

POLITECNICO DI TORINO



Corso di Laurea Magistrale in Ingegneria Biomedica

Dipartimento di Ingegneria Meccanica e Aereospaziale

Tesi di Laurea Magistrale

**Processo di funzionalizzazione e risposta
biologica della lega Ti6Al4V funzionalizzata
con polifenoli naturali**

Relatori

Prof.ssa Silvia Spriano

Dott.ssa Sara Ferraris

Candidato

Stefano Geraci

Aprile 2018

Abstract

Introduzione: La realizzazione di biomateriali funzionalizzati con molecole naturali rappresenta un'importante opportunità per la ricerca biomedica. L'accoppiamento fra materiali differenti permette di combinarne le proprietà, con possibili effetti sinergici sulla salute umana. I polifenoli naturali presentano proprietà funzionali interessanti per la salute come un effetto antiossidante, antibatterico e antitumorale, ma a causa della ridotta biodisponibilità e stabilità in ambiente fisiologico ci sono dei limiti nelle applicazioni terapeutiche. La funzionalizzazione di materiali impiantabili con i polifenoli permetterebbe di incrementarne le applicazioni cliniche.

Obiettivi: Investigare i fattori che influenzano il processo di funzionalizzazione superficiale di Ti6Al4V con polifenoli naturali, con particolare attenzione al ruolo svolto dal calcio. Parallelamente si è studiata la risposta biologica dei campioni trattati chimicamente e funzionalizzati con estratti del tè verde rispetto a cellule tumorali e sane.

Materiali: Campioni in lega Ti6Al4V lucidati (Liscio) e trattati chimicamente (MimeTi) sono stati utilizzati come substrato in questo lavoro. Le biomolecole impiegate per la funzionalizzazione dei campioni sono l'acido gallico (GA), usato come molecola modello, polifenoli naturali estratti dal tè verde (TPH) e vinacce di uva rossa Barbera (PPH).

Metodi: I polifenoli naturali sono stati estratti tramite estrazione idroalcolica. Il processo di funzionalizzazione è stato caratterizzato studiando sei diverse soluzioni, per determinare i fattori che influenzano il legame superficie/polifenoli. La funzionalizzazione avviene ponendo il substrato attivato in 5 ml di soluzione con polifenoli (1 mg/ml) per 3 h a 37 °C. La presenza e l'attività delle molecole sulla superficie dei campioni sono state valutate misurando l'angolo di contatto ed eseguendo il test di Folin&Ciocalteu. Ulteriori caratterizzazioni sono state ottenute dall'analisi XPS, fluorescenza e misura del potenziale zeta.

È stata valutata la risposta biologica di cellule sane (hFOB) e tumorali (U2OS) in contatto con il materiale trattato chimicamente e funzionalizzato con TPH, valutando la vitalità a 7 giorni e gli eventuali danni al DNA mediante i marcatori γ -H2ax, 53BP1, ciclina B1.

Risultati: La formazione di complessi calcio/gallato è riscontrabile nelle soluzioni che presentano ioni Ca^{2+} e pH neutro, mostrando un'intensa colorazione blu. Il test F&C ha evidenziato come i campioni funzionalizzati in presenza di ioni Ca^{2+} presentino concentrazioni equivalenti di GA maggiori. I campioni MimeTi presentano angoli di contatto nettamente inferiori rispetto ai campioni Liscio. Le analisi XPS e fluorescenza confermano l'avvenuta funzionalizzazione.

I campioni MimeTi hanno mostrato un effetto antitumorale non riscontrato in precedenza, mentre la funzionalizzazione con TPH non sembra avere un effetto rilevante.

Conclusioni: La presenza di ioni Ca^{2+} in soluzione permette di ottenere una maggior concentrazione di polifenoli sulla superficie dei campioni. La formazione di complessi calcio/gallato stabilizza le molecole favorendo la deposizione di uno strato superficiale.

La risposta biologica necessita di ulteriori accertamenti: la funzionalizzazione con polifenoli non sembra avere un effetto significativo sulle proprietà antitumorali rispetto ai campioni MimeTi, probabilmente per quantitativo presente che dovrà essere aumentato in lavori futuri.

Indice

Capitolo 1 – Polifenoli e fonti naturali	1
1.1 Generalità	1
1.2 Definizione e classificazione	1
1.2.1 Flavonoidi	3
1.2.1.1 Flavoni, flavonoli, flavanonoli e flavanoni	3
1.2.1.2 Isoflavonoidi e neoflavonoidi	4
1.2.1.3 Flavanoli	4
1.2.2 Antocianidine	5
1.2.3 Calconi	5
1.2.4 Acidi fenolici	5
1.2.4.1 Acido gallico	6
1.2.5 Stilbeni	6
1.2.6 Lignani	7
1.3 Biosintesi e fonti naturali	7
1.4 Polifenoli del tè verde	8
1.5 Polifenoli dell’uva	9
Capitolo 2 – Proprietà biologiche	10
2.1 Polifenoli e salute	10
2.1.1 Biodisponibilità	10
2.2 Attività antiossidante	11
2.3 Effetto antibatterico	12
2.4 Reazione con tessuto osseo	17
2.5 Patologie cardiovascolari	18
2.6 Patologie neurodegenerative	20
2.7 Effetto antitumorale	21
2.7.1 Attività pro-ossidante	22

Capitolo 3 – Interazioni con i metalli	24
3.1 Meccanismo di chelazione	24
3.2 Ferro	25
3.3 Metalli di transizione	26
3.4 Titanio	28
3.5 Metalli nobili	29
3.6 Metalli alcalini e alcalini terrosi	30
3.7 Terre rare	31
Capitolo 4 – Metodi e Materiali	32
4.1 Preparazione dei campioni	32
4.2 Polifenoli	33
4.2.1 Estrazione TPH	34
4.3 Funzionalizzazione con GA	35
4.3.1 Determinazione fattori implicati nel legame superficie/ polifenoli	35
4.4 Funzionalizzazione con polifenoli naturali	36
4.5 Test di Folin&Ciocalteu	39
4.5.1 Retta di calibrazione GA	39
4.5.2 Test F&C per campioni massivi	40
4.6 Spettrografia UV-vis	40
4.7 Potenziale zeta	40
4.8 Misura angolo di contatto	41
4.9 Analisi XPS	41
4.10 Test di fluorescenza	42
4.11 Test cellulari	43
4.11.1 Cellule	43
4.11.2 Valutazione citotossicità	43
4.11.3 Valutazione danni al DNA	44

Capitolo 5 – Risultati e Discussione	45
5.1 Analisi sulle soluzioni di funzionalizzazione	45
5.1.1 Test di F&C sulle soluzioni	47
5.2 Analisi sui campioni di Ti6Al4V	48
5.2.1 Angolo di contatto	48
5.2.2 Misurazione del pH	51
5.2.3 F&C per campioni massivi	51
5.3 Confronto MimeTi funzionalizzati con GA, TPH, PPH	53
5.3.1 Analisi XPS	54
5.3.2 Analisi fluorescenza	56
5.3.3 Potenziale zeta	56
5.3.3.1 Spettro UV-vis al variare del pH	58
5.4 Test cellulari	59
5.4.1 Valutazione danni al DNA	60
Conclusioni	62
Ringraziamenti	63
Bibliografia	64
Sitografia	82

Capitolo 1

Polifenoli e fonti naturali

1.1 Generalità

I polifenoli sono una vasta famiglia di sostanze fitochimiche costituita da più di 8000 molecole, che svolgono un importante ruolo nella difesa e crescita delle piante [1]. I composti fenolici contribuiscono alla pigmentazione dei vegetali, agiscono da fungicidi, pesticidi naturali e inibitori alimentari nei confronti degli insetti infestanti e svolgono un ruolo attrattivo per gli insetti impollinatori. L'attività antiossidante dei polifenoli protegge le piante dallo stress ossidativo e dall'esposizione alla luce dello spettro UV [2,3]. La concentrazione e la tipologia dei polifenoli variano secondo la famiglia del vegetale e sono influenzate da fattori ambientali sia biotici che abiotici [4].

L'interesse verso i polifenoli nasce in un primo momento per il loro utilizzo nel settore della concia delle pelli animali: alcune molecole, i tannini, hanno la proprietà di legare le proteine formando composti insolubili, evitando così la putrefazione della pelle e permettendone la conversione in cuoio [5].

Studi recenti si concentrano sulle ricadute positive per la salute. Alcune attività biologiche investigate riguardano le malattie neurodegenerative, le malattie cardiovascolari, diabete, effetto antibatterico, salute dentale, terapie antitumorali, riduzione stress ossidativo e rallentamento dell'invecchiamento [6-9].

1.2 Definizione e classificazione

Nell'industria cosmetica, parafarmaceutica e alimentare vengono comunemente considerati polifenoli i composti organici di origine naturale con una struttura aromatica contenente più gruppi ossidrilici [9].

Quideau et al. [10] propongono l'uso del termine polifenolo per definire molecole che presentano più di una unità fenolica e nessun sostituente azotato, derivanti esclusivamente dalle vie metaboliche dell'acido shikimico/fenilpropanoide e/o dei polichetidi. Questa definizione esclude gli acidi fenolici, inclusi quelli che presentano più di un gruppo ossidrilico sull'anello benzenico. In letteratura gli acidi fenolici sono utilizzati come molecole modello per descrivere le proprietà dei polifenoli, pertanto sono inclusi nella classificazione ivi proposta [11].

La classificazione dei polifenoli si basa principalmente sulla struttura dello scheletro carbonioso e sulla posizione e numero dei sostituenti (Fig. 1.1) [12].

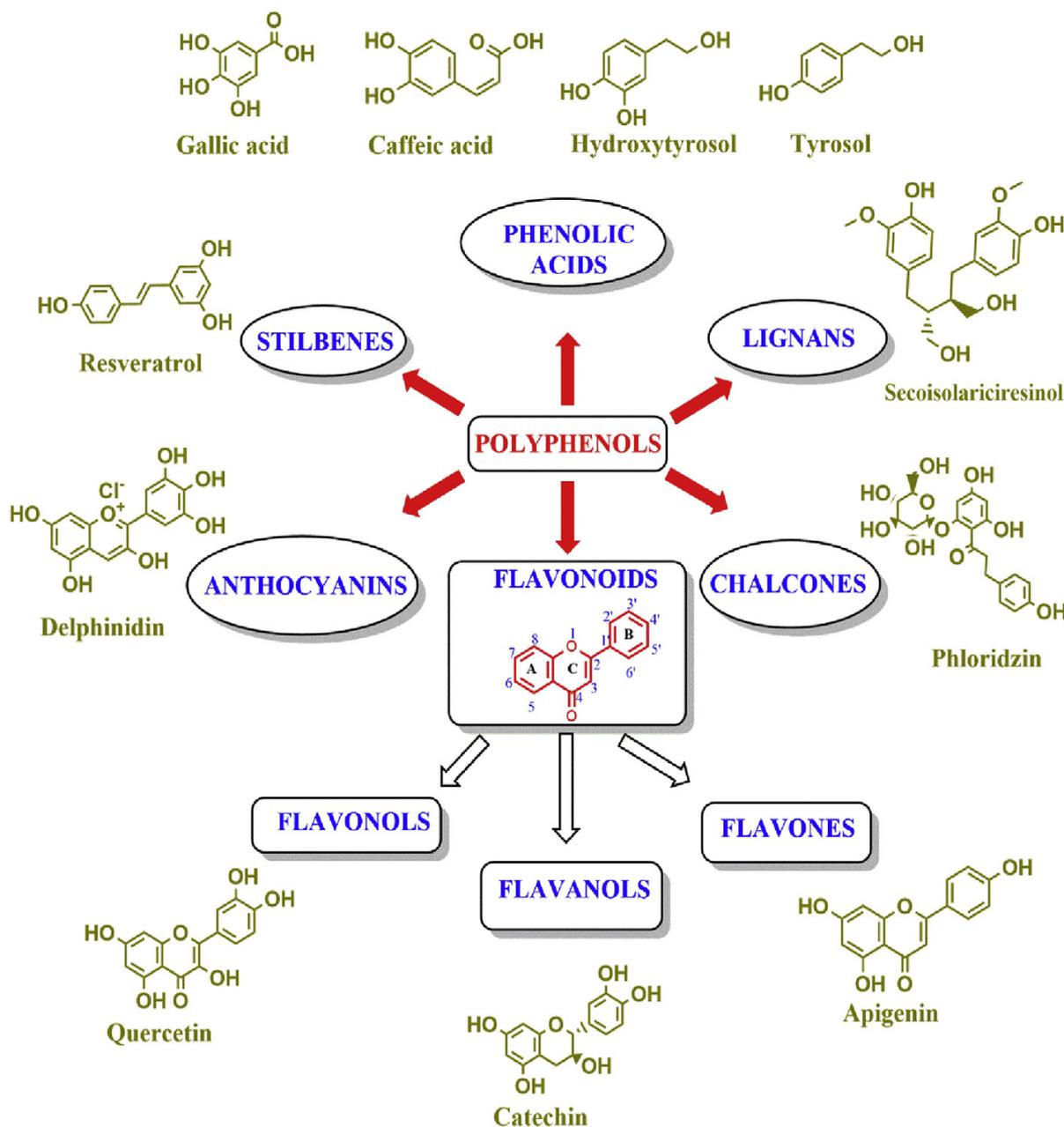


Fig. 1.1: Classificazione schematica dei polifenoli con la struttura chimica di alcune molecole rappresentative [7].

Una prima suddivisione avviene tra flavonoidi e non flavonoidi. I primi sono molecole caratterizzate dall'aver una struttura chimica a 15 atomi di carbonio e si suddividono in flavonoli, flavanoli, flavoni, isoflavonoidi, flavanonoli, flavanoni, flavan3,4dioli. Le antocianine e i calconi possono essere ricondotti alla classe dei flavonoidi ma presentano caratteristiche differenti [13]. La classe delle molecole non flavonoidi presenta strutture eterogenee: tra le molecole principali si ricordano gli acidi fenolici che posseggono un unico anello benzenico e sono suddivisibili in acidi benzoici e acidi idrossicinnamici; stilbeni e lignani che presentano due anelli aromatici uniti con catene differenti [1].

1.2.1 Flavonoidi

I flavonoidi hanno una struttura chimica $C_6-C_3-C_6$ che consiste in due anelli fenilici chiamati A e B uniti da un anello eterociclico 4H-pirano denominato C. Le differenti classi di flavonoidi sono legate a modifiche del livello di ossidazione, al numero e posizione dei sostituenti (Fig. 1.2) [14]. La biosintesi dei flavonoidi avviene per la condensazione della fenilalanina con tre molecole di malonil-CoA. I flavonoidi possono trovarsi in forma di aglicone o più frequentemente come glicoside con uno o più gruppi zuccherini [2].

