenzare il fenomeno e vista la sua importanza come interfaccia tra il biomateriale e le cellule, negli ultimi anni si sono intensificati gli sforzi per studiare questo fenomeno. In particolare, sono state impiegate differenti tecniche al fine di indentificare e quantificare le proteine adsorbite (spettroscopia di massa, proteomica quantitativa labelfree), anche se tuttora tale composizione non è stata del tutto identificata. È stato però mostrato come l'adsorbimento delle proteine cambi a secondo della rugosità della superfice. Sfruttando un'analisi mediante spettroscopia di massa, come proteine adsorbite sono state identificate fibronectina, albumina, fibrinogeno, IgG e complemento C3. Recentemente è stato dimostrato come la proteomica quantitativa label-free fornisce una visione più completa della composizione e della funzione delle proteine adsorbite, identificando 25 distinte proteine plasmatiche di cui fibronectina, albumina, fibrinogeno e apolipoproteina AI costituiscano il 75% della conta spettrale totale[77][78].

Il titanio ruvido in ambito ortopedico viene preferito al titanio liscio in quanto è stata trovata una correlazione positiva tra rugosità superficiale ed integrazione ossea. Questa correlazione dipende dalle differenti capacità del materiale di interfacciarsi con l'ambiente biologico, in quanto il titanio ruvido non solo è in grado di adsorbire più proteine rispetto al titanio liscio ma le proteine adese cambiano [79]. È stato dimostrato come nelle soluzioni multicomponenti, nonostante l'albumina risulti la proteina principale del siero che dovrebbe adsorbirsi in massa sul substrato del titanio ruvido, la proteina principalmente adsorbita è la fibronectina. L'albumina, viste le sue piccole dimensioni, arriva più velocemente sulla superficie; tuttavia, per effetto Vroman[10], viene sostituita dalla fibronectina che pur presentando maggiori dimensioni e risultando più lenta può formare un maggior numero di siti di legame. Questo fenomeno dipende dal fatto che la fibronectina predilige superfici più ruvide, perché l'aumento della rugosità superficiale comporta una maggiore idrofilicità del materiale (minore angolo di contatto), a differenza dell'albumina che predilige superfici più lisce. Inoltre, bisogna ricordare che l'albumina, la fibronectina e il titanio presentano una carica negativa, motivo per il quale entrambe le proteine subiscono una repulsione da parte della superficie ma sfruttando domini carichi positivamente riescono ad adsorbirsi con la superficie[60]. La fibronectina, essendo di dimensioni superiori rispetto all'albumina, riesce a fornire un maggior numero di domini con cui interagire con la superficie, come i domini aC. In conclusione, è stato dimostrato come la presenza nella fibronectina della sequenza arginina-glicina-acido aspartico (dominio RGD) influenzi positivamente l'adesione degli osteoblasti.

2.4 RIVESTIMENTO ANTIBATTERICO

Partendo dallo studio di base sull'adsorbimento proteico sopra descritto, è' possibile affrontare uno specifico medical need. L'adesione e la proliferazione batterica rimangono una delle principali conseguenze postoperatorie che portano al fallimento degli impianti e dei dispositivi biomedici. Il pre-adsorbimento di proteine può essere utilizzato per modificare la superficie degli impianti e impartire loro specifiche proprietà. Alcune proteine, come l'albumina, hanno una forte affinità chimica per ioni/elementi antibatterici come l'argento e possono essere utili per una funzionalizzazione che limiti la citotossicità dei medesimi.

Una delle conseguenze postoperatorie che portano al fallimento degli impianti e dei dispositivi biomedici sono le infezioni associate ai biomateriali (BAI), causate principalmente dall'adesione e dalla proliferazione batterica sulle superfici degli impianti[80].

La patogenesi delle infezioni comincia con l'adesione (mediata da proteine di superficie dei batteri, dal moto browniano e da forze di Van der Walls) e dalla proliferazione batterica in cui le colonie secernano in maniera continua una soluzione polisaccaride extracellulare; successivamente si viene a generare un biofilm batterico che protegge le colonie batteriche dalla risposta immunitaria dell'ospite. Motivo per il quale è spesso necessario un secondo intervento chirurgico atto a sostituire l'impianto[81].

Lo scenario appena descritto riguarda in generale la maggior parte dei biomateriali utilizzati, compresi il titanio e le sue leghe per cui si sono sviluppate delle tecniche fisicochimiche note come rivestimenti antimicrobici, con lo scopo di funzionalizzare i biomateriali aumentandone le capacità antibatteriche, sia da un punto di vista di adesione che di proliferazione, migliorando così la longevità degli impianti[82].

I rivestimenti antimicrobici sono classificati in: agenti inorganici (ioni Ag, Cu, ZnO, MoS2) e agenti organici (antibiotici, polimeri, peptidi-antimicrobici). Gli agenti inorganici sono impiegati sia sotto forma di ioni che sotto forma di nanoparticelle. Gli agenti inorganici sono generalmente: più stabili di quelli organici, non introducono sottoprodotti pericolosi e differentemente degli agenti organici non presentano la problematica dei batteri multifarmaco-resistenti (MDR)[83].

Tra gli agenti inorganici spicca l'argento (sia in forma ionica che nanoparticellare)[84]. Gli ioni argento sono in grado di legarsi ai batteri mediante le proteine enzimatiche e mediante i gruppi mercaptanici del DNA, portando rispettivamente all'arresto della replicazione del DNA e all'inattivazione degli enzimi respiratori dei batteri. Le nanoparticelle di Ag (AgNP) hanno mostrato proprietà chimico-fisiche più stabili e un effetto antimicrobico esteso rispetto agli ioni di Ag. D'altra parte le AgNP presentano una citotossicità maggiore rispetto agli ioni a causa nel loro rapido rilascio nell'ambiente biologico.

Il BSA come dimostrato da numerosi studi possiede delle capacità stabilizzanti, in particolare tende a formare un rivestimento che ingloba gli ioni argento generando delle nanoparticelle con dimensioni differenti a secondo della concentrazione della soluzione[85]. Esse genereranno un comportamento antimicrobico differente, dove più piccolo è il diametro delle nanoparticelle più è facile che entrino nella cellula batterica e pertanto maggiore sarà l'efficacia antibatterica.

In particolare è stato dimostrato come l'integrazione del BSA nelle AgNP diminuisca la citotossicità delle NP e contrasti le infezioni batteriche. Il BSA riveste le AgNP agendo come un setaccio, permettendo un rilascio controllato degli ioni e quindi diminuendone la tossicità[86].

Una nuova tecnologia volta a prevenire la colonizzazione batterica delle superfici degli impianti in titanio è stata attuata utilizzando le AgNP per funzionalizzare le superfici in lega di titanio Ti-6Al-4V rivestiti da cheratina. Da questa tecnologia è risultato come la funzionalizzazione delle superfici hanno mostrato un'elevata attività antimicrobica in grado non solo di mantenere la biocompatibilità del materiale ma anche di incrementare l'adesione e la proliferazione cellulare[87].
Capitolo 3

3 FUNZIONALIZZAZIONE DEL TITANO

Il titanio e le sue leghe sono tra i materiali più comunemente utilizzati per la sostituzione dei tessuti duri grazie alle loro buone proprietà meccaniche e chimiche; tuttavia sono considerati materiali bioinerti. Motivo per il quale, diverse tecniche sono state utilizzate per modificarne le superfici mediante funzionalizzazioni o coating al fine migliorarne la biocompatibilità. I parametri principalmente modificati mediante funzionalizzazione superficiale riguardano la rugosità, la bagnabilità e la chimica superficiale[49].

3.1 MODIFICHE SUPERFICIALI DEL TITANIO

In letteratura sono state proposte diverse modifiche della superficie al fine di promuovere l'osteointegrazione degli impianti in titanio. La strategia più semplice è quella di modificare la morfologia della superficie per migliorare l'adesione meccanica tra impianto e osso. In questo

campo si potrebbero elencare l'attacco chimico, la sabbiatura, la sinterizzazione di particelle di Ti e il micropatterning.

Dall'altra parte la deposizione di un rivestimento bioattivo (ad esempio idrossiapatite o vetro bioattivo) potrebbe essere impiegata per migliorare l'adesione tra impianto e osso. I rivestimenti sono molto efficaci in termini di miglioramento della bioattività, ma generano

un'interfaccia potenzialmente critica per la delaminazione, sia durante l'impianto che durante il carico fisiologico.

Inoltre, la cristallinità e la stechiometria dell'apatite depositata non possono essere rigorosamente controllate; può verificarsi il bioriassorbimento del rivestimento di apatite amorfa, favorendo la mobilizzazione dell'impianto[88], [89].

In letteratura sono stati proposti diversi trattamenti, al fine di indurre un comportamento bioattivo esclusivamente tramite modifiche superficiali che escludono rivestimenti con altri materiali.

Tra questi un processo innovativo al fine di rendere indurre un comportamento bioattivo sulla superficie del titanio è un trattamento termochimico brevettato dal gruppo di ricerca che ha supervisionato questo lavoro di tesi (EP2214732)[90], in grado di stimolare la rigenerazione dei tessuti sia da un punto di vista inorganico che organico. Il trattamento prevede dapprima un attacco acido in acido fluoridrico (HF) diluito, seguito da una fase di ossidazione con perossido di idrogeno con lo scopo di creare gruppi ossidrile (OH) sulla superficie del campione. Tale trattamento genera una superficie multifunzionale, con una complessa topografia superficiale caratterizzata da una micro e nano rugosità in grado di influenzare l'interazione osteoblastica e di inibire l'adesione batterica. Inoltre, le superfici presentano un'elevata presenza di gruppi OH fortemente acidi che non solo influenzano l'idrofilicità del substrato e permettono di interagire con l'ambiente biologico ma inducono la precipitazione dell'idrossiapatite[89].

Tramite questo protocollo si ottiene una superficie multifunzionale, che presenta un comportamento bioattivo della superficie sia da un punto di vista inorganico che biologico. Per bioattività inorganica si intende la capacità della superficie di indurre la precipitazione dell'idrossiapatite (parte minerale dell'osso) adsorbendo ioni Ca^{2+} e PO₄³⁻ da parte di fluidi biologici, mentre per bioattività biologica si intende la capacità della superficie di stimolare la risposta biologica (adesione, proliferazione e differenziazione cellulare).

3.2 LE FASI DEL PROCESSO TERMOCHIMICO

Il trattamento prevede dapprima un attacco acido in acido fluoridrico (HF) in grado di rimuovere l'ossido nativo presente sulla superficie del titanio o delle sue leghe mediante la reazione[91]:

 $Ti+3HF->Ti^{3+}+3/2$ H₂+3F⁻

Questa fase del trattamento induce una modifica la superficiale del materiale rendendola microrugosa, in particolare, nella lega Ti-6Al-4V, l'acido provoca una dissoluzione preferenziale della fase alfa (ricca di Al) della lega bifasica[89].

Successivamente si procede con una fase di ossidazione con perossido di idrogeno (H₂O₂). L'ossidazione ha lo scopo di creare gruppi ossidrile (OH) sulla superficie del campione. Il perossido di idrogeno provoca sulla superficie del titanio una corrosione portando alla formazione di un pattern nanoporoso. Differentemente, nel caso della lega Ti-6Al-4V, la fase alfa è ricoperta da uno strato di passivazione più efficiente (in quanto sono presenti sia Ti che Al) rispetto alla fase beta (ricca di V) e pertanto è possibile notare una corrosione intergranulare tra la fase alfa e beta. La fase di ossidazione provoca la ri-passivazione della superficie del materiale. Al termine di queste fasi la superficie si presenta microrugosa, con delle porosità nanomeriche e con gruppi ossidrile esposti.

Successivamente, può essere effettuato un trattamento termico finale, in un intervallo di temperatura compreso tra 300°C e 600°C, al fine di stabilizzare lo strato di ossido del materiale (non eseguito nell'ambito di questa tesi). Inoltre, è stato dimostrato come questo trattamento termico non altera la superficie spugnosa e nanostrutturata mantenendo pressoché invariate le proprietà meccaniche del materiale. In particolare, le fasi del processo sono state ottimizzate al fine di evitare la formazione di cricche superficiali, in quanto la loro presenza altera le proprietà meccaniche del materiale, in particolar modo la resistenza a fatica[90]. Nell'immagine seguente (3.1) viene mostrato il trattamento chimico su un campione di Ti-6Al-4V.



Immagine 3.1: immagine FESEM di un campione Ti-6Al-4V trattato

3.3 CONSIDERAZIONI

3.3.1 Topografia superficiale

Le superfici modificate si presentano con una topografia multiscala caratterizzata da una microrugosità sovrapposta ad un nanorugostità.

La presenza di un ossido nanostrutturato sulla superficie del materiale è di grande importanza sia da un punto di vista biologico che implantologico. I nanopori permettono di modulare selettivamente la risposta di osteoblasti e batteri. I batteri, a differenza delle cellule eucariote, presentano una forma caratteristica, sono molto meno deformabili e a seguito dell'attaccamento sulle superfici tendono a mantenere la loro forma. Tali caratteristiche ostacolano l'adesione batterica sulle superfici trattate per mezzo della loro topografia su scala nanometrica, differentemente gli osteoblasti saranno attratti da questa rugosità nanometrica[88], [89], [92].

3.3.2 Chimica superficiale

Il trattamento è in grado di generare sulla superficie dei gruppi OH di elevata importanza per le sue proprietà di bioattività inorganica e organica. In particolare, a seguito del trattamento termico, si nota una leggera diminuzione dei gruppi OH esposti rispetto al semplice trattamento chimico, dovuta probabilmente alla rimozione dell'acqua assorbita. Il trattamento aumenta lo spessore dello strato dell'ossido superficiale rispetto al titanio non trattato, passando da 4-6 nm sul titanio puro e Ti-6Al-4V non trattato a 80-100 nm per il titanio puro trattato e 200-300nm per la lega Ti-6Al-4V; aumentando ulteriormente a seguito del trattamento termico (350 nm per la lega Ti-6Al-4V) e aumentando la cristallinità dell'ossido. È stato riscontrato come il trattamento aumenta le proprietà meccaniche dello stato dell'ossido del materiale aumentandone il carico a rottura, dovuto all'aumento dello spessore e della cristallinità. Inoltre, l'aumento dello strato di passivazione aumenta la resistenza alla corrosione rispetto al titanio non trattato.

Infine, il trattamento termochimico sembra ridurre il rilascio di ioni all'interno dell'organismo, dovuto dallo spessore maggiore dello stato di ossido, rispetto a quello nativo, e quindi migliorando la biocompatibilità del materiale[88], [89], [93]. Bisogna però tener presente che, dal punto di vista industriale, l'esecuzione di un trattamento termico a 600°C non è un processo di routine per chi esegue trattamenti superficiali per il settore odontoiatrico: vantaggi e svantaggi vanno quindi considerati con attenzione.

3.3.3 Bagnabilità superficiale

La bagnabilità superficiale, come già discusso nel capitolo 2, è uno dei parametri di fondamentale importanza nell'adsorbimento delle proteine sulle superficie e nella successiva interazione con le cellule dell'organismo. Il trattamento chimico è in grado di aumentare la bagnabilità dei materiali, a causa della maggiore rugosità superficiale e della presenza dei gruppi OH sulla superficie. La bagnabilità della superficie pertanto facilita l'adsorbimento proteico, in particolare le proteine contenenti la sequenza RGD, come la fibronectina, che migliora l'adesione e la diffusione degli osteoblasti[88], [89], [94].

3.3.4 Bioattività in vitro

Il materiale così trattato presenta una superficie bioattiva da un punto di vista inorganico, in grado di promuovere la precipitazione di idrossiapatite in forma parzialmente amorfa con cristalli di piccole dimensioni, adsorbendo ioni di Ca^{2+} e PO_4^{3-} da parte dei fluidi biologici sfruttando le interazioni elettrostatiche tra i cationi e la superfice carica negativamente del materiale, dovuta all'abbondanza di gruppi OH con comportamento acido rispetto a quelli con comportamento basico. La presenza dei gruppi OH aumenta l'idrofilicità del materiale che stimola la nucleazione dei fosfati di calcio e la rapida biomineralizzazione.

Inoltre, è stato dimostrato come la presenza di nanopori sulle superficie sia un fattore determinante per la biomineralizzazione, la precipitazione di apatite e della sua adesione. Si può evidenziare come la lega trattata rispetto al titanio puro trattato adsorba sulla sua superficie un maggior numero di ioni Ca^{2+} e PO_4^{3-} , dovuto al maggior numero di gruppi OH sulla superficie della lega.

Infine, il trattamento termico non causa una alterazione delle proprietà bioattive, sia per la lega che per il titanio puro[89], [95], [96].

3.3.5 Funzionalizzazione biologica

Il trattamento è in grado di stimolare la risposta biologica, e in particolare sfruttando la presenza dei gruppi OH sulla superficie è possibile ancorare su di essa una serie di biomolecole coinvolte nella crescita della componente inorganica e organica dell'osso, senza l'ausilio di rivestimenti esterni, spesso potenzialmente tossici. L'aumento dell'idrofilicità superficiale influenza l'adsorbimento delle proteine, in particolare le proteine contenenti la sequenza RGD, come la fibronectina che migliora l'adesione e la

diffusione degli osteoblasti. E'importante ricordare che le cellule osteoblastiche sono sensibili alla presenza di nano-pattern che ne incrementano l'ancoraggio sulla superficie. Tra le biomolecole che si possono ancorare ai gruppi OH del materiale si è dimostrata di significativa importanza la factorai alcalina (ALP), in quanta è un anzima soinvalta nella

significativa importanza la fosfatasi alcalina (ALP), in quanto è un enzima coinvolto nella mineralizzazione ossea e la sua applicazione migliora e accelera la precipitazione di idrossiapatite favorendo la guarigione ossea[97].

Questa sua capacità può essere spiegata dal fatto che ALP contiene un sito attivo (per ioni Zn^{2+}) con un'elevata affinità per il legame del fosfato, fungendo da centro di nucleazione per l'idrossiapatite.

Visto che la lega trattata presenta un maggior numero di gruppi OH rispetto al titanio puro trattato può legare con un maggior numero di ALP portando ad una funzionalizzazione più efficace e una più rapida colonizzazione cellulare che favorisce una più rapida e fisiologica osteointegrazione. Infatti, è stato dimostrato come gli osteoblasti sui titani modificati e funzionalizzati con ALP presentino una forma poligonale e che siano ben sparsi sulla superficie, possedendo una forma tridimensionale con molti filopodi esposti sulla superficie aderendo al substrato nanoporoso. Inoltre, le cellule adese alla superficie presentano un elevato numero di contatti tra di loro, segno dello sviluppo di una rete cellulare tridimensionale importante per l'integrazione ossea. Infine, è stato dimostrato come la presenza di ALP induca una proliferazione e differenziazione osteoblastica, rispetto ad altri materiali che privilegino solo una riducendo l'altra, fatto che implica una più rapida e fisiologica integrazione ossea degli impianti titanio modificati[96].

Capitolo 4

4 MATERIALI E METODI

Nel seguente capitolo verranno affrontati e descritti tutti i processi, gli esperimenti e le analisi effettuate durante il presente lavoro di tesi al fine di valutare l'adsorbimento di proteine da siero sui campioni utilizzati. L'utilizzo di una moltitudine di metodologie di indagine per la caratterizzazione e l'analisi dei campioni è necessaria al fine di comprendere il fenomeno complesso dell'adsorbimento proteico. In particolare, le tecniche impiegato permettono di valutare: la presenza della proteina (ATR-FTIR e misure con anticorpi fluorescenti); la carica elettrica dei campioni (potenziale zeta); la bagnabilità dei campioni (angolo di contatto statico); le interazioni delle proteine con le superfici (KPFM) e test biochimici (BCA e Hartree-Lowry).

I campioni utilizzati per lo studio di questa tesi si suddividono in due substrati: lega di titanio Ti-6Al-4V (ASTM B348, grado 5, Titanium Consulting and Trading) e lega di titanio Ti-6Al-4V trattata chimicamente al fine di sviluppare un ossido superficiale micro-nanoporoso.

I campioni utilizzati prima di essere impiegati sono stati sottoposti ad un procedimento con differenti step progressivi. In questo capitolo verranno descritti nel dettaglio tutte le fasi che caratterizzano gli step.

4.1 PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

4.1.1 Taglio

I campioni in lega di titanio per gli esperimenti sono stati prodotti a partire da barre cilindriche di Ti-6Al-4V del diametro di 10mm. Le barre sono state opportunatamente tagliate trasversalmente al fine di ottenere dei dischi dello spessore di 2mm e del diametro di 10mm, come le barre di origine.

Per ottenere i campioni della dimensione indicata si è utilizzata una troncatrice automatica (IsoMet High Speed Pro, Buelher) con una lama tagliente abrasiva in alluminia (Al₂O₃). La macchina è stata rappresentata nell'immagine seguente 4.1 [98].



Immagine 4.1: troncatrice automatica IsoMet High Speed Pro, Buelher[98]

L'operazione di taglio utilizzata per la produzione di campioni è quella del taglio abrasivo ad umido, ed in particolare si sono andati ad impostare i seguenti parametri: 3600 rpm con una velocità di v=4mm/min.

L'operazione di taglio è una fase molto delicata nella produzione dei campioni, in quanto tale fase va ad influenzare le successive fasi di manipolazione dei campioni e quindi va ad incidere sulla buona riuscita del lavoro. È importante nella fase di taglio fare attenzione a non generare alcuna disomogeneità, difetto, graffi, fratture o deformazioni alla struttura del campione metallico.

Nonostante queste accortezze il campione presenta comunque dei difetti superficiali, tra i quali rigature, bave e una superficie rugosa.

4.1.2 Lucidatura

Al fine di ottenere dei campioni con una superficie "omogenea" priva di difetti dovuti alla fase di taglio, si è ricorso alla lucidatura dei campioni per mezzo di una macchina lucidatrice manuale (LaboPol-2, Struers, Birmendorf, Svizzera), visibile nell'immagine sottostante, Immagine 4.2 [99].



Immagine 4.2 lucidatrice LaboPol-2, Struers, Svizzera[99]

Nell'immagine è chiaramente visibile il piatto rotante su cui vengono posizionate le carte abrasive di forma circolare, si evidenzia inoltre il rubinetto dal quale fuoriesce acqua, fluido fondamentale nel processo di lucidatura, che permette sia la dispersione del calore generata durante la lavorazione dovuto all'attrito tra il campione e la carta abrasiva, sia la diminuzione del grippaggio tra il campione e la carta di lucidatura che altrimenti ostacolerebbe la lavorazione.

Osservando l'immagine si può inoltre vedere, in alto a sinistra, una testa rotante che permette di lucidare più campioni contemporaneamente utilizzando un apposito portacampioni. Qui i campioni vengono inseriti in degli incavi di forma circolare, opportunatamente dimensionati per i nostri campioni, e fissati su un lato mediante dell'adesivo. Questa procedura, nonostante permetta di lavorare più velocemente, porta ad un lavoro meno preciso e accurato, pertanto si è proceduto ad effettuare una lucidatura manuale. In tale fase si è mantenuto il campione adeso alla carta di lucidatura mediante il dito dell'operatore, cercando di apportare una pressione costante durante la lavorazione e prestando particolare attenzione alla superficie in maniera da renderla piatta, senza creare inclinazioni.

A seconda della tipologia di campione da lucidare si procede in maniera differente, ma in generale la lucidatura viene effettuata su entrambe le facce del campione e su una di queste viene effettuato un marchio, tipicamente a forma di x, al fine di distinguere il fronte dal retro. Andando nel dettaglio la superficie da trattare viene tenuta a contatto con la carta abrasiva cercando di mantenere un angolo di contatto costante con la direzione di rotazione del piatto, così da produrre sulla superficie creste e solchi paralleli tra di loro. Successivamente il campione viene ruotato di un angolo di circa 90° e viene effettuata una seconda lucidatura sempre con la stessa tipologia di carta abrasiva. Infine la lucidatura viene considerata ben eseguita se le rigature e le creste derivate dalla lucidatura precedente non sono più visibili, si è altresì utilizzato un microscopio ottico con ingrandimenti del 5x e 20x per assicurarsi della corretta riuscita dell'operazione.

Gli stadi di lucidatura appena descritti vengono ripetuti, in sequenza, sulla faccia del campione utilizzando carte abrasive con grana via via più fine ed impiegando una velocità di rotazione media del piatto di 250 giri/min.

Nel caso di difetti particolarmente evidenti a causa della troncatrice si è effettuato una prima grossolana lucidatura su entrambe le facce del campione con una carta abrasiva in carburo di silicio con un numero di grana 120 (p120). Nel corso del seguente lavoro di tesi comunque l'utilizzo di questa carta è stato piuttosto raro.

Per quanto riguarda i campioni in lega di titanio sono stati lucidati utilizzando inizialmente una carta abrasiva p320, con grana più grande, e passando sequenzialmente a carte abrasive con grana via via più fine (p600, p800, p1000, p2500 ed infine a p4000), in modo da ottenere campioni sempre più lucidi e privi di rigature o imperfezioni. Questa procedura è valida per il fronte dei campioni mentre per il retro si è proceduto ad effettuare una lucidatura con grana a p320.