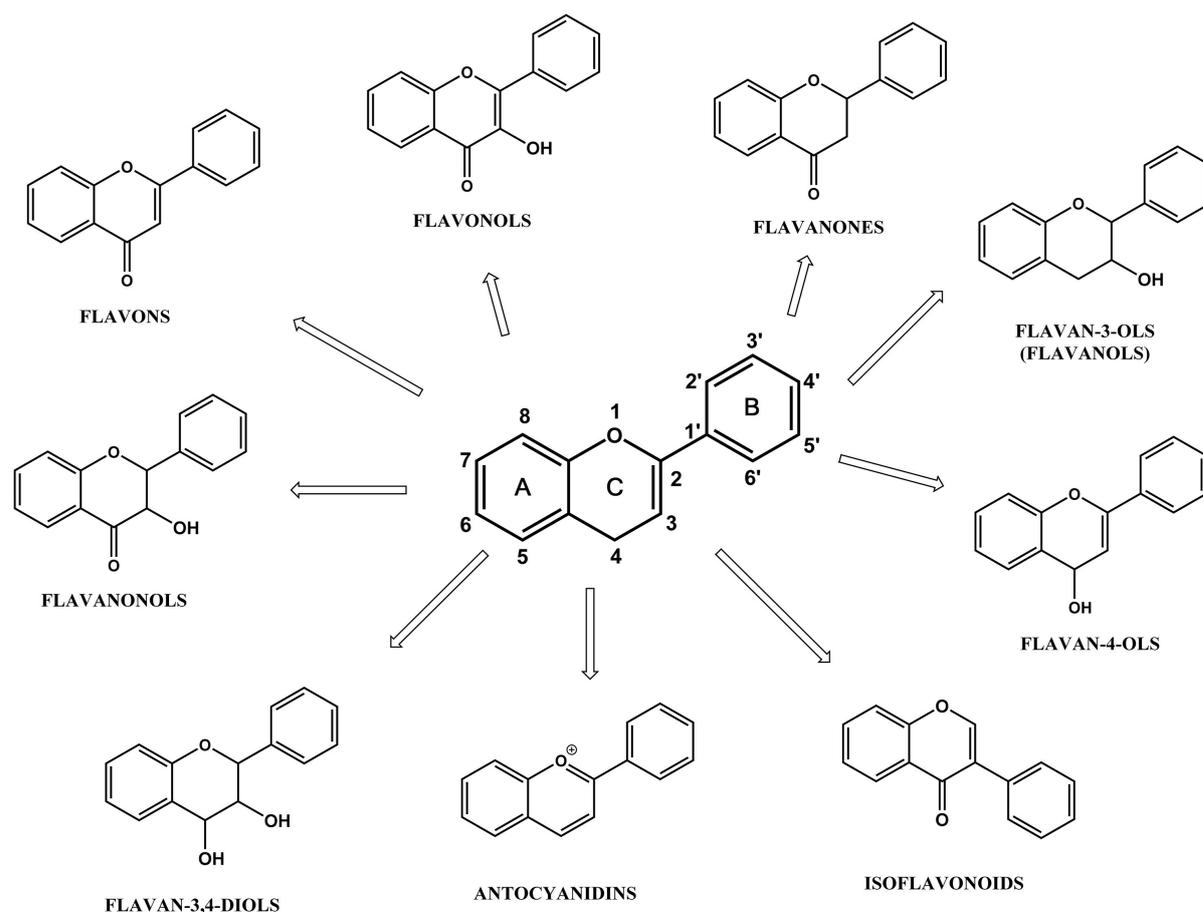


Fig. 1.2: Struttura base dei flavonoidi e delle differenti classi [14].

1.2.1.1 Flavoni, flavonoli, flavanonoli e flavanoni

Caratterizzati dal gruppo carbonilico in posizione C4 e dal collegamento tra l'anello B e l'anello eterociclico C in posizione C2, flavoni, flavonoli, flavanonoli e flavanoni sono un ampio sottogruppo dei polifenoli naturali. Tra i flavonoidi, i flavonoli sono le molecole maggiormente presenti in frutta e verdura [15]. Tra i flavanoli sono state studiate in particolare le proprietà biologiche della quercetina che è utilizzata per il trattamento di numerose patologie per via delle sue proprietà antiossidanti (Fig. 1.3) [16]. L'attività antiossidante è influenzata dalla

struttura, dal tipo dei sostituenti e dalla stabilità della molecola. I flavanoni risultano essere i flavonoidi più stabili all'esposizione luminosa [17].

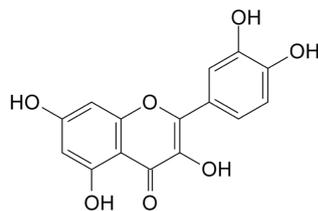


Fig. 1.3: *Struttura della quercetina [1].*

1.2.1.2 Isoflavonoidi e neoflavonoidi

A differenza degli altri flavonoidi, gli iso/neoflavonoidi non derivavano dalla struttura del 2-fenil-1,4-benzopyrone, ma rispettivamente dal 3-fenilcromone e della 4-fenilcumarina [18]. Gli isoflavonoidi sono abbondanti nei legumi e per la loro similarità con gli estrogeni vengono chiamati fitoestrogeni [19].

1.2.1.3 Flavanoli

I flavanoli o flavan-3-oli presentano alcune differenze rispetto agli altri flavonoidi, come l'assenza del carbonile C4 e il doppio legame C2-C3. A seconda della configurazione del gruppo OH in posizione C3 e dell'anello benzenico B in C2, i flavanoli vengono definiti catechine se sono molecole con configurazione *trans*, epicatechine se hanno una configurazione *cis*. Inoltre è possibile definire quattro diversi diastereoisomeri: (+)-catechina, (-)-catechina, (+)-epicatechina, (-)-epicatechina (Fig. 1.4) [19]. Il tè verde contiene un elevato numero di flavanoli tra i quali (-)-epigallocatechina gallato, (-)-epicatechina, (-)-epigallocatechina, (-)-epicatechina gallato e (+)-catechina [20].

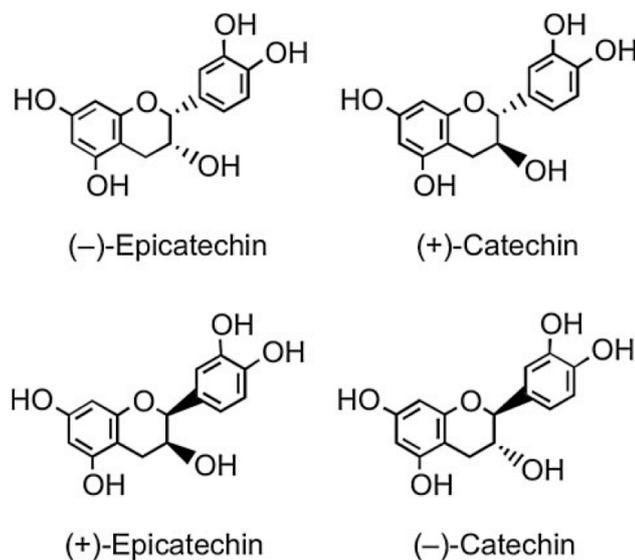


Fig. 1.4: *Strutture degli isomeri del flavan-3-olo [19].*

1.2.2 Antocianidine

Le antocianidine sono molecole cationiche che si trovano frequentemente nella forma glicosilata delle antocianine [21]. Le antocianine sono tra i più importanti pigmenti naturali e il loro colore è influenzato dal pH locale, variando da rosso in condizioni acide, viola-blu a pH intermedi, giallo in ambienti alcalini [22]. Le antocianine sono responsabili della variazione di colore nel vino rosso: nel vino giovane reagiscono con i flavanoli intensificando la colorazione rosso-violacea che muta in rosso-arancio con l'aumentare di molecole piranoantocianine derivate dalla fermentazione e invecchiamento del vino [23].

1.2.3 Calconi

I calconi sono formati da due anelli benzenici collegati da una catena a tre atomi di carbonio α - β insatura. La reattività del gruppo cheto etilenico fornisce al calcone diversi campi di attività, da catalizzatori di polimerizzazione a molecola fluorescente [24]. Essendo sintetizzabili attraverso differenti metodi chimici, nei confronti dei calconi si sta sviluppando un importante interesse farmacologico [25].

1.2.4 Acidi fenolici

Gli acidi fenolici sono una delle maggiori classi dei composti fenolici. La struttura chimica di base consiste in un unico anello benzenico cui è legato un gruppo carbossilico o una catena di tre atomi di carbonio, a seconda del sottogruppo di appartenenza tra acidi benzoici e acidi idrossicinnamici (Fig. 1.5) [26].

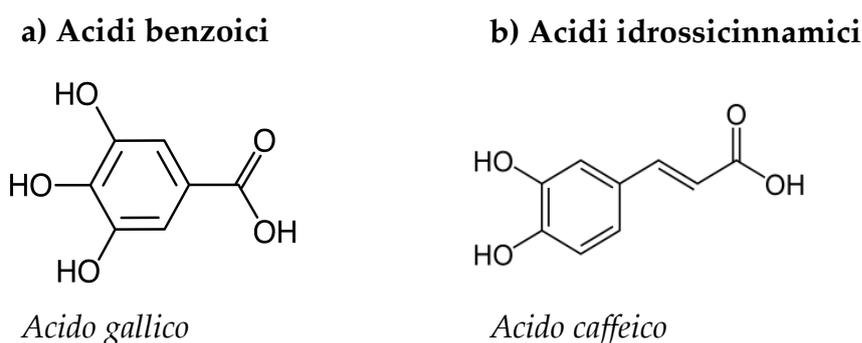


Fig. 1.5: Esempio di molecole di acidi fenolici: (a) acido gallico per gli acidi benzoici; (b) acido caffeico per gli acidi idrossicinnamici [II,III].

Le differenze tra i due gruppi non si limitano esclusivamente alla struttura: se gli acidi benzoici si trovano principalmente come glucosidi, gli acidi idrossicinnamici possono essere associati ad altre molecole formando esteri semplici come l'acido clorogenico, combinazione tra l'acido caffeico e l'acido chinico [27]. Bevande come

caffè e tè verde contengono concentrazioni significative di acidi fenolici, in particolare il caffè è ricco di acido caffeico mentre nel tè, sia verde sia nero, si registra la presenza dell'acido gallico sia come aglicone che per l'elevata concentrazione di molecole gallate [20,27].

1.2.4.1 Acido gallico

L'acido gallico (GA, acido 3,4,5-idrossibenzoico) è rappresentato in Fig. 1.5 (a). Appartiene al gruppo degli acidi benzoici ed è caratterizzato dalla presenza di tre gruppi ossidrilici come sostituenti sull'anello aromatico. La presenza di gruppi OH ravvicinati permette alla molecola di acido gallico di chelare ioni metallici; in particolare è nota la formazione di complessi ferro-gallati, alla base della produzione di alcuni tipi d'inchiostro [28,29]. Come per altri polifenoli la stabilità dell'acido gallico è maggiore in ambiente acido rispetto ad ambienti alcalini [30], con costante di dissociazione acida, legata alla deprotonazione del gruppo carbossilico, di 4.4 mentre i gruppi ossidrilici hanno pKa maggiori [31]. Presente in molti cibi e bevande derivate dalle piante, suscita interesse per le sue proprietà antiossidanti, antibatteriche e anticancerogene [11].

1.2.5 Stilbeni

Gli stilbeni sono molecole fenoliche con una struttura 1,2-difeniletilene che derivano dalla via metabolica del fenilpropanoide [32]. Sono fitoallessine che proteggono le piante da attacchi esogeni ed eliminano i composti tossici promuovendo la produzione di enzimi extracellulari [33]. Gli stilbeni si trovano in un numero limitato di piante commestibili ma data la loro presenza nell'uva e quindi nel vino, sono presenti all'interno della dieta mediterranea. In particolare sul resveratrolo, sostanza caratteristica del vino rosso, si concentrano diversi studi per indagare le sue proprietà biologiche (Fig. 1.6) [34-36].

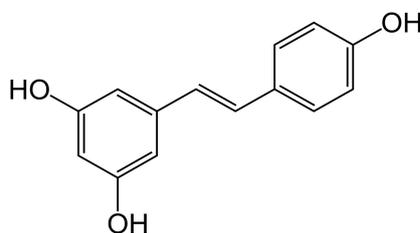


Fig. 1.6: Molecola di resveratrolo [IV].

1.2.6 Lignani

I lignani sono formati da dimeri di fenilpropano, uniti da un legame C-C tra gli atomi centrali della catena. Sono molecole presenti in diverse piante, in particolare nei semi di sesamo e lino [37]. Come gli isoflavonoidi, i lignani agiscono da fitoestrogeni, cioè da estrogeni non steroidei, modulando l'azione ormonale [38].

1.3 Biosintesi e fonti naturali

I polifenoli sono tra i principali prodotti del metabolismo secondario delle piante insieme ai terpenoidi e alcaloidi. Derivano principalmente da due vie metaboliche: la via dell'acido shikimico e la via dei poliacetati [4]. La principale via metabolica è quella dell'acido shikimico che permette di ottenere fenilpropanoidi, come gli acidi idrossicinnamici, convertendo precursori derivati dalla glicolisi in diversi aminoacidi aromatici tra i quali il più comune è la fenilalanina. I prodotti del meccanismo metabolico dello shikimato sono i precursori della via dei poliacetati, specificatamente la via dell'acido malonico, la quale induce la condensazione di un secondo anello aromatico sulla molecola. I flavonoidi derivano da questa via metabolica [39].

Verma et al. [4] identificano quattro fattori che influenzano la produzione e concentrazione dei polifenoli: (i) genetico, (ii) ontogenetico, (iii) morfogenetico, (iv) fattori ambientali. Famiglie di piante differenti non hanno le medesime concentrazioni e tipologie di polifenoli, ciò dipende dalla presenza di specifici enzimi metabolici che se pur simili non hanno un'identica funzione ed espressione genica[40]. L'ontogenetica consiste nella diversa espressione genica durante le fasi di maturazione di un organismo, mentre i fattori morfogenetici influiscono sulla distribuzione delle molecole in parti differenti della pianta [4,41]. L'ambiente circostante influenza l'ammontare dei polifenoli: i fattori possono essere biotici come la presenza di funghi e microorganismi, o abiotici come temperatura, altitudine, esposizione luminosa, metodi di coltura [42].

I composti fenolici si trovano in tutti gli alimenti di origine vegetale: frutta, verdura, cereali, legumi, cioccolato e bevande come vino, tè e caffè. Jiménez et al. [43] confrontando i dati estratti dal *Phenol-Explorer database* hanno identificato le principali fonti di polifenoli: spezie ed erbe aromatiche come chiodi di garofano (*eugenia caryophyllata*), menta piperita (*mentha x piperita*) e l'anice stellato (*illicium verum*) risultano avere il maggior ammontare di molecole polifenoliche in 100g di prodotto.

Tra le 100 principali fonti di polifenoli il gruppo maggiormente presente è quello delle piante aromatiche, seguito dalla frutta, semi, verdure, bevande non alcoliche, cereali, prodotti del cacao, bevande alcoliche e olii vegetali. Considerando le porzioni tipiche consigliate, sono le bacche del sambuco nero (*sambucus nigra*), dell'aronia (*aronia melanocarpa*) e del ribes nero (*ribes nigrum*) a contenere l'ammontare maggiore di polifenoli che arriva oltre i 1000 mg per porzione. Prodotti come la frutta rossa hanno un contenuto di polifenoli complesso ed eterogeneo rispetto ad altre tipi di piante [44].

L'approvvigionamento delle molecole polifenoliche avviene quasi esclusivamente tramite la dieta alimentare seguita. Tra le varie abitudini alimentari la dieta dell'Asia orientale e la dieta mediterranea ricoprono un importante ruolo per l'assunzione dei polifenoli. Le popolazioni asiatiche seguono un regime alimentare ricco di prodotti a base di soia e altri legumi ricchi di fitoestrogeni [19]. Studi analizzano la correlazione tra l'assunzione di tali prodotti e la riduzione del rischio d'insorgenza di patologie come il carcinoma mammario [45]. La dieta mediterranea si basa sull'abbondante consumo di frutta e verdura, l'utilizzo dell'olio d'oliva e la moderata assunzione di vino [46]. Si ipotizza che l'incidenza di patologie degenerative e a carico del sistema cardiocircolatorio risulti ridotta nelle popolazioni mediterranee proprio in virtù di assunzione di molecole antiossidanti [47].

1.4 Polifenoli del tè verde

Il tè verde è una bevanda non alcolica ottenuta dall'infuso delle foglie di *Camellia sinensis*, che presenta una complessa composizione chimica tra polifenoli, alcaloidi, caffeina, metalli, in particolare potassio e sodio, e altre molecole [48]. Le molecole principali sono i flavan-3oli contenuti fino a 200 mg/g nelle foglie essiccate [49]. A seconda della varietà di tè verde, varia la concentrazione di polifenoli pur rimanendo (-)-epigallocatechina gallato (EGCG, Fig. 1.7) la molecola presente a maggior concentrazione [50]. Altri flavanoli presenti sono: (-)-epicatechina, (-)-epigallocatechina, (-)-epicatechina gallato e (+)-catechina [20]. Anche i flavonoli sono presenti nel tè verde, in particolare la quercitina, il kaempferolo e la muricitina [51]. Gli effetti salutari del tè verde sono attribuiti alla presenza dei polifenoli, in particolare alle catechine. Studi *in vitro* e su modello animale indicano come le proprietà antiossidanti difendano l'organismo

dall'insorgenza di patologie croniche e degenerative come patologie del sistema cardiocircolatorio e diabete [52].