Per quanto riguarda i campioni destinati al trattamento chimico si sono seguite le stesse procedure ma utilizzando un numero di carte inferiore, si è passati dalla carta a p320 a quella p400 ultimando la lucidatura del fronte e nel retro si è effettuata la medesima lucidatura dei campioni in lega di titanio utilizzando una carta con grana a p320.

4.1.3 Lavaggio

Dopo la fase di lucidatura e prima di qualsiasi altra operazione è necessario lavare e pulire i campioni mediante un lavaggio ad ultrasuoni per mezzo di una macchina per la sonificazione (Sonica Utrasonic Cleaner 2200 S3, Soltec), visibile in nell'immagine 4.3 [100].



Immagine 4.3: Sonica Utrasonic Cleaner 2200 S3, Soltec, utilizzata per la pulizia ad ultrasuoni dei campioni[100]

La pulizia dei campioni costa di tre passaggi: il primo prevede un lavaggio per cinque minuti in acetone (C_3H_6O), il secondo ed il terzo prevedono un lavaggio di dieci minuti in acqua ultra-pura (Milli-Q)(immagine 4.4)[101]. Tali passaggi sono rappresentati schematicamente nella seguente tabella 4.1. In generale da qui in avanti quando si fa utilizzo di acqua si intende acqua ultra-pura (Milli-Q).

	Solvente	Durata trattamento (min)
Fase 1	Acetone (C ₃ H ₆ O)	5
Fase 2	Acqua ultra pura (Milli-Q)	10
Fase 3	Acqua ultra pura (Milli-Q)	10

Tabella 4.1: Fasi di lavaggio dei campioni



Immagine 4.4: Arium Pro Ultrapure Water Sytem, macchinario utilizzato per prelevare l'acqua ultrapura [101].

In tutti i passaggi i campioni vengono disposti all'interno di un becher che viene riempito, fino a coprire totalmente il/i campioni in questione, con il solvente richiesto dal passaggio specifico.

I campioni, come descritti in questo capitolo, presentano un fronte ed un retro e nelle fasi di pulizia vengono posti all'interno dei becher con una pinzetta evitando in tal modo contaminazioni di sorta e vengono poggiati sul retro e quindi del marchio x, permettendo in tal modo una pulizia efficace sulla superficie libera del campione, per mezzo della sonificazione. In particolare prima di procedere alle varie fasi del lavaggio, il becher, con all'interno il solvente e i campioni in questione, viene ricoperto con un foglio di alluminio sempre per evitare possibili contaminazioni. Predisponendo tutto ciò il becher viene inserito all'interno del sonificatore. Al termine del primo lavaggio i campioni vengono estratti mediante pinzetta e inseriti all'interno di un nuovo becher contenete acqua ultrapura così da essere sciacquati per immersione. Al termine del risciacquo, atto a rimuovere possibili residui, i campioni vengono messi all'interno del becher destinato alla seconda fase del lavaggio. Si procede come descritto sopra nuovamente con una nuova fase di risciacquo e poi con la terza fase in un nuovo becher. Al termine della terza fase i campioni vengono messi ad asciugare su una carta assorbente all'interno di una cappa biologica a flusso laminare[102], affinché si possano completamente asciugare senza venire contaminati.



Immagine 4.5: CYTOSAFE-N2000, cappa utilizzata in diverse fasi del lavoro di tesi [102]

4.1.4 Trattamento chimico

Nel seguente lavoro di tesi, come già largamente trattato nel capitolo 3, è stato adoperato un trattamento chimico sui campioni in lega di titanio sottoposti a lucidatura con carta abrasiva sino ad un numero di grani pari a 400. Tale trattamento chimico è coperto da un brevetto (EP2214732, 2013)[65] e prevede un trattamento superficiale del titanio, atto a rendere bioattiva la superficie, aumentando le prestazioni in vivo e l'integrazione ossea. Il trattamento prevede dapprima un attacco acido in acido fluoridrico (HF) diluito, seguito da una fase di ossidazione con perossido di idrogeno con lo scopo di creare gruppi ossidrile (OH) sulla superficie del campione. Tale trattamento genera una superficie multifunzionale, con una complessa topografia superficiale caratterizzata da una micro e nano rugosità in grado di influenzare l'interazione osteoblastica e di inibire l'adesione batterica. Inoltre, le superfici presentano un'elevata presenza di gruppi OH fortemente acidi che non solo influenzano l'idrofilicità del substrato e permettono di interagire con l'ambiente biologico ma inducono la precipitazione dell'idrossiapatite[103].

I campioni così trattati da qui in avanti presenteranno la denominazione CT. Mentre i campioni non trattati e sottoposti a lucidatura con carta abrasiva sino ad un numero di grani

pari a 4000 verranno denominati Ti64. Di seguito vengono riportati i campioni prima e dopo il trattamento chimico nell'immagine 4.6.



Immagine 4.6: Campioni di Ti-6Al-4V prima(a) e dopo il trattamento chimico(b)

Dall'Immagine 4.6 è possibile osservare come i campioni CT cambino colore a seguito del trattamento chimico. Questo cambiamento di colore dipende dal fatto che il trattamento aumenta lo spessore dello strato dell'ossido superficiale rispetto al titanio non trattato, passando da 4-6 nm sul Ti64 a 200-300nm per i campioni CT.

4.2 Adsorbimento proteico

Nel seguente paragrafo verranno illustrati i protocolli implementati nel corso degli esperimenti effettuati, 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 dell'adsorbimento proteico in vitro, fenomeno di per sé complesso e dalle molteplici sfumature.

Le soluzioni proteiche utilizzate nel seguente lavoro di tesi sono state: albumina di siero bovino (BSA) in soluzione tampone fosfato ed il siero fetale bovino (FBS).

Siero fetale bovino (FBS)

Il siero fetale bovino (FBS), come già ampiamente discusso nel capitolo 1, non necessita una particolare preparazione o accorgimenti prima di essere utilizzato, in quanto lo si compra direttamente in lotti.

Il siero durante questo studio è stato conservato in un congelatore a -20°C in appositi contenitori sterili. Per l'utilizzo il siero è stato scongelato in frigorifero e si è fatta attenzione ad evitare cicli di congelamento e scongelamento che lo danneggerebbero.

Una volta scongelato è stato pipettato all'interno del pozzetto contenete i campioni da trattare nella dose di 1ml/pozzetto. A seguito della deposizione del siero, la piastra multipozzetto, viene avvolta in un foglio di alluminio e viene trasferita in un incubatore per 2h alla temperatura di 37°C affinché il processo di adsorbimento possa avvenire.

Al termine della fase di incubazione la piastra multi-pozzetto viene estratta dall'incubatore e aperta sotto cappa a flusso laminare evitando così contaminazioni. A questo punto vengono presi i campioni, sciacquati 3 volte in acqua milli-Q e lasciati ad asciugare su carta assorbente.

Una volta asciugati vengono posti all'interno di piastre multi pozzetto sterili, un campione per ogni pozzetto. A questo punto i campioni sono pronti per essere sottoposti alle successive analisi e presenteranno da qui in avanti la denominazione Ti-FBS (campioni Ti64 sui quali è stato effettuato l'adsorbimento di FBS) e CT-FBS (campioni CT sui quali è stato effettuato l'adsorbimento di FBS).

Albumina da siero bovino (BSA)

L'adsorbimento di albumina è stato eseguita ad una concentrazione di 20mg/mL, mimando la concentrazione fisiologica, in una soluzione di tampone fosfato salino (PBS) a pH 7.4.

La soluzione viene preparata in due step: inizialmente viene preparata la soluzione PBS, successivamente viene aggiunto il BSA allo scopo di ottenere una soluzione dalla concentrazione desiderata.

La soluzione di PBS viene preparata sciogliendo in un becher delle compresse preconfezionate (Phosfate Buffered Saline, Sigma Aldrich) in acqua MilliQ, a temperatura ambiente mediante agitazione meccanica, per mezzo di uno stirrer magnetico. Ogni compressa è stata disciolta in 200mL di acqua MilliQ. Una volta preparata la soluzione di PBS è possibile aggiungere il BSA.

Il BSA è stato utilizzato sotto forma di polvere liofilizzata (Bovine Serum Albumin, Sigma Aldrich) che deve essere conservata in frigorifero al fine di evitare il degradamento delle sue proprietà. Per ogni mL di soluzione PBS vengono disciolti 20mg di BSA, in modo tale da ottenere una soluzione simil fisiologica di 20 mg/mL.

Una volta preparata, la soluzione è stata pipettata all'interno del pozzetto contenete i campioni da trattare nella dose di 1ml/pozzetto. A seguito della deposizione, la piastra

multi-pozzetto, viene avvolta in un foglio di alluminio e viene trasferita in un incubatore per 2h alla temperatura di 37°C affinché il processo di adsorbimento possa avvenire.

Al termine della fase di incubazione la piastra multi-pozzetto viene estratta dall'incubatore e aperta sotto cappa a flusso laminare evitando così contaminazioni. A questo punto vengono presi i campioni, sciacquati 3 volte in acqua milli-Q e lasciati ad asciugare su carta assorbente.

Una volta asciugati vengono posti all'interno di piastre multi-pozzetto sterili, un campione per ogni pozzetto. Da qui in avanti i campioni così trattati prendono la denominazione Ti-BSA (campioni Ti64 sui quali è stato effettuato l'adsorbimento di BSA) e CT-BSA (campioni CT sui quali è stato effettuato l'adsorbimento di BSA).

Di seguito viene rappresentata una Tabella (4.2) con tutti i campioni utilizzati durante il lavoro di questa tesi.

Nome	Descrizione
Ti64	Campioni Ti-6Al-4V lucidati a p4000
СТ	Campioni Ti64 sui quali è stato effettuato l'adsorbimento di BSA
Ti-BSA	Campioni Ti64 sui quali è stato effettuato l'adsorbimento di BSA
Ti-FBS	Campioni Ti64 sui quali è stato effettuato l'adsorbimento di FBS
CT-BSA	Campioni CT sui quali è stato effettuato l'adsorbimento di BSA
CT-FBS	Campioni CT sui quali è stato effettuato l'adsorbimento di FBS

Tabella 4.2: Tipologie di campioni utilizzati nel corso del lavoro di tesi

4.3 Analisi biochimiche per la valutazione dell'adsorbimento proteico

Le analisi per la misurazione della quantità di proteine adsorbite sui campioni sono diverse. Nel seguente lavoro di tesi si è utilizzato il saggio BCA, acido bicinconinico, per misurare la quantità di proteine del siero (FBS) adsorbite sui campioni. Inoltre durante il lavoro di tesi si è deciso di provare l'efficacia di un altro saggio, ovvero il saggio Hartree-Lowry, per il quale sono state utilizzate soluzioni di proteine differenti, BSA e FBS.

4.3.1 Test BCA

Il test dell'acido bicinconinico (BCA), noto come test Smit, è un test biochimico atto alla determinazione della concentrazione totale delle proteine in una soluzione, mediante metodi colorimetrici. All'aumentare della concentrazione proteica, la soluzione passa da un colore verde al viola[104].

Il test si basa sulla reazione che intercorre tra le proteine nella soluzione e gli ioni Cu2+ in un ambiente alcalino (reazione del biureto) che porta alla riduzione degli ioni Cu2+ a Cu1+. La quantità di ioni ridotti è proporzionale alla quantità di proteine presenti nella soluzione. A questo punto gli ioni Cu1+ reagiscono con l'acido bicinconinico, due molecole di acido bicinconinico chelano con ogni ione Cu1+, formando un complesso viola-porpora che assorbe la luce ad una lunghezza d'onda di 562nm.

Questa reazione colorimetrica continua a progredire nel tempo ma a causa della lentezza di sviluppo permette di consentire l'analisi di un gran numero di campioni. Per la quantificazione delle proteine presenti sul campione, vengono analizzati gli spettri di assorbimento e confrontati con quelli di soluzioni proteiche di concentrazione nota (tipicamente BSA) dalle quali viene ricavata una retta di calibrazione.

Nel presente lavoro di tesi il saggio BCA è stato impiegato per lo studio dell'adsorbimento di proteine da siero sui campioni sottoposti a trattamento chimico. Di seguito è esposto il protocollo di analisi del saggio BCA[105].

Protocollo BCA Test per valutare diverse metodologie di distacco proteine con SDS

Il test BCA lavora con delle soluzioni motivo per il quale si è proceduto a stilare dei metodi atti al distacco delle proteine dalla superficie dei campioni presi in esame. In letteratura non esiste una metodologia standard per il distacco delle proteine ma sono presenti una moltitudine di metodi che vanno dall'utilizzo di una serie di lavaggi in PBS all'utilizzo di soluzioni (SDS, tampone RIPA, Triton-X 100) al fine di staccare le proteine adese[106]–[112].

Visto l'utilizzo in esame si è deciso di adoperare l'utilizzo del tensioattivo SDS (2%) e per agevolare e ottimizzare il distacco si è pensato di procedere secondo quattro metodologie [112]–[114]:

- 1. un bagno ultrasonico a RT (room temperature) per 30minuti (30').
- 2. un bagno ultrasonico a RT per 1h (1h).
- 3. un orbital shaker (100 rpm) e incubati a 37°C per 2h(2h).
- 4. un orbital shaker (100 rpm) e incubati a 37°C per 8h (8h).

Si è lavorato in duplicato (indicato con A e B) utilizzando un totale di 24 campioni CT-FBS, di questi sono stati utilizzati 6 per ognuno dei quattro metodi di distacco, come mostrato nella Tabella 4.3:

Numero	Nome	Tipo di distacco
3	30' A	Bagno ultrasonico a RT per 30 min
3	30' B	Bagno ultrasonico a RT per 30 min
3	1h A	Bagno ultrasonico a RT per 1h
3	1h B	Bagno ultrasonico a RT per 1h
3	2h A	Orbital shaker a 37°C per 2h
3	2h B	Orbital shaker a 37°C per 2h
3	8h A	Orbital shaker a 37°C per 8h
3	8h B	Orbital shaker a 37°C per 8h

Tabella 4.3: Campioni per metodi di distacco

Per le varie tipologie di campione si sono effettuate le quattro corrispondenti metodologie di distacco inserendo i campioni in una piastra multi-pozzetto dove si è effettuata una incubazione con 300µl di una soluzione SDS al 2%. Al termine del distacco proteico, si è passato alla preparazione del test BCA, dove è stato preparato il reagente di lavoro mescolando i reagenti A e B del kit BCA (Thermoscientific) con un rapporto 50:1 per A:B. Successivamente sono state preparate nove soluzioni di BSA a contenuto proteico noto: (0-0,5-1-2-3-4-5-7,5-10) µg, che serviranno per la generazione della curva standard di calibrazione. A questo punto sono stati presi 100 µl per ogni campione (sia della curva di calibrazione che per i differenti metodi di distacco) e sono stati miscelati con i reagenti del kit BCA. A questo punto per ogni campione si è lavorato in triplicato tecnico e sono stati pipettati in una piastra multi-pozzetto, da 96 well, 200µl/pozzetto, come mostrato nella Tabella 4.4.

BSA standard point

0 µg	0 µg	0 µg	0,5 μg	0,5 μg	0,5 μg	1 µg	1 µg	1 µg	2 µg	2 µg	2 µg
3 µg	3 µg	3 µg	4 µg	4 µg	4 µg	5 µg	5 µg	5 µg	7,5 µg	7,5 µg	7,5 μg
10 µg	10 μg	10 μg	30'A	30'A	30'A	30'B	30'B	30'B	1hA	1hA	1hA
1hB	1hB	1hB	2hA	2hA	2hA	2hB	2hB	2hB	8hA	8hA	8hA
8hB	8hB	8hB									

Tabella 4.4: disposizione dei campioni standard e dei campioni per metodo di distacco

È stato misurato il valore di assorbanza associato alla soluzione derivante dalle proteine presenti su ciascuno dei campioni e la curva standard a 570 nm da uno spettrometro a piastre (96well)[115] (Immagine 4.8).



Immagine 4.8: Spettrometro a piastre per la lettura dell'assorbanza nel test BCA [115]

La quantità di proteine distaccate per le quattro metodologie di distacco è stata stimata in funzione della curva standard di calibrazione (Immagine 4.9).



Immagine 4.9: Curva di calibrazione standard per il saggio BCA

4.3.2 Protocollo Hartree-Lowry

Il protocollo Hartree-Lowry, è un test biochimico atto alla determinazione della concentrazione totale delle proteine in una soluzione, mediante metodi colorimetrici.

Il test si basa sulla reazione che intercorre tra le proteine nella soluzione e gli ioni Cu2+ in un ambiente alcalino (reazione del biureto) che porta alla riduzione degli ioni Cu2+ a Cu1+. La quantità di ioni ridotti è proporzionale alla quantità di proteine presenti nella soluzione. A questo punto viene aggiunto il reattivo Folin (fosfomolibdico-fosfotungstico) che verrà ridotto dal complesso rame-proteina, assumendo una colorazione blu con un massimo alla lunghezza d'onda 720nm. Per la quantificazione delle proteine presenti sul campione, vengono analizzati gli spettri di assorbimento e confrontati con quelli di soluzioni proteiche di concentrazione nota (tipicamente BSA) dalle quali viene ricavata una retta di calibrazione[116].

Protocollo Hartree-Lowry

Sono stati preparati i reagenti (A,B e C) del kit Hatree-Lowry[117].

È stata preparata una soluzione madre di BSA 0,3 mg/ml, dalla quale sono state preparate sette soluzioni a concentrazione nota (0-0,03-0,06-0,09-0,12-0,15-0,3) mg/ml che sono state utilizzati per la curva standard di calibrazione della curva. Per ciascuna soluzione è

stata presa 1ml alle quali è stato aggiunto per ognuno 0,9ml di reagente A del kit Hatree-Lowry e sono state incubate a 60°C per 10min. Al termine dell'incubazione è stato aggiunto 0,1ml di reagente B del kit per ciascuna soluzione e sono state lasciate ad incubare per 10 min. Successivamente sono stati aggiunti 3ml di reagente C del kit per ciascuna soluzione e sono state lasciate ad incubare a 60°C per 10min. Infine le soluzioni sono state lasciate incubare le soluzioni per 60 minuti a temperatura ambiente. A questo punto è stato possibile misurare il valore di assorbanza per le soluzioni della curva di calibrazione (Immagine 4.10) utilizzando uno spettrofotometro (Immagine 4.11)[118] a 650nm.



Curva di calibrazione Hatree-Lowry

Immagine 4.10: Curva di calibrazione standard per il saggio Hatree-Lowry



Immagine 4.11: Spettrofotometro utilizzato per il protocollo Hartree-Lowry [118]

Per il protocollo Hatree-Lowry si è lavorato in duplicato con i seguenti campioni: 2 Ti64 (blank), 2 CT, 2 Ti-BSA, 2 Ti-FBS e 2 CT-FBS. La quantità totale di proteine adsorbite è stata quantificata mediante il kit apposito del saggio Hartree-Lowry. Dove i campioni sono stati disposti in una piastra multi-pozzetto uno alla volta, e sono stati aggiunti i reagenti del kit secondo procedura. Inizialmente, è stato aggiunto per ognuno 0,9ml di reagente A del kit e sono state incubate a 60°C per 10min. Al termine dell'incubazione è stato aggiunto 0,1ml di reagente B del kit per ciascun campione e sono stati lasciati ad incubare per 10 min. Successivamente sono stati aggiunti 3ml di reagente C del kit per ciascun campione e sono stati lasciati ad incubare a 60°C per 10min. Infine i campioni sono stati lasciati ad incubare a for company en stati aggiunto è stato possibile misurare il valore di assorbanza per i campioni utilizzando uno spettrofotometro a 650nm.

Per determinare le proteine adsorbite su ciascun campione, è stata sfruttata la curva di calibrazione precedentemente calcolate.

4.4 Protocollo adsorbimento con anticorpi fluorescenti

Nell'ambito di questa tesi si sono svolte delle misurazioni utilizzando degli anticorpi marcati con fluorofori, anti-BSA-DyLight550, (1.34 mg/ml) e ati-FN-Alexa488, (0.71 mg/ml), al fine di identificare le proteine (BSA e FN) adese ai campioni a seguito dell'incubazione in FBS. Questi anticorpi se vengono irradiati con una sorgente luminosa ad una specifica lunghezza d'onda, si eccitano e rilasciano un segnale caratterizzato da una determinata lunghezza d'onda. Sono state testate durante il lavoro di tesi due strategie per l'incubazione degli anticorpi. La scelta di utilizzare anticorpi specifici per il BSA e la FN

risiede nel fatto che entrambe sono proteine presenti a concentrazioni non indifferenti nel siero e pertanto la loro identificazioni su campioni su cui è stata fatto un adsorbimento di FBS, permette di studiare l'adesione di queste proteine sui campioni e di confrontarle con i campioni sui quali è stato effettuato l'incubazione della singola proteina.

Sono stati utilizzati per queste misure 22 campioni 11 Ti64 e 11 CT, in particolare si è lavorato in duplicato e sono stati utilizzati come controlli, dei campioni in assenza di anticorpo specifico, ma caratterizzati esclusivamente da un'incubazione con proteine (BSA, FN, FBS).

I campioni dopo essere stati lavati secondo la procedura vista nel paragrafo 4.1.3 (5min acetone, 10 in H2O e 10 in H2O) ed asciugati sotto cappa, sono stati disposti in piastre multi-pozzetto. Ogni pozzetto è stato poi riempito con 1 mL di PBS 1% (in maniera tale da sommergere completamente il campione), e si sono effettuati tre risciacqui ogni 5 minuti, dove ad ogni risciacquo il PBS è stato aspirato e rimmerso ogni volta. Successivamente avviene la fase di incubazione, durante la quale si sono utilizzate 3 differenti soluzioni proteiche: FBS con la quale si è proceduto come visto nel paragrafo 4.2 (1 ml/pozzetto per 2h a 37 °C), fibronectina FN (0,2 mg/ml) e BSA (20 mg/ml). Per le singole soluzioni proteiche (BSA e FN) è stato necessario modificare il metodo di adsorbimento e sono stati coperti con un dischetto copri-oggetto e sono stati sistemati in una camera umida, contenente un cordoncino di carta assorbente opportunatamente bagnato con acqua, disposto lungo il perimetro interno. (Immagine 4.9)



Immagine 4.12: Camera umida per gli adsorbimenti del BSA e del FN

I campioni utilizzati per queste misurazioni sono riportati nella seguente Immagine 4.13:



Immagine 4.13: schema dei campioni dopo l'adsorbimento proteico

Una volta terminato l'adsorbimento, sono stati trasferiti i campioni in una nuova piastra multi-pozzetto, si ripete il lavaggio in PBS (tre risciacqui ogni 5 minuti), ma differentemente dapprima la soluzione in PBS viene lasciata in modo che i campioni rimangano bagnati così da mantenerli il più umido possibile prima dell'utilizzo degli anticorpi.

Per l'incubazione con gli anticorpi (anti-BSA-DyLight550 e anti-FN-Alexa488). Sono state provate due strategie:

- nella prima l'incubazione è stata fatta in una piastra camera umida per 2h a temperature ambiente ed è stata depositata una goccia 10 µl/campione di anticorpo (1,34 µg/ml per ogni anticorpo) sui campioni che sono stati coperti con un vetrino. Questa strategia si è rilevata fallimentare, in quanto gli anticorpi non sono stati rilevati, motivo per il quale si è deciso di provare con una seconda strategia di incubazione con gli anticorpi;
- nella seconda l'incubazione è stata fatta in una piastra multi-pozzetto per 2h a temperature ambiente mediante o-ring, ovvero un tubetto in PE opportunatamente tagliato, in cui sono stati pipettati 85 µl/campione di anticorpo. L'utilizzo dell'oring è stato effettuato allo scopo di amplificare il riconoscimento tra le proteine (FN

e BSA) con i corrispettivi anticorpi (anti-BSA-DyLight550 e anti-FN-Alexa488). Per questa strategia sono state provate due concentrazioni di 1 μ g/ml e 5 μ g/ml per ogni anticorpo.Il tutto deve essere avvolto da carta stagnola al fine di evitare il contatto diretto della luce con gli anticorpi, immagine 4.14.



Immagine 4.14: piastra per l'incubazione degli anticorpi con o-ring

A seguito di un ulteriore lavaggio in PBS (tre risciacqui ogni 5 minuti), i campioni vengono disposti su un foglio di plastica e montanti, usando una goccia di un montante (Fluoroschield, #F6182, Sigma), circa 20 μ l, e viene posizionato un vetrino. Il montante serve per preservare le caratteristiche del fluoroforo. Immagine 4.15.



Immagine 4.15: disposizione dei campioni per l'analisi in ChemiDoc MP

Successivamente vengono preparati 2 spot 1 di BSA ed 1 di FN, pipettando una goccia di Anti-FN e Anti-BSA su 2 distinti vetrini e coperti con un altro vetrino. A fine procedura i campioni vengono posizionati su un foglio di plastica trasparente e analizzati al Chemidoc imaging (Immagine 4.16) e mediante il microscopio a scansione confocale.

4.5 Caratterizzazione superficiale

L'importanza dell'analisi superficiale del titanio è giustificata dal fatto che gli eventi che hanno luogo a seguito dell'impianto di un materiale in un organismo biologico, dipendono dalle interazioni che ha tale ambiente con la superficie del materiale e non del bulk. Argomento che è già stato ampiamente discusso nel capitolo 2. Motivo del quale il seguente capitolo verterà sulle principali tecniche (Chemidoc, microscopio a scansione confocale, potenziale zeta, angolo di contatto, kelvin probe force microscopy e ATR-FTIR) impiegate per valutare le proprietà di superficie dei campioni realizzati durante il presente lavoro di tesi.

4.5.1 ChemiDoc

Il ChemidocMP Imaging system (BIO RAD) (Immagine 4.17) è uno strumento in grado di acquisire immagini per fluorescenza o chemiluminescenza irradiando sorgenti luminose a differente lunghezza d'onda. Lo strumento possiede un ampio campo di acquisizione e quindi permette di analizzare più campioni contemporaneamente. Permettendo, di effettuare un'analisi comparativa del segnale dei campioni analizzati nelle medesime condizioni di misura.



Immagine 4.16: strumento ChemiDoc MP Imaging system (BIO RAD)

Il dispositivo fornisce un'immagine colorimetrica, dove vengono rilevati colori differenti a seconda dell'elemento rilevato e l'intensità dei colori è direttamente dipendente dalla quantità di segnale rilevato. Questo dispositivo è stato utilizzato nel seguente lavoro di tesi per la rilevazione degli anticorpi anti-BSA-DyLight550 e anti-FN-Alexa488 sui campioni Ti-BSA, Ti-FN, Ti-FBS, CT-BSA, CT-FN e CT-FBS, analizzati nel paragrafo 4.4.



CAMPIONI

Immagine 4.17: schema dei campioni utilizzati per il protocollo adsorbimento con anticorpi fluorescenti

I campioni con Anti-FN vengono analizzati a 488nm e i campioni Anti-BSA vengono analizzati a 550 nm.

4.5.2 Microscopio a scansione confocale (LSCM)

Il microscopio a scansione confocale è un microscopio a scansione mediante laser, noto anche come profilometro ottico. Permette di fare degli ingrandimenti che vanno dal 50x al 1000x. All'interno del dispositivo sono presenti una serie di riflettori/deflector diversi, che possono essere usati per scopi differenti.



Immagine 4.18: Schema microscopio a scansione confocale[119]

Nella figura sono evidenziati i principali componenti del microscopio:

- A: punto focale di ingresso
- B: punto focale di uscita
- D: punto del campione da analizzare
- M1: specchio dicroico
- M2: specchio su cui giace il campione
- O: obiettivo
- P: sorgente laser

La sorgente luminosa sulla sinistra agisce come fotomoltiplicatore, aumentando la risoluzione ed il contrasto dell'immagine finale. Per fare ciò, il microscopio confocale utilizza un pinhole di eccitazione (A), ovvero un diaframma che consente di ridurre il fascio luminoso in una sorgente puntiforme, restringendo il campo di azione. Allo stesso scopo viene utilizzato il pinhole di emissione (B), limitando il passaggio di fotoni esclusivamente a quelli provenienti dal campione posizionato sullo specchio (M2) [119].

Un altro vantaggio del microscopio confocale è quello di poter ottenere immagini 3D. Variando il piano di messa a fuoco del campione è infatti possibile ottenere più sezioni che una volta messe insieme ricostruiranno la struttura tridimensionale.

Mentre nel microscopio ottico si vanno a collezionare nell'immagine tutti i punti anche quelli non a fuoco, nel confocale si vanno a collezionare solo i punti messi a fuoco ovvero sono i punti messi sul piano focale andando a togliere nell'immagine quelli esterni.

Uno dei limiti di questo microscopio è un elevato slope: affinché il fascio venga acquisito deve riflettere con un angolo tale da essere ripreso dall'obbiettivo (O), mentre, nel caso in

cui dovesse rimbalzare fuori, il fascio riflesso viene perso. Questo è un problema che si presenta principalmente con le superfici lisce e non con quelle rugose. Una delle possibili soluzioni è quella di usare un obbiettivo con una grande apertura focale. Un caso particolare si verifica in presenza di superfici "verticali" (come mostrato nell'Immagine 4.), nelle quali il dispositivo non riuscirà acquisire la luce portando alla formazione di artefatti. La risoluzione dello strumento è di una decina di nanometri.



Immagine 4.19: Esempio di superficie verticale

Due dei principali parametri da tenere in considerazione per l'analisi del profilo delle superfici sono:

- La Waviness, ovvero ondulazioni macroscopiche della superficie, caratterizzata da una ripetizione a bassa frequenza e larga ampiezza;
- Rugosità, ovvero ondulazioni microscopiche e grani sulla superficie, caratterizzata invece da una ripetizione ad alta frequenza a bassa ampiezza (μm).

I principali parametri che caratterizzano la rugosità sono i seguenti:

- Ra: media aritmetica dell'altezza della superficie rispetto alla linea mediana del profilo, che può essere fuorviante, in quanto superfici molto diverse possono avere stessa Ra, motivo per il quale si tende ad implementare altri parametri;
- Rq: root mean square;
- Rsk: skewness indica il tipo di distribuzione sulla superficie, se >0 indica una distribuzione della superficie sopra la linea mediana e quindi una predominanza di

picchi, mentre se <0 indica una distribuzione della superficie sotto la linea mediana e quindi una predominanza di valli e depressioni.

- Rkk: kurtosis indica quanto sono acuminati gli elementi della superficie, con un valore
 >3 si ha una distribuzione stretta degli elementi sulla superficie, quindi i picchi e le valli saranno acuminati, mentre con un valore <3 si ha una distribuzione più ampia degli elementi sulla superficie, e quindi i picchi e le valli sono più smussati.
- Rv: indica la massima profondità di una valla rispetto alla linea mediana.
- Rp: indica la massima altezza di picco rispetto alla linea mediana.
- Rt=Rv+Rp: somma della massima valle e del massimo picco.

Lo strumento adoperato nel seguente lavoro di tesi è stato il microscopio confocale a scansione laser LSM 900 MAT presente nell'Immagine 4.20:



Immagine 4.20: microscopio confocale a scansione laser LSM 900 MAT

Prima di effettuare la misura bisogna impostare la potenza del laser, che regola il numero di features che si vanno a cogliere, lo standard è del 10%, che è comunque modificabile pe evitare di raggiungere la saturazione dell'immagine. Un altro parametro fondamentale è la dimensione del pinhole, che permette di escludere le parti non a fuoco della figura; come standard viene solitamente utilizzato 1AU (area unit). Ulteriore parametro da settare è il z-stack, esso corrisponde alla massima estensione del campione analizzato; per impostarlo è necessario indicare al macchinario la superficie iniziale e quella finale del campione. Si

decide così il numero di slices su cui suddividere il campione (standard: 70/80 slices), impostando anche un intervallo di separazione tra di esse. Il programma dello strumento alla fine della misura consente di andare a rimuovere gli artefatti in post-produzione.

Questo strumento è stato adoperato per l'acquisizione della topografia e della rugosità delle superfici dei campioni Ti64, CT, CT-FBS e Ti-FBS. Per le seguenti misure sono stati utilizzati 3 campioni per tipologia (3 Ti64, 3 CT, 3 CT-FBS e 3 Ti-FBS). Per ogni campione sono state effettuate 4 misurazioni: 3 per la rugosità e 1 per la topografia.

Per le misure della rugosità si è usato un ingrandimento 20x (200) (come previsto da normativa ISO25178[120]), ed un ingrandimento di 50x (500) per la topografia che necessita di una risoluzione maggiore.

ConfoMap è il programma utilizzato per analizzare le misurazioni ottenute. Permette di apprendere la topografia con delle rappresentazioni 3D e di andare ad estrarre le informazioni della rugosità inserendo 2 filtri di tipo Fourier in serie uno passa basso, che va a togliere la nanorugosità, e un passa alto, che permette di separare la rugosità e la waviness; questi filtri presentano un cut-off variabile a seconda della superficie secondo uno standard tabellato.

4.5.3 Misure di bagnabilità

Per determinare la bagnabilità di una superficie una delle tecniche più utilizzate è l'angolo di contatto che si viene a formare tra una goccia d'acqua depositata sulla superficie stessa. Il principio fisico su cui si basa questa tecnica è descritto dalla legge di Young (Immagine 4.21 [121]), che corrisponde al bilancio delle forze agenti su una goccia deposta su una superficie ideale, in particolare la tensione interfacciale della fase liquida e quella gassosa (γ LG), la tensione interfacciale tra la fase solida e quella liquida (γ SL), e la tensione interfacciale tra quella solida e gassosa (γ SG), raggiungono l'equilibrio.



Immagine 4.21: Angolo di contatto di una goccia depositata su una superficie[121]

Quando una goccia viene di liquido viene posizionata su una superficie solida, il liquido può comportarsi in due differenti modi: diffondersi sulla superficie e creare un film sottile; oppure può distribuirsi approssimativamente sulla superficie e mantenere comunque la sua forma a goccia.

Secondo la convenzione si definiscono superfici idrofobiche le superfici che presentano un angolo di contatto maggiore di 90°, e superfici idrofile quelle che presentano un angolo di contatto minore di 90°.

Il fine di questa serie di indagine è quello di valutare come la differente topografia di superficie va a modificare la bagnabilità del campione e come questa influenzi l'adsorbimento proteico sulla superficie.

Per eseguire le misure dell'angolo di contatto nel seguente lavoro si è ricorso allo strumento KRÜSS DSA 100, dove i campioni sono stati analizzati una alla volta. Il campione in esame è stato posizionato su un piano, facendo attenzione che ricada al centro del piano, ed è stato inquadrato da una telecamera, regolata fino alla messa a fuoco, in modo che sullo schermo compaia solo il campione. A questo punto è stata depositata con l'ausilio di una pipetta una goccia d'acqua ultra-pura di 5µl sul campione facendo attenzione a non dare sforzi durante la deposizione e non alterando in alcun modo la forma della goccia, si sono attesi 10 secondi prima di catturare l'immagine e successivamente facendo ricorso al programma dello strumento è stato calcolato l'angolo di contatto del campione. È importante aspettare sempre lo stesso quantitativo di tempo tra la deposizione della goccia e la sua cattura; in quanto una volta deposta la goccia è instabile e tende ad appiattirsi col passare del tempo.

Nel seguente lavoro di tesi la misura dell'angolo di contatto è stata eseguita tre volte su quattro tipologie di campioni: Ti64, CT, Ti-FBS e CT-FBS.

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 tutte le tipologie di campioni oggetto di indagine.

4.5.4 Potenziale zeta

Il potenziale ζ , detto potenziale elettrocinetico, è generalmente legato all'ambito dei sistemi colloidali, ma viene anche utilizzato nell'ambito delle superfici solide. Nel presente lavoro di tesi il potenziale ζ verrà calcolato: nell'ambito i sistemi colloidali per la determinazione

della curva di titolazione per il siero FBS e nell'ambito delle superfici solide sui campioni analizzati (Ti64, CT, Ti-FBS e CT-FBS)[122].

Sistemi colloidali

Nell'ambito dei sistemi colloidali si parte dall'assunto che una particella (come una proteina) dispersa in una soluzione elettrolitica presenta delle cariche elettrostatiche superficiali che generano un campo elettrostatico responsabile della ridistribuzione degli ioni presenti nello spazio circostante. Gli ioni di carica opposta vengono attirati elettrostaticamente aumentandone la concentrazione nell'intorno della particella carica mentre gli ioni di carica opposta vengono allontanati [123].

In particolare si andranno a generare due zone nello strato di liquido che circonda la particella: una interna, detta strato stazionario (di Stern), dove si raccoglieranno gli ioni che subiscono una maggiore influenza della carica della particella; e una esterna, detta strato diffuso (di Gouy-Chapman), dove si raccoglieranno gli ioni che subiscono una minore influenza della carica della particella. L'insieme dei due strati costituiscono un doppio strato elettrico o elettrochimico, detto EDL, intorno a ciascuna particella. Lo strato diffuso presenta una dimensione maggiore rispetto allo strato stazionario ed inoltre è composto da ioni metastabili, che tendono a muoversi in accordo con il liquido che circonda la particella; in particolare oltre il piano definito di taglio gli ioni tendono a sostituirsi e ad essere sostituiti in modo da mantenere le dimensioni del EDL costante. Il potenziale in corrispondenza del piano di taglio, e quindi della zona di scivolamento tra la fase liquida mobile e la fase stazionaria fissa, viene definito potenziale ζ .



Immagine 4.22: Potenziale ζ per le particelle di una dispersione [123]

Come mostrato nell'Immagine 4.22, il potenziale elettrico per una generica particella carica diminuisce in funzione della distanza dalla sua superficie: in particolare questo diminuisce rapidamente all'interno dello strato stazionario e più lentamente all'interno dello strato diffuso, fino ad annullarsi all'infinito.

In questo lavoro di tesi si è calcolata la curva il potenziale ζ del FBS sfruttando la tecnica del dynamic light scattering (DLS).

Il DLS è una tecnica fisica che permette di determinare la distribuzione dimensionale di piccole particelle (es. proteine) in soluzione. Nel DLS le particelle in soluzione vengono messe in movimento per mezzo di un campo elettrico applicato e contemporaneamente vengono colpite da un laser incidente[124]. Lo strumento presenta una sorgente laser che viene separato un due fasci, uno viene utilizzato come riferimento mentre l'altro attraversa il campione da analizzare. I due fasci vengono rilevati, dai quali si rileva uno scostamento in frequenza dovuto all'effetto Doppler e da ciò è possibile determinare la velocità delle particelle, la mobilità elettroforetica e il potenziale ζ .



Immagine 4.23: schema per la misura del potenziale ζ in un sistema colloidale [124]

Per la misura della curva di titolazione del FBS è stata effettuata mediante lo strumento Litesizer 500 (Anto Parr) rappresentato nell'Immagine 4.24 [125].



Immagine 4.24: Litesizer 500 (Anto Parr) sulla sinistra e cuvette per la misura elettroforetica a destra[125]

Per effettuare la misurazione le soluzioni sono state inserite all'interno di una cuvette caratterizzata dalla presenza di due elettrodi, fondamentali per l'applicazione del campo elettrico per la soluzione. Nel caricamento della cuvette bisogna fare evitare la formazione di bolle che potrebbero dare interferenza nella misurazione. La soluzione da inserire nella cuvette è stata preparata diluendo FBS con un rapporto 1:10 in acqua milliQ ed è stata aggiunta una soluzione di KCl 0.001 M al fine di ottenere una concentrazione di 5 mg/ml.

Per la generazione della curva di titolazione sono state effettuate nove misurazioni a valori di pH fissi: 2,5-3-3,5-4-5-6-7-8-9. Le soluzioni a pH fisso sono state generate aggiungendo goccia a goccia una soluzione NaOH 0,05 M per il range basico e la soluzione HCl 0,05 M per il range acido. Al termine di ogni misura la cuvette è stata pulita utilizzando tre risciacqui in acqua milliQ. Per ogni punto della curva sono state calcolate tre misurazioni delle quali è stata fatta una media.

Superfici solide

Nell'ambito delle superfici solide il potenziale ζ è indicativo della carica superficiale che si forma sulla superficie di un materiale massivo posto in contatto con un sistema acquoso elettrolitico ed è definito in corrispondenza del piano di taglio, ovvero della zona di scivolamento tra la fase mobile liquida e quella stazionaria fissa. Le cariche all'interfaccia solido-liquido si comportano in maniera consona al modello EDL, dove si viene a formare a ridosso della superficie uno strato di controioni stabili fortemente legati alla superficie e un secondo strato più esterno mobile diffuso composto da controioni debolmente legati.

Il concetto di EDL per una superficie solida è illustrato nell'Immagine 4.25[126].



Immagine 4.25: Potenziale ζ per una superficie solida [126]

Quando una soluzione elettrolitica scorre attraverso un capillare per effetto di una differenza di pressione, si presenta agli estremi del condotto una differenza di potenziale elettrico, ed è quindi possibile misurare una tensione o una corrente. Il capillare attraverso cui scorre la soluzione elettrolitica può avere forme differenti, nel caso dello studio di questa tesi, si ha avuto a che fare con un capillare dalla forma regolare formato dallo spazio creato tra le due superfici planari dei due campioni messi in parallelo.
Quando la soluzione attraversa il capillare si genereranno delle forze di taglio sui controioni presenti nella parte mobile dell'EDL, che cominceranno a muoversi secondo il flusso della soluzione. Questo accade in quanto come ribadito nel corso del capitolo gli ioni dello strato di Stern sono molto stabili e tendenzialmente rimangono vicino alla superficie, mentre gli ioni dello strato diffuso sono più labili e si delineerà pertanto il così detto piano di taglio; che altro non è se non una linea di separazione in corrispondenza della quale si potrà distinguere la zona dove si ha il movimento degli ioni in soluzione e la zona dove si hanno ioni fissi e trattenuti dalla superficie. Si presume che tale piano di taglio si trovi appena fuori dallo strato di Stern e in corrispondenza di esso si misurerà il potenziale ζ .

Quindi a causa del flusso della soluzione elettrolitica si genereranno agli estremi del condotto una differenza di cariche che creerà una forza elettrica misurabile mediante degli elettrodi.

In conclusione per calcolare il potenziale ζ bisogna collegarlo con il potenziale di flusso. A tale scopo si utilizza l'equazione di Helmholtz-Smoluchowski (2), che fornisce una relazione lineare tra la portata del fluido e il potenziale ζ [127].

$$\zeta = \frac{1}{\Delta p} * \frac{\eta}{\epsilon * \epsilon 0} * \frac{L}{A}$$
(2)

Dove Istr è la corrente di flusso, Δp è la differenza di pressione nella cella, η è la viscosità della soluzione elettrolitica, $\epsilon^*\epsilon 0$ è il coefficiente dielettrico della soluzione elettrolitica, L è la lunghezza del canale rettangolare formato dai due campioni disposti in parallelo, A è l'area formata dalla distanza tra i due campioni e la loro larghezza.

Lo strumento di misura utilizzato è stato il SurPASS electrokinetic analyzer (Anton Paar), mostrato nell'Immagine 4.16; questo strumento è dotato di una cella a gap regolabile, permettendo di regolare la distanza tra i campioni all'interno della cella di misura.



Immagine 4.26: SurPASS electrokinetic analyzer per la misura del potenziale ζ

I campioni analizzati nell'ambito di questo lavoro di tesi, sono stati analizzati due alla volta così da generare il capillare regolare ove far scorrere la soluzione elettrolitica. I campioni analizzati sono: Ti64, CT, Ti-FBS e CT-FBS

I campioni analizzati in coppia vengono fissati su due porta-campioni con un apposito adesivo, successivamente vengono inseriti all'interno della cella in modo da lasciare gap di circa 100um tra le superfici dei campioni montati.

La cella di misura viene rappresentata nell'Immagine 4.27.



Immagine 4.27: componenti della cella di misura per il calcolo del potenziale ζ

Il potenziale ζ è fortemente influenzato dal valore di pH, perciò per individuare la carica superficiale alle diverse condizioni a cui i campioni si potrebbero trovare fisiologicamente sono state eseguite tre diverse analisi. una curva di titolazione, una curva mantenendo il pH 4 costante, una curva mantenendo il pH 7.4 costante. Nella curva di titolazione è possibile identificare la correlazione tra potenziale ζ e pH permettendo la misurazione del punto isoelettrico e quindi, l'individuazione del valore di pH al quale la carica netta sulla superficie analizzata è nulla. È stata effettuata la misura a pH 7.4 con un flusso di azoto costante 0.2 bar, per valutare la carica superficia in condizioni fisiologiche di pH e valutare la presenza di un eventuale rilascio. In particolare, quando si lavora a pH 7.4 (instabile tende a diminuire), si utilizza dell'azoto inerte per stabilizzare il valore di pH della soluzione. Si è effettuata l'analisi di potenziale a pH 4 per valutare invece la carica superficiale dei campioni a pH infiammatorio e valutare un eventuale rilascio.

Prima di fare qualunque operazione bisogna assicurarsi che il pH-metro e la sonda di conducibilità siano opportunatamente calibrati, utilizzando per il pH-metro tre soluzioni a differenti pH 4.01-7-9.21, mentre per calibrare la sonda di conducibilità si utilizza una soluzione di KCl 0.1M. Prima di effettuare la misurazione del potenziale zeta si effettua il lavaggio della conduttura interna dello strumento con 500ml di acqua ultra-pura Milli-Q. A operazione conclusa si procede col riempimento del macchinario (fill) utilizzando come soluzione elettrolitica una soluzione di KCl in cui vengono disciolti in un bacher 45mg in 600ml di acqua Milli-Q al fine di ottenere una conducibilità di 15-18mS/m sotto l'azione di uno stirrer per facilitare lo scioglimento. Successivamente si effettua il rinse durante il quale si aggiusta il gap a circa 100um. A questo punto segue l'operazione di flow check, in cui si sceglie la condizione ottimale di flusso dell'elettrolita (100ml/min) impostando una pressione.

A questo punto, bisogna impostare il pH sul quale si vuole effettuare la misurazione. Il sistema per far ciò è caratterizzato da due soluzioni: 0,05 M una acida (HCl) e una basica (NaOH). Per settare un pH costante si preleva dalla soluzione acida/basica e lo si mette nella soluzione di KCl fino a raggiungere il pH desiderato, mentre per la titolazione lo strumento è in grado di effettuarla in maniera automatica variando gradualmente il pH. Bisogna precisare, però, che, affinché si effettui la titolazione, è necessario dividerla in due step differenti: una titolazione acida e una basica nella quale non si utilizzeranno pertanto

una sola coppia di campioni, come in quelle a pH costante, ma si utilizzeranno due coppie differenti di campioni.

Titolazione

A secondo della curva (acida o basica) che si vuole ottenere si inserisce nella soluzione KCl un tubetto che lo collega con la soluzione acida (HCl) o basica (NaOH), attraverso il quale il sistema è in grado di far variare il suo pH in maniera autonoma. Per la curva acida il pH viene fatto variare tra 2 e 5, mentre per la curva basica il pH viene fatto variare tra 5 e 9. Per ciascuna curva (basica e acida) il sistema prende 15 punti e per ogni punto effettua quattro misurazioni di cui fa la media.

pH costante

Per il pH 4 costante si pipetta nella soluzione KCL la soluzione acida (HCl) fino al raggiungimento del pH voluto. A questo punto si fa partire la misurazione dove vengono presi 15 punti, con uno stacco di 7 minuti uno dall'altro.

Per il pH 7.4 costante si pipetta nella soluzione KCL la soluzione basica (NaOH) fino al raggiungimento del pH voluto. In tali condizioni la soluzione di KCl è instabile e tende a bruschi cambiamenti di pH, motivo per il quale per mantenere il pH costante a 7.4 è necessario utilizzare una bombola di azoto liquido, imponendo un flusso di 0,3 Bar, che stabilizza il pH della soluzione.

4.5.5 Kelvin Probe Force Microscopy (KPFM)

La microscopia a forza atomica (AFM) consente di visualizzare la topografia superficiale di un campione utilizzando un cantilever con una punta alla sua estremità e permette di acquisire informazioni sulle proprietà meccaniche, elettriche e magnetiche delle superfici[128].

L'AFM è in grado di operare in differenti modalità: contact mode, tapping mode e noncontact mode.

Nella contact mode la punta del cantilever viene trascinata sulla superficie del campione e a secondo della deflessione del cantilever viene determinata la topografia superficiale del campione. Nella tapping mode il cantilever oscilla a valori prossimi della sua frequenza di risonanza e le interazioni tra la punta del cantilever e la superficie del campione, provocano una alterazione della sua frequenza di oscillazione e della sua ampiezza. Motivo per cui, la scelta del materiale della punta, le dimensioni della punta, le costanti di risonanza e la costante elastica della punta, sono informazioni di altissima importanza. Inoltre, questa modalità consente di ridurre drasticamente l'usura della punta rispetto alla contact mode.

Nella non-contact mode il cantilever oscilla a valori prossimi della sua frequenza di risonanza senza mai toccare il campione. Le interazioni tra la punta e la superficie provocano una variazione della linea di oscillazione del cantilever che può essere rilevata utilizzando un laser, rendendo così possibile acquisire informazioni sulla topografia del substrato.