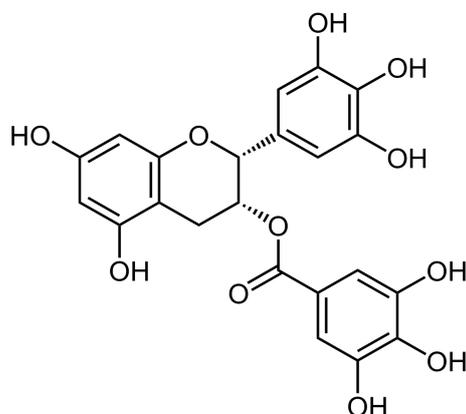


Fig. 1.7: *Struttura chimica della molecola gallato di (-)-epigallocatechina [V].*

1.5 Polifenoli dell'uva

L'uva è un frutto ricco di composti fenolici, distribuiti tra semi, polpa e buccia in tipologie e concentrazioni differenti così come nei prodotti derivati come il vino. Le proantocianidine, oligomeri di flavonoidi dette anche procianidine, sono le molecole maggiormente presenti nei semi e nella buccia, dove si trovano anche le antocianine, responsabili della colorazione, assenti nella polpa. Nel vino rosso le antocianine e i flavonoidi come la (+)-catechina, sono i due maggiori gruppi ma sono presenti anche acidi idrossicinnamici e molecole come il resveratrolo [53]. I polifenoli presenti nelle vinacce, i residui dell'uva dopo il processo di vinificazione, dipendono principalmente dalla varietà di uva utilizzata. Nell'uva rossa le antocianine raggiungono la maggior concentrazione, seguite da catechine, epigallocatechine, gallo catechine, procianidine B1-B2-B4-C1 [54]. È presente anche acido gallico sia in forma semplice che come galloglucoside [55]. I polifenoli dell'uva e del vino possono prevenire lo sviluppo di patologie modulando gli effetti delle specie ossidanti limitando lo stress ossidativo [35].

Capitolo 2

Proprietà biologiche

2.1 Polifenoli e salute

Gli effetti positivi sulla salute dovuti all'azione delle molecole polifenoliche, suscitano particolare interesse nella comunità scientifica. Secondo i dati degli archivi PubMed [VI], il numero di ricerche scientifiche sull'argomento, negli ultimi dieci anni, è aumentato da 827 del 2007 a 2580 nel 2017 (Fig 2.1).

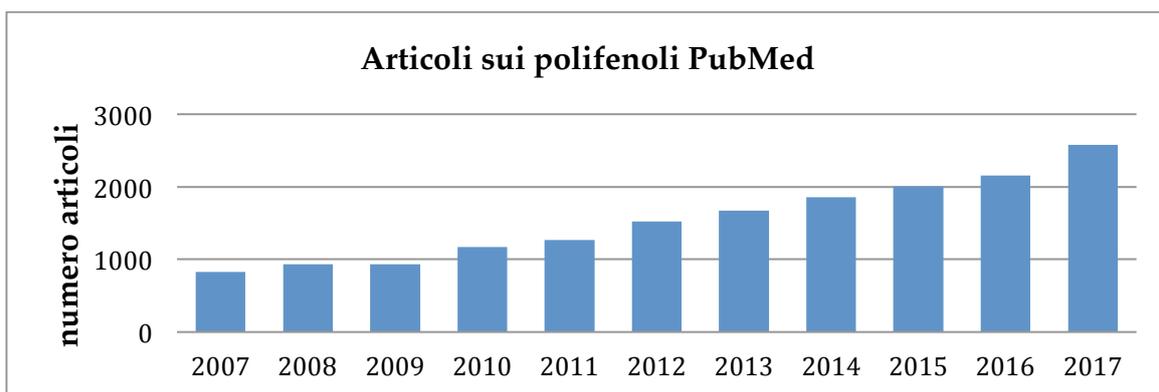


Fig. 2.1: Numero ricerche scientifiche sui polifenoli per anno secondo gli archivi PubMed. I dati sono stati ottenuti ricercando sul portale PubMed gli articoli con parola chiave "polyphenol" [VI].

Le proprietà biologiche dei polifenoli sono influenzate principalmente dal ruolo svolto dalle molecole nelle reazioni di ossidoriduzione. In particolare l'azione antiossidante è un fattore protettivo per le malattie cardiovascolari e le patologie neurodegenerative [6,7]. In alcune situazioni i polifenoli possono agire come molecole pro-ossidanti, pertanto è opportuno assicurarsi che questo effetto si verifichi esclusivamente in modo controllato per poterlo utilizzare come strategia antitumorale [56].

2.1.1 Biodisponibilità

L'azione dei polifenoli non dipende esclusivamente dalla concentrazione delle molecole nel cibo, ma anche dalla biodisponibilità al seguito dell'assorbimento, metabolizzazione e della concentrazione sanguigna [57]. Studi *in vitro* dimostrano l'efficacia dell'azione dei composti fenolici, ma le concentrazioni necessarie per un effetto terapeutico non sono spesso raggiungibili *in vivo* esclusivamente attraverso una dieta, quindi l'azione supplementare di farmaci risulta necessaria [58]. I polifenoli posseggono un'elevata affinità con le proteine, formando legami sia covalenti sia non-covalenti e complessi insolubili, motivo per la limitata biodisponibilità delle

molecole assunte attraverso l'alimentazione [59]. In particolare le interazioni con le proteine salivari, come l' α -amilasi, o proteine sanguigne, come l'albumina, influenzano la biodisponibilità. Molecole con massa molecolare maggiore hanno una maggiore affinità con le proteine per via delle interazioni idrofobiche che si instaurano [60].

La funzionalizzazione di materiali con polifenoli è una strategia, riportata in letteratura, per ottimizzare un rilascio controllato di molecole, aumentarne la biodisponibilità e per ottenere effetti sinergici tra le proprietà del biomateriale e delle molecole fenoliche. Esempi di substrati utilizzati sono nano-particelle d'oro [61], vetri bioattivi [11,62-64] e chitosano [65,66].

2.2 Attività antiossidante

Lo stress ossidativo è alla base di differenti patologie che causano un deterioramento delle condizioni di salute. Le specie reattive dell'ossigeno (ROS) sono le principali molecole ossidanti, sono prodotte fisiologicamente dall'organismo ma in determinati casi possono causare danni a carico delle cellule. Le ROS reagiscono ossidando le membrane cellulare di acidi grassi poli-insaturi, causando invecchiamento cellulare e possono danneggiare il DNA inducendo l'apoptosi [67].

I polifenoli sono antiossidanti naturali che agiscono da riducenti nelle reazioni con le specie ossidanti. L'attività riducente dipende dalla struttura chimica: la presenza di elettroni delocalizzati sull'anello aromatico permette, qualora si formassero radicali PhO^\bullet , di stabilizzarli per effetto della risonanza bloccando così la propagazione radicalica [68]. Sono due le meccaniche ipotizzate: il trasferimento di un atomo d'idrogeno, trasferimento di un singolo elettrone (Fig. 2.2).

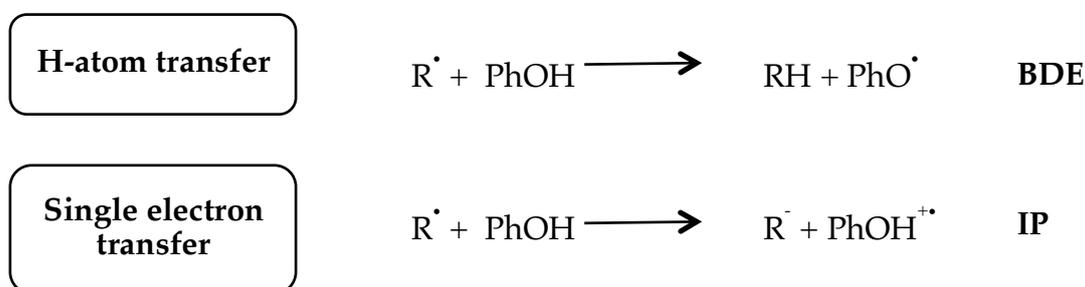


Fig. 2.2: Il trasferimento di un atomo d'idrogeno (H-atom transfer) e il trasferimento singolo elettrone (Single electron transfer) sono due meccaniche antiossidanti dei polifenoli [10].

La reazione di trasferimento di un atomo d'idrogeno (*H-atom transfer*) è legata alla capacità dei gruppi funzionali ossidrilici di donare un atomo H. L'efficacia dell'azione antiossidante risiede nella rapidità di donazione dell'atomo H e dalla stabilità del radicale fenolico PhO[•] che si forma. La stabilità dipende dalla presenza, numero e posizione di ulteriori gruppi ossidrilici [10]. Leopoldini et al. [69] evidenziano come la presenza di gruppi OH in posizione orto e/o para aumenti l'attività antiossidante, in quanto favorisce il trasferimento di atomi H agendo sull'energia di dissociazione del legame (BDE). Il meccanismo *H-atom transfer* è governato dalla BDE relativa ai gruppi ossidrilici dei polifenoli.

L'assenza di un gruppo OH in posizione orto sull'anello B, determina una scarsa efficacia del meccanismo *H-atom transfer* per molecole come il kaempferolo, la quale attività antiossidante è legata al secondo meccanismo: trasferimento di un singolo elettrone. Il meccanismo *single electron transfer* dipende dal potenziale di ionizzazione (IP) e dalla stabilità del radicale cationico PhOH^{•+} che si forma dopo la reazione con una specie ossidante. Un'estesa delocalizzazione e coniugazione degli elettroni π , permette di abbassare il valore di IP, facilitando la donazione elettronica, come accade per il resveratrolo [69].

Inoltre i polifenoli agiscono come fattore di prevenzione dello stress ossidativo andando a inibire o rallentare la produzione di ROS. Sono un insieme di meccanismi che comprendono l'azione inibitoria di enzimi come la xantina ossidasi [70], o la chelazione di ioni metallici che potrebbero agire come iniziatori di una catena radicalica [71].

2.3 Effetto antibatterico

L'azione antimicrobica dei polifenoli può essere ricondotta sia a un'attività diretta contro gli agenti patogeni sia all'inibizione di alcuni fattori virulenti [72]. L'effetto antibatterico diretto si riscontra nei casi in cui le molecole interagiscono direttamente con le cellule batteriche danneggiandole: è il caso della quercetina che è in grado di inibire l'attività dell'enzima DNA girasi del batterio *E. coli*, un enzima presente nelle cellule procariote ma non nell'essere umano [73]. Anche ECGC mostra proprietà antibatteriche nei confronti dell' *E. coli* inibendo alcuni fattori virulenti come la mobilità di gruppo del batterio e la formazione del biofilm [72]. È importante evitare la formazione del biofilm batterico, in quanto esso protegge i batteri da numerosi fattori esterni, permettendoli di moltiplicarsi anche in ambienti aggressivi, facilitando la colonizzazione e il progredire e il

cronicizzarsi delle infezioni (Fig. 2.3) [74]. In generale le catechine mostrano una maggiore efficacia verso i batteri Gram-positivi rispetto ai Gram-negativi per via della barriera lipopolisaccaride [75]. L'effetto antibatterico potrebbe derivare dall'interazione tra le cariche negative dei polifenoli e la carica positiva che caratterizza la membrana lipidica dei batteri Gram-positivi [76]. Le catechine estratte dal tè verde hanno mostrato *in vitro* efficacia nel prevenire l'adesione dello *S. mutans*, batterio responsabile della formazione delle carie. La loro azione antibatterica è da attribuire alla denaturazione di ligandi proteici senza mostrare un'elevata potenzialità battericida [77]. I polifenoli del tè verde agiscono prevalentemente sulla membrana batterica, modificandone lo spessore e struttura. L'interazione è governata dal numero di gruppi OH sull'anello B e dalla presenza di sostituenti gallati [78].

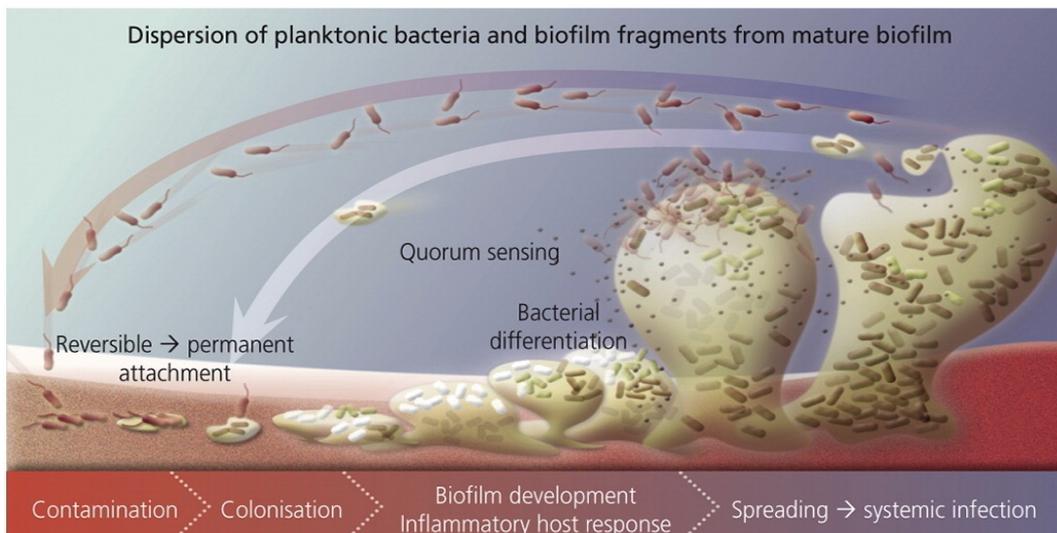


Fig 2.3: Fasi di formazione di biofilm batterico [74].

L'acido gallico comparato con le catechine mostra di avere un maggior effetto inibitorio nei confronti del *H. pylori* ed *E. coli* [79,80]. L'acido gallico diminuisce l'adesione alle superfici dello *S. aureus* [81]; alcuni polifenoli si sono inoltre mostrati efficaci contro alcuni ceppi di questo batterio resistenti agli antibiotici [82]. Secondo uno studio di Borges et al. [83] l'acido gallico e l'acido ferulico sono in grado di indurre cambiamenti irreversibili alle membrane di diversi batteri; queste modifiche vanno dall'alterazione della carica superficiale di membrana alla formazione di pori sulla parete cellulare con conseguente perdita di costituenti intracellulari. Molecole fenoliche estratte dal vino, compreso l'acido gallico, hanno mostrato un effetto antibatterico contro alcuni patogeni respiratori, in particolare verso alcuni batteri Gram-negativi [84].

È possibile avere un effetto sinergico o additivo con l'ampicillina e la penicillina G contro *S. aureus* meticillina resistente, ipotizzando un'interazione non competitiva al medesimo sito sulla membrana batterica. È stata invece osservata un'interazione antagonista fra estratti del tè e tetraciclina e gentamicina [76].

Papuc et al. [85] riportano i meccanismi di azione antibatterica, mostrati nella seguente tabella (Tabella 2.1).

Tabella 2.1: Meccanismi dell'attività antibatterica dei polifenoli [85].