La kelvin probe force microscopy (KPFM) si basa su una configurazione dell'AFM e permette di misurare la differenza di potenziale di contatto (CPD) tra una punta conduttiva di AFM e il campione, generando una mappa di potenziale superficiale [129]. Quando la punta AFM si avvicina alla superficie di un campione viene generata una forza elettrica dovuta alla differenza dei loro livelli di Fermi (lavoro termodinamico necessario per aggiungere un elettrone al corpo) e di vuoto (energia di un elettrone stazionario libero). Tra la punta e la superficie del campione sono applicate una tensione alternata e una tensione continua. La tensione continua viene regolata al fine di minimizzare le forze elettrostatiche che intercorrono tra punta e la superficie, in modo da annullare la differenza di potenziale tra la superficie e la punta del cantilever, ottenendo una mappatura della tensione applicata alla punta nell'area analizzata. Il potenziale di superficie è quindi determinato dal valore della tensione continua applicata durante la misura[130].

La tecnica del KPFM è stata adoperata per andare ad individuare e studiare come le proteine interagiscono con le superfici in titanio dei campioni CT e Ti64.

Innanzitutto si è proceduto al lavaggio dei campioni secondo la procedura vista nel paragrafo 4.1.3 (5min acetone, 10 in H2O e 10 in H2O) ed asciugati sotto cappa. Successivamente segue la fase di incubazione con il siero FBS, sono state effettuate due modalità:

 nella prima sui campioni è stata deposta una goccia di FBS, in modo da non ricoprire completamente il campione, al fine di valutarne le differenze tra la zona proteica e la non-proteica. Si è proceduto all'incubazione per 2h a 37°C con successivo risciacquo (3 volte) dei campioni in acqua. Per ogni campione è stata marcata con l'utilizzo di un bisturi la zona di separazione tra l'alone della goccia di FBS e il campione non trattato. Tale marcatura è stata riprodotta in 3 punti differenti della zona di separazione (2 sui bordi e uno al centro del campione), così da facilitare l'analisi. Questa metodologia non ha permesso un'indagine chiara delle due zone (proteica e non-proteica), motivo per il quale si è pensato di adoperare una seconda modalità di indagine;

nella seconda al fine di rendere più evidente la zona di separazione tra la zona proteica e non proteica è stato utilizzato l'adesivo Kapton®, con il quale si è coperta una metà del campione mentre nell'altra metà è stato effettuato l'adsorbimento con FBS (2h a 37°C). Il Kapton® stato fatto aderire sulla superficie in modo da evitare la formazione di bolle e l'infiltrazione di sostanze nella zona opportunatamente coperta. Al termine della fase di adsorbimento l'adesivo è stato tolto, al fine di rendere possibile l'analisi, e i campioni sono stati sciacquati (3 volte in acqua). Per ogni campione è stata marcata con un bisturi la separazione tra la zona proteica (dove è stato effettuato l'adsorbimento con FBS) e la zona non trattata (dove è stato adeso il Kapton®). Tale marcatura è stata riprodotta in tre punti differenti della zona di separazione (due sui bordi e uno al centro del campione), così da facilitare l'analisi.

Nella seguente lavoro di tesi le misurazioni sono state prese adoperando lo strumento Innova AFM (Bruker) (Immagine 4.18). Prima di iniziare la misura sono stati impostati dei parametri:

- Altezza: inizialmente solo in avanti o "forward" e, nel caso in cui la misurazione non sia soddisfacente, si procede ad effettuare una seconda misura "backward"; infine le curve vengono confrontate (idealmente dovrebbero sovrapporsi);
- Amplitude: consente di osservare se si sono generate delle forze elettrostatiche tra campione e punta;
- Fase: permette di vedere, a seconda dello sfasamento, se la tecnica sta analizzando materiali differenti (ad esempio le proteine causano un ritardo di fase, che viene catturato con questa metodologia);
- Errore;
- Potenziale di superficie.



Immagine 4.28: Innova AFM (Bruker)

Per ottenere un'immagine con una buona risoluzione si è deciso di lavorare con 128 linee, ovvero si è deciso di dividere l'area da analizzare in 128 che devono essere misurate sequenzialmente per ottenere le immagini. Oltre a ciò, per l'acquisizione delle immagini, bisogna settare lo scan rate, ovvero la velocità della scansione, e lo scan range, la dimensione dell'area del campione che si analizza. Come regola generale bisogna ricordare che maggiore è l'area di analisi minore deve essere la velocità di scansione, in caso contrario la punta rischia di schiantarsi con la superficie del campione.

I campioni sono stati analizzati uno per volta. In particolare, il campione in esame viene posizionato mediante uno scotch biadesivo sul porta-campioni magnetico, il quale possiede dei motori piezoelettrici che permettono di regolare la posizione del campione durante l'analisi.

Per ogni misurazione sono state ricavate immagini colorimetriche della topografia (topo) e del potenziale di superficie (PS), dalle quali è stato possibile individuare la distribuzione delle proteine sulla superficie, layer proteico o agglomerati.

Per l'acquisizione delle immagini topografiche si è lavora in tapping mode ed è stata utilizzata una punta di silicio dopato con antimonio. In particolare, il dispositivo presenta sulla testa un sistema di rilevamento della posizione, mediante l'utilizzo di un laser, che colpisce il cantilever e viene riflesso verso un fotodiodo. In questo modo il segnale originato dal sensore viene rielaborato per costruire una mappa topografica della superficie.



Immagine 4.29: schema misura della posizione del cantilever[131]

Per l'acquisizione delle immagini sul potenziale di superficie è stata utilizzata la lift mode, dove la punta viene sollevata rispetto al campione da esaminare e viene mantenuta ad una altezza costante 300µm.

Le immagini di topografia e potenziale di superficie sono state elaborate grazie al software Gwyddion. Con questo programma è possibile scalare e graduare il sistema di misura, rimuovere possibili imperfezioni dell'immagine e applicare dei filtri per migliorarne la qualità. Per la topografia è stato utilizzato un filtro polinomiale del secondo ordine, mentre per il potenziale di superficie è stato utilizzato un filtro matching.

Per le immagini del potenziale di superficie è stata invertita la scala, in quanto il potenziale va applicato al substrato e non alla punta, così da avere un valore più assoluto.

4.5.6 Spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier a riflettanza totale attenuta (ATR-FTIR)

La ATR-FTIR, Spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier a riflettanza totale attenuta, è una tecnica analitica non distruttiva utilizzata per studiare un'ampia varietà di molecole in condizioni differenti; in particolare, nell'ambito del seguente lavoro di tesi, si è focalizzata l'utilizzo di questa tecnica per studiare come le differenti superfici dei campioni influenzino le proprietà e la conformazione delle proteine da siero adese alla superficie.

In generale, la ATR-FTIR sfrutta una sorgente di radiazione infrarossa (IR) che investe il campione e che viene poi rilevata da un detector. Quando un raggio IR interagisce con le molecole presenti sulla superficie del campione, differenti lunghezze d'onda di questo

vengono assorbite a secondo dei legami degli atomi presenti nelle molecole. Motivo per il quale sulla base dell'assorbanza di un campione è possibile determinarne informazioni chimiche e strutturali e quindi è possibile associare ai gruppi funzionali presenti nelle proteine, delle caratteristiche bande di assorbimento[132].

La tecnica della ATR prevede nel dirigere la luce infrarossa attraverso un materiale infrarosso trasparente con un alto indice di rifrazione (un cristallo di Ge solitamente), detto elemento di riflessione interna (IRE), verso la superficie del campione a contatto con IRE[133]. In generale l'IRE deve possedere due caratteristiche principali:

- Deve essere otticamente trasparente in modo che il materiale non assorba la radiazione;
- Deve avere un indice di rifrazione più elevato di quello del mezzo che lo circonda, in modo tale da riflettere internamente l'energia.

Il ATR-FTIR presenta una bassa profondità di indagine, pochi micron, motivo per cui si presta bene come tecnica per analisi superficiali e in particolare l'interazione delle proteine sulle superfici. Nel caso specifico, gli spettri infrarossi delle proteine presentano cinque bande caratteristiche, tre delle quali note come bande ammidiche. La banda Amide I, presente tra 1600 e 1700 cm⁻¹, è principalmente causata dalle vibrazioni di allungamento di C=O accoppiata con l'allungamento C-N e la piegatura N-H. La banda Amide II, presente tra 1500 e 1600 cm⁻¹, è principalmente causata dal tratto C-N insieme alla flessione N-H. La banda Amide III, presente tra 1200 e 1300 cm⁻¹, è principalmente causata dalle vibrazioni di gruppo N-H e dallo stiramento del gruppo C-N, insieme alla deformazione dei gruppi C-H e N-H[134], [135].

Nonostante tutte le bande ammidiche siano utili nell'identificazione della struttura secondaria delle proteine, la banda Amide I è senza dubbio la più utilizzata nell'analisi della struttura secondaria perché è la più sensibile ai cambiamenti strutturali, dovuto al fatto che l'identificazione di questa banda dipenda dal legame idrogeno all'interno della molecola, dove tale legame, insieme alle interazioni dipolo-dipolo, influenza il modo in cui una molecola interagisce con la radiazione infrarossa, rendendo la banda sensibile all'identificazione della struttura secondaria delle proteine (α -elica, β -foglietto, ...), come mostrato nell'Immagine 4.30 [136].



Immagine 4.30: spettro FTIR che mostra le bande Amide, e una vista espansa della banda Amide I[136]

Nel seguente lavoro di tesi, i campioni analizzati mediante tecnica ATR-FTIR sono stati: Ti64, CT, Ti-FBS e CT-FBS. Per ogni campione è stata effettuata una misurazione.

Successivamente i campioni sono stati analizzati una seconda volta a seguito della misurazione del potenziale zeta e i risultati sono stati confrontati con le misurazioni iniziali. Per ogni misurazione è stata effettuata una misurazione.

Lo strumento con cui si sono analizzati i campioni è lo spettrometro FTIR Thermo ScientificTM NicoletTM iS50 (Immagine 4.31), dove la superficie dei campioni da analizzare sono stati messi a contatto con il cristallo IRE. Si è fissato il campione mediante un sistema di bloccaggio e successivamente è stato acquisito lo spettro (da 500 a 4000 cm^-1), imponendo 32scan per ogni analisi. Prima della misurazione dello spettro del campione, è stato acquisito un background dell'aria, che poi sarà sottratto allo spettro del campione per eliminare artefatti dovuti da contaminazioni ambientali.



Immagine 4.31: spettrometro FTIR Thermo ScientificTM NicoletTM iS50

4.6 Rivestimento antimicrobico

Vista la comprovata affinità del BSA per l'argento e in particolare la tendenza di formare un rivestimento che ingloba gli ioni argento generando delle nanoparticelle con dimensioni differenti a seconda della concentrazione della soluzione. Con un comportamento citocompatibile e antimicrobico. Si è pensato di funzionalizzare le superfici dei campioni Ti64 e CT con albumina ed argento al fine di renderle antibatteriche rimanendo comunque citocompatibili.

4.6.1 Funzionalizzazione

Per la funzionalizzazione dei campioni ci si è servito di una soluzione di nitrato di argento (AgNO₃) a differenti concentrazioni (0.1 M, 0.05 M e 0.01 M). I campioni utilizzati nel seguente trattamento sono stati sia 4 CT che 4 Ti64.

Precedentemente alla fase di funzionalizzazione, i campioni sono stati lavati secondo la procedura vista nel paragrafo 4.1.3 (5min acetone, 10 in H₂O e 10 in H₂O) ed asciugati sotto cappa. Successivamente i campioni sono stati disposti su una piastra multi-pozzetto e si è effettuata una incubazione in BSA 1ml per campione, alla contrazione di 20mg/ml in PBS, 2h a 37°C. A questo punto i campioni sono stati presi e sciacquati 3 volte in acqua milli-Q e lasciati ad asciugare su carta assorbente. A questo punto sono state preparate le tre soluzioni di AgNO3, a partire da una soluzione madre 1 M facendo una serie di diluizioni in acqua, della concentrazione di 0.1 M, 0.05 M e 0.01 M che saranno chiamati da qui in avanti rispettivamente C1, C2 e C3.

I campioni (4 CT-BSA e 4 Ti-BSA) sono stati posizionati in dei tubetti avvolti da stagnola. Per i campioni analizzati due (1 CT-BSA e 1 Ti-BSA) sono stati utilizzati come blank e negli altri sei (3 CT-BSA e 3 Ti-BSA) è stata fatta la funzionalizzazione con le tre soluzioni in AgNO3. Per ogni i blank sono stati pipettati 5ml/campione di acqua milliQ, per i restanti sei campioni sono stati pipettati a coppia (1 CT-BSA e 1 Ti-BSA) la soluzione C1, C2 e C3. A questo punto si sono lasciati incubare i campioni per 2h temperatura ambiente, in oscurità. Infine sono stati presi e sciacquati 3 volte in acqua milli-Q e lasciati ad asciugare su carta assorbente.

Lo schema dei campioni funzionalizzati CT e Ti64 è presentato nella Tabella 4.5.

Nome	Descrizione
Ti-BSA	Campioni Ti64 sui quali è stato effettuato l'adsorbimento di BSA
	(Blank)
CT-BSA	Campioni CT sui quali è stato effettuato l'adsorbimento di BSA
	(Blank)
Ti-BSA-C1	Campioni Ti-BSA funzionalizzati con la soluzione C1
Ti-BSA-C2	Campioni Ti-BSA funzionalizzati con la soluzione C2
Ti-BSA-C3	Campioni Ti-BSA funzionalizzati con la soluzione C3
CT-BSA-C1	Campioni CT-BSA funzionalizzati con la soluzione C1
CT-BSA-C2	Campioni CT-BSA funzionalizzati con la soluzione C2
CT-BSA-C3	Campioni CT-BSA funzionalizzati con la soluzione C3

Tabella 4.5: Schema campioni CT e Ti64 funzionalizzati con le soluzioni AgNO3 C1, C2 e C3.

I campioni così trattati sono stati analizzati tramite differenti tecniche che permettono di valutare: la presenza dell'argento sulle superfici (ATR-FTIR), la composizione degli elementi sulla superficie (FESEM) e la dimensione delle nano-particelle di Ag (DLS) eventualmente formatesi in sospensione.

4.6.2 ATR-FTIR

La tecnica ATR-FTIR è stata utilizzata al fine fi individuare la presenza di argento sulla superficie del materiale, i campioni sono stati: Ti-BSA, CT-BSA, Ti-BSA-C1, Ti-BSA-C2, Ti-BSA-C3, CT-BSA-C1, CT-BSA-C2, CT-BSA-C3. Per ogni campione è stata effettuata una misurazione.

Lo strumento con cui si sono analizzati i campioni è lo spettrometro FTIR Thermo ScientificTM NicoletTM iS50 (Immagine 4.30), dove la superficie dei campioni da analizzare sono stati messi a contatto con il cristallo IRE. Si è fissato il campione mediante un sistema di bloccaggio e successivamente è stato acquisito lo spettro (da 500 a 4000 cm⁻¹), imponendo 32scan per ogni analisi. Prima della misurazione dello spettro del campione, è stato acquisito un background dell'aria, che poi sarà sottratto allo spettro del campione per eliminare artefatti dovuti da contaminazioni ambientali.

4.6.3 DLS

La tecnica del DLS è stata adoperata al fine di individuare la possibile formazione di nanoparticelle di argento (e le loro dimensioni) in soluzioni di albumina con un differente contenuto in argento (0.1M, 0.05M e 0.01M).

Inizialmente sono state preparate due soluzioni di BSA in PBS con una concentrazione di 35 mg/ml (BSA1) e di 20 mg/ml (BSA2). Le soluzioni BSA1 e BSA 2 sono state diluite in acqua fino al raggiungimento per entrambe della concentrazione di 5mg/ml. Le soluzioni BSA1 e BSA2 sono state generate allo scopo di confrontare se la concentrazione iniziale delle soluzioni inficia nella dimensione delle nanoparticelle.

Parallelamente sono state preparate una terza soluzione di BSA in PBS con una concentrazione di 20mg/ml e una soluzione madre di AgNO3 1M che è stata diluita al fine di generare tre soluzioni con una concentrazione di C1=0.1M, C2=0.05M e C3=0.01M. Le soluzioni C1, C2 e C3 sono state addizionate, in tre provette differenti, alla soluzione BSA 20mg/ml e sono state diluite in acqua fino al raggiungimento per tutte e tre della concentrazione di 5mg/ml. Nella Tabella 4.6 viene rappresentato uno schema delle soluzioni utilizzate per la misurazione.

Nome	Descrizione
BSA.1	Soluzione BSA 35mg/ml diluita in acqua fino a 5mg/ml
BSA.2	Soluzione BSA 20mg/ml diluita in acqua fino a 5mg/ml
BSA-C1	Soluzione BSA 20mg/ml addizionata alla soluzione C1 e diluita in acqua fino a 5mg/ml
BSA-C2	Soluzione BSA 20mg/ml addizionata alla soluzione C2 e diluita in acqua fino a 5mg/ml
BSA-C2	Soluzione BSA 20mg/ml addizionata alla soluzione C3 e diluita in acqua fino a 5mg/ml

Tabella 4.6: Schema soluzioni analizzate per il DLS



Immagine 4.32: Soluzioni BSA, BSA-C1, BSA- C2 e BSA-C3

Per la misura è stato utilizzato lo strumento Litesizer 500 (Anto Parr) rappresentato nell'Immagine 4.24. Le soluzioni prima di essere analizzate sono state agitate al fine di evitare la formazione di depositi sul fondo delle provette. Ogni soluzione è stata analizzata una volta e sono state rilevate il raggio idrodinamico e l'indice di polidispersività.

4.6.4 FESEM-EDS

Le tecniche di microscopia elettronica permettono di acquisire un'immagine topografica della superficie di un campione sfruttando l'interazione tra un fascio di elettroni e la superficie del campione. Il fascio di elettroni, viene focalizzato da una serie di lenti e una volta, a contatto con la superficie produrrà elettroni secondari (SE), elettroni retrodiffusi (BSE) e raggi X caratteristici[137]. In generare, al contatto tra il fascio di elettroni con la superficie del campione si vengono a generare due tipologie di interazione: anelastica, in cui vengono emessi elettroni retrodiffusi, a seguito dello scontro degli elettroni del fascio con il nucleo o gli elettroni di un atomo del campione, dagli strati più profondi del campione[138]. Nell'Immagine 4.33 viene mostrata la generazione degli SE e degli BSE.



Immagine 4.33: Generazione degli elettroni secondari (SE1) e degli elettroni retrodiffusi (SE2, SE3) [137]

Nella microscopia elettronica a scansione ad emissione di campo (FESEM), la sorgente degli elettroni è costituita da un cannone ad emissione di campo (FEG), che utilizza un gradiente di potenziale per emettere il fascio di elettroni. Il FEG presenta un singolo filamento di tungsteno con una punta acuminata come sorgente degli elettroni. Il principio di funzionamento del FEG si basa sulla presenza di due coppie di anodi che agiscono come una lente elettrostatica, dove la prima coppia estrae gli elettroni dal filamento e la seconda coppia li accelera. La sorgente degli elettroni per funzionare deve essere tenuta in condizione di vuoto spinto in modo da mantenere la degli elettroni ed impedire la contaminazione del catodo. Il FESEM riesce a raggiungere una risoluzione fino a 2/3 nm[139].

La spettroscopia a raggi X a dispersione di energia (EDS) permette di calcolare la composizione elementare di un campione, rilevando i raggi X caratteristici emessi dal campione a seguito dell'irradiazione con un fascio di elettroni. Ogni elemento presenta un proprio spettro di emissione dei raggi X e pertanto andando a rilevare i raggi X emessi dal campione è possibile generare uno spettro che indichi la composizione elementare del campione[137].



Immagine 4.34: Schema dello spettro di un'analisi EDS [137] Nel seguente lavoro di tesi sono stati analizzati i seguenti campioni: Ti64, CT-BSA, Ti-BSA, CT-BSA-C1, Ti-BSA-C1, CT-BSA-C2, Ti-BSA-C2, CT-BSA-C3 e Ti-BSA-C3. Lo strumento adoperato è stato il SEM-FEG Supra 40 (ZEISS) (Immagine 4.35)



Immagine 4.35: SEM-FEG Supra 40 (ZEISS) sulla sinistra e porta-campioni sulla destra I campioni sono stati metallizzati mediante platino, così da garantire delle ottime proprietà conduttive. Successivamente sono stati disposti in degli stub tramite adesivo e sono state disposte su un disco porta-campioni. Prima di procedere alle misurazioni il dispositivo è stato messo sotto vuoto. Per ogni campione sono state effettuate due tipologie di misurazione:

- Topografica (5kV): si sono prese immagini a differenti ingrandimenti (10000x, 30000x, 70000x e 100000x)
- EDS (15 kV): di ogni campione sono state analizzate le aree e i punti di interesse.

Capitolo 5

5 RISULTATI

In questo capitolo vengono riportati i risultati delle analisi effettuate sui campioni utilizzati durante il corso del seguente lavoro di tesi al fine di studiare il fenomeno complesso dell'adsorbimento proteico da FBS. La prima parte di questo capitolo riguarderà le analisi relative alla caratterizzazione superficiale dei campioni, la seconda parte si concentrerà sui test di adsorbimento proteico e infine la terza parte riguarderà l'analisi delle superfici antimicrobiche.

L'utilizzo di un set di diverse metodologie di indagine per la caratterizzazione e l'analisi dei campioni è necessaria al fine di comprendere il fenomeno complesso dell'adsorbimento proteico da soluzioni multicomponenti, quali FBS. Utilizzando una singola tecnica non risulterebbe possibile ottenere risultati soddisfacenti.

5.1 ANALISI SUPERFICIALI

Facendo riferimento alle tecniche descritte nel capitolo 4, sono riportati di seguito i risultati relativi alla caratterizzazione superficiale.

5.1.1 Microscopio a scansione confocale (LSCM)

In questo paragrafo verranno analizzati i risultati relativi all'analisi LSCM. LSCM è stata impiegata per l'analisi della topografia e della rugosità della superficie dei campioni Ti64 e CT prima e dopo l'adsorbimento dell'FBS. Per ciascuno dei campioni analizzati sono riportate delle tabelle di rugosità e le immagini topografiche.

5.1.1.1 Ti64 vs CT

Inizialmente è stata eseguita un'analisi riguardante i campioni Ti64 e CT prima dell'adsorbimento di FBS. Nell'immagine seguente (5.1) vengono riportate le tabelle con i parametri di rugosità e le immagini topografiche.



Immagine 5.1: Confronto tra la rugosità e la topografia dei campioni Ti64 e CT

Ad una prima osservazione, risulta immediata la differenza tra la rugosità e la topografia dei due campioni, infatti i campioni CT e Ti64 presentano un differente trattamento morfologico e inoltre i campioni CT presentano un trattamento chimico che modifica la morfologia superficiale rendendola micro-nano-strutturata.

Da un punto di vista topografico è chiaro come la superficie del Ti64 sia più omogenea e "liscia", con valori di Sa ed Sq nell'ordine delle decine di nm e di Sp, Sv, Sz dei decimi di micron, rispetto a quella del CT, mentre la superficie del CT è caratterizzata da una predominanza di picchi e valli di maggiore altezza e quindi da una superficie disomogenea e rugosa, con valori di Sa ed Sq nell'ordine dei decimi di µm e di Sp, Sv, Sz di alcuni micron. Si nota anche che il rapporto Sq/Sa è pari a 1.28 per il Ti64 e pari a 1.35 per il CT.

Un rapporto Sq/Sa pari a 1.25 caratterizza una superficie con distribuzione Gaussiana delle altezze, mentre valori maggiori si ottengono quando la superficie presenta degli elementi più "aguzzi" (sharp). I dati ottenuti mostrano che il trattamento chimico rende la superficie leggermente più acuminata, anche se in entrambi i casi i valori ottenuti non si discostano molto dal riferimento con distribuzione Gaussiana. A conferma di ciò, osservando le tabelle dei parametri di rugosità e in particolare i valori di skewness (Ssk) e kurtosis (Sku) risultano delle differenze. Un Ssk uguale a 0 significa che la differenza delle altezze è distribuita uniformemente fra picchi e valli, mentre i valori negativi del parametro indicano una preponderanza delle valli ed i valori positivi indicano una preponderanza dei picchi. Su entrambe le superfici in esame il valore di Ssk è negativo, indicando una preponderanza delle valli, ma il valore assoluto di questo parametro è superiore per il CT per la formazione di cavità e la corrosione delle asperità durante il trattamento chimico. Il parametro Sku vale 3 quando si ha una distribuzione Gaussiana delle altezze; Sku>3 indica una distribuzione delle altezze con andamento acuto e viceversa (Sku<3 per una distribuzione delle altezze con andamento appiattito). In accordo con i valori di Sq/Sa, si registra un valore di Sku di 3.98 per Ti64 e di 9.83 per CT:

5.1.1.2 CT vs CT-FBS

Nel seguente paragrafo verranno analizzati la rugosità e la topografia dei campioni CT prima e dopo adsorbimento in FBS. Nell'immagine seguente (5.2) vengono riportate le tabelle dei parametri di rugosità e le immagini topografiche.



Immagine 5.2: Confronto tra la rugosità e la topografia dei campioni CT e CT-FBS

È possibile notare dalle tabelle dei parametri di rugosità come, a seguito dell'adsorbimento proteico, la superficie non presenta delle differenze significative. Inoltre, osservando le

immagini topografiche non è possibile osservare la presenza di materiale proteico adeso alla superficie del campione. Se ne deduce che, se l'adsorbimento di proteine è avvenuto, lo strato adsorbito non è così spesso da coprire la topografia superficiale indotta dal trattamento chimico e dalla lucidatura dei campioni e che le eventuali proteine adsorbite non formano agglomerati di scala micrometrica.

5.1.1.3 Ti64 vs Ti-FBS

Nel seguente paragrafo verranno analizzati la rugosità e la topografia dei campioni Ti64 prima e dopo adsorbimento in FBS. Nell'immagine seguente (5.3) vengono riportate le tabelle dei parametri di rugosità e le immagini topografiche.



Immagine 5.3: Confronto tra la rugosità e la topografia dei campioni Ti64 e Ti-FBS

I campioni Ti64 e Ti-FBS si presentano con valori molto simili per quanto concerne la rugosità e la topografia. Non è possibile notare osservando le immagini topografiche la presenza di materiale proteico adeso alla superficie. Anche in questo caso, si possono trarre conclusioni analoghe a quanto detto nel paragrafo precedente.

5.1.1.4 Ti-FBS vs CT-FBS

Nell'immagine seguente (5.4) vengono riportate le tabelle di rugosità e le immagini topografiche.



Immagine 5.4: Confronto tra la rugosità e la topografia dei campioni Ti-FBS e CT-FBS

Ad una prima osservazione, risulta immediata la differenza tra la rugosità e la topografia dei due campioni. Infatti, osservando i valori di rugosità (Sa, Sq,Sp,Sv,Sz), risulta evidente come la superficie CT-FBS presenti valori più elevati della Ti-FBS. Questi valori dipendono sicuramente dal trattamento meccanico differente (lucidatura fino a 4000 o 400 grit rispettivamente per Ti64 e CT) e dal trattamento chimico del CT. Come quanto detto nei paragrafi precedenti, su nessuna delle due tipologie di superfici è possibile notare la presenza di materiale proteico, mediante questa tecnica, a seguito dell'adsorbimento.

5.1.2 BAGNABILITÀ

In questo paragrafo vengono analizzati i risultati relativi alle prove di bagnabilità eseguite sui campioni Ti64, CT, Ti-FBS e CT-FBS al fine di andare a studiare le loro caratteristiche superficiali. Nell'analisi seguente sono state effettuate 3 misurazioni per ogni campione, da cui sono state calcolate la media e la deviazione standard dell'angolo di contatto statico, come mostrato nell'Immagine 5.5.



Immagine 5.5: Confronto dei risultati di bagnabilità per i campioni Ti64, CT, Ti-FBS e CT-FBS

Osservando il grafico riportato nell'Immagine 5.5, si nota come tutti i campioni presentano delle superfici idrofile. Si nota come i campioni CT presentano un angolo di contatto inferiore rispetto al Ti64. Questa diminuzione dell'angolo è motivata proprio dal trattamento chimico sui campioni che modifica la superficie del campione rendendola nanostrutturata, aumentando la bagnabilità superficiale, e inoltre genera gruppi OH sulla superficie che aumentano a loro volta la bagnabilità.

A seguito dell'adsorbimento proteico i campioni presentano valori confrontabili dovuti dalla presenza di proteine sulla superficie dei campioni. Questo fenomeno può essere spiegato considerando l'elevato numero di gruppi polari (amminici e carbossilici) presenti negli aminoacidi che costituiscono le proteine.

Inoltre, osservando le deviazioni standard si nota come i campioni trattati chimicamente (CT e CT-FBS) presentano una maggiore riproducibilità della bagnabilità rispetto alle controparti non trattate, evidentemente affette da una certa variabilità di comportamento (Ti64 e Ti-FBS).

5.1.3 POTENZIALE ZETA

Il potenziale ζ è un parametro rilevante nello studio dell'adsorbimento proteico sulle superfici dei campioni. Il potenziale ζ è sensibile alle variazioni del pH, motivo per il quale, al fine di effettuare un'analisi più completa dell'adsorbimento proteico, sono state analizzate differenti condizioni. In particolare, sono state effettuate 3 misurazioni: una a pH 4 costante, al fine di valutare un ambiente acido come nei processi infiammatori, una a pH 7.4 costante, al fine di valutare un ambiente simil-fisiologico e delle curve di titolazione, al fine di valutare come la superficie (e le proteine) si comportano al variare del pH.

In particolare, per ogni misurazione sono stati analizzati 15 punti, per ognuno dei quali si effettuano 4 misurazioni da cui si ricava il valor medio e la deviazione standard.

5.1.3.1 Potenziale zeta a pH 4

Nella seguente analisi sono stati analizzati a pH 4 costante i campioni (Ti64 e CT) pre- e post- adsorbimento in FBS al fine di valutarne la presenza delle proteine adsorbite sulla superficie, in un ambiente acido come nei processi infiammatori.



Immagine 5.6: potenziale ζ a pH 4 per CT, Ti64, Ti-FBS e CT-FBS.

I campioni Ti64 e CT, presentano un andamento costante nel tempo, rispettivamente a -5mV e -23.2mV. Questa differenza di carica tra le due tipologie di campioni dipende dalla presenza sul CT, a seguito del trattamento chimico, di un maggior numero di gruppi OH e dal loro comportamento acido. Il fatto che il potenziale zeta sia costante nel tempo indica che entrambe le superfici risultano stabili chimicamente e non reattive a pH acido.

A seguito dell'adsorbimento, i campioni Ti-FBS e CT-FBS presentano inizialmente valori positivi, circa 24 mV per entrambi, e possiedono un andamento decrescente nel tempo, più pronunciato nel CT-FBS che nel Ti-FBS. L'aumento di potenziale zeta, rispetto alla stessa superficie prima dell'adsorbimento, può essere considerato significativo in quanto è superiore a 20 mV (generalmente riportato come il limite di riproducibilità e significatività per misure di potenziale zeta) ed è dovuto all'adsorbimento proteico e in particolar modo alla presenza dei gruppi basici delle proteine adese che vengono protonati assumendo una carica positiva; a pH acido è ragionevole pensare che vi siano pochi gruppi carbossilici deprotonati a compensare questa carica e che vi sia, sullo strato proteico adsorbito, una carica netta risultante positiva. D'altra parte, la diminuzione del potenziale zeta da parte del CT-FBS all'aumentare del tempo, con il raggiungimento di un plateau a 3.5 mV, può essere considerato significativo (superiore a 20 mV) ed è dovuto, probabilmente, ad un progressivo distacco delle proteine ed alla parziale esposizione del substrato e delle sue cariche negative (OH acidi). Il fatto che il potenziale zeta si stabilizzi nel tempo (dopo circa 1h) ad un valore significativamente diverso da quello del substrato indica rispettivamente che il desorbimento delle proteine è limitato nel tempo e l'esposizione del substrato solo parziale. La superficie Ti-FBS risulta invece chimicamente stabile a pH acido. Se ne deduce un diverso meccanismo di adsorbimento di alcune proteine del siero a seconda della chimica superficiale del substrato: nel caso della superficie CT si può presumere che il chemi-adsorbimento di tipo elettrostatico giochi un ruolo maggiore (per la presenza di gruppi funzionali con una carica netta come gli OH deprotonati), mentre nel caso di Ti64 si presume che l'adsorbimento sia prevalentemente di tipo fisico (forze deboli). Da quanto ottenuto in queste misure, si deduce che il chemi-adsorbimento risulta selettivo verso alcune proteine, mentre altre vengono desorbite, in condizioni infiammatorie. Da quanto ottenuto in lavori precedenti [Tesi di Dottorato Jacopo Barberi][142], si può supporre che le proteine selettivamente adsorbite (e non desorbite), a pH infiammatorio, su CT-FBS comprendano l'albumina, la cui azione anti-infiammatoria è nota.

5.1.3.2 potenziale zeta a pH 7.4

Nella seguente analisi sono stati analizzati a pH 7.4 costante i campioni (Ti64 e CT) pre e post adsorbimento in FBS al fine di valutarne la presenza delle proteine adsorbite sulla superficie, in un ambiente simil-fisiologico. Bisogna specificare che mantenere nello strumento il pH costante al valore di 7.4 è molto difficile motivo per il quale è stato necessario l'utilizzo di azoto al fine di stabilizzare la misura.



Immagine 5.7: potenziale ζ a pH 7.4 per il CT, Ti64, Ti-FBS e CT-FBS.

A pH fisiologico il potenziale zeta si mantiene praticamente costante per tutti i tipi di campione: le superfici risultano chimicamente stabili, non reattive, e non si osservano fenomeni di desorbimento proteico. È possibile notare come i campioni CT presentino una carica significativamente meno negativa (- 47 mV) rispetto al Ti64 (-80mV), al contrario di quanto avveniva a pH acido. Questa differenza può essere spiegata dal fatto che, mentre il CT presenta una carica negativa a causa dell'elevato numero di gruppi OH con comportamento acido che vengono deprotonati completamente a pH fisiologico, e che comportano il raggiungimento di un plateau di potenziale zeta, il Ti64, invece, ha una superficie con una carica fortemente negativa a causa della sua natura idrofoba che porta la sostituzione dell'acqua adsorbita sulla superficie con dei gruppi OH⁻ provenienti dalla soluzione in quantità sempre crescente man mano che il pH della soluzione cresce (e quindi la concentrazione di OH in soluzione). Il Ti64 raggiunge un valore di plateau solo a pH

superiori a 7: oltre questo pH anche gli OH debolmente acidi presenti sulla sua superficie sono deprotonati.

A seguito dell'adsorbimento proteico i campioni presentano valori di potenziale zeta più elevati rispetto al substrato, in quanto le proteine adese espongono sulla superficie anche gruppi basici protonati, ma il potenziale zeta è complessivamente negativo per una prevalenza, a questo pH, dei gruppi COO-carichi negativamente. Risultano significative le differenze di potenziale zeta fra Ti64 e Ti-FBS, mentre risulta molto vicino (differenza non significativa) il valore di potenziale zeta di CT e CT-FBS: in questo caso non è possibile utilizzare questo dato per confermare o meno la presenza di proteine sulla superficie. La differenza di potenziale zeta fra CT-FBS e Ti-FBS è al limite della significatività (circa 20 mV).

5.1.3.3 Curve di titolazione del potenziale zeta

Nella seguente analisi sono stati analizzati mediante delle curve di titolazione del potenziale zeta i campioni (Ti64 e CT) pre- e post- adsorbimento in FBS al fine di valutare come si comportano le superfici (e le proteine) al variare del pH e per l'individuazione del punto isoelettrico (PI).

Nelle seguenti analisi per la generazione delle curve di titolazione sono state effettuate due misurazioni, una per il range acido (da pH 2.5 a pH>5.5) e una per il range basico (da pH 5.5 a pH >9) che sono state poi accostate nei grafici, motivo per il quale nelle curve sottostanti in corrispondenza del pH 5.5 ci sono dei gradini o delle alterazioni della curva.

Titolazione Ti64 vs Ti-FBS

Nel seguente grafico (Figura 5.8) viene mostrato il confronto tra i campioni Ti64 e Ti-FBS.



Immagine 5.8: curve di potenziale ζ per Ti64, Ti-FBS e FBS

A seguito dell'adsorbimento proteico il PI viene spostato verso valori più alti, infatti, per il Ti64 il PI è di 4.1 mentre per il Ti-FBS è di 4.8. Questo spostamento è da attribuire alle proteine dell'FBS adsorbite sulla superficie, osservando, infatti, la curva del siero (eseguita tramite DLS) si nota come il PI di questa e del Ti-FBS coincida.

Nella regione basica si nota come le curve Ti64 e Ti-FBS raggiungono un plateau rispettivamente a -57 mV e -45 mV. Tali valori sono correlati all'adsorbimento proteico per Ti-FBS, in particolare le proteine adsorbite sulla superficie espongono degli amminoacidi con gruppi COO- che si deprotonano completamente assumendo una carica negativa e raggiungendo un plateau per ogni valore di pH superiore a pH 6. Si osserva che anche la curva del siero mostra un plateau per pH superiori a 6: se ne può dedurre che, complessivamente, le proteine non risultano fortemente denaturate (perdita della struttura secondaria) dopo adsorbimento, anche se questa prima indicazione necessita conferme. Bisogna poi tener presente che il siero contiene molte proteine diverse e che questa osservazione generale potrebbe non valere per alcune specifiche proteine.

Nel caso del Ti64 il plateau è dovuto alla deprotonazione di OH debolmente acidi.

A pH circa 7 si osserva un delta di potenziale zeta della superficie dopo adsorbimento di circa 20 mV, a pH costante (uguale a 7) si era registrato un delta di poco superiore a 25 mV: anche se non c'è una precisa corrispondenza nei valori assoluti di potenziale zeta misurati a pH costante o in fase di titolazione, si conferma una differenza significativa di potenziale zeta prima e dopo adsorbimento.

Nella regione acida, si nota come la curva Ti-FBS presenti un plateau a circa 38 mV per valori inferiori a pH 3.5. Anche la curva di FBS presenta un plareau analogo. Tale valore può essere giustificato dalla presenza dei gruppi carbossilici presenti nelle proteine adsorbite dal siero che vengono protonati, a pH inferiore a 3.5, non bilanciando più le cariche positive dei gruppi amminici degli aminoacidi. La corrispondenza del plateau fra la curva Ti-FBS e FBS è correlabile ad una struttura secondaria simile per molte proteine del siero. Aumentando il pH si passa dal Pka dei gruppi carbossilici che, deprotonandosi, acquistano carica negativa e portano il potenziale zeta a diminuire. A pH 4 il delta di potenziale zeta della superficie, prima e dopo adsorbimento, è di circa 25 mV, a pH costante (pari a 4) si era registrato un delta di circa 30 mV: anche se i valori assoluti di potenziale zeta non sono del tutto riproducibili, confrontando la misura a pH costante e in titolazione, si conferma quindi un significativo cambiamento di potenziale zeta dopo adsorbimento che conferma, anche a pH acido, la presenza di proteine in superficie.

Si nota anche che la curva ottenuta dopo adsorbimento presenta nell'intorno del PI una elevata pendenza, mentre nello stesso range di pH la curva del FBS è molto più appiattita. Questo fenomeno è dovuto al fatto che le proteine assumono una configurazione terziaria che espone, verso la superficie e la soluzione, gli amminoacidi più idrofobici dal momento che il substrato non ha un'elevata densità di gruppi funzionali polari. Viceversa, in soluzione, le proteine espongono verso la soluzione acquosa i residui più idrofilici.

Titolazione CT vs CT-FBS

Nella seguente immagine (5.9) viene mostrato il confronto tra i campioni CT e CT-FBS.



Immagine 5.9: curve di potenziale ζ per CT, CT-FBS e FBS

La curva CT possiede per la sua interezza valori di potenziale zeta negativo che non permette l'individuazione del PI, anche se è possibile stimare il suo valore, per interpolazione della curva con l'intercetta dell'asse delle ascisse, per pH inferiore di 3. Questo andamento della curva è da attribuirsi alla presenza di un elevato numero di gruppi OH sulla superficie del campione. Si può notare come a seguito dell'adsorbimento proteico il PI venga spostato verso valori più alti, raggiungendo valori nell'intorno di 4.3, avvicinandosi al PI del siero 4.8, senza però raggiungerlo. Si può quindi ipotizzare una parziale esposizione del substrato anche dopo adsorbimento: nell'interpretare la curva CT-FBS bisogna quindi tener presente che essa è dovuta sia ai gruppi funzionali esposti dalle proteine sia a quelli del substrato. L'elevata pendenza della curva di CT-FBS nell'intorno del PI può essere interpretata come nel caso di Ti-FBS.

Nella regione acida, la curva CT-FBS presenta un valore di potenziale zeta crescente raggiungendo valori nell'ordine dei 32 mV. Questo comportamento può essere giustificato dalla presenza dei gruppi carbossilici presenti nelle proteine adsorbite che vengono protonati non bilanciando più le cariche positive dei gruppi amminici. Aumentano il pH, si passa dal Pka dei gruppi carbossilici che, deprotonandosi, riacquistano la carica negativa e portano il potenziale zeta a diminuire. A pH 4 vi è una notevole differenza di potenziale zeta prima e dopo adsorbimento, pari a circa 30 mV, in accordo con quanto osservato nella misura a pH 4costante. Si osserva, nel range acido della curva CT-FBS, che le deviazioni standard sono più elevate di quanto normalmente misurato: questo fenomeno può essere correlato con il desorbimento di proteine registrato a pH 4 costante. Non si osserva il plateau a pH inferiore a 3.5 , forse per il significativo distacco di proteine.

Nella regione basica, si nota come le curve CT e CT-FBS raggiungono un plateau a valori di potenziale zeta molto simili, rispettivamente a -31 mV e -35 mV, analogamente a quanto osservato a pH 7.4 costante. In particolare, è possibile notare come il CT raggiunga il plateau a valori di pH di circa 5.5, indicando come tale campione deprotoni completamente i suoi gruppi funzionali OH acidi ad un pH basso (comportamento degli ossidrili come un acido forte). Difficile trarre conclusioni sul significato del valore di potenziale zeta di CT-FBS a pH fisiologico.

Titolazione Ti-FBS vs CT-FBS



Immagine 5.10: curve di potenziale ζ per Ti-FBS, CT-FBS e FBS

Analizzando il grafico riportato nell'immagine 5.10, si vede come i PI dei campioni Ti-FBS, CT-FBS e della soluzione FBS siano molto vicini, rispettivamente 4.3 per il Ti-FBS e 4.8 per il CT-FBS e FBS. Questi valori similari permettono di stabilire come i campioni Ti64 e CT a seguito del trattamento adsorbono proteine dal siero. In particolare, la differenza di PI che si registra tra i Ti-FBS e CT-FBS è da attribuire alla quantità di proteine adese sulla superficie, inferiore per CT-FBS.

Nella regione acida, si conferma una significativa differenza fra CT-FBS e Ti-FBS che può essere correlata al progressivo desorbimento di proteine nel caso di CT-FBS.

Nella regione basica, le curve Ti-FBS e CT-FBS raggiungono un plateau a valori di potenziale zeta molto simili, rispettivamente -45 mV e -35 mV. Nel caso di Ti-FBS tale valore, significativamente diverso da quello registrato su Ti64, è da attribuirsi alla presenza dello strato di proteine adsorbite. Nel caso di CT-FBS, l'interpretazione è meno univoca, data la somiglianza con la curva di CT, ma, considerando che le deviazioni standard sono molto basse, che non si sono osservati fenomeni di desorbimento nella misura a pH 7.4 e che il valore di potenziale zeta è molto vicino a quello di Ti-FBS, è presumibile che, anche

nel caso di CT-FBS, la curva di potenziale zeta del range basico sia dovuta alla presenza delle proteine adsorbite, senza differenze di rilievo rispetto a Ti-FBS.

Risulta inoltre interessante confrontare le curve ottenute con quelle già pubblicate dal gruppo di ricerca degli autori (Applied Surface Science 599 (2022) 154023)[140], relative all'adsorbimento di l'albumina fetale bovina, e qui sotto riportate per completezza. L'albumina è una proteina presente in grande quantità nel siero, ma le curve di titolazione del potenziale zeta registrate su Ti64 e su CT dopo adsorbimento di albumina, risultano diverse da quelle qui riportate per Ti-FBS e CT-FBS. Si nota la bassa pendenza, intorno al PI, della curva di CT con albumina e, commentate nel testo dell'articolo citato, le basse deviazioni standard nel campo acido di questa curva. Un risultato simile è riportato nella tesi di dottorato di Veronica Peretti [141] per quel che riguarda Ti64 dopo adsorbimento di BSA e FBS. Se ne conclude che diverse proteine vengono adsorbite dal FBS oltre all'albumina e che queste hanno un adsorbimento diverso da quest'ultima: ad esempio, per quel che riguarda la superficie di CT, vengono rilasciate in ambiente acido e presentano una struttura terziaria che espone esternamente i residui idrofobi piuttosto che quelli idrofili.



Immagine 5.11: relativa all'adsorbimento di albumina (BSA) su superfici di titanio diversamente trattate pubblicata [140]: sono di interesse le curve di Ti64_BSA e
Ti64(HF-H2O2)_BSA (questa superficie corrisponde a CT dopo adsorbimento di BSA)

Infine, viene riportata un'immagine (5.12) complessiva delle curve di titolazione per una più chiara comprensione delle differenze ed analogie fra le superfici in esame.



Immagine 5.12: curve di potenziale ζ per Ti64, CT, Ti-FBS, CT-FBS e FBS

5.1.4 Kelvin Probe Force Microscopy (KPFM)

Sono state effettuate due prove. Nella prima, è stata deposta sui campioni una goccia di FBS, in modo da non ricoprire completamente il campione, al fine di valutare le differenze di potenziale elettrico sulle diverse aree della superficie. Nella seconda, al fine di rendere più evidente la zona di separazione delle due aree, è stato utilizzato l'adesivo Kapton®, con il quale si è coperta una metà del campione mentre nell'altra metà è stato effettuato l'adsorbimento con FBS.

Indipendentemente dalla prova utilizzata, per ogni misurazione sono state ricavate immagini colorimetriche della topografia (topo) e del potenziale elettrico di superficie (PS), dalle quali è stato possibile individuare la distribuzione delle proteine sulla superficie, la presenza o meno di un layer proteico o di agglomerati. Le immagini riguardanti il potenziale elettrico di superficie sono state prese considerando il potenziale applicato al substrato e non alla punta.

5.1.4.1 PRIMA PROVA

Sono state effettuate 2 misurazioni una per il Ti64 e una per il CT. Per ogni campione è stata marcata, con l'utilizzo di un bisturi, la zona di separazione tra l'alone della goccia di FBS e il campione non trattato. Tale marcatura è stata riprodotta in 3 punti differenti della zona di separazione (2 sui bordi e uno al centro del campione), così da facilitare l'analisi.



Immagine 5.13: immagine topografiche (colonna a sinistra) e di potenziale elettrico superficiale (colonna a destra) 100x100 µm in differenti zone del bordo della goccia depositata.

Dalle immagini (5.13) è possibile osservare come i campioni CT presentino una superficie nano-micro-rugosa e viene messa in rilievo la fase beta del materiale che spicca sulla fase alfa. Oltre a ciò dalle immagini topografiche non è possibile individuare la presenza di materiale proteico sulla superficie e osservando le immagini del potenziale elettrico la situazione si mostra confusa.




Dalle immagini (5.14) topografiche è possibile notare gli effetti della lucidatura dei campioni Ti64. Inoltre è possibile vedere in queste immagini delle zone più elevate rispetto alla superficie che potrebbero indicare l'adsorbimento di proteine sulla superficie. Confrontando queste zone, nelle immagini di potenziale elettrico superficiale è possibile notare come queste presentino un potenziale elettrico inferiore confermando la presenza proteica. Infine, nell'ultima riga, è stato fatto un ingrandimento nella zona centrale dove è stato individuato un agglomerato proteico visibile sia nell'immagine topografica che in quella del potenziale elettrico superficiale.

Le immagini sia per il Ti64 che per il CT acquisite per mezzo della prima prova sono risultate poco significative, in quanto non è stato possibile distinguere in maniera esatta tra la zona non sottoposta ad adsorbimento e l'alone lasciato dalla goccia di FBS. Questo è probabilmente dovuto alle fasi di risciacquo dei campioni prima della misura che portano ad una alterazione del bordo delle due zone, a seguito di un distaccamento proteico.

Non avendo raggiunto i risultati sperati con la semplice deposizione della goccia di FBS sul campione, siamo ricorsi all'utilizzo dell'adesivo Kapton® al fine di rendere più evidente il confine di separazione tra le due zone sulla superficie.

5.1.4.2 SECONDA PROVA

Sono state effettuate tre misurazioni due per il Ti64 e una per il CT. Al fine di rendere più evidente la zona di separazione delle 2 aree sulla superficie (con proteine adsorbite e non) è stato utilizzato l'adesivo Kapton®, il quale è stato fatto aderire sulla superficie del campione in modo da evitare la formazione di bolle e l'infiltrazione di sostanze nella zona mascherata. Al termine della fase di adsorbimento, l'adesivo è stato tolto al fine di rendere possibile l'analisi.

Per ogni campione è stata marcata con un bisturi la separazione tra la zona con proteine adsorbite (dove è stato effettuato l'adsorbimento con FBS) e la zona non trattata (dove è stato adeso il Kapton®). Tale marcatura è stata riprodotta in tre punti differenti della zona di separazione (due sui bordi e uno al centro del campione), così da facilitare l'analisi.