Antibacterial activity mechanism	Polyphenols interaction site	Consequence	Example	Sources	
Interaction with bacterial cell wall	Outer membrane (OM)	Releasing of the LPS; reduction of the tolerance of the cell to both high ionic strength and low osmotic pressure	EGCG is able to bind directly to the peptidoglycan from <i>S. aureus</i>	Zhao and others (2002)	
			Cloudberry, raspberry, black currant and blueberry are able to release LPS from <i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium VTT E-981151 and <i>Salmonella enterica</i> serovar Infantis VTT E-97738	Nohynek and others (2006)	
	Peptidoglycan	Binding to peptidoglycan, affects cell integrity and so, the reduction of tolerance of the cell to both high ionic strength and low osmotic pressure	EGCG bind peptidoglycan from <i>S. aureus</i> EGCG bind peptidoglycan from Gram-positive and Gram-negative bacteria producing aggregates (<i>Streptococcus mutans</i>) and grooves (<i>Pseudomonas aeruginosa</i>)	Zhao and others (2002) Yoda and others (2004); Cui and others (2012)	
	LPS	Binding and neutralization of LPS with inhibitory effect on LPS binding to cells	Cranberry, tea, and grapes proanthocyanidins interaction with Gram-negative bacteria	Delehanty and others (2007)	
Interaction with the cell membrane	Bilayer	Irreversible changes in membrane properties and membrane integrity	Binding of LPS through Lipid A component	Cranberry, grape juice, green tea proanthocyanidins interaction with LPS	Johnson and others (2008)
			Fimbriae	Attachment inhibition	Purified proanthocyanidins extracted from cranberry inhibited the adherence of P-fimbriated <i>Escherichia coli</i> to cell surfaces
Prevention and control of the biofilm	Adhesines Polyphenols – Quorum sensing	Inhibition of bacterial attachment Inhibit biofilm maturation	Tea polyphenols produce cell membrane permeability increasing, disruption of cell membrane and releasing of small cellular molecules in <i>Serratia marcescens</i>	Yi and others (2014)	
			Gallic acid and ferulic acid compromise the integrity of cytoplasm membrane of <i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. aureus</i> and <i>L. monocytogenes</i> with leakage of cellular constituents	Borges and others (2013)	
Prevention and control of the biofilm	Adhesines Polyphenols – Quorum sensing	Inhibition of bacterial attachment Inhibit biofilm maturation	Gallic acid inhibited the adhesion of <i>P. aeruginosa</i> , <i>L. monocytogenes</i> and <i>S. aureus</i> ; ferulic acid inhibited the adhesion of <i>P. aeruginosa</i> and <i>S. aureus</i>	Borges and others (2012)	
			Gallic acid caused total inhibition of swimming (<i>L. monocytogenes</i>) and swarming (<i>L. monocytogenes</i> and <i>E. coli</i>) motilities; Ferulic acid caused total inhibition of swimming (<i>L. monocytogenes</i>) and swarming (<i>L. monocytogenes</i> and <i>E. coli</i>) motilities	Borges and others (2012)	
			<i>Capparis spinosa</i> methanolic extract inhibited swimming and swarming motility of <i>S. marcescens</i> , PAO1, <i>E. coli</i> and <i>P. mirabilis</i>	Abraham and others (2011)	
			<i>Rosa rugosa</i> tea inhibited swarming motility and biofilm formation of <i>Chromobacterium violaceum</i> O26	Zhang and others (2014)	
			Cranberry proanthocyanidins, in concentration of 100 µg/mL, limited motility, particular swarming motility, and reduced biofilm formation of <i>P. aeruginosa</i> , without down-regulated proteins related to flagella and type IV pili	Urley and others (2014)	
			Quercetin significantly inhibited the swimming and swarming behavior of <i>P. aeruginosa</i> and <i>Y. enterocolitica</i>	Gopu and others (2015)	
			Apigenin lower the amounts of extracellular alkali-soluble glucans, intracellular iodophilic polysaccharides and fructans in <i>Streptococcus mutant</i> biofilm	Koo and others (2003)	
			<i>Capparis spinosa</i> methanolic extract inhibited exopolysaccharide production in <i>Escherichia coli</i> , <i>Proteus mirabilis</i> , <i>Serratia marcescens</i> and PAO1	Abraham and others (2011)	

continua a pagina seguente

Antibacterial activity mechanism	Polyphenols interaction site	Consequence	Example	Sources
Microbial enzyme inhibition and substrate deprivation	Microbial enzymes	Inhibit bacterial sporulation	Quercetin inhibited exopolysaccharide production in <i>K. pneumoniae</i> , <i>P. aeruginosa</i> , and <i>Y. enterocolitica</i>	Gopu and others (2015)
			Ferulic acid completely inhibit colony spreading of <i>S. aureus</i>	Borges and others (2012)
		Decrease cyclic-di-AMP levels	Tannic acid, theaflavin-3'-gallate and theaflavin-3,3'-digallate inhibited <i>B. subtilis</i> cyclic di-AMP synthase	Opoku-Temeng and Sintim (2016)
			Decrease enzyme activity	Fumarate reductase flavoprotein, dihydroorotate dehydrogenase, dihydrofolate reductase, NADH-dependent enoyl ACP-reductase, DNA gyrase subunit from <i>E. coli</i> are target for 19 flavonoids
			Hyaluronic acid-splitting enzymes Hyal B – from <i>Streptococcus agalactiae</i> – was inhibited by flavonoids	Hertel and others (2006)
			Licochalcone A and C from the roots of <i>Glycyrrhiza inflata</i> inhibited the electron transport chain of the bacterial respiration chain	Haraguchi and others (1998)
			Tannins inhibiting the oxidative phosphorylation	Scalbert (1991)
	Tannins inhibited NADH-ubiquinone-1-oxidoreductase activity of <i>Paracoccus denitrificans</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Photobacterium phosphoreum</i> , and <i>Thermus thermophilus</i> HB-8	Konishi and others (1993)		
Protein regulation	Repression/ stimulation of the bacterial genes	Down-regulated proteins	Treatment of <i>P. aeruginosa</i> with cranberry proanthocyanidins down-regulated 2 proteins implicated in ATP synthesis, a cytochrome C (PA2482), hypothetical protein PA2481 and proteins involved in DNA and RNA synthesis (Top A, Rp1 C, and Mfd), and acid cycle proteins (subunits of acetyl-CoA carboxylase and fumarase)	Ulrey and others (2014)
			Apple flavonoid phloretin control <i>E. coli</i> O157:H7 biofilm formation by repressing curli genes <i>csgA</i> and <i>csgB</i>	Lee and others (2011)
		Up-regulated proteins	Treatment of <i>P. aeruginosa</i> with cranberry proanthocyanidins up-regulated 12 proteins related to iron siderophores or cation transporters (such as PchD, PvdN, PhuS), 5 proteins involved in amino acids synthesis (such as PA0335, PA2044, HutG), proteins involved in response to stress (such as OsmC, SodM), and a hypothetical protein involved in flavonoid metabolism (PA3450)	Ulrey and others (2014)
Metal iron deprivation due to chelating ability	Ionic iron	Iron immobilization	Gallotanins from mango (<i>Mangifera indica</i>) exhibit antibacterial activity against Gram-positive food spoilage bacteria and Gram-negative <i>E. coli</i> , due their ability to chelate iron	Engels and others (2009)
			Parsley (<i>Petroselinum crispum</i>) and cilantro (<i>Coriandrum sativum</i>) polyphenols rich extracts inhibited <i>Bacillus subtilis</i> and <i>Escherichia coli</i> due to ferrous sequestering activity	Wong and Kitts (2006)
			Cranberry proanthocyanidins lower the abundance of cytochromes in <i>P. aeruginosa</i> .	Ulrey and others (2014)

La funzionalizzazione di superfici di materiali impiantabili con molecole antibatteriche permetterebbe di limitare l'uso di antibiotici per ridurre i casi di fallimento settico. In ambito ortopedico le infezioni articolari periprotetische (PJI) hanno un'incidenza tra 1-2% [86], mentre in campo dentale si registrano perimplantiti in circa il 14% delle protesi [87].

Trentin et al. [88] hanno funzionalizzato campioni in Permanox con tannini condensati, ottenendo effetti antiadesivi contro alcuni batteri Gram-positivi (*S. epidermidis*, *S. aureus*, *E. faecalis*). La funzionalizzazione avviene ponendo 300 µL di

una soluzione contenente polifenoli sul campione messo in rotazione. Hanno utilizzato una soluzione di acetone al 70% con concentrazione 4 mg/ml. Successivamente hanno effettuato un trattamento termico a 80 °C per 2 h, ottenendo un film di 39 ± 13 nm. Per via della poca stabilità del rivestimento, questo metodo di funzionalizzazione è adatto per materiali che necessitano esposizioni limitate.

La funzionalizzazione di polistirene con acido tannico e pirogallolo ha mostrato proprietà antiadesive sia contro batteri Gram-Positivi sia Gram-Negativi, senza rivelare citotossicità sui fibroblasti. Il rivestimento avviene spontaneamente ponendo il materiale in soluzione contenente polifenoli, quando il pH è moderatamente alcalino (pH 7,8) e in presenza di ossigeno disciolto. Le esatte meccaniche della formazione del rivestimento devono essere ulteriormente chiarite, ma gli autori ipotizzano che una polimerizzazione in soluzione diminuisca la solubilità delle molecole favorendo la deposizione di un film sulla superficie del materiale [89].

Si può sfruttare la funzionalizzazione con polifenoli per realizzare metodi di sintesi, economici ed ecologici, per la deposizione di materiali con proprietà antibatteriche sulla superficie di biovetri. Per permettere il legame polifenolo/vetro, si deve prima attivare il substrato con una serie di lavaggi in vasca a ultrasuoni: cinque minuti in acetone per rimuovere le contaminazioni superficiali e tre volte (cinque minuti l'una) in acqua bidistillata per esporre i gruppi ossidrilici. La funzionalizzazione avviene attraverso immersione in soluzioni contenenti polifenoli (1 mg/ml per GA e polifenoli estratti dal tè verde, 5 mg/ml per polifenoli estratti dalla buccia dell'uva rossa) per 3 h a 37 °C [62, 63]. La concentrazione superficiale di polifenoli dipende dalla reattività del vetro. Sulla superficie dei vetri funzionalizzati, può avvenire una riduzione *in situ* di nanoparticelle di argento in una soluzione acquosa 0,005 M di AgNO_3 , che nel caso di utilizzo di estratti del tè verde ha permesso di ottenere risultati statisticamente significativi contro *S. aureus* [64].

L'accoppiamento con biomateriali non ha sempre mostrato risultati migliorativi, come nel caso chitosano\molecole polifenoliche, dove due diversi studi hanno riscontrato sia un'elevata attività antimicrobica [65], che nessun effetto inibitorio significativo [66].

2.4 Reazioni con tessuto osseo

Dudarić et al. [90] identificano cinque diversi meccanismi con i quali i polifenoli difendono la salute delle ossa. Il riassorbimento osseo è ridotto grazie (i) all'azione antiossidante e (ii) anti-infiammatoria dovuta all'inibizione dell'attività di enzimi pro-infiammatori. (iii) Favoriscono l'osteoblastogenesi e (iv) riducono il differenziamento degli osteoclasti agendo sulle ROS, molecole che promuovono l'attività osteoclastica sia direttamente che indirettamente. Inoltre è riscontrabile (v) un'azione osteoimmunologica (Fig. 2.4).

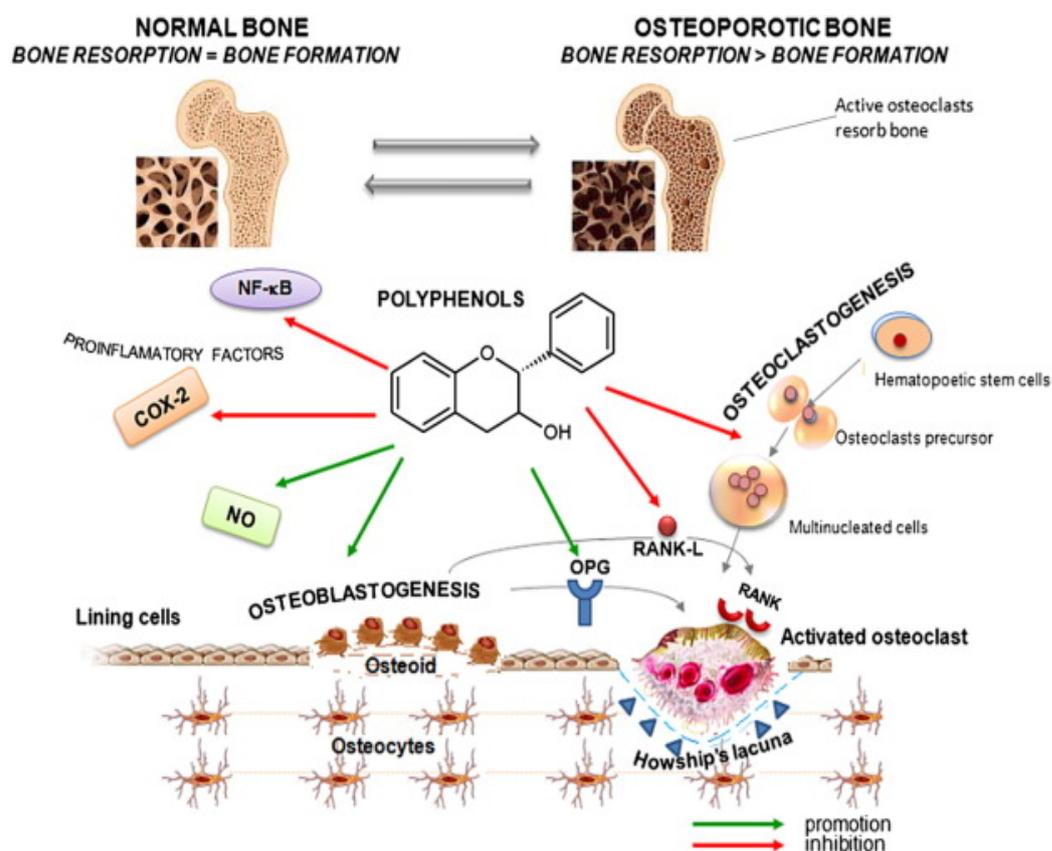


Fig. 2.4: Ruolo dei polifenoli sulla dinamica del tessuto osseo [90].

Il benessere delle ossa è regolato dal bilanciamento dell'attività degli osteoblasti e degli osteoclasti. L'equilibrio si mantiene stabile a seconda del rapporto tra il ligando RANKL, che attraverso l'attivazione del fattore di trascrizione NF-κB stimola il differenziamento degli osteoclasti, e la glicoproteina osteoprotegerina OPG prodotta dagli osteoblasti. Infiammazione e attività ormonale sono alcuni fattori che influenzano l'equilibrio RANKL/OPG. I polifenoli modulando la risposta infiammatoria limitano l'espressione di RANKL mentre molecole come i lignani e isoflavonoidi possono stimolare la produzione di OPG imitando l'attività degli estrogeni [91]. Inoltre risulta che i flavonoidi inibiscono la proliferazione

delle cellule staminali mesenchimali, inducendo il differenziamento in osteoblasti [92]. In presenza di stress ossidativo il differenziamento e l'attività degli osteoclasti sono stimulate e aumenta il rischio di insorgenza di osteoporosi. L'utilizzo di polifenoli estratti da foglie di tè verde, in modelli murini, ha permesso di ottenere un minor deterioramento della micro-architettura ossea, aumentandone l'integrità [93]. De Amorim et al. [94] hanno riscontrato come il tè verde possa migliorare il contenuto minerale delle ossa in pazienti diabetici. Il diabete comporta alterazioni del metabolismo del fosforo e del calcio, riduce la sintesi del collagene, vitamina D e ormone paratiroideo, aumentando il rischio di osteoporosi e fratture ossee. Nei pazienti, che hanno assunto per venti settimane capsule contenenti un estratto di tè verde, è aumentata la componente minerale delle ossa senza però un aumento della densità. Gli autori si spiegano tale risultato considerando l'andamento intermittente dell'ormone paratiroideo, che contrariamente ad una somministrazione continuativa, contribuisce ad aumentare il volume di osso spongioso.

L'acido gallico può influenzare la formazione d'idrossiapatite (HAP), regolando la morfologia e la struttura del cristallo. Il processo di crescita del cristallo di HAP risulta limitato principalmente in direzione 0 0 2. Il meccanismo di azione è probabilmente legato all'interazione tra l'acido gallico e gli ioni Ca^{2+} [95].