ANALISI CT

Immagine 5.15: immagine topografiche (riga superiore) e di potenziale elettrico superficiale (riga inferiore), disposte in modo da generare una mappa che va dalla zona

non-adsorbita a quella adsorbita. Sono presenti sulla destra due ingrandimenti. Analizzando la mappa topografica (5.15) è possibile notare gli effetti della lucidatura e del pattern nano-micro-rugoso che caratterizza le superfici dei campioni CT. Non è possibile notare con la mappa topografica la presenza di un layer o di un accumulo proteico, se non in corrispondenza del confine delle due zone, indicato con kapton, sembrerebbe esserci qualche agglomerato proteico confermato dalla mappa PS.

Analizzando la mappa del potenziale elettrico superficiale (5.15) è possibile notare in maniera netta come, nella zona con proteine, il potenziale elettrico sia minore rispetto alla zona senza proteine, per la presenza di materiale proteico non conduttore. Inoltre, osservando la distribuzione omogenea del valore di potenziale elettrico nella zona con proteine è possibile concludere che si ha la formazione di un layer continuo di proteine adsorbite. In particolare, è possibile notare come, in presenza delle linee di lucidatura, nella zona con proteine il potenziale elettrico rimane costante ed uniforme, sottolineando la formazione di un layer continuo sulla superficie.

Infine, nelle due immagini a destra (5.15), vengono mostrati degli ingrandimenti nella zona con proteine dove è possibile vedere delle strutture di forma globulare che risaltano nelle immagini topografiche e facendo un confronto con le immagini di potenziale elettrico si nota come queste presentano un potenziale elettrico inferiore rispetto al resto della superficie, confermando la presenza di agglomerati proteici.



Prima analisi Ti64

Immagine 5.16: immagine topografiche (riga superiore) e di potenziale elettrico superficiale (riga inferiore), disposte in modo da generare una mappa che va dalla zona senza proteine a quella con proteine. Sono presenti sulla destra due ingrandimenti.
Analizzando la mappa topografica (5.16) è possibile notare le linee di lucidatura del Ti64 ed è evidente il confine (Kapton) tra la zona con proteine e la zona senza. Concentrando

l'attenzione sul confine (Kapton) si può osservare come dalla mappa PS come alcune proteine si siano infiltrate al disotto del Kapton® e si siano adese anche nella zona nonadsorbita. Osservando la parte più a sinistra della mappa PS si vede come sia l'unica area della zona non-adsorbita nella quale le proteine non si sono adese, infatti, presenta un potenziale elettrico molto diverso rispetto al resto del campione. Inoltre, osservando la distribuzione disomogenea del valore di potenziale elettrico nella zona con proteine è possibile concludere che si ha la formazione di una superficie con adsorbimento proteico disomogeneo differentemente a quello che si formava sui campioni CT (5.15).

Infine, nelle due immagini a destra (5.16), vengono mostrati degli ingrandimenti nella zona con proteine dove è possibile notare delle strutture di forma globulare che risaltano nelle immagini topografiche e facendo un confronto con le immagini di potenziale elettrico si constata come queste non vengano evidenziate ma anzi mostrino una situazione confusa: potrebbe quindi non trattarsi di agglomerati proteici.

Seconda analisi Ti64





Dalle analisi topografiche è possibile osservare in tutte le zone analizzate la presenza di sporgenze. Analizzando la zona di confine (zona intermedia tra la zona a dx con proteine e la zona senza proteine a sx) è possibile notare come in corrispondenza delle sporgenze viste nell'immagine topografica sia presente una diminuzione del potenziale elettrico, rispetto alla zona senza proteine a sinistra: è possibile pertanto affermare la presenza di agglomerati proteici. Analizzando la zona con proteine è possibile osservare come la presenza delle sporgenze non sia necessariamente corrispondente alla presenza di agglomerati proteici, vista la stabilità del potenziale elettrico. Analizzando l'immagine del potenziale elettrico è possibile confermare come la superficie, a seguito dell'adsorbimento proteico, non presenti

la formazione di un layer proteico, ma presenta degli agglomerati sparsi sulla superficie. Inoltre, è possibile confrontando la zona di confine rispetto alla zona con proteine si riscontra una maggior numero di agglomerati, a causa della presenza del Kapton® confermando quanto detto precedentemente. Infine, dalla zona con proteine osservata ad elevati ingrandimenti è possibile confermare quanto detto sulla base delle immagini a più bassi ingrandimenti.

5.1.5 Spettroscopia Infrarossa a Trasformata di Fourier a Riflettanza Totale Attenuta (ATR-FTIR)

Al fine di studiare come le superfici dei campioni Ti64 e CT influenzino l'adsorbimento delle proteine, contenute nel FBS, è stata utilizzata la tecnica non distruttiva dell'ATR-FTIR. Sono state effettuate differenti misurazioni allo scopo di confrontare i campioni Ti64 e CT precedentemente e successivamente all'adsorbimento proteico con FBS.



ATR-FTIR CT vs CT-FBS

Immagine 5.18: spettri ATR-FTIR per CT e CT-FBS

Nello spettro CT-FBS non è possibile individuare picchi relativi all'adsorbimento delle proteine probabilmente per via del suo ridotto spessore e del cattivo contatto fra la punta dello strumento ed una superficie rigida come quella metallica che non permette di acquisire bene il segnale.

ATR-FTIR Ti64 vs Ti-FBS



Immagine 5.19: spettri ATR-FTIR per Ti64 e Ti-FBS, con un ingrandimento per il Ti-FBS

Dal grafico riportato nell'immagine 5.19 è possibile individuare una chiara distinzione tra i campioni analizzati. Lo spettro del Ti64 si presenta piatto, senza picchi relativi a gruppi funzionali, come atteso.

Il Ti-FBS presenta dei picchi, messi in evidenza nell'ingrandimento, nel range 1700-1600 cm⁻¹ e 1600-1500 cm⁻¹ che possono essere associati rispettivamente alla banda dei gruppi ammide I e II. La presenza di questi picchi conferma che sul Ti-FBS sono state effettivamente adsorbite delle proteine. Vista la complessità della miscela proteica presente

nel FBS, non è pensabile di fare una deconvoluzione dei picchi delle ammidi per investigare la struttura secondaria delle proteine, ma questa misura è da intendersi come eventualmente utile per una conferma della loro presenza o meno.

ATR-FTIR Ti-FBS pre vs post misura di potenziale z

Vista l'individuazione di materiale proteico dalla precedente analisi (Immagine 5.19) sul campione Ti-FBS, si è pensato di studiare il comportamento delle proteine sulla superficie a differenti condizioni di pH. Per far ciò, i campioni di Ti-FBS utilizzati per le misure di potenziale zeta sono stati adoperati per una misura in ATR-FTIR. I campioni post misura di potenziale zeta (pz) sono stati presi in differenti condizioni: dopo la misura a pH 4 costante, dopo la misura a pH 7.4 costante, dopo la misura di titolazione acida (pza), dopo la misura di titolazione basica (pzb). I grafici relativi a queste analisi sono riportati nell'immagine 5.19.



Immagine 5.20: confronto degli spettri ATR-FTIR tra: a) Ti-FBS vs Ti-FBS post misura di pz pH 7.4; b) Ti-FBS vs Ti-FBS post misura di pz pH 4; c) Ti-FBS vs Ti-FBS post misura di pza e d) Ti-FBS vs Ti-FBS post misura di pzb

Come si può notare nell'immagine 5.20, i campioni post misura di potenziale z presentano dei segnali significativamente più bassi, gli spettri appaioni quasi piatti, rispetto allo spettro acquisito dopo adsorbimento.

In particolare, questo discorso vale per i campioni dopo titolazione del potenziale zeta nel range acido e basico mentre, per i campioni sottoposti a misura del potenziale zeta a pH costante, si nota la presenza di alcuni picchi (in particolare per il pH 4); fenomeno che potrebbe dipendere dal fatto che la titolazione genera un ambiente più aggressivo (variazione di pH) che porta le proteine a staccarsi più facilmente. Da queste analisi, si ottiene comunque l'informazione aggiuntiva che un parziale distacco delle proteine avviene anche in condizioni in cui dalle curve di potenziale zeta non si osserva un incremento della deviazione standard o una variazione di potenziale zeta: si tratta dei casi in cui il desorbimento della proteina adsorbita non causa l'esposizione del substrato e quindi è ragionevole che il potenziale zeta non subisca variazioni.

5.2 Quantificazione dell'adsorbimento proteico

Al fine di quantificare le proteine adsorbite sui campioni Ti64 e CT sono state utilizzate differenti analisi: saggio BCA, saggio Hartree-Lowry e un protocollo mediante l'utilizzo di anticorpi fluorescenti.

5.2.1 Saggio BCA

Sono state analizzate e confrontate quattro metodiche di distacco delle proteine di FBS dai campioni CT-FBS, utilizzando una soluzione SDS al 2% (Immagine 5.21). Le metodologie di distacco utilizzate sono state:

- 1. un bagno ultrasonico a RT per 30 minuti (30').
- 2. un bagno ultrasonico a RT per 1h (1h).
- 3. un orbital shaker (100 rpm) a 37°C per 2h (2h).
- 4. un orbital shaker (100 rpm) a 37°C per 8h (8h).



Immagine 5.21: Confronto del saggio BCA, sui campioni CT-FBS, sulle metodiche di distacco: bagno ultrasonico a RT per 30 minuti (30'), bagno ultrasonico a RT 1h, orbital shaker a 37°C per 2h e orbital shaker a 37°C per 8h

In generale, le metodologie di distacco mediante il bagno ultrasonico permettono di ottenere risultati migliori (di staccare un maggior quantitativo di proteine) rispetto alle metodologie in orbital-shaker.

In particolare, è stato possibile riscontrare come il metodo di distacco in bagno ultrasonico a RT per 1h, abbia permesso di distaccare un numero di proteine di un ordine di grandezza maggiore rispetto agli altri metodi di distacco.

5.2.2 Saggio Hartree-LowrySfruttando la curva di curva di calibrazione calcolata, nel paragrafo 4.3, sono stati analizzati i campioni Ti64 (utilizzato come bianco),





Immagine 5.22: confronto del saggio Hartree-Lowry per i campioni Ti-64 (blank), CT, Ti-BSA, Ti-FBS e CT-FBS.

Analizzando l'immagine 5.22 è possibile notare come la tecnica non evidenzia delle differenze significative tra i vari campioni. In particolare, dai risultati per i campioni CT-FBS e Ti-FBS non è possibile identificarne identificare una differenza statisticamente significativa.

5.2.3 Protocollo adsorbimento con anticorpi fluorescenti

Nell'ambito di questa tesi si sono svolte delle misurazioni utilizzando degli anticorpi marcati con fluorofori, anti-BSA-DyLight550, (1.34 mg/ml) e ati-FN-Alexa488, (0.71 mg/ml), al fine di identificare le proteine (BSA e FN) adese ai campioni a seguito dell'incubazione in FBS.

Sono state testate effettuate tre misurazioni: nella prima l'incubazione degli anticorpi è stata effettuata mediante la deposizione di una goccia (1,34 μ g/ml per ogni anticorpo) su ogni campione, mentre nella seconda e nella terza l'incubazione è stata effettuata mediante o-ring e sono state testate rispettivamente due concentrazioni di 1 μ g/ml e 5 μ g/ml per ogni anticorpo.

I campioni, per tutte e tre le misurazioni, sono stati analizzati con il ChemidocMP imaging e LSCM.

Prima misurazione (1,34 μ g/ml)



Immagine 5.23: confronto mediante ChemidocMP dell'adesione di BSA e FN sui campioni Ti-BSA, Ti-FN, Ti-FBS, CT-BSA, CT-FN e CT-FBS mediante (1,34 µg/ml) anti-BSA e anti-FN

Dall'Immagine 5.21 non si riescono ad acquisire informazioni per la presenza di BSA e FN sui vari campioni. L'unico segnale che si riesce ad acquisire sono i due spot di soluzione di BSA e FN. La misurazione si presenta fallimentare, motivo per il quale si è ricorso all'incubazione tramite o-ring per migliorare il riconoscimento proteine-anticorpi.

Seconda misurazione (o-ring) (1 μ g/ml)

Anti-FN





Immagine 5.24: confronto mediante ChemidocMP dell'adesione di BSA e FN sui campioni Ti-BSA, Ti-FN, Ti-FBS, CT-BSA, CT-FN e CT-FBS mediante (o-ring) (1 μ g/ml) anti-BSA e anti-FN

Osservando l'immagine 5.21, Anti-BSA non si riescono ad acquisire informazioni utili per l'investigazione della presenza di BSA sui vari campioni. Diversamente nell'immagine Anti-FN si riesce a vedere del segnale dal campione CT-FN-antiFN, indicando la presenza di fibronectina sul campione. Nei restanti campioni l'analisi rimane infruttuosa. Bisogna ricordare che le seguenti immagini Anti-BSA e Anti-FN sono con un contrasto particolarmente aumentato per una migliore individuazione del BSA e FN.

Per completare le analisi i campioni sono stati analizzati in fluorescenza mediante LSMC per individuare la BSA (Immagine 5.25) e la FN (Immagine 5.26).



Immagine 5.25: confronto mediante LSMC dell'adesione di BSA sui campioni Ti-BSA, Ti-FBS, CT-BSA e CT-FBS mediante anti-BSA (1 µg/ml)

Dall'immagine 5.25, si nota come nei campioni CT-BSA-AntBSA è possibile identificare una maggiore presenza di BSA rispetto a quanto accade per i campioni CT-FBS-AntBSA. Nonostante questo fosse un risultato atteso e riconducibile alla complessità del siero, resta comunque il fatto che il BSA venga adsorbito sulla superficie del materiale.

D'altra parte, per i campioni Ti64 non è possibile notare una differenza significativa tra i Ti-BSA-AntBSA e i Ti-FBS-AntBSA. In generale, è possibile notare come la presenza di BSA nei campioni Ti64 (BSA e FBS) sia inferiore rispetto ai campioni CT (BSA e FBS), fenomeno che potrebbe dipendere dalle caratteristiche chimico-fisiche che possiede il CT a seguito del trattamento chimico.



Immagine 5.26: confronto mediante LSMC dell'adesione di FN sui campioni Ti-FN, Ti-FBS, CT-FN e CT-FBS mediante anti-FN (1 µg/ml)

Dall'immagine 5.26, si nota come nei campioni CT-FN-AntFN è possibile identificare una maggiore presenza di FN rispetto a quanto accade per i campioni CT-FBS-AntFN, come confermato anche dall'Immagine 5.24. Nonostante questo fosse un risultato atteso e riconducibile alla complessità del siero, resta comunque il fatto che il FN venga adsorbito sulla superficie del materiale.

D'altra parte, per i campioni Ti64 non è possibile notare una differenza significativa tra i Ti-FN-AntFN e i Ti-FBS-AntFN. In generale, è possibile notare come la presenza di FN nei campioni Ti64 (FN e FBS) sia inferiore rispetto ai campioni CT (FN e FBS), fenomeno che potrebbe dipendere dalle caratteristiche chimico-fisiche che possiede il CT a seguito del trattamento chimico.

Infine, dal confronto tra i campioni Ti-FN-AntFN e Ti-FBS-AntFN e i rispettivi controlli, la quantità effettiva di FN adsorbita sembra molto bassa.

Visto i risultati insoddisfacenti per le seguenti analisi si è pensato di ripetere la misurazione utilizzando una concentrazione di anticorpi maggiore (5 μ g/ml) in modo da rendere migliore l'identificazione delle proteine.



Terza misurazione (o-ring) (5 µg/ml)

Immagine 5.27: confronto mediante ChemidocMP dell'adesione di BSA e FN sui campioni Ti-BSA, Ti-FN, Ti-FBS, CT-BSA, CT-FN e CT-FBS mediante (o-ring) (5 µg/ml) anti-BSA e anti-FN

Come si può osservare dall'immagine 5.27 è possibile individuare in maniera più chiara la presenza degli anticorpi sui campioni rispetto a quanto accadeva nel caso della prima concentrazione, $1 \mu g/ml$.

Nei campioni CT-BSA-AntBSA è possibile notare la presenza di un segnale più forte rispetto a quello che si nota per i campioni Ti-BSA-AntBSA, mentre nei campioni Ti-FBS-AntBSA e CT-FBS-AntBSA non è possibile notare la presenza di segnale e quindi la presenza di Anti-BSA.

È possibile notare gli anti-FN in particolare nei campioni CT-FN-AntFN, ma anche nei CT-FBS-AntFN, Ti-FBS-AntFN e nei Ti-FN-AntFN. Bisogna comunque precisare che per vedere gli anti-FN è stato necessario aumentare sensibilmente il tempo di esposizione rispetto agli anti-BSA.



Immagine 5.28: confronto mediante LSMC dell'adesione di FN sui campioni Ti-FN, Ti-FBS, CT-FN e CT-FBS mediante anti-FN (5 µg/ml)

Dall'immagine 5.28, si nota come nei campioni CT-FN-AntFN e CT-FBS-AntFN è possibile identificare una presenza elevata di FN. In particolare, si nota un aumento significativo di segnale nei campioni rispetto a quanto accadeva nel caso della prima concentrazione, $1 \mu g/ml$.

D'altra parte, per i campioni Ti64 non è possibile notare una differenza significativa tra i Ti-FN-AntFN e i Ti-FBS-AntFN. In generale, è possibile notare come la presenza di FN nei campioni Ti64 (FN e FBS) sia inferiore rispetto ai campioni CT (FN e FBS), fenomeno che potrebbe dipendere dalle caratteristiche chimico-fisiche che possiede il CT a seguito del trattamento chimico.

Nonostante l'aumento di concentrazione non si sono comunque riscontrati dei risultati soddisfacenti con questa tecnica.

5.3 Test sulle superfici antimicrobiche

Nel seguente paragrafo sono stati analizzati i campioni Ti64 e CT, funzionalizzati con tre soluzioni di nitrato di argento (AgNO₃) a differenti concentrazioni (C1=0.1 M, C2= 0.05 M e C3=0.01 M), al fine di valutare: la presenza dell'argento e dell'albumina sulle superfici (ATR-FTIR), la composizione elementale della superficie (FESEM-EDS) e la dimensione delle nano-particelle di Ag (DLS) eventualmente formatesi in sospensione.

5.3.1 ATR-FTIR

Nelle seguenti analisi si è cercato di individuare la presenza dell'argento e dell'albumina sulle superfici, i risultati dei campioni analizzati (CT e Ti64) sono stati mostrati nelle seguenti Immagini 5.29 e 5.30.



Immagine 5.29: spettri ATR-FTIR per Ti-BSA, Ti-BSA-C1, Ti-BSA-C2 e Ti-BSA-C3; con un ingrandimento per una wavelength tra 2000-500 cm⁻¹

Nell'Immagine 5.29 si notano nel campione Ti-BSA dei picchi a circa 1650 cm⁻¹ che potrebbero essere associati al gruppo ammide I, indicando la presenza di materiale organico adeso sulla superficie del campione. In particolare, negli spettri dei campioni Ti-BSA-C1 e Ti-BSA-C3 si notano questi picchi (circa 1650 cm⁻¹) con una intensità maggiore. Questo fenomeno potrebbe dipendere dalla presenza di nanoparticelle di argento (AgNP) sulla superficie dei campioni che legandosi con la BSA intensificano il legame ammide I [86]. Motivo per il quale, è stato fatto un ingrandimento tra 2000-500 cm-1, dal quale si nota un leggero aumento dei picchi in quel range, ma la misura si presenta eccessivamente rumorosa per confermare questa supposizione.



Immagine 5.30: spettri ATR-FTIR per CT-BSA, CT-BSA-C1, CT-BSA-C2 e CT-BSA-C3; con un ingrandimento per una wavelength tra 2000-500 cm^-1

Nell'Immagine 5.30, relativa al substrato CT, si notano dei picchi a circa 1650 cm⁻¹ che potrebbero essere associati al gruppo ammide I, indicando la presenza di materiale organico adeso sulla superficie del campione. Dall'ingrandimento risulta una situazione rumorosa e non chiara.

5.3.2 DLS

Nella analisi seguente si è cercato di valutare le dimensioni delle nano-particelle di Ag formatesi in soluzioni con differenti concentrazioni di AgNO₃ (Tabella 5.1), confrontando tali valori con due soluzioni di BSA. BSA.1 e BSA.2 sono due soluzioni di BSA a 5mg/ml che hanno avuto origine da soluzioni a differente concentrazione. BSA.1 inizialmente era una soluzione a 35 mg/ml in PBS, mentre BSA.2 era una soluzione a 20 mg/ml; entrambe le soluzioni sono state portate a 5 mg/ml aggiungendo H₂O.

Name	Polydispersity index	Hydrodynamic radius	Peak 1 (intensity)	Peak 2 (intensity)	Peak 3 (intensity)
		nm	nm	nm	nm
BSA.1	26,465	139,722	8,082	340,332	65,049
BSA.2	30,748	153,035	300,492	8,272	56,920
BSA-C1	28,036	376,539	456,728	866,124	34,439
BSA-C2	27,809	568,850	665,627	94,358	
BSA-C3	18,185	2130,365	1987,365	58,108	

Tabella 5.1: Confronto mediante DLS delle dimensioni e della polidispersività di nanoparticelle nelle soluzioni: BSA.1, BSA.2, BSA-C1, BSA-C2 e BSA-C3

Dalla Tabella 5.30, si vede come, i valori di BSA.1 e BSA.2 sono simili, soprattutto se confrontati con le altre soluzioni, sottolineando come la concentrazione della soluzione di partenza non inficia le seguenti analisi. Inoltre, si può constatare come la dimensione delle nano-particelle sia inversamente proporzionale alla concentrazione di argento.

Questo fenomeno dipende dal fatto che la BSA è uno stabilizzante e ad alta concentrazione (ossia quando la concentrazione di Ag è minore) si raggiunge una quantità tale da stabilizzare gli atomi di Ag, permettendone l'aggregazione, quindi dimensioni più grandi e distribuzione stretta. Al contrario, a bassa concentrazione di BSA (ed alta concentrazione di Ag), lo strato stabilizzante non permette l'aggregazione degli atomi di Ag, quindi dimensioni più piccole e distribuzione più ampia[85].

5.3.3 FESEM-EDS

Nelle seguenti analisi si è cercato di individuare la composizione degli elementi sulle superfici. Sono stati analizzati 9 campioni: Ti64, CT-BSA, Ti-BSA, CT-BSA-C1, Ti-BSA-C1, CT-BSA-C2, Ti-BSA-C2, CT-BSA-C3 e Ti-BSA-C3.

Per ogni campione sono state effettuate due tipologie di misurazione: morfologica (per acquisire informazioni riguardanti la topografia superficiale) ed EDS (per acquisire informazioni riguardanti la composizione superficiale).

TiG4

5.3.3.1 Ti64

Immagine 5.31: analisi FESEM sul campione Ti64, con analisi EDS su tre zone di cui viene riportato lo spettro

Dall'Immagine 5.31 è possibile osservare la morfologia superficiale del campione Ti64 (Figura 5.31 a) che si presenta liscio e con delle macchie scure, dovute alla presenza di carbonio. Analizzando il campione con EDS, nelle tre zone indicate (Figura 5.31 b), si è osservato come questo presenti valori coerenti nello spettro 1 e 3; mentre nello spettro 2 (Figura 5.31 d) si vede una contaminazione da parte del Si dovuta probabilmente alla carta di lucidatura in carburo di silicio (SiC).

5.3.3.2 CT-BSA



Immagine 5.32: analisi FESEM sul campione CT-BSA, con analisi EDS su tre zone di cui viene riportato lo spettro

Dall'Immagine 5.32 è possibile osservare la morfologia superficiale micro e nano-porosa tipica del campione CT, dove si vede emergere la fase beta, che viene mostrata in dettaglio nell'ingrandimento (Figura 5.32 b). Analizzando il campione con EDS, nelle tre zone indicate in Figura 5.32 c), non è stato possibile identificare la presenza di BSA sulla superficie, visto il basso quantitativo di carbonio nei punti analizzati. Solo nello spettro 1 (Figura 5.32 d), in corrispondenza del grano di fase beta, si nota un aumento di C, dovuto probabilmente al fatto che la fase beta presenta una reattività maggiore della fase alfa e quindi su di essa potrebbe essersi depositato della BSA.

5.3.3.3 CT-BSA-C1 (C1=0.1 M)

CT-BSA-C1



Immagine 5.33: analisi FESEM sul campione CT-BSA-C1, con analisi EDS su quattro zone di cui viene riportato lo spettro

Dall'Immagine 5.33 è possibile osservare la morfologia superficiale del campione CT-BSA-C1 (Figura 5.33 a), caratterizzata dalla presenza di un layer discontimuo, dovuto alla presenza di BSA e Ag. Questa morfologia superficiale dipende dalla presenza di Ag sulla superficie e non era osservabile su CT-BSA. Diversamente a quanto accadeva nell'Immagine 5.32, la BSA dopo essere stata adsorbita, in presenza di Ag, si solubilizza parzialmente, aggrega e ei-precipita sulla superficie, generando una morfologia superficiale come quella nella figura 5.33 a. Analizzando il campione con EDS, nelle quattro zone indicate in Figura 5.33 b, è possibile osservare come la quantità di Ag, N e C aumenti in corrispondenza della fase beta (Figura 5.33 c-d), in quanto essendo più reattiva tenderà a interagire con la BSA e Ag generando su di essi degli agglomerati grazie all'interazione BSA-Ag. La quantità di Ag, N e C diminuisce in alcune zone della superficie, come riportato in Figura 5.33 e-f.