2.5 Patologie cardiovascolari

L'impatto positivo sulla prevenzione delle patologie cardiovascolari (CVD), è legato all'azione dei polifenoli su fattori di rischio come la pressione sanguigna, l'aggregazione piastrinica, le condizioni della parete endoteliale e le reazioni con i lipidi [6]. Un ruolo principale è ricoperto dall'azione anti-infiammatoria, sia per eventi acuti sia cronici, legata all'attività antiossidante e di regolazione cellulare. Quercetina e resveratrolo mostrano un'azione inibitoria di molecole pro-infiammatorie come $TNF\alpha$ e IL-6, limitando l'azione infiammatoria dovuta all'interazione tra pareti endoteliali, monociti e linfociti T [96]. Flavonoidi e altri polifenoli estratti dall'uva hanno la proprietà di inibire l'ossidazione del colesterolo LDL, che attraverso l'alterazione delle funzioni endoteliali e l'attivazione piastrinica, promuove l'insorgenza dell'aterosclerosi [97]. Il resveratrolo possiede numerose potenzialità per la prevenzione di CVD, impedendo l'ossidazione lipidica e proteica. Il suo effetto protettivo è attribuibile sia alla propria attività antiossidante, sia alla sovraregolazione di antiossidanti

cellulari endogeni, come gli enzimi superossido dismutasi e catalasi. L'aumento dei livelli di glutazione, così come il mantenimento in forma ridotta delle proteine tioliche delle membrane cellulari, sono ulteriori effetti protettivi [98]. Inoltre l'assunzione di vino rosso, cioccolato e prodotti derivati dalla soia, permette di agire sull'espressione dell'ossido nitrico sintasi endoteliale (eNOS), un enzima che produce monossido di azoto (NO), molecola con proprietà vaso dilatatorie e che inibisce l'adesione e l'aggregazione piastrinica (Fig. 2.5) [99].

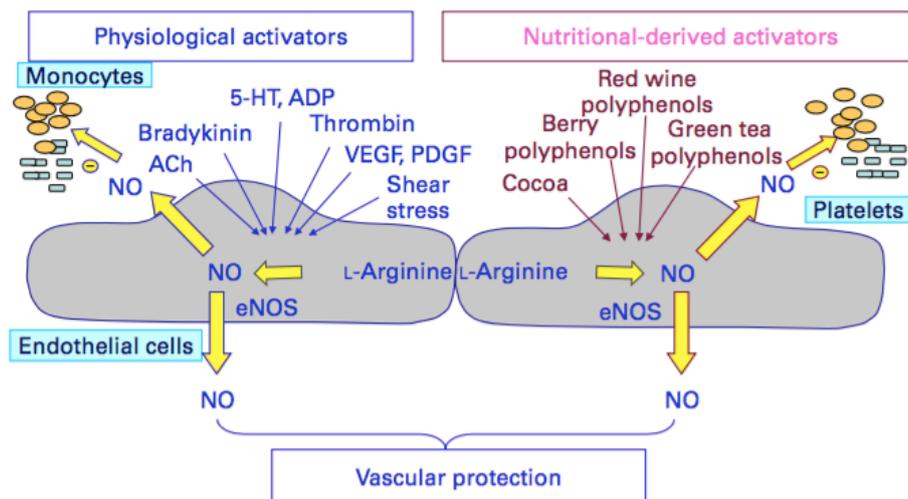


Fig. 2.5: La formazione di NO endoteliale è influenzata sia da stimoli fisiologici sia da attivatori derivati da prodotti vegetali [100].

La fisiologica attività della parete endoteliale è favorita anche dalla produzione del fattore iperpolarizzante di derivazione endoteliale (EDHF), molecola che è in grado di determinare una vasodilatazione dovuta al rilassamento delle cellule muscolari lisce [100]. L'interazione con specifici target molecolari attiva cascate di segnalazione, in grado di produrre effetti inibitori e detossificanti sulle ROS. I target principali sui quali risulta una maggiore attivazione sono il recettore estrogenico alfa ($ER\alpha$), la sirtuina 1 (SIRT1) e AMPK [100]. Hugel et al. [101] identificano, in una fitoterapia a base di prodotti vegetali, una strategia contro l'ipertensione. Comparando diversi flavonoidi, i procianidini oligomerici mostrano un maggior raggio di azione per regolare la pressione sanguigna, riducendo l'espressione del fattore vasocostrittore ET-1 e riducendo l'attivita della metalloproteasi ACE. Gli estratti del te verde preservano dal rischio d'insorgenza di CVD regolando la produzione di sostanze vasocostrittrici come l'angiotensina II e vasodilatatrici come EDHF [102]. L'assunzione di GA, da parte d'individui affetti dal diabete mellitico di tipo II, diminuisce il livello di proteine C reattive,

indicatori di rischio per le CVD, riducendo anche l'ossidazione del colesterolo LDL [103].

I polifenoli agiscono come fattori protettivi in aree ischemiche, favorendo l'angiogenesi e preservando le unità neurovascolari a seguito di un ictus. La loro azione permette di ridurre il volume infartuale, l'apoptosi cellulare, l'edema e i processi ossidativi lipidici e mitocondriali [104].

2.6 Patologie neurodegenerative

Malattie neurodegenerative, come l'Alzheimer e la malattia di Parkinson, presentano un'eziopatogenesi differente ma si possono tracciare caratteristiche comuni dei meccanismi molecolari alla base dell'insorgenza delle patologie (Fig. 2.6) [105].

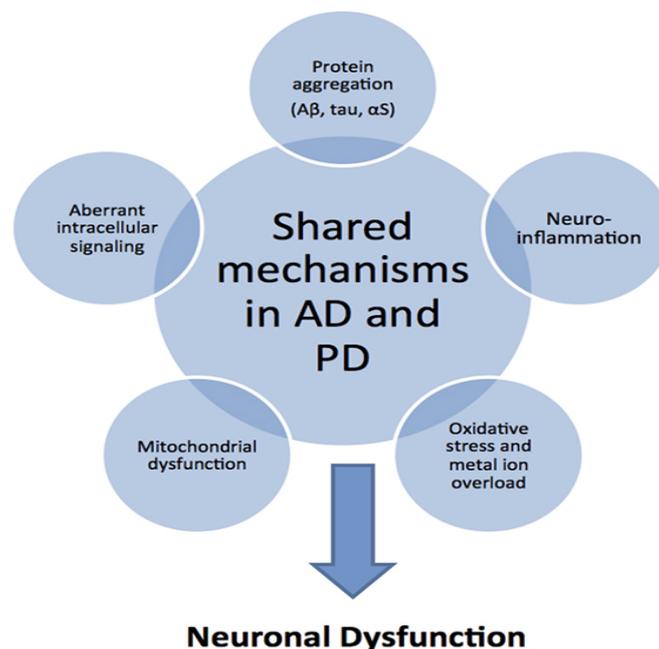


Fig. 2.6: Meccanismi molecolari comuni tra la malattia di Alzheimer e la malattia di Parkinson [105].

La presenza di stress ossidativo causato da un'eccessiva concentrazione di ioni metallici, processi infiammatori a carico delle unità neurali, il deposito di aggregati proteici e conseguente formazione di placche amiloidi, disfunzione mitocondriale e alterazione dei meccanismi di segnalazione cellulare sono tutti fattori che contribuiscono all'insorgenza di patologie neurodegenerative [105]. I polifenoli hanno mostrato proprietà tali da poter considerarli validi strumenti per la prevenzione dei meccanismi molecolari alla base dello sviluppo delle malattie a carico del sistema cerebrale. Il potenziale antiossidante dei polifenoli permette di regolare la concentrazione delle ROS, limitando i possibili danni causati

dall'ossidazione di proteine, lipidi e acidi nucleici [7]. Estratti da semi dell'uva hanno la capacità di inibire la formazione di oligomeri di betamiloide diminuendone la concentrazione a livello cerebrale [106], inoltre EGCG mostra potenzialità nel disaggregare placche proteiche, riducendone la stabilità strutturale attraverso interazioni idrofobiche, aromatiche e legami idrogeno [107]. Sárközi et al. [108] hanno somministrato tè verde a topi nei quali è stato indotto stress ossidativo per esposizione a fumi di diossido di manganese. L'attività antiossidante ha permesso di ridurre i cambiamenti sull'attività corticale spontanea ed evocata, pur non influenzando la tossicità delle nanopolveri.

Il resveratrolo modula l'attività MAPK/ERK nelle cellule neurali, stimolando la produzione di neurotrofina, molecola importante per il mantenimento della plasticità sinaptica [109]. Test *in vitro* su colture neurogliali murine hanno mostrato effetti neuroprotettivi, data l'inibizione dell'attivazione microgliale con conseguente diminuzione degli effetti pro-infiammatori, dovuta alla riduzione della NADPH ossidasi e sottoregolazione del fattore nucleare κ B [110].

Pur oltrepassando la barriera ematoencefalica, considerando la ridotta biodisponibilità *in vivo*, alcuni effetti possono non raggiungere l'efficacia terapeutica. In alcuni casi non c'è un'univocità sull'effetto neuroprotettivo, come per l'attivazione del fattore HIF-1 α . Questo fattore protegge la cellula durante fasi d'ipossia, modificando l'angiogenesi, la glicolisi e il metabolismo del ferro. Alcuni autori riportano come i polifenoli possano attivare l'azione di HIF-1 α attraverso un aumento del livello del mRNA associato, altri invece riscontrano un effetto inibitorio dannoso per la salute cellulare [111].

2.7 Effetto antitumorale

Nell'ottica di prevenzione primaria contro le neoplasie maligne, i polifenoli presentano diversi possibili meccanismi antitumorali. Le proprietà antiossidanti permettono di ridurre il rischio di danni al DNA mediati dall'azione delle ROS, inoltre le molecole polifenoliche presentano caratteristiche in grado di inibire la formazione e progressione di tumori. Bloccano la fase di tumorigenesi interagendo con fattori pro-mutageni e pro-cancerogeni. L'inibizione avviene sia intercettando molecole pro-cancerogene attraverso interazioni idrofobiche, sia limitando l'attivazione metabolica di composti come alcune ammine eterocicliche coinvolte nel processo tumorale [112]. Modulando la risposta infiammatoria, limitano l'angiogenesi tumorale, inoltre presentano proprietà citostatiche selettive

per le cellule pre-cancerose e cancerose. Agiscono anche come promotori dell'apoptosi tumorale inibendo le proteine antiapoptosi presenti nelle cellule tumorali [113].

Le proprietà antitumorali di EGCG sono riconducibili a diversi meccanismi [114]. Khafif et al. [115] hanno rilevato un'azione sinergica tra EGCG e la curcumina contro cellule maligne dell'epitelio orale. Ciò è dovuto ai diversi target dei due polifenoli: EGCG agisce sulla fase G1 del ciclo delle cellule tumorali mentre la curcumina blocca le cellule in S/G2M. La curcumina (Fig. 2.7) è un polifenolo estratto dalla *Curcuma longa*, sulla quale si concentrano diversi studi riguardo le proprietà antitumorali.

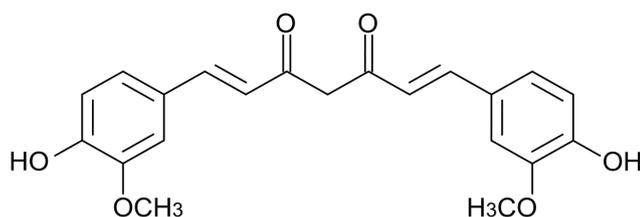


Fig. 2.7: Molecola di curcumina [VII].

Induce l'apoptosi nelle cellule tumorali con meccanismi caspasi dipendenti e indipendenti, mediando il rilascio dai mitocondri del citocromo c e fattore di induzione apoptodica [116], sovraregolando la produzione di proteine pro-apoptosi [117] e inibendo la produzione di alcuni fattori di trasduzione [118]. Anche GA presenta proprietà antitumorali come limitare i danni a carico del DNA [104], così come il resveratrolo induce meccanismi di apoptosi in cellule tumorali [119].

I polifenoli presentano anche un'efficacia terapeutica contro i tumori, da non intendere sostitutiva delle terapie standard. La combinazione tra chemioterapia e molecole fenoliche estratte da tè verde può migliorare il trattamento riducendo gli effetti negativi dovuti allo stress ossidativo sistemico indotto dai chemioterapici [120].

2.7.1 Attività pro-ossidante

Un'ulteriore strategia è considerare l'attività pro-ossidante dei polifenoli. In uno studio Quen et al. [121] hanno dimostrato come le cellule tumorali sono più suscettibili a H_2O_2 rispetto alle cellule sane. Un'elevata dose di acido ascorbico ha prodotto H_2O_2 , che si è rilevato essere tossico per cellule di glioblastoma, tumore al pancreas e all'ovaio in modelli murini, ma non per le cellule dei tessuti sani. Il perché le cellule cancerose siano più sensibili allo stress ossidativo è ancora da

chiarire, dato che normalmente producono più specie reattive rispetto alle cellule normali [122]. Quindi l'attività pro-ossidante dei polifenoli può essere sfruttata come strategia antitumorale. Le proprietà pro-ossidanti si verificano in certe condizioni, come la presenza di ioni di metalli di transizione coinvolti in reazioni di ossidoriduzione e pH alcalini. Un radicale ossidrilico dalla bassa stabilità può reagire con l'ossigeno formando $O_2^{\cdot-}$. Più frequente è l'azione d'intermediari metallici, come ioni ferro (III) e rame (II). In presenza di unità di catecolo o di pirogallolo può avvenire la riduzione di Cu^{2+} in Cu^+ attraverso un meccanismo di trasferimento singolo elettrone intramolecolare (Fig. 2.8). Gli ioni Cu^+ possono partecipare alla reazione di Fenton, producendo specie reattive dannose per il DNA. Gli ioni Cu^{2+} avendo un potenziale di riduzione (0.15V) inferiore rispetto agli ioni Fe^{3+} (0.77 V) sono identificati come i principali responsabili dell'azione pro-ossidante [10, 56]. Inoltre nei tumori la concentrazione di ioni rame è maggiore rispetto alle cellule sane [123].

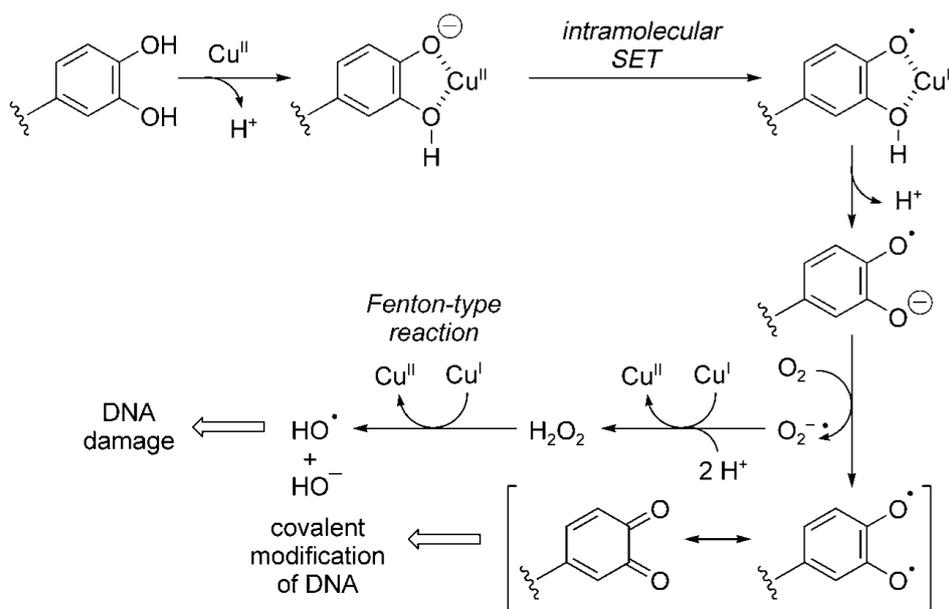


Fig. 2.8: Schema del meccanismo pro-ossidante mediato da ioni Cu^{2+} [10].

I polifenoli sono in grado di sequestrare gli ioni rame legati alla cromatina nucleare nei linfociti e nelle cellule del cancro pancreatico, inducendo danni al DNA. La degradazione del DNA cellulare è stata associata alla generazione delle ROS dovuta all'interazione tra gli ioni rame e le molecole polifenoliche [124].