5.3.3.4 CT-BSA-C2 (C2= 0.05 M)



Immagine 5.34: analisi FESEM sul campione CT-BSA-C2, con analisi EDS su quattro zone di cui viene riportato lo spettro

Dall'Immagine 5.34 è possibile osservare la morfologia micro- e nano-porosa tipica del CT 5.34(a), caratterizzata dalla presenza di cricche dovute probabilmente al trattamento chimico. Nel seguente caso si ripresenta la situazione vista precedentemente (CT-BSA-C1), dove, analizzando il campione con EDS, nelle quattro zone indicate in Figura 5.34 b, è possibile osservare come la quantità di Ag, N e C aumenti in corrispondenza della fase beta (Figure 5.34 c-d) e diminuisca nel resto del campione (Figure 34 e-f). Inoltre, è possibile notare un aumento del contenuto di Ag sulla superficie rispetto al caso precedente (Immagine 5.33), nonostante la soluzione usata per la preparazione del campione avesse una concentrazione inferiore a prima (0.05 M invece di 0.1 M), evidenziando come una minore concentrazione di Ag tenda a generare agglomerati di maggiore dimensione, fenomeno sottolineato dalle analisi DLS svolte in precedenza (Paragrafo 5.3.2).

5.3.3.5 СТ-ВЅА-СЗ (СЗ=0.01 М)



Immagine 5.35: analisi FESEM sul campione CT-BSA-C3, con analisi EDS su quattro zone di cui viene riportato lo spettro

Dall'Immagine 5.35 è possibile osservare la morfologia micro- e nano-porosa tipica del CT (Figura 5.35 a). Dalle analisi EDS (Figure 5.35 e, f, g, h) si dimostra come non sia presente sul campione alcun contaminante o elemento estraneo, pertanto si può ipotizzare che il layer superficiale che, per quanto discontinuo, risulta evidentemente più esteso in questo caso dei campioni precedenti e che contiene solo C e Ag, sia dovuto alla presenza di BSA e Ag. La superficie del campione ricorda molto quella del campione CT-BSA-C1, confermando il fatto che la BSA dopo essere stato adsorbita, venga parzialmente desorbita e in presenza di Ag si aggrega e riprecipita sulla superficie. Sulla superficie si vengono pertanto a generare degli agglomerati proteici in numero e dimensione maggiore rispetto al caso del CT-BSA-C1. A motivare questa disposizione è la presenza dell'Ag (stabilizzato dalla BSA) che si presenta, nella soluzione utilizzata per la preparazione del campione, in concentrazione minore rispetto al CT-BSA-C1.

Inoltre, si ripresenta la situazione vista precedentemente, sia nel CT-BSA-C1 che nel CT-BSA-C2, dove è possibile constatare come la quantità di Ag, N e C aumenti in corrispondenza della fase beta (Figure 5.35 d-f-g) e diminuisca nel resto del campione (Figure 5.35 e-h).

Infine, osservando l'ingrandimento di Figura 5.35 b) si possono identificare delle nanoparticelle di argento, visibili come spot nel layer proteico.

5.3.3.6 Ti-BSA



Immagine 5.36: analisi FESEM sul campione Ti-BSA, con analisi EDS su quattro zone di cui viene riportato lo spettro

Dall'Immagine 5.36 è possibile osservare la morfologia superficiale del campione Ti-BSA (Figura 5.36 a) che si presenta liscio, dove è possibile notare la presenza di una contaminazione contenente Na che può essere confermata dallo spettro 1 (Figura 5.36 d). Inoltre, analizzando gli spettri EDS di area non è possibile individuare la presenza di materiale organico in forma estesa sulla superficie del campione (BSA).

5.3.3.7 Ti-BSA-C1 (C1=0.1 M)



Immagine 5.37: analisi FESEM sul campione Ti-BSA-C1, con analisi EDS su quattro zone di cui viene riportato lo spettro

Dall'Immagine 5.37 è possibile osservare la morfologia superficiale del campione Ti-BSA-C1 (Figura 5.37 a) che si presenta liscio con la presenza di macchie scure dovute alla presenza di C. Inoltre, sulla superficie è possibile notare la presenza di agglomerati proteici e di nanoparticelle di argento, messi in evidenza nell'ingrandimento in Figura 5.37 b). Dalle analisi morfologiche e di EDS è possibile osservare come le proteine (BSA) interagiscono con l'argento generando nanoparticelle in prossimità degli agglomerati di BSA. Infatti, il quantitativo di Ag aumenta sensibilmente in prossimità dell'agglomerato proteico (Figura 5.37 e) rispetto a quanto accade nel resto della superficie (Figure 5.37 d,f,g). Non è osservabile il layer discontinuo osservato sul campione CT-BSA-C1.

5.3.3.8 Ti-BSA-C2 (C2= 0.05 M)



Immagine 5.38: analisi FESEM sul campione Ti-BSA-C2, con analisi EDS su quattro zone di cui viene riportato lo spettro

Dall'Immagine 5.38 è possibile osservare la morfologia superficiale del campione Ti-BSA-C2 5.38(a) che si presenta liscio con la presenza di macchie scure dovute alla presenza di C. Inoltre, sulla superficie è possibile notare la presenza di agglomerati proteici e di nanoparticelle di argento, messi in evidenza nell'ingrandimento in Figura 5.38 b), con dimensioni confrontabili con quelli osservabili sul campione Ti-BSA-C1 (Figura 5.37), ma in numero superiore. Questo fenomeno dipende dal fatto che il campione Ti-BSA-C2 presenta una concentrazione inferiore di Ag rispetto al campione Ti-BSA-C1. Inoltre, è possibile notare come in presenza dell'agglomerato proteico (Figura 5.38 e) il quantitativo di Ag (6.57 atomic%) sia significativamente maggiore rispetto a quello del campione Ti-BSA-C1 (3.71 atomic%); mentre nel resto della superficie il quantitativo si mantiene ugualmente basso. Anche in questo caso non si osserva un layer discontinuo ricco in Ag e C, ma bensì gli aggregati.

5.3.3.9 Ті-BSА-СЗ (СЗ=0.01 М)



Immagine 5.39: analisi FESEM sul campione Ti-BSA-C3, con analisi EDS su quattro zone di cui viene riportato lo spettro

Dall'Immagine 5.39 è possibile osservare la morfologia superficiale del campione Ti-BSA-C3 (Figura 5.39 a) che si presenta liscio con la presenza di macchie scure dovute alla presenza di C. Inoltre, sulla superficie è possibile notare la presenza di agglomerati proteici e di nanoparticelle di argento, messi in evidenza nell'ingrandimento (Figura 5.39 b), con un numero e dimensioni sensibilmente superiori rispetto al campione Ti-BSA-C2 (Figura 5.38).

Questo fenomeno dipende dal fatto che il campione Ti-BSA-C3 presenta una concentrazione inferiore di Ag rispetto al campione Ti-BSA-C2 e più BSA che stabilizza le nanoparticelle di Ag.

6 CONCLUSIONI

Nello studio eseguito in questa tesi si è indagato l'adsorbimento di siero fetale bovino, soluzione proteica multicomponente, al fine di simulare un ambiente simil-fisiologico, su due tipologie di superfici: lega Ti-6Al-4V lucidata (Ti64) e lega Ti-6Al-4V sottoposta ad un trattamento chimico brevettato (CT), al fine di generare una superficie multifunzionale micro/nano-strutturata e bioattiva.

Dall'analisi topografica (LSCM) si evince la diversa topografia di CT rispetto a Ti64, ma non è possibile osservare la presenza di materiale proteico, in forma di aggregati, sulla superficie dei campioni CT-FBS e Ti-FBS. Mediante l'analisi del potenziale elettrico di superficie (KPFM), invece, emerge come sui campioni CT-FBS si viene a generare sulla superficie un layer proteico omogeneo, mentre su Ti-FBS si forma una superficie con adsorbimento disomogeneo.

Una differenza di comportamento fra il substrato Ti64 e quello CT è confermata dalle misure del potenziale zeta. Su entrambe le superfici, a seguito dell'adsorbimento proteico, si verifica una variazione del PI (misurato tramite titolazione del potenziale zeta), che si avvicina a quello dell'FBS, segno che l'adsorbimento ha avuto luogo. Le proteine adese sulla superficie di CT-FBS lasciano in parte esposto il substrato (il PI non coincide con quello del FBS) rispetto a Ti-FBS: questo risultato è coerente con le immagini di potenziale elettrico, dove inizialmente sul CT è presente un layer omogeneo e si desorbe parzialmente a pH acido, prima del PI, esponendo parzialmente il substrato.

A pH costante pari a 4, i campioni Ti64 e CT, presentano un andamento costante del potenziale zeta nel tempo (risultano stabili chimicamente e non reattive), con un valore negativo e con valore assoluto maggiore per CT che presenta un maggior numero di gruppi OH con comportamento acido. A seguito dell'adsorbimento, i campioni Ti-FBS e CT-FBS presentano inizialmente valori positivi di potenziale zeta (per la presenza dei gruppi amminici protonati delle proteine). La diminuzione del potenziale zeta da parte di CT-FBS, all'aumentare del tempo (per circa 1 h), è dovuto ad un progressivo distacco delle proteine ed alla parziale esposizione del substrato e delle sue cariche negative. La superficie Ti-FBS risulta invece chimicamente stabile a pH acido. Le analisi FTIR hanno evidenziato che, durante le misure di potenziale zeta, si verifica in ogni caso un parziale desorbimento delle proteine, ma si può concludere solo nel caso di CT-FBS, mantenuto a pH 4, questo causi

l'esposizione del substrato. Si ha quindi un diverso meccanismo di adsorbimento di alcune proteine del siero a seconda della chimica superficiale del substrato: nel caso della superficie CT si può presumere che il chemi-adsorbimento di tipo elettrostatico giochi un ruolo maggiore (per la presenza di gruppi funzionali con una carica netta come gli OH deprotonati), mentre nel caso di Ti64 si presume che l'adsorbimento sia prevalentemente di tipo fisico (forze deboli). Inoltre, il chemi-adsorbimento risulta selettivo verso alcune proteine in condizioni infiammatorie: le proteine selettivamente adsorbite (e non desorbite), a pH infiammatorio, su CT-FBS comprendono presumibilmente l'albumina, la cui azione anti-infiammatoria è nota.

A pH fisiologico, il potenziale zeta si mantiene praticamente costante per tutti i tipi di campione (CT, CT-FBS, Ti64, Ti-FBS): le superfici risultano chimicamente stabili, non reattive, e non si osservano fenomeni di desorbimento proteico tali da esporre i substrati. Tutte le superfici hanno potenziale zeta negativo, anche se, a seguito dell'adsorbimento proteico, i campioni presentano valori di potenziale zeta più elevati (meno negativi) rispetto al substrato, in quanto le proteine adese espongono sulla superficie anche gruppi basici protonati, oltre ai gruppi carbossilici deprotonati.

Nella regione acida delle curve di titolazione del potenziale zeta, si conferma una significativa differenza fra CT-FBS e Ti-FBS che può essere correlata al progressivo desorbimento di proteine nel caso di CT-FBS. Da un confronto con dati di letteratura, si può desumere che anche se l'albumina è una proteina presente in grande quantità nel siero, diverse proteine vengono adsorbite dal FBS, oltre all'albumina, e che queste hanno un adsorbimento diverso da quest'ultima: ad esempio, per quel che riguarda la superficie CT, l'albumina non viene rilasciata in ambiente acido, mentre altre proteine del FBS sì, ed alcune proteine del FBS presentano una struttura terziaria che espone esternamente i residui idrofobi piuttosto che quelli idrofili, come fa invece l'albumina.

Misure di bagnabilità mostrano che tutte le superfici sono idrofiliche e che la bagnabilità aumenta dopo adsorbimento di FBS, per l'esposizione di molti gruppi funzionali polari presenti nelle proteine. I campioni CT presentano una deviazione standard dei valori di angolo di contatto molto più bassa di quanto accade per Ti64: questo dato è in accordo con la presenza di un layer proteico continuo come osservato tramite KPFM.

Infine, sono state testate diverse tecniche per quantificare le proteine adsorbite: questa misura è risultata essere molto difficoltosa. Dalle analisi mediante anticorpi fluorescenti, si

è visto come i campioni CT sono in grado di adsorbire un quantitativo di proteine superiori rispetto a quanto accade per i campioni Ti64. A conferma che il trattamento chimico sia in grado di implementare l'adsorbimento proteico.

Non è stato possibile, durante lo svolgimento di questa tesi, riuscire ad individuare le modalità e l'orientamento con cui le proteine si adsorbono sulle differenti superfici. In quanto le analisi mediante ATR-FTIR si sono dimostrate non efficaci. In tal senso come prospettiva futura l'utilizzo di altre tecniche potrebbe portare ad una comprensione più chiara del fenomeno dell'adsorbimento proteico e delle interazioni chimico-fisiche con l'ambiente biologico.

Inoltre, per il futuro si potrebbero utilizzare tecniche per l'individuazione del contenuto proteico effettivamente adsorbito sulle superfici, visto l'utilizzo di una miscela complessa come FBS, unita a colture cellulari, così da analizzare al meglio l'effetto che hanno le differenti superfici.

Partendo dallo studio sull'adsorbimento proteico, si è affrontato il problema dell'adesione e la proliferazione batterica, utilizzando una funzionalizzazione delle superfici in esame, Ti64 e CT, con albumina ed argento al fine di renderle antibatteriche rimanendo comunque citocompatibili.

Le analisi mediante ATR-FTIR non si sono dimostrate adatte per l'individuazione di argento sulla superficie dei campioni. D'altra parte, mediante analisi FESEM-EDS è stata dimostrata la presenza di argento sulle superfici e si è notato un comportamento differente per le superfici Ti64 e CT. Nelle superfici CT si è notato come l'argento tenda a reagire con l'albumina aggregandosi e precipitando formando un layer irregolare e discontinuo, mentre sulle superfici Ti64 si è visto come l'argento interagisce con l'albumina formando nanoparticelle in prossimità di agglomerati di albumina. In entrambe le superfici, in particolare per il Ti64, si è notato come la formazione e la dimensione di nanoparticelle di argento sia inversamente proporzionale alla sua concentrazione; aspetto confermato dalla analisi mediante DLS nelle sospensioni a differente concentrazione di argento.

Un possibile proseguimento del lavoro di tesi potrebbe essere uno studio sulle differenti superfici trattate riguardante le proprietà antibatteriche e di citocompatibilità mostrate in presenza di colture batteriche e cellulari.

Bibliografia

- J. van der Valk *et al.*, "Fetal Bovine Serum (FBS): Past Present Future," *ALTEX*, vol. 35, no. 1, pp. 99–118, 2018, doi: 10.14573/altex.1705101.
- [2] "Siero fetale bovino", Accessed: Sep. 13, 2022. [Online]. Available: https://www.wikit.wiki/article/it/Siero fetale bovino
- [3] "Fetal Bovine Serum Labome https://www.labome.com/method/Fetal-Bovine-Serum.html".
- [4] "Siero Fetale Bovino', Wikipedia".
- [5] C. W. Boone, N. Mantel, T. D. Caruso, E. Kazam, and R. E. Stevensont, "QUALITY CONTROL STUDIES ON FETAL BOVINE SERUM USED IN TISSUE CULTURE."
- [6] J. van der Valk *et al.*, "Optimization of chemically defined cell culture media Replacing fetal bovine serum in mammalian in vitro methods," *Toxicology in Vitro*, vol. 24, no. 4. pp. 1053–1063, Jun. 2010. doi: 10.1016/j.tiv.2010.03.016.
- J. I. Heger *et al.*, "Human serum alters cell culture behavior and improves spheroid formation in comparison to fetal bovine serum," *Exp Cell Res*, vol. 365, no. 1, pp. 57–65, Apr. 2018, doi: 10.1016/j.yexcr.2018.02.017.
- [8] "T.Lindl, 'Composition of FBS.""
- [9] M. Rabe, D. Verdes, and S. Seeger, "Understanding protein adsorption phenomena at solid surfaces," *Adv Colloid Interface Sci*, vol. 162, no. 1–2, pp. 87–106, 2011, doi: 10.1016/j.cis.2010.12.007.
- [10] L. Vroman and A. L. Adams, "Adsorption of Proteins Out of Plasma and Solutions in Narrow Spaces," 1986.
- [11] Y. Yang, R. Cavin, and J. L. Ong, "Protein adsorption on titanium surfaces and their effect on osteoblast attachment," 2003.
- [12] R. Hewlett, M. D. M. Evans, W. R. Walshi, G. Johnsont, and J. G. Steele', "Mechanism of initial attachment of cells derived from human bone to commonly used prosthetic materials during cell culture."
- [13] K. L. Kilpadi, P.-L. Chang, and S. L. Bellis, "Hydroxylapatite binds more serum proteins, purified integrins, and osteoblast precursor cells than titanium or steel."
- [14] B. D. Bovan, T. W. Hummert, D. D. Dean, and Z. Schwartz, "Role of material surfaces in regulating bone and cartilage cell response," 1996.
- [15] G. Zhao, A. L. Raines, M. Wieland, Z. Schwartz, and 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, no. 18, pp. 2821–2829, 2007, doi: 10.1016/j.biomaterials.2007.02.024.

- [16] "Wessman SJ, Levings RL. Benefits and risks due to animal serum used in cell culture production. Dev Biol Stand. 1999;99:3-8. PMID: 10404869.".
- [17] J. van der Valk *et al.*, "The humane collection of fetal bovine serum and possibilities for serum-free cell and tissue culture," in *Toxicology in Vitro*, 2004, vol. 18, no. 1, pp. 1–12. doi: 10.1016/j.tiv.2003.08.009.
- [18] I. Dimarakis and N. Levicar, "Cell Culture Medium Composition and Translational Adult Bone Marrow-Derived Stem Cell Research," *Stem Cells*, vol. 24, no. 5, pp. 1407–1408, May 2006, doi: 10.1634/stemcells.2005-0577.
- [19] F. Mannello and G. A. Tonti, "Concise Review: No Breakthroughs for Human Mesenchymal and Embryonic Stem Cell Culture: Conditioned Medium, Feeder Layer, or Feeder-Free; Medium with Fetal Calf Serum, Human Serum, or Enriched Plasma; Serum-Free, Serum Replacement Nonconditioned Medium, or Ad Hoc Formula? All That Glitters Is Not Gold!," *Stem Cells*, vol. 25, no. 7, pp. 1603–1609, Jul. 2007, doi: 10.1634/stemcells.2007-0127.
- [20] A. Pisciotta *et al.*, "Human Serum Promotes Osteogenic Differentiation of Human Dental Pulp Stem Cells In Vitro and In Vivo," *PLoS One*, vol. 7, no. 11, Nov. 2012, doi: 10.1371/journal.pone.0050542.
- [21] N. Stute, K. Holtz, M. Bubenheim, C. Lange, F. Blake, and A. R. Zander, "Autologous serum for isolation and expansion of human mesenchymal stem cells for clinical use," 2004.
- [22] ~I A Rothschild, M. Oratz, and S. S. Schreiber, "Serum Albumin."
- [23] X. Zhang *et al.*, "Investigation of the Interaction of Naringin Palmitate with Bovine Serum Albumin: Spectroscopic Analysis and Molecular Docking," *PLoS One*, vol. 8, no. 3, Mar. 2013, doi: 10.1371/journal.pone.0059106.
- [24] "Bovine serum albumin https://en.wikipedia.org/wiki/Bovine_serum_albumin".
- [25] H. H. Cai, X. Zhong, P. H. Yang, W. Wei, J. Chen, and J. Cai, "Probing site-selective binding of rhodamine B to bovine serum albumin," *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp*, vol. 372, no. 1–3, pp. 35–40, Dec. 2010, doi: 10.1016/j.colsurfa.2010.09.017.
- [26] "BSA_Product_Information_Sheet.pdf».".
- [27] A. Jahanban-Esfahlan, A. Ostadrahimi, R. Jahanban-Esfahlan, L. Roufegarinejad, M. Tabibiazar, and R. Amarowicz, "Recent developments in the detection of bovine serum albumin," *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 138. Elsevier B.V., pp. 602–617, Oct. 01, 2019. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.07.096.
- [28] D. Sleep, "Albumin and its application in drug delivery," *Expert Opinion on Drug Delivery*, vol. 12, no. 5. Informa Healthcare, pp. 793–812, May 01, 2015. doi: 10.1517/17425247.2015.993313.
- [29] B. X. Huang, H. Y. Kim, and C. Dass, "Probing three-dimensional structure of bovine serum albumin by chemical cross-linking and mass spectrometry," *J Am Soc Mass Spectrom*, vol. 15, no. 8, pp. 1237–1247, Aug. 2004, doi: 10.1016/j.jasms.2004.05.004.

- [30] L. Parisi, A. Toffoli, B. Ghezzi, B. Mozzoni, S. Lumetti, and G. M. Macaluso, "A glance on the role of fibronectin in controlling cell response at biomaterial interface," *Japanese Dental Science Review*, vol. 56, no. 1. Elsevier Ltd, pp. 50–55, Dec. 01, 2020. doi: 10.1016/j.jdsr.2019.11.002.
- [31] R. Pankov and K. M. Yamada, "Fibronectin at a glance," *J Cell Sci*, vol. 115, no. 20, pp. 3861–3863, Oct. 2002, doi: 10.1242/jcs.00059.
- [32] "Fibronectine and Integrin https://www.ks.uiuc.edu/Research/fibronectin/".
- [33] K. Skorstengaard, M. S. Jensen, P. Sahl, T. E. Petersen, and S. Magnusson, "Complete primary structure of bovine plasma fibronectin," 1986.
- [34] E. G. Hayman and E. Ruoslahti, "DISTRIBUTION OF FETAL BOVINE SERUM FIBRONECTIN AND ENDOGENOUS RAT CELL FIBRONECTIN IN EXTRACELLULAR MATRIX."
- [35] K. Wang, C. Zhou, Y. Hong, and X. Zhang, "A review of protein adsorption on bioceramics," *Interface Focus*, vol. 2, no. 3. Royal Society, pp. 259–277, 2012. doi: 10.1098/rsfs.2012.0012.
- [36] P. Tengvall, "Protein interactions with biomaterials," in *Comprehensive Biomaterials II*, Elsevier, 2017, pp. 70–84. doi: 10.1016/B978-0-12-803581-8.10110-9.
- [37] T. S. Tsapikouni and Y. F. Missirlis, "Protein-material interactions: From micro-to-nano scale," *Materials Science and Engineering B: Solid-State Materials for Advanced Technology*, vol. 152, no. 1–3. pp. 2–7, Aug. 25, 2008. doi: 10.1016/j.mseb.2008.06.007.
- [38] W. Norde, "DRIVING FORCES FOR PROTEIN ADSORPTION AT SOLID SURFACES," 1996.
- [39] E. A. Vogler, "Protein adsorption in three dimensions," *Biomaterials*, vol. 33, no. 5, pp. 1201–1237, 2012, doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.10.059.
- [40] D. R. Schmidt, H. Waldeck, and W. J. Kao, "Protein Adsorption to Biomaterials," in *Biological Interactions on Materials Surfaces*, Springer US, 2009, pp. 1–18. doi: 10.1007/978-0-387-98161-1_1.
- [41] P. E. Scopelliti *et al.*, "The effect of surface nanometre-scale morphology on protein adsorption," *PLoS One*, vol. 5, no. 7, 2010, doi: 10.1371/journal.pone.0011862.
- [42] K. Rechendorff, M. B. Hovgaard, M. Foss, V. P. Zhdanov, and F. Besenbacher,
 "Enhancement of protein adsorption induced by surface roughness," *Langmuir*, vol. 22, no. 26, pp. 10885–10888, Dec. 2006, doi: 10.1021/la0621923.
- [43] P. Thevenot, W. Hu, and L. Tang, "Surface Chemistry Influences Implant Biocompatibility," 2008.
- [44] W. Norde, "My voyage of discovery to proteins in flatland ...and beyond," *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 61, no. 1. pp. 1–9, Jan. 15, 2008. doi: 10.1016/j.colsurfb.2007.09.029.

- [45] T. Kopac, K. Bozgeyik, and J. Yener, "Effect of pH and temperature on the adsorption of bovine serum albumin onto titanium dioxide," *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp*, vol. 322, no. 1–3, pp. 19–28, Jun. 2008, doi: 10.1016/j.colsurfa.2008.02.010.
- [46] M. Wahlgren and T. Arnebrant, "Protein adsorption to solid surfaces," 1991.
- [47] L. Tercinier, A. Ye, A. Singh, S. G. Anema, and H. Singh, "Effects of Ionic Strength, pH and Milk Serum Composition on Adsorption of Milk Proteins on to Hydroxyapatite Particles," *Food Biophys*, vol. 9, no. 4, pp. 341–348, Nov. 2014, doi: 10.1007/s11483-014-9360-5.
- [48] J. Barberi and S. Spriano, "Titanium and protein adsorption: An overview of mechanisms and effects of surface features," *Materials*, vol. 14, no. 7, 2021, doi: 10.3390/ma14071590.
- [49] "Table I. Selected Mechanical Requirements Properties of Titanium Bar for Implant* ASTM Grade." [Online]. Available: www.tms.org/jom.html
- [50] M. Textor, C. Sittig, V. Frauchiger, S. Tosatti, and D. M. Brunette, "7 Properties and Biological Significance of Natural Oxide Films on Titanium and Its Alloys."
- [51] K. Imamura, M. Shimomura, S. Nagai, M. Akamatsu, and K. Nakanishi, "Adsorption characteristics of various proteins to a titanium surface," *J Biosci Bioeng*, vol. 106, no. 3, pp. 273–278, Sep. 2008, doi: 10.1263/jbb.106.273.
- [52] O. R. Cámara, L. B. Avalle, and F. Y. Oliva, "Protein adsorption on titanium dioxide: Effects on double layer and semiconductor space charge region studied by EIS," *Electrochim Acta*, vol. 55, no. 15, pp. 4519–4528, Jun. 2010, doi: 10.1016/j.electacta.2010.03.003.
- [53] A. Klinger, D. Steinberg, D. Kohavi, and M. N. Sela, "Mechanism of adsorption of human albumin to titanium in vitro," 1997.
- [54] Y. Yang, R. Glover, and J. L. Ong, "Fibronectin adsorption on titanium surfaces and its effect on osteoblast precursor cell attachment," *Colloids Surf B Biointerfaces*, vol. 30, no. 4, pp. 291–297, Aug. 2003, doi: 10.1016/S0927-7765(03)00116-4.
- [55] Y. Kang, X. Li, Y. Tu, Q. Wang, and H. Ågren, "On the mechanism of protein adsorption onto hydroxylated and nonhydroxylated TiO2 surfaces," *Journal of Physical Chemistry C*, vol. 114, no. 34, pp. 14496–14502, Sep. 2010, doi: 10.1021/jp1037156.
- [56] D. D. Deligianni, N. Katsala, S. Ladas, D. Sotiropoulou, J. Amedee, and Y. F. Missirlis, "E!ect of surface roughness of the titanium alloy Ti}6Al}4V on human bone marrow cell response and on protein adsorption," 2001.
- [57] B. Feng, J. Weng, B. C. Yang, S. X. Qu, and X. D. Zhang, "Characterization of surface oxide films on titanium and adhesion of osteoblast," *Biomaterials*, vol. 24, no. 25, pp. 4663–4670, 2003, doi: 10.1016/S0142-9612(03)00366-1.
- [58] L. Parisi *et al.*, "Plasma proteins at the interface of dental implants modulate osteoblasts focal adhesions expression and cytoskeleton organization," *Nanomaterials*, vol. 9, no. 10, Oct. 2019, doi: 10.3390/nano9101407.
- [59] D. Kohavi, L. Badihi, G. Rosen, D. Steinberg, and M. N. Sela, "An in vivo method for measuring the adsorption of plasma proteins to titanium in humans," *Biofouling*, vol. 29, no. 10, pp. 1215–1224, Nov. 2013, doi: 10.1080/08927014.2013.834332.
- [60] M. N. Sela, L. Badihi, G. Rosen, D. Steinberg, and D. Kohavi, "Adsorption of human plasma proteins to modified titanium surfaces," *Clin Oral Implants Res*, vol. 18, no. 5, pp. 630–638, Oct. 2007, doi: 10.1111/j.1600-0501.2007.01373.x.
- [61] T. Hanawa, "Titanium-tissue interface reaction and its control with surface treatment," *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, vol. 7, no. JUL. Frontiers Media S.A., 2019. doi: 10.3389/fbioe.2019.00170.
- [62] L. Richert, F. Variola, F. Rosei, J. D. Wuest, and A. Nanci, "Adsorption of proteins on nanoporous Ti surfaces," *Surf Sci*, vol. 604, no. 17–18, pp. 1445–1451, Aug. 2010, doi: 10.1016/j.susc.2010.05.007.
- [63] S. Ferraris, A. Bobbio, M. Miola, and S. Spriano, "Micro- and nano-textured, hydrophilic and bioactive titanium dental implants," *Surf Coat Technol*, vol. 276, pp. 374–383, Aug. 2015, doi: 10.1016/j.surfcoat.2015.06.042.
- [64] Y. Yoneyama, T. Matsuno, Y. Hashimoto, and T. Satoh, "In vitro evaluation of H2O2 hydrothermal treatment of aged titanium surface to enhance biofunctional activity," *Dent Mater J*, vol. 32, no. 1, pp. 115–121, 2013, doi: 10.4012/dmj.2012-087.
- [65] "TEPZZ _47¥ B_T (54) MULTIFUNCTIONAL TITANIUM SURFACES FOR BONE INTEGRATION MULTIFUNKTIONALE TITANOBERFLÄCHEN ZUR KNOCHENINTEGRATION SURFACES DE TITANE MULTIFONCTIONNELLES POUR UNE INTÉGRATION DANS L'OS (84) Designated Contracting States: AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HR HU IE IS IT LI LT LU LV MC MT NL NO PL PT (43) Date of publication of application." [Online]. Available: http://onlinelibrary.wiley.com/
- [66] S. Ferraris *et al.*, "Multifunctional commercially pure titanium for the improvement of bone integration: Multiscale topography, wettability, corrosion resistance and biological functionalization," *Materials Science and Engineering C*, vol. 60, pp. 384–393, Mar. 2016, doi: 10.1016/j.msec.2015.11.049.
- [67] K. Imamura *et al.*, "Influences of properties of protein and adsorption surface on removal kinetics of protein adsorbed on metal surface by H2O2-electrolysis treatment," *J Colloid Interface Sci*, vol. 345, no. 2, pp. 474–480, May 2010, doi: 10.1016/j.jcis.2010.01.083.
- [68] D. Ionita, R. Popescu, T. Tite, and I. Demetrescu, "The behaviour of pure titanium in albumin solution," *Molecular Crystals and Liquid Crystals*, vol. 486, pp. 166/[1208]-174/[1216], 2008, doi: 10.1080/15421400801917957.
- [69] D. Kohavi, L. Badihi Hauslich, G. Rosen, D. Steinberg, and M. N. Sela, "Wettability versus electrostatic forces in fibronectin and albumin adsorption to titanium surfaces," *Clin Oral Implants Res*, vol. 24, no. 9, pp. 1002–1008, Sep. 2013, doi: 10.1111/j.1600-0501.2012.02508.x.
- [70] L. Burgos-Asperilla, M. C. García-Alonso, M. L. Escudero, and C. Alonso, "Study of the interaction of inorganic and organic compounds of cell culture medium with a Ti

surface," *Acta Biomater*, vol. 6, no. 2, pp. 652–661, 2010, doi: 10.1016/j.actbio.2009.06.019.

- [71] A. M. Sultan, Z. E. Hughes, and T. R. Walsh, "Effect of calcium ions on peptide adsorption at the aqueous rutile titania (110) interface," *Biointerphases*, vol. 13, no. 6, p. 06D403, Dec. 2018, doi: 10.1116/1.5046531.
- [72] N. Hori *et al.*, "Electrostatic control of protein adsorption on UV-photofunctionalized titanium," *Acta Biomater*, vol. 6, no. 10, pp. 4175–4180, 2010, doi: 10.1016/j.actbio.2010.05.006.
- [73] H. Felgueiras, V. Migonney, S. Sommerfeld, N. S. Murthy, and J. Kohn, "Competitive adsorption of albumin, fibronectin and collagen type I on different biomaterial surfaces: A QCM-D study," in *IFMBE Proceedings*, 2014, vol. 41, pp. 1597–1600. doi: 10.1007/978-3-319-00846-2_394.
- [74] L. Parisi *et al.*, "Titanium dental implants hydrophilicity promotes preferential serum fibronectin over albumin competitive adsorption modulating early cell response," *Materials Science and Engineering C*, vol. 117, Dec. 2020, doi: 10.1016/j.msec.2020.111307.
- [75] H. P. Felgueiras, N. S. Murthy, S. D. Sommerfeld, M. M. Brás, V. Migonney, and J. Kohn, "Competitive Adsorption of Plasma Proteins Using a Quartz Crystal Microbalance," *ACS Appl Mater Interfaces*, vol. 8, no. 21, pp. 13207–13217, Jun. 2016, doi: 10.1021/acsami.5b12600.
- [76] M. Pegueroles, C. Tonda-Turo, J. A. Planell, F. J. Gil, and C. Aparicio, "Adsorption of fibronectin, fibrinogen, and albumin on TiO2: Time-Resolved Kinetics, structural changes, and competition study," *Biointerphases*, vol. 7, no. 1–4, pp. 1–13, 2012, doi: 10.1007/s13758-012-0048-4.
- [77] C. G. Dodo, P. M. Senna, W. Custodio, A. F. Paes Leme, and A. A. del Bel Cury,
 "Proteome analysis of the plasma protein layer adsorbed to a rough titanium surface," *Biofouling*, vol. 29, no. 5, pp. 549–557, May 2013, doi: 10.1080/08927014.2013.787416.
- [78] M. Lorenzetti, G. Bernardini, T. Luxbacher, A. Santucci, S. Kobe, and S. Novak, "Surface properties of nanocrystalline TiO2 coatings in relation to the in vitro plasma protein adsorption," *Biomedical Materials (Bristol)*, vol. 10, no. 4, Aug. 2015, doi: 10.1088/1748-6041/10/4/045012.
- [79] F. Romero-Gavilán *et al.*, "Proteome analysis of human serum proteins adsorbed onto different titanium surfaces used in dental implants," *Biofouling*, vol. 33, no. 1, pp. 98– 111, Jan. 2017, doi: 10.1080/08927014.2016.1259414.
- [80] L. Chen *et al.*, "A Review on Antimicrobial Coatings for Biomaterial Implants and Medical Devices," *Journal of biomedical nanotechnology*, vol. 16, no. 6. NLM (Medline), pp. 789–809, Jun. 01, 2020. doi: 10.1166/jbn.2020.2942.
- [81] S. Veerachamy, T. Yarlagadda, G. Manivasagam, and P. K. Yarlagadda, "Bacterial adherence and biofilm formation on medical implants: A review," *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part H: Journal of Engineering in Medicine*, vol.

228, no. 10. SAGE Publications Ltd, pp. 1083–1099, Oct. 06, 2014. doi: 10.1177/0954411914556137.

- [82] R. Roy, M. Tiwari, G. Donelli, and V. Tiwari, "Strategies for combating bacterial biofilms: A focus on anti-biofilm agents and their mechanisms of action," *Virulence*, vol. 9, no. 1. Taylor and Francis Inc., pp. 522–554, Jan. 01, 2018. doi: 10.1080/21505594.2017.1313372.
- [83] A. Algburi, N. Comito, D. Kashtanov, L. M. T. Dicks, and M. L. Chikindas, "Control of biofilm formation: Antibiotics and beyond," *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 83, no. 3. American Society for Microbiology, 2017. doi: 10.1128/AEM.02508-16.
- [84] S. Chernousova and M. Epple, "Silver as antibacterial agent: Ion, nanoparticle, and metal," *Angewandte Chemie - International Edition*, vol. 52, no. 6. pp. 1636–1653, Feb. 04, 2013. doi: 10.1002/anie.201205923.
- [85] B. He, J. J. Tan, K. Y. Liew, and H. Liu, "Synthesis of size controlled Ag nanoparticles," *J Mol Catal A Chem*, vol. 221, no. 1–2, pp. 121–126, Nov. 2004, doi: 10.1016/j.molcata.2004.06.025.
- [86] A. Ravindran, T. C. Prathna, V. K. Verma, N. Chandrasekaran, and A. Mukherjee, "Bovine serum albumin mediated decrease in silver nanoparticle phytotoxicity: Root elongation and seed germination assay," *Toxicol Environ Chem*, vol. 94, no. 1, pp. 91–98, Jan. 2012, doi: 10.1080/02772248.2011.617034.
- [87] A. Cochis *et al.*, "Silver-doped keratin nanofibers preserve a titanium surface from biofilm contamination and favor soft-tissue healing," *J Mater Chem B*, vol. 5, no. 42, pp. 8366–8377, 2017, doi: 10.1039/c7tb01965c.
- [88] S. Ferraris *et al.*, "Multifunctional commercially pure titanium for the improvement of bone integration: Multiscale topography, wettability, corrosion resistance and biological functionalization," *Materials Science and Engineering C*, vol. 60, pp. 384–393, Mar. 2016, doi: 10.1016/j.msec.2015.11.049.
- [89] 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, no. 3, pp. 533–545, Mar. 2011, doi: 10.1007/s10856-011-4246-2.
- [90] "TEPZZ _47¥ B_T (54) MULTIFUNCTIONAL TITANIUM SURFACES FOR BONE INTEGRATION MULTIFUNKTIONALE TITANOBERFLÄCHEN ZUR KNOCHENINTEGRATION SURFACES DE TITANE MULTIFONCTIONNELLES POUR UNE INTÉGRATION DANS L'OS (84) Designated Contracting States: AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HR HU IE IS IT LI LT LU LV MC MT NL NO PL PT (43) Date of publication of application." [Online]. Available: http://onlinelibrary.wiley.com/
- [91] E. M. M. Sutrer and G. J. Goetz-Grandmont~, "THE BEHAVIOUR OF TITANIUM IN NITRIC-HYDROFLUORIC ACID SOLUTIONS," 1990.
- [92] K. Anselme, P. Davidson, A. M. Popa, M. Giazzon, M. Liley, and L. Ploux, "The interaction of cells and bacteria with surfaces structured at the nanometre scale," *Acta*

Biomaterialia, vol. 6, no. 10. Elsevier Ltd, pp. 3824–3846, 2010. doi: 10.1016/j.actbio.2010.04.001.

- [93] S. Ferraris, A. Venturello, M. Miola, A. Cochis, L. Rimondini, and S. Spriano,
 "Antibacterial and bioactive nanostructured titanium surfaces for bone integration," *Appl Surf Sci*, vol. 311, pp. 279–291, Aug. 2014, doi: 10.1016/j.apsusc.2014.05.056.
- [94] J. W. Park, J. H. Jang, C. S. Lee, and T. Hanawa, "Osteoconductivity of hydrophilic microstructured titanium implants with phosphate ion chemistry," *Acta Biomater*, vol. 5, no. 6, pp. 2311–2321, 2009, doi: 10.1016/j.actbio.2009.02.026.
- [95] S. Ferraris *et al.*, "Bioactive materials: In vitro investigation of different mechanisms of hydroxyapatite precipitation," *Acta Biomater*, vol. 102, pp. 468–480, Jan. 2020, doi: 10.1016/j.actbio.2019.11.024.
- [96] S. Ferraris, S. Spriano, C. L. Bianchi, C. Cassinelli, and E. Vernè, "Surface modification of Ti-6Al-4 v alloy for biomineralization and specific biological response: Part II, alkaline phosphatase grafting," *J Mater Sci Mater Med*, vol. 22, no. 8, pp. 1835–1842, Aug. 2011, doi: 10.1007/s10856-011-4365-9.
- [97] S. Spriano, S. Ferraris, G. Pan, C. Cassinelli, and E. Vernè, "Multifunctional titanium: Surface modification process and biological response," in *Journal of Mechanics in Medicine and Biology*, Apr. 2015, vol. 15, no. 2. doi: 10.1142/S0219519415400011.
- [98] "IsoMet High Speed Pro Precision Cutting Saw | Buehler. Buehler, an ITW Company https://www.buehler.com/isoMet-high-speed-pro.php.".
- [99] "LaboPol-2, Struers, Birmendorf, Svizzera http://www.priniotakis.gr/catalog2/product_info.php?language=en&products_id=54.".
- [100] "Lavatrice a Ultrasuoni 2200 S3 Soltec Ultrasonic cleaners http://www.soltec.it/d1/it/ultrasoniccleaner/18. .".
- [101] "Arium Pro Ultrapure Water Sytem https://www.sartorius.com/en/products/waterpurification/ultrapure-water-systems/arium-pro".
- [102] "CYTOSAFE-N2000 http://www.nuovafims.it/oldWebSite/cappe_flusso_laminare/citosafe.htm".
- [103] 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, no. 3, pp. 533–545, 2011, doi: 10.1007/s10856-011-4246-2.
- [104] P. K. Smith et al., "Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid'," 1985.
- [105] T. Fisher Scientific, "Preparation of the BCA working reagent (WR) Microplate procedure (sample to WR ratio = 1:8)." [Online]. Available: https://www.thermofisher.com/bcafaqs
- [106] Y. Liu, J. Wu, H. Zhang, Y. Wu, and C. Tang, "Covalent immobilization of the phytic acid-magnesium layer on titanium improves the osteogenic and antibacterial properties," *Colloids Surf B Biointerfaces*, vol. 203, Jul. 2021, doi: 10.1016/j.colsurfb.2021.111768.

- [107] K. Cai, J. Bossert, and K. D. Jandt, "Does the nanometre scale topography of titanium influence protein adsorption and cell proliferation?," *Colloids Surf B Biointerfaces*, vol. 49, no. 2, pp. 136–144, May 2006, doi: 10.1016/j.colsurfb.2006.02.016.
- [108] K. Cai, M. Frant, J. Bossert, G. Hildebrand, K. Liefeith, and K. D. Jandt, "Surface functionalized titanium thin films: Zeta-potential, protein adsorption and cell proliferation," *Colloids Surf B Biointerfaces*, vol. 50, no. 1, pp. 1–8, Jun. 2006, doi: 10.1016/j.colsurfb.2006.03.016.
- [109] C. Rösch *et al.*, "Albumin-lysozyme interactions: Cooperative adsorption on titanium and enzymatic activity," *Colloids Surf B Biointerfaces*, vol. 149, pp. 115–121, Jan. 2017, doi: 10.1016/j.colsurfb.2016.09.048.
- [110] Y. tong Yao *et al.*, "Effects of pore size and porosity on cytocompatibility and osteogenic differentiation of porous titanium," *J Mater Sci Mater Med*, vol. 32, no. 6, Jun. 2021, doi: 10.1007/s10856-021-06548-0.
- [111] K. Isoshima *et al.*, "The change of surface charge by lithium ion coating enhances protein adsorption on titanium," *J Mech Behav Biomed Mater*, vol. 100, Dec. 2019, doi: 10.1016/j.jmbbm.2019.103393.
- [112] F. Kratz *et al.*, "Cleaning of biomaterial surfaces: Protein removal by different solvents," *Colloids Surf B Biointerfaces*, vol. 128, pp. 28–35, Apr. 2015, doi: 10.1016/j.colsurfb.2015.02.016.
- [113] Z. Gong *et al.*, "Effects of diameters and crystals of titanium dioxide nanotube arrays on blood compatibility and endothelial cell behaviors," *Colloids Surf B Biointerfaces*, vol. 184, Dec. 2019, doi: 10.1016/j.colsurfb.2019.110521.
- [114] P. Ma *et al.*, "Effects of titanium with different micro/nano structures on the ability of osteoblasts to resist oxidative stress," *Materials Science and Engineering C*, vol. 123, Apr. 2021, doi: 10.1016/j.msec.2021.111969.
- [115] "Lettore multi-mode per micropiastre Synergy HTX https://www.ahsi.it/prodotto/synergy-htx".
- [116] E. F. Hartree, "Determination of Protein: A Modification of the Lowry Method That Gives a Linear Photometric Response," 1972.
- [117] "BT 210 BIOCHEMISTRY LAB Hartree-Lowry Method Of Protein Estimation Theory/Principle: Methodology: a)Materials Required."
- [118] "Shimadzu Europe UV-2600 Spectrophotometer http://www.speciation.net/Database/Instruments/Shimadzu-Europe/UV2600--Spectrophotometer-;i3076".
- [119] "Inoué, S. (2006). Foundations of Confocal Scanned Imaging in Light Microscopy. In: Pawley, J. (eds) Handbook Of Biological Confocal Microscopy. Springer, Boston, MA".
- [120] "Geometrical product specifications (GPS)-Surface texture: Areal-Part 600: Metrological characteristics for areal topography measuring methods INTERNATIONAL STANDARD ISO 25178-600 COPYRIGHT PROTECTED DOCUMENT," 2019.

- [121] "Angolo di contatto. Wikipedia".
- [122] "Potenziale zeta https://it.wikipedia.org/wiki/Potenziale_zeta".
- [123] "tecnologia farmaceutica http://www.galenotech.org/potzeta.htm".
- [124] S. Bhattacharjee, "DLS and zeta potential What they are and what they are not?," *Journal of Controlled Release*, vol. 235. Elsevier B.V., pp. 337–351, Aug. 10, 2016. doi: 10.1016/j.jconrel.2016.06.017.
- [125] "Particle size analyzer : Anton-Paar.com. Anton Paar https://www.antonpaar.com/corpen/products/details/litesizer/.".
- [126] S. Ferraris, M. Cazzola, V. Peretti, B. Stella, and S. Spriano, "Zeta potential measurements on solid surfaces for in Vitro biomaterials testing: Surface charge, reactivity upon contact with fluids and protein absorption," *Front Bioeng Biotechnol*, vol. 6, no. MAY, May 2018, doi: 10.3389/fbioe.2018.00060.
- [127] "The Zeta Potential for Solid Surface Analysis https://austria-forum.org/webbooks/zeta00en2014iicm".
- [128] "Microscopia a forza atomica https://it.wikipedia.org/wiki/Microscopio_a_forza_atomica".
- [129] W. Melitz, J. Shen, A. C. Kummel, and S. Lee, "Kelvin probe force microscopy and its application," *Surface Science Reports*, vol. 66, no. 1. Elsevier B.V., pp. 1–27, 2011. doi: 10.1016/j.surfrep.2010.10.001.
- [130] "kelvine probe force microscope https://en.wikipedia.org/wiki/Kelvin_probe_force_microscope".
- [131] "Sadewasser, S. & Glatzel, T. Kelvin probe force microscopy, cap. 1. vol. 8 (Springer, 2012).".
- [132] C. Berthomieu and R. Hienerwadel, "Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy," *Photosynthesis Research*, vol. 101, no. 2–3. pp. 157–170, Sep. 2009. doi: 10.1007/s11120-009-9439-x.
- [133] "Riflettanza totale attenuata (ATR) https://www.mt.com/it/it/home/products/L1_AutochemProducts/ReactIR/attenuated-totalreflectanceatr.html#:~:text=L'ATR%20%C3%A8%20una%20delle,di%20pressoch%C3%A9%20tut te%20le%20sostanze.".
- [134] D. M. Byler and H. Susi, "Examination of the Secondary Structure of Proteins by Deconvolved FTIR Spectra."
- [135] J. Xie, C. Riley, M. Kumar, and K. Chittur, "FTIR/ATR study of protein adsorption and brushite transformation to hydroxyapatite," 2002.
- [136] S. E. Glassford, B. Byrne, and S. G. Kazarian, "Recent applications of ATR FTIR spectroscopy and imaging to proteins," *Biochimica et Biophysica Acta Proteins and*

Proteomics, vol. 1834, no. 12. Elsevier B.V., pp. 2849–2858, 2013. doi: 10.1016/j.bbapap.2013.07.015.

- [137] M. Abd Mutalib, M. A. Rahman, M. H. D. Othman, A. F. Ismail, and J. Jaafar, "Scanning Electron Microscopy (SEM) and Energy-Dispersive X-Ray (EDX) Spectroscopy," in *Membrane Characterization*, Elsevier Inc., 2017, pp. 161–179. doi: 10.1016/B978-0-444-63776-5.00009-7.
- [138] W. Zhou, R. P. Apkarian, Z. Lin Wang, and D. Joy, "Fundamentals of Scanning Electron Microscopy."
- [139] M. J. Park, D. H. Kim, K. Park, D. Y. Jang, and D. C. Han, "Design and fabrication of a scanning electron microscope using a finite element analysis for electron optical system," *Journal of Mechanical Science and Technology*, vol. 22, no. 9, pp. 1734–1746, Sep. 2008, doi: 10.1007/s12206-008-0317-9.
- [140] J. Barberi, L. Mandrile, L. Napione, A.M. Giovannozzi, A.M. Rossi, A. Vitale, S. Yamaguchi, S. Spriano, "Albumin and fibronectin adsorption on treated titanium surfaces for osseointegration: An advanced investigation", doi: 10.1016/j.apsusc.2022.154023
- [141] V. Peretti, Tesi di dottorato, Politecnico di Torino, 2018
- [142] J. Barberi, Tesi di dottorato, Politecnico di Torino