Capitolo 3

Interazioni con i metalli

3.1 Meccanismo di chelazione

La presenza di due o più gruppi ossidrilici vicini su un anello benzenico, conferisce ad alcuni polifenoli la capacità di chelare ioni metallici. Le unità catecolo e pirogallolo hanno però potenzialità differenti a seconda del tipo di ione e grandezza della molecola [125]. In generale, sui gruppi catecolo, si trova una vasta letteratura che descrive le proprietà di legame con superficie e formazione di complessi con i metalli, andando a indagare molteplici campi di applicazione. In particolare sulla DOPA (3,4-diidrossifenilalanina), amino acido presente nel bisso dei molluschi, si concentrano le attenzioni della comunità scientifica per i forti legami adesivi che instaura anche in ambienti umidi, ipotizzando applicazioni dalle vernici navali a idrogeli adesivi [126].

Nei polifenoli naturali la complessazione con i metalli dipende dal rapporto delle concentrazioni delle specie coinvolte, dal numero di unità catecolo e pirogallolo presenti nelle molecole e dal pH dell'ambiente che influenza la dissociazione dei gruppi ossidrilici [127]. Risulta che la pK_a non sia legata direttamente alla capacità di chelare metalli ma dia informazioni sull'affinità del legame, data la correlazione con il numero di gruppi OH vicini che influenzano mutuamente il proprio livello di acidità [128].

La formazione di complessi con i metalli, in particolare con ioni coinvolti in reazioni radicaliche come rame e ferro, implementa le proprietà antiossidanti dei polifenoli. Il sequestro di tali ioni permette di diminuirne la concentrazione, limitando così il potenziale pro-ossidante [71]. In casi specifici la formazione dei complessi, in particolare con il rame, ha invece un effetto opposto, aumentando la produzione di specie radicaliche attraverso reazioni di tipo Fenton [56].

L'assenza di unità catecolo o pirogallolo non implica l'impossibilità di chelare ioni metallici. Altri siti di chelazione si possono trovare nei flavonoidi che possiedono un gruppo carbonile in posizione C4. La quercetina è in grado di formare complessi metallici sia con l'unità catecolo dell'anello B, sia attraverso i siti di legame tra l'ossigeno del gruppo carbonile C4 e i gruppi ossidrilici in posizione 3 o 5 [129].

3.2 Ferro

Le interazioni fra polifenoli e il ferro sono ampiamente discusse in letteratura. Oltre alle potenzialità antiossidanti, che derivano dalla possibilità di ridurre la concentrazione degli ioni ferro liberi di innescare stress ossidativo, storicamente la formazione di complessi ferro-gallati è collegata alla produzione d'inchiostri. L'inchiostro ferro-gallato è caratterizzato da una colorazione blu scura ed è stato ampiamente utilizzato, ora sostituito per via dell'eccessiva acidità che può provocare il deterioramento della carta e per la modifica della colorazione a causa dell'invecchiamento [29]. Ponce et al. [29] descrivono la formazione del composto ferro-gallato con l'interazione dell'acido gallico con gli ioni Fe^{3+} (Fig. 3.1).

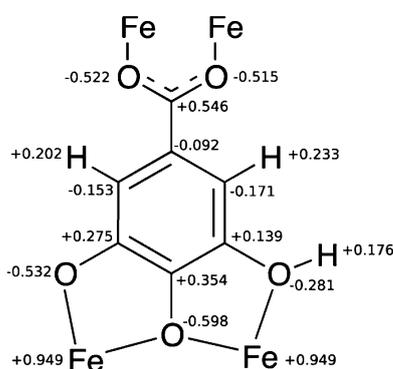


Fig. 3.1: *Composto Fe(III) gallato con cariche elettriche relative ai vari atomi [29].*

Avviene un trasferimento elettronico tra l'orbitale del ligando polifenolico e l'orbitale del metallo, tale trasferimento di un elettrone comporta l'assorbimento di luce che genera la tipica colorazione blu scura rilevabile spettrografia UV-vis [130].

Lo ione ferroso Fe^{2+} è più pericoloso rispetto allo ione ferrico Fe^{3+} , in quanto più reattivo e coinvolto in reazioni pro-ossidanti come la reazione di Fenton. Andjelković et al. [131] identificano come GA sia in grado di legare anche gli ioni ferrosi ma in modo meno significativo rispetto ad acidi idrossicinnamici con unità catecolo. Ipotizzano che il terzo gruppo OH stabilizzi l'elettrone delocalizzato riducendo l'efficacia del legame con il ferro. Lu et al. [132] analizzano la cinetica di reazione tra GA e Fe^{2+} ottenuto dal solfato ferroso. Il rapporto ottimale è di 1:1 e la reazione è influenzata dal pH e dalla temperatura. La reazione avviene in tre fasi che coinvolgono la dissociazione acida di GA, la ionizzazione di $FeSO_4$ e la reazione tra lo ione ferroso e GA con la formazione del complesso metallico.

Anche altri polifenoli mostrano affinità con il ferro. La quercetina è in grado di legare ioni Fe^{2+} anche in forma non deprotonata, preferibilmente nei siti 3-idrossi-4-oxo, o 5-idrossi-4-oxo. È favorito il rapporto 1:2 metallo/ligando anche se è

possibile un rapporto 1:1[129]. Ren et al. [133] evidenziano come il rapporto 1:2 ferro/quercetina sia il più stabile ma sono richieste tre molecole di quercetina per saturare completamente i legami del ferro detossificandolo formando sei legami Fe-O ortogonali.

L'affinità tra ferro e polifenoli può essere sfruttata per realizzare soluzioni dalle diverse applicazioni. Yang et al. [134] hanno realizzato un rivestimento superficiale con il complesso ferro-acido tannico. L'acido tannico (TA) è in grado di formare un reticolo grazie alla coordinazione con ioni ferrici permettendo la formazione di rivestimenti nanostrutturati. Utilizzando una superficie di quarzo dalla bassa bagnabilità hanno evidenziato come l'ordine di funzionalizzazione sia importante per la qualità del rivestimento. Utilizzando prima FeCl_3 poi TA si ottiene uno strato più stabile in condizioni acide. L'aggiunta di soluto alcalino aumenta la rugosità superficiale e la densità del rivestimento per via delle dimensioni minori degli aggregati (Fig. 3.2).

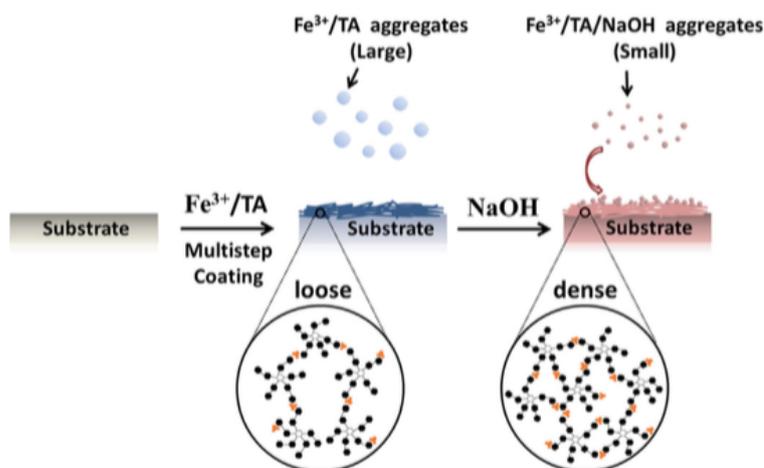


Fig. 3.2: Schema di un rivestimento superficiale con un film ferro/TA [134].

In relazione con leghe ferrose come gli acciai, i polifenoli mostrano proprietà anticorrosive. L'adsorbimento superficiale di miricetina e rutina ha ridotto la corrosione di un acciaio dolce posto in H_2SO_4 [135], mentre un rivestimento con polifenoli estratti dalle acque di scarico di un frantoio, ha avuto un effetto protettivo per l'acciaio al carbonio esposto a HCl [136].

3.3 Metalli di transizione

Oltre al ferro i polifenoli hanno affinità con diversi altri metalli. Diversi polifenoli hanno mostrato capacità di formare complessi con ioni Co^{2+} [137], negli infusi di tè possono trovarsi complessi tra gli ioni di Al, Cu, Fe, Mn, Ni, Zn e le catechine [138].

I complessi con il rame sono studiati per le possibili potenzialità in strategie antitumorali [56], per esempio il resveratrolo legandosi con ioni Cu^{2+} è in grado di degradare il DNA cellulare [139]. Cu^{2+} forma tre diversi complessi con GA ed EGCG a seconda del rapporto fra le specie e il pH, mentre arriva fino a sei complessi considerando gli estratti di tè nero e verde [140,141]. I flavonoidi, in particolare la quercetina, sono in grado di formare complessi ternari con il rame e il DNA [142]. Complessi ternari si formano anche con l'interazione di GA, acidi alifatici dicarbossilici e ioni bivalenti di rame, zinco, cobalto e nichel [28]. La stessa molecola forma complessi ibridi biidratati con ioni Co^{2+} , Ni^{2+} , Mn^{2+} . Le soluzioni hanno colorazioni differenti dal blu scuro dei complessi ferro-gallati, avendo tonalità sul marrone [143].

I polifenoli mostrano una ridotta affinità con gli ioni zinco rispetto agli ioni rame e ferro [144,145], con l'alluminio sono state studiate diverse applicazioni. Ioni Al^{3+} possono essere utilizzati per realizzare complessi con TA al fine di produrre nanoparticelle a rilascio di farmaco (Fig. 3.3).

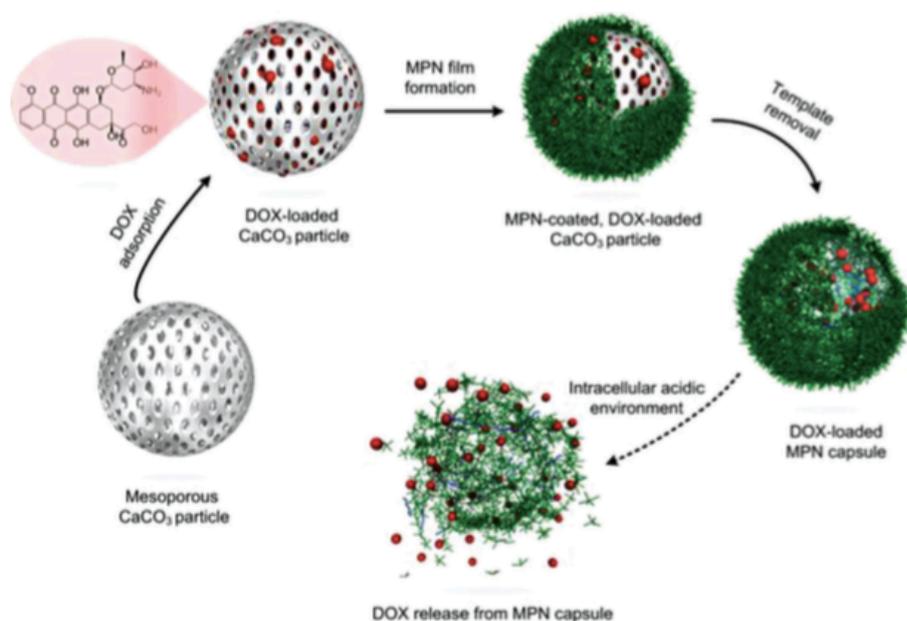


Fig. 3.3: Formazione di nanoparticella pH sensibile realizzata da un film di Al^{3+} /TA contenente il farmaco antitumorale doxorubicina [146].

Inglobando farmaci chemioterapici si può sfruttare la sensibilità al pH del film Al(III) /TA considerando la maggior acidità in prossimità di tessuto tumorale. A pH fisiologici le particelle sono relativamente stabili, mentre a pH minori (pH ~5) il rilascio farmacologico è maggiore. Inoltre l'integrazione di manganese e gadolinio potrebbe fornire anche potenzialità teranostiche [146]. La quercetina

forma complessi con Cr^{3+} che ha maggior impatto sul trasferimento del singolo elettrone che sul trasferimento di un atomo d'idrogeno [147].

Sfruttando l'affinità tra le molecole fenoliche e i metalli si possono realizzare dei sensori per l'identificazione delle specie. La modifica superficiale di cellulosa con GA può fornire uno strumento per la rimozione d'impurità metalliche da soluzioni acquose. Le potenzialità dipendono dal pH: valori troppo bassi inibiscono l'attivazione dei siti di legame, a valori maggiori la formazione d'idrossidi metallici insolubili limita l'estrazione. Per chelare gli ioni Al^{3+} pH 3,5 è risultato il miglior compromesso [148]. La modifica di elettrodi di carbonio vitreo con keampferolo e luteolina che permette di identificare la presenza di rame [149], così come una membrana polimerica con ioni Cu^{2+} dispersi, che per via della sottrazione di rame in presenza di chelanti metallici, come i polifenoli, modifica il proprio potenziale permettendone l'identificazione [150].

3.4 Titanio

Córdoba et al. [151] hanno utilizzato due flavonoidi, la taxifolina e la quercitrina (glicoside della quercetina), per funzionalizzare un substrato di titanio. La modificazione superficiale del substrato con molecole polifenoliche è stata pensata per realizzare un materiale per applicazioni in campo ortopedico, che sia antimicrobico, abbia un'azione antiinfiammatoria e promuova il differenziamento delle cellule mesenchimali in osteoblasti. La funzionalizzazione è stata resa possibile effettuando un'amino-silanizzazione con (3-aminopropil)trietossisilano (APTES), il quale forma uno strato auto-assemblato sull'ossido passivante TiO_2 . I flavonoidi si legano in modo covalente alla superficie attraverso la reazione tra il proprio gruppo carbonile e il gruppo amino dell'organosilano (Fig. 3.4). È possibile legare la quercitrina in forma ridotta ma ha mostrato risultati peggiorativi rispetto al precedente stato [152]. Altri campioni sono stati funzionalizzati tramite la tecnica di *drop casting*, depositando i polifenoli in una soluzione di etanolo direttamente sulla superficie di titanio. Test biologici hanno evidenziato come i campioni funzionalizzati con legami covalenti mostrino risultati più incoraggianti. Si spiegano i risultati ottenuti considerando il maggior rilascio dei polifenoli dalla superficie *drop casting* e dal differente orientamento delle molecole, in particolare dell'esposizione dell'unità catecolo [151].

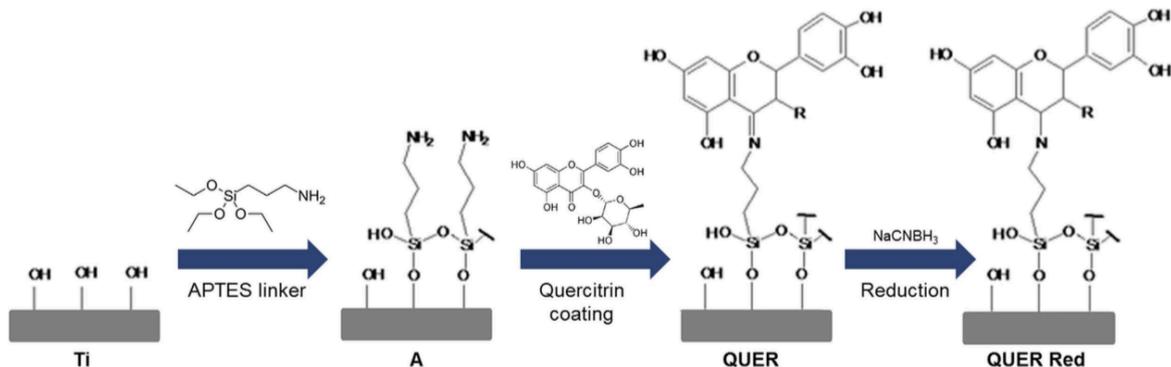


Fig. 3.4: Schema della funzionalizzazione di una superficie in titanio con APTES e un flavonoide [152].

La cinetica di deposizione di uno strato di polifenoli varia a seconda della molecola utilizzata [153]. L'acido tannico inizia a reagire con il substrato di Ti (iv) formando un primo strato sottile e rigido, sul quale si deposita uno strato meno compatto fino a una dimensione critica. Dopo circa 5 h iniziano a depositarsi particelle di dimensione maggiore dovute alla polimerizzazione del polifenolo in soluzione arrivando a formare uno strato di circa 50 nm. Il pirogallato mostra invece una cinetica differente: il primo strato ha caratteristiche viscoelastiche e diventa più rigido e compatto man mano che aumenta la massa adsorbita. È necessaria una prima polimerizzazione per far sì che si sviluppi un rivestimento e che cresca in maniera costante fino a uno spessore di 75 nm.

3.5 Metalli nobili

I polifenoli possono essere utilizzati come intermediari per la produzione di nanoparticelle di metalli nobili. La riduzione chimica da sali aurei è il metodo più rapido, economico ed ecologico. La forma, il colore, le dimensioni e la stabilità delle nanoparticelle auree (AuNPs) dipendono dal metodo di preparazione e dalla natura degli stabilizzatori utilizzati. Importante è il rapporto tra specie riducente e ioni Au^{3+} , una concentrazione maggiore di polifenoli causa la formazione di aggregati se le molecole utilizzate non agiscono contemporaneamente da stabilizzatori. L'acido caffeico agisce solo da riducente mentre l'acido sinapico anche da stabilizzatore [154].

Sanna et al. [155] utilizzano EGCG, resveratrolo e fisetina per produrre in un'unica soluzione nanoparticelle d'oro funzionalizzate, da utilizzare in terapie antitumorali. I polifenoli legano gli ioni Au^{3+} riducendoli *in situ* ad Au^0 , il trasferimento elettronico e i legami idrogeno inter/intra molecolari stabilizzano la formazione di nanoparticelle di circa 10-25 nm a seconda del polifenolo utilizzato.

Utilizzando EGCG in rapporti tra 23:1 e 23:5 la dimensione delle AuNPs diminuisce nell'ultimo caso, così come il potenziale zeta (ζ) che passa da 21 mV a -22mV. Il problema per l'applicazione terapeutica è la bassa stabilità a pH fisiologici [156]. Le potenzialità di stabilizzatore di GA sono aumentate se sono presenti ioni Mg^{2+} come agenti coordinanti [61].

Meccanismi simili si trovano per la produzione di nanoparticelle di argento (AgNPs). Le molecole fitochimiche estratte dalla canaigre (*Rumex hymenosepalus*) reagendo con $AgNO_3$ producono AgNPs di diametro 2-40 nm. Le dimensioni sono direttamente influenzate dalla concentrazione di ioni Ag^+ e dal tempo di reazione. La formazione di NP è riscontrabile anche visivamente osservando la variazione di colore delle soluzioni contenenti polifenoli e sali d'argento, caratterizzate da un colore marrone scuro. I cristalli che si formano hanno prevalentemente una struttura cubica a facce centrali (79%) ed esagonale (21%), struttura atipica per l'argento [157]. L'utilizzo di estratti naturali per la produzione o riduzione *in situ* di AgNPs permette di aumentare la biocompatibilità del materiale e facilitarne l'uso per applicazioni mediche, come la realizzazione di superfici antibatteriche [64,158]. Inoltre si rende il processo produttivo meno inquinante.

La produzione di nanoparticelle di platino (PtNPs) procede dalla riduzione di ioni Pt^{4+} . Si raggiungono dimensioni di 4 nm e le particelle sono stabilizzate dalla nuvola elettronica intorno all'ossigeno del gruppo carbonile polifenolico [159]. L'interazione tra flavoni e ioni bivalenti del platino e del palladio permette di avere un effetto inibitorio sulla perossidazione lipidica e sulla formazione di ossidi radicalici [160].

3.6 Metalli alcalini e alcalini terrosi

Le interazioni tra molecole fenoliche e gli elettroliti fisiologici sono attualmente ancora in via di investigazione, il resveratrolo pare modulare il sequestro e il rilascio intracellulare del calcio all'interno dei linfociti e altre cellule del sistema immunitario, ma ulteriori studi sono necessari per una comprensione più specifica del meccanismo [161].

L'interazione fra GA e Ca^{2+} influenza *in vitro* la crescita di cristalli di HAp [95]. I polifenoli estratti dal tè verde permettono di ottenere nanoparticelle di HAp mesoporosa, quando sono combinati con ortofosfati. Si formano precursori di HAp quando i polifenoli formano complessi con gli ioni Ca^{2+} in soluzione acquosa o la superficie di $Ca(OH)_2$. La molecola chelante orienta la crescita del cristallo, per

via dell'ingombro sterico e la presenza degli anelli aromatici idrofobi. La formazione di HAp avviene tramite sintesi idrotermali (4 h a 120°C), condizioni che promuovono l'ossidazione delle molecole polifenoliche, lasciando la porosità nel materiale [162, 163]. La carica negativa della quercetina interagisce con i piani di HAp, orientandone la crescita, mediando il trasporto e rilascio degli ioni Ca^{2+} [164]. La funzionalizzazione di biovetri con polifenoli, permette la crescita di cristalli di HAp, con struttura differente a seconda delle molecole utilizzate: polifenoli estratti dal tè verde producono una struttura globulare, polifenoli estratti dall'uva una a tappeto compatto, GA una struttura a colonna [63].

Significativo è il ruolo che gli ioni degli elementi alcalino/alcalino terrosi possono ricoprire come agenti coordinanti della polimerizzazione dei polifenoli. L'aggiunta di una soluzione cationica di Ca^{2+} permette di stabilizzare polifenoli in soluzione anionica con ioni fosfato e carbonato, ottenendo un coprecipitato inorganico/naturale per il rilascio controllato delle molecole polifenoliche [165]. Geißler et al. [153] hanno trovato, sullo strato superficiale del film di TA e pirogallolo, tracce di Mg e Na (percentuali tra il 4-2%), presenti nella soluzione buffer utilizzata per la funzionalizzazione del titanio. Gli autori ipotizzano che i due elementi prendano parte alla formazione del reticolo. Sono note le numerose potenzialità di coordinazione con numerose specie chimiche dei metalli alcalini, interazioni che portano alla formazione di reticoli polimerici [166], quindi la definizione di un complesso con le molecole fitochimiche è probabile.

Come detto in precedenza, gli ioni Mg^{2+} stabilizzano la complessazione tra oro e GA, mentre gli ioni K^+ e Ca^{2+} svolgano un ruolo minore [61].

3.7 Terre rare

La quercetina forma complessi con gli ioni trivalenti delle terre rare. La stechiometria generale dei complessi è 1:3 dove tre sono le molecole di quercetina intorno a un atomo trivalente di La, Nb, Eu, Gd, Tb, Dy, Tm, Y. Il complesso è inoltre idratato da sei molecole d'acqua. Il complesso con La^{3+} riesce a legarsi con il DNA di cellule tumorali [167]. Gli effetti antitumorali del complesso quercetina/ La^{3+} sono riscontrati anche da ulteriori studi. In cellule del carcinoma alla cervice ha dimostrato di avere elevati effetti citotossici, migliori rispetto alla quercetina semplice, ma bisogna verificare la selettività del complesso [168]. L'interazione tra il flavonolo morina con La^{3+} e Gd^{3+} mostra proprietà antibatteriche nei confronti dell' *E. coli* e *S. Aureus* [169].

Capitolo 4

Metodi e Materiali

4.1 Preparazione dei campioni

Il substrato utilizzati in questo lavoro per la funzionalizzazione è la lega di titanio Ti6Al4V (ASTM B348, Gr5, Titanium Consulting and Trading), ampiamente utilizzata in campo biomedico come materiale ortopedico o per impianti dentali [170]. I campioni sono dischetti di diametro 10 mm e spessore 2 mm (Fig. 4.1); alcuni già forniti dall'azienda, altri ottenuti dal taglio di una barra del medesimo materiale tramite troncatrice automatica (Brillant 220, ATM, Germania) con lama di allumina operante a una velocità di avanzamento di 0,02 mm/s.



Fig. 4.1: *Campioni Ti6Al4V.*

I campioni sono stati lucidati su ambo i lati con una carta abrasiva di grana 120, utilizzando una velocità di lavoro 250 rms. Dopodiché su una faccia è stata posta una lettera di marchiatura tramite penna elettrica, mentre l'altra è stata ulteriormente lucidata utilizzando carte con grana progressivamente più fina: 320-600-800-1000-2500-4000.

Successivamente i campioni sono stati lavati in ultrasuoni (Sonica ultrasonic cleaner, Soltec, Italia) per rimuovere le impurità superficiali, seguendo la seguente procedura:

- 5 minuti in acetone in un bagno a ultrasuoni;
- 10 minuti in acqua bidistillata in bagno a ultrasuoni;
- 10 minuti in acqua bidistillata in bagno a ultrasuoni.

I campioni lavati sono stati sottoposti a uno specifico trattamento chimico brevettato al fine di ottenere uno strato di ossido micro e nano strutturato, che esponga gruppi OH e che preservi le proprietà meccaniche del substrato. Tale

trattamento consiste in un etching acido seguito da una riossidazione controllata [171]. L'aspetto dei campioni dopo il trattamento chimico passa da grigio metallico a cangiante (Fig. 4.2). Tutti i campioni che hanno subito tale procedura sono stati denominati MimeTi. Per permettere le successive funzionalizzazione con polifenoli, la superficie dei campioni è stata attivata attraverso un'esposizione a irraggiamento UV per 1 h. All'interno della tesi, tranne quando diversamente specificato, sono stati utilizzati tali campioni.



Fig. 4.2: *Campioni di Ti6Al4V dopo il trattamento chimico (MimeTi).*

I campioni destinati a test cellulari sono stati ottenuti in modo pulito, sterilizzando in autoclave a 121 °C e 1 bar per 20 minuti acqua, i materiali necessari per la funzionalizzazione e dischetti di titanio lucidati prima di procedere il trattamento chimico e la funzionalizzazione. Tutti i passaggi sono stati svolti sotto cappa sterile e le soluzioni di funzionalizzazione sono state filtrate con filtri <math><20\mu\text{m}</math>.

4.2 Polifenoli

Nello svolgimento della tesi sono state utilizzate diverse tipologie di polifenoli (Tabella 4.1). L'acido gallico (GA 97,5-102,5% titration, Sigma-Aldrich) è stato utilizzato come molecola modello per la funzionalizzazione con polifenoli, considerando le sue proprietà biologiche e la presenza in cibo e bevande di origine vegetale come uva e tè [11].

Tabella 4.1: *Acronimi dei polifenoli utilizzati.*

Acronimo	Descrizione
GA	Acido gallico
TPH	Polifenoli estratti da foglie di tè verde
PPH	Polifenoli estratti dalle vinacce d'uva rossa Barbera

Sono stati utilizzati anche polifenoli estratti dalle foglie di tè verde (TPH) e polifenoli estratti dalle vinacce dell'uva rossa Barbera (PPH).

4.2.1 Estrazione TPH

I polifenoli del tè verde (TPH) sono stati estratti tramite estrazione idroalcolica [172]. I polifenoli sono stati estratti partendo da foglie di tè verde (varietà Longjing, Hangzhou, Cina) tritate ed essiccate (Fig. 4.3 a). L'estrazione avviene ponendo 1 g di foglie macinate in 50 ml di etanolo all'80%, ottenuto miscelando 40 ml di etanolo con 10 ml di acqua bidistillata (Fig. 4.3 b). Il preparato è stato posto in un bagno riscaldato (Julabo, Sw23) sotto agitazione, a una temperatura di 60 °C per 1 h. Successivamente utilizzando filtri di carta (Whatman, GE Healthcare life sciences, UK) il preparato è stato filtrato per separare l'estratto dalle foglie triturate (Fig. 4.3 c). L'estratto è stato poi posto in piastre di vetro e inserito in incubatore (Alpha incubator, Bicasa, Italia) a 37 °C per lasciare evaporare l'etanolo rimasto (Fig. 4.3 d). Evaporato l'etanolo, l'estratto di tè verde è stato risospeso in acqua bidistillata, raccolto congelato a una temperatura di -18 °C e poi liofilizzato (Fig. 4.3 e).

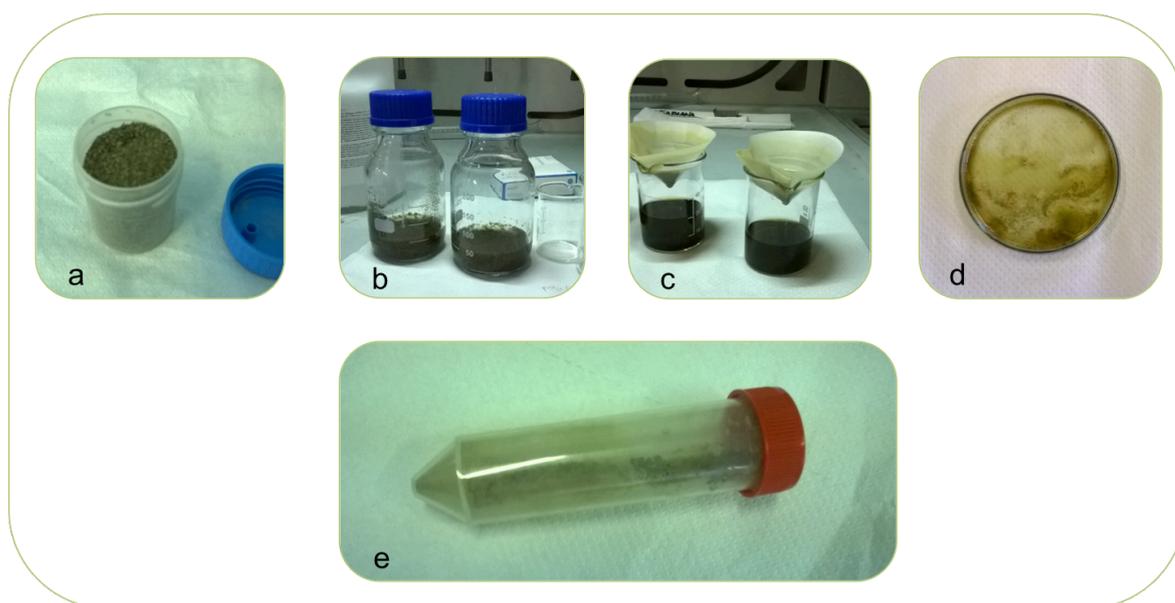


Fig. 4.3: Fasi di estrazione TPH. a) foglie di tè verde; b) foglie tè verde con etanolo 80% in concentrazione 1:50; c) filtraggio estratto di tè verde dopo 1 h a bagnomaria; d) TPH dopo evaporazione etanolo; e) TPH liofilizzati.

I polifenoli estratti dalle vinacce di uva rossa barbera (PPH) sono stati estratti con un'analogia procedura partendo da vinacce di uva rossa (Vigneto Vaglio Serra, Asti, Piemonte, Italia) essiccate e macinate.

4.3 Funzionalizzazione con GA

La funzionalizzazione è avvenuta ponendo un campione in 5 ml di una soluzione 1 mg/ml di acido gallico in un *medium*, per 3 h in incubatore a 37 °C. Dopo l'incubazione, i campioni hanno subito un doppio lavaggio in acqua bidistillata e sono stati fatti asciugare sotto flusso laminare a temperatura ambiente.

Sono state utilizzate varie soluzioni solvente per determinare i fattori che influenzano il legame superficie/polifenoli.

4.3.1 Determinazione fattori implicati nel legame superficie/polifenoli

Al fine di verificare quale ruolo svolgono pH e ioni Ca^{2+} nel legame superficie/polifenoli, si sono realizzate soluzioni con caratteristiche differenti da utilizzare nella fase di funzionalizzazione (Tabella 4.2).

Tabella 4.2: Soluzioni di funzionalizzazione realizzate in H_2O bidistillata e relativi soluti.

Soluzione	Soluti	Conc. CaCl_2 [mg/l]
SBF	NaCl ; NaHCO_3 ; KCl ; $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$; $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 1M-HCl; CaCl_2 ; Na_2SO_4 ; TRIS	292
Sol. Ca	CaCl_2	292
Sol. Ca1 + t	CaCl_2 ; 1M-HCl; TRIS	292
Sol. Ca2 +t	CaCl_2 ; 1M-HCl; TRIS	584
TRIS/HCl	1M-HCl; TRIS	–
H_2O	–	–

La soluzione SBF (Simulated Body Fluid) è stata preparata secondo il protocollo Kokubo & Takadama [173]. La Sol. Ca è stata realizzata per verificare l'effetto della presenza di ioni Ca^{2+} in assenza di tampone, al pH naturalmente raggiunto con l'aggiunta di GA. La Sol. Ca1+t è stata prodotta con la medesima concentrazione di CaCl_2 della soluzione SBF mentre per la Sol. Ca2+t è stata utilizzata una concentrazione doppia. La soluzione TRIS/HCl è una soluzione tampone realizzata al fine di verificare l'effetto dovuto alla deprotonazione dei polifenoli a pH 7.4 in assenza di ioni Ca^{2+} . Sono state realizzate delle prove anche utilizzando come solvente per la funzionalizzazione l'acqua distillata, in modo da analizzare la capacità dei polifenoli di legarsi alla superficie in assenza di un tampone e ioni calcio.

Le soluzioni di funzionalizzazione sono state ottenute sciogliendo 1 mg/ml di GA nei diversi mezzi. Dopo la completa solubilizzazione il pH è stato misurato (edge, Hanna instruments,) a 37 °C e a temperatura ambiente e la colorazione delle soluzioni è stata annotata. È stato inoltre eseguito il test F&C sulle soluzioni diluite 1:30 in acqua bidistillata.

Con ogni soluzione di funzionalizzazione contenente GA, sono stati funzionalizzati sia i campioni MimeTi, sia i campioni di lega di titanio lisci, al fine di verificare l'impatto del trattamento chimico superficiale sull'interazione con i polifenoli. La funzionalizzazione è avvenuta ponendo il campione in 5 ml di soluzione contenente GA e lasciati per 3 h in incubatore a 37 °C. Delle soluzioni post-funzionalizzazione è stato misurato il pH a 37 °C. Sui campioni è stato effettuato il test F&C per campioni massivi e misurato l'angolo di contatto.

È stato ulteriormente approfondito l'effetto del calcio effettuando una funzionalizzazione in due passaggi:

1. adsorbimento superficiale di Ca^{2+} ;
2. funzionalizzazione in soluzione TRIS/HCl+GA.

Questa prova è stata implementata solo per i campioni MimeTi. L'adsorbimento superficiale di Ca^{2+} è stato realizzato ponendo i campioni, in 5 ml di soluzione e lasciati reagire 3 h in incubatore a 37 °C: per quattro campioni è stata utilizzata come soluzione Sol. Ca1+t, per gli altri quattro Sol. Ca2+t.

Dopo l'adsorbimento, i campioni MimeTi_Ca(1 o 2) sono poi stati posti in 5 ml di TRIS/HCl+GA e lasciati reagire per 3 h in incubatore a 37 °C. È stato misurato il pH a temperatura ambiente delle soluzioni post-funzionalizzazione, eseguito il test F&C per campioni massivi e sui campioni è stato misurato l'angolo di contatto.

4.4 Funzionalizzazione con polifenoli naturali

Utilizzando come *medium* di funzionalizzazione la soluzione SBF, sono stati funzionalizzati campioni MimeTi con estratti naturali (TPH, PPH). La funzionalizzazione è avvenuta con una procedura analoga a quella utilizzata per GA: il campione è posto in 5 ml di soluzione 1 mg/ml di relativi polifenoli per 3 h a 37 °C.

Tabella 4.3: Descrizione dei campioni e delle soluzioni utilizzate.

Acronimo	Descrizione
SBF	“Simulated Body Fluid;” soluzione acquosa che riproduce la concentrazione elettrolitica del plasma sanguigno;
Sol. Ca	Soluzione acquosa contenente la medesima concentrazione di Ca^{2+} della soluzione SBF;
Sol. Ca1+t	Soluzione acquosa contenente la medesima concentrazione di Ca^{2+} della soluzione SBF. La soluzione presenta un tampone TRIS/HCl;
Sol. Ca2+t	Soluzione acquosa contenente una concentrazione di Ca^{2+} doppia rispetto alla soluzione SBF. La soluzione presenta un tampone TRIS/HCl;
TRIS/HCl	Soluzione tampone;
MimeTi_SBF+GA	Lega di titanio trattata chimicamente e funzionalizzata in una soluzione SBF contenente acido gallico in concentrazione 1 mg/ml;
MimeTi_Sol. Ca+GA	Lega di titanio trattata chimicamente e funzionalizzata in Sol. Ca contenente acido gallico in concentrazione 1 mg/ml;
MimeTi_Sol. Ca1+t+GA	Lega di titanio trattata chimicamente e funzionalizzata in Sol. Ca1+t contenente acido gallico in concentrazione 1 mg/ml;
MimeTi_Sol. Ca2+t+GA	Lega di titanio trattata chimicamente e funzionalizzata in Sol. Ca2+t contenente acido gallico in concentrazione 1 mg/ml;
MimeTi_TRIS/HCl+GA	Lega di titanio trattata chimicamente e funzionalizzata in TRIS/HCl contenente acido gallico in concentrazione 1 mg/ml;
MimeTi_H ₂ O+GA	Lega di titanio trattata chimicamente e funzionalizzata in acqua bidistillata contenente acido gallico in concentrazione 1 mg/ml;
MimeTi_Ca1_TRIS/HCl+GA	Lega di titanio trattata chimicamente e funzionalizzata in due passaggi: prima un adsorbimento superficiale di calcio dalla soluzione Sol. Ca1+t, funzionalizzazione TRIS/HCl contenente acido gallico in concentrazione 1 mg/ml;

Continua a pagina seguente

Acronimo	Descrizione
MimeTi_Ca2_TRIS/HCl+GA	Lega di titanio trattata chimicamente e funzionalizzata in due passaggi: prima un adsorbimento superficiale di calcio dalla soluzione Sol. Ca ²⁺ , funzionalizzazione TRIS/HCl contenente acido gallico in concentrazione 1 mg/ml;
Liscio_SBF+GA	Lega di titanio lucidata e funzionalizzata in una soluzione SBF contenente acido gallico in concentrazione 1 mg/ml;
Liscio_Sol. Ca+GA	Lega di titanio lucidata e funzionalizzata in Sol. Ca contenente acido gallico in concentrazione 1 mg/ml;
Liscio_Sol. Ca1+t+GA	Lega di titanio lucidata e funzionalizzata in Sol. Ca ^{1+t} contenente acido gallico in concentrazione 1 mg/ml;
Liscio_Sol. Ca2+t+GA	Lega di titanio lucidata e funzionalizzata in Sol. Ca ^{2+t} contenente acido gallico in concentrazione 1 mg/ml;
Liscio_TRIS/HCl+GA	Lega di titanio lucidata e funzionalizzata in TRIS/HCl contenente acido gallico in concentrazione 1 mg/ml;
Liscio_H ₂ O+GA	Lega di titanio lucidata e funzionalizzata in acqua bidistillata contenente acido gallico in concentrazione 1 mg/ml;
MimeTi_SBF+TPH	Lega di titanio trattata chimicamente e funzionalizzata in una soluzione SBF contenente polifenoli del tè verde in concentrazione 1 mg/ml;
MimeTi_SBF+PPH	Lega di titanio trattata chimicamente e funzionalizzata in una soluzione SBF contenente polifenoli delle vinacce dell'uva in concentrazione 1 mg/ml;

4.5 Test di Folin&Ciocalteu

Il test di Folin&Ciocalteu (F&C) viene utilizzato per determinare i polifenoli totali in una soluzione [174]. Per realizzare il test F&C sono necessari:

- 2 ml di soluzione da analizzare;
- 6 ml di acqua bidistillata;
- 0,5 ml del reagente F&C (Folin&Ciocalteu phenol reagent, Sigma Aldrich);
- 1,5 ml di soluzione Na_2CO_3 20% w/V in acqua bidistillata (10 g di Na_2CO_3 in 50 ml d'acqua bidistillata).

La soluzione di carbonato di sodio serve a ridurre l'acidità della soluzione del test. Il reattivo F&C è una miscela di acido fosfomolibdico e acido tungstico, caratterizzata da una forte colorazione gialla. Aggiungendo il reattivo in una soluzione contenente polifenoli, per l'attività riducente delle molecole fenoliche, dopo 2 h, si ottiene una soluzione con ossido di tungsteno e ossido di molibdeno caratterizzata da una colorazione blu. È stata misurata l'assorbanza a 760 nm con uno spettrofotometro UV (UV 26000, Shimadzu).

Per passare dall'assorbanza alla concentrazione totale di polifenoli è stata utilizzata la retta di calibrazione realizzata con la molecola modello GA. La concentrazione totale di polifenoli è stata espressa in concentrazione equivalente di GA.

4.5.1 Retta di calibrazione GA

La retta di calibrazione è stata realizzata effettuando il test F&C su sette soluzioni a concentrazione nota di GA (Tabella 4.4).

Tabella 4.4: Soluzioni utilizzate per la realizzazione della retta di calibrazione.

	Comp. 1	Comp. 2	Vtot [ml]	Conc [mg/ml]
Sol A	50 mg GA	50 ml acqua	50	1
Sol B	10 ml Sol A	90 ml acqua	100	0,1
1	1 ml Sol B	49,5 ml acqua	50	0,001
2	1 ml Sol B	39 ml acqua	40	0,0025
3	1 ml Sol B	19 ml acqua	20	0,005
4	1 ml Sol B	9 ml acqua	10	0,01
5	2 ml Sol B	8 ml acqua	10	0,02
6	3 ml Sol B	7 ml acqua	10	0,03
7	4 ml Sol B	6 ml acqua	10	0,04

4.5.2 Test F&C per campioni massivi

Il test F&C è un'analisi specifica per le soluzioni. Al fine di misurare la concentrazione totale di polifenoli sulla superficie di un materiale è stata utilizzata una variante del test ottimizzata per la valutazione su campioni solidi. Il campione è posto in 8 ml di H₂O bidistillata, con 0,5 ml di reattivo F&C e 1,5 ml di Na₂CO₃ 20% w/V in acqua bidistillata e lasciato reagire per 2 h. La valutazione sulla concentrazione totale di polifenoli avviene come nel caso di soluzioni ed espressa in concentrazione equivalente di GA.

4.6 Spettrografia UV-vis

Sono stati acquisiti gli spettri UV-vis tra 290 -1000 nm delle soluzioni: SBF+GA, Sol. Ca+GA, Sol. Ca1+T+GA, Sol. Ca2+T+GA, TRIS/HCl+GA, H₂O+GA.

L'acquisizione dello spettro UV-vis è stata realizzata per confronto con le osservazioni sul colore delle soluzioni.

Ulteriori acquisizioni sono state effettuate per le soluzioni di GA, TPH, PPH in acqua a pH 3 e 5, per valutare le eventuali variazioni di colore a seguito di deprotonazione dei gruppi acidi.

4.7 Potenziale zeta

La misura del potenziale zeta (SurPass, Antom Paar) è implementata per studiare la carica superficiale dei campioni al variare del pH dell'ambiente di esposizione. L'analisi è stata effettuata utilizzando due campioni posizionati in modo da avere le superfici funzionalizzate una di fronte all'altra. Una prima fase è eseguita per impostare parametri iniziali:

1. Si effettua un primo passaggio di 100 ml di soluzione elettrolitica (soluzione di KCl in acqua bidistillata 45 mg in 600 ml) per bagnare le superfici dei campioni;
2. Si regola la distanza tra campioni a circa 100 μ m;
3. Si verifica la pressione necessaria per avere un flusso di 100 ml/min;

Il pH iniziale della soluzione è di circa 5,6 con conducibilità di 15 mS/m.

La prima sessione di misura è stata effettuata in range acido andando ad aggiungere HCl in quantità crescente (15 prove da 0 - 2,6 ml) alla soluzione elettrolitica. Successivamente sono stati effettuati due cicli lavaggio con acqua ultra pura ed è stata svolta la misura in range basico aggiungendo NaOH.

La quantità di reagente basico inserita è di un ordine di grandezza minore rispetto al reagente acido. In range acido le misure sono state effettuate fino a pH 2.9, mentre in range basico fino a 9. La misura basica è stata effettuata in un secondo momento perché i polifenoli risultano meno stabili in ambiente alcalino [30].

È stato misurato il potenziale zeta di MimeTi_SBF+GA, MimeTi_SBF+PPH, MimeTi_SBF+TPH, ricercando il punto isoelettrico delle superfici. Successivamente è stato svolto il test F&C per verificare se l'esposizione prolungata a pH alcalini abbia modificato la concentrazione di polifenoli superficiali.

4.8 Misura angolo di contatto

La misura di angolo di contatto permette di valutare la bagnabilità della superficie di un materiale. Una goccia (5 μ l) di acqua bidistillata è stata depositata sulla superficie da osservare e un'immagine è stata ottenuta tramite la fotocamera di una macchina per la misura dell'angolo di contatto (DSA 100, Kruss, Germania). L'angolo risultante è stato ricavato tramite software ImageJ (ImageJ 1.50d, Wayne Rasband NIH, USA) ed espresso in sessagesimali (Fig. 4.4).

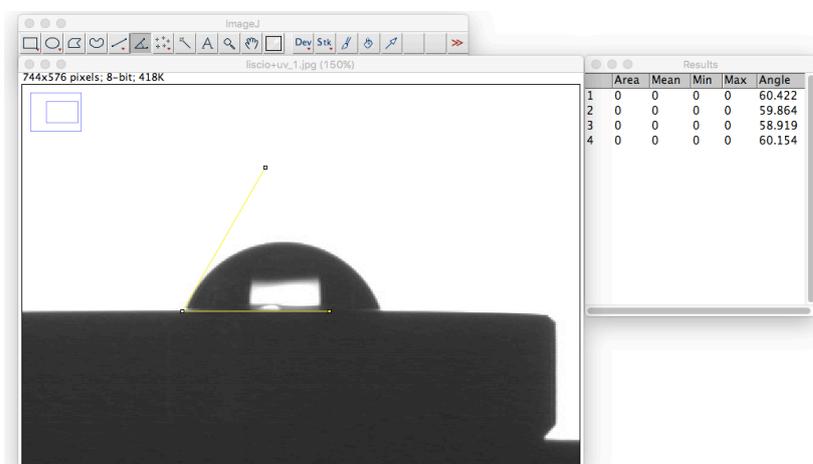


Fig. 4.4: *Acquisizione misura angolo di contatto tramite software ImageJ.*

La misura dell'angolo di contatto è stata eseguita su campioni MimeTi e lisci sia tal quali che funzionalizzati (Tabella 4.5).

4.9 Analisi XPS

La tecnica di spettroscopia fotoelettrica a raggi X (XPS, PHI 5000 Versaprobe, Physical Electronics) è stata effettuata al fine di verificare l'avvenuta funzionalizzazione superficiale dei campioni. L'analisi permette di ottenere la composizione dello strato superficiale e attraverso spettri ad alta risoluzione di

indagare lo stato chimico dei legami nelle regioni dello spettro del carbonio (C) e dell'ossigeno (O).

Sono stati sottoposti ad analisi XPS i seguenti campioni: MimeTi, MimeTi_SBF+GA, MimeTi_SBF+TPH, MimeTi_SBF+PPH.

4.10 Test di fluorescenza

I test a fluorescenza sfruttano le proprietà di auto-fluorescenza delle molecole fitochimiche [175]. Le immagini sono ottenute mediante un microscopio a fluorescenza montante un filtro rosso.

L'indagine è stato condotta sui campioni MimeTi_SBF+GA, MimeTi_SBF+TPH e MimeTi_SBF+PPH per osservare la distribuzione delle molecole sulla superficie del campioni. I campioni analizzati sono i medesimi dell'analisi XPS.

Tabella 4.5: *Tipologia dei campioni e prove effettuate. Dati ottenuti da letteratura [176*,177**].*

Campioni	Angolo di contatto	F&C	Pot. ζ	XPS	Fluorescenza
MimeTi TQ	✓	-	✓**	✓	-
MimeTi UV	✓	✓	-	-	-
Mimeti_SBF+GA	✓	✓	✓	✓	✓
MimeTi_Sol.Ca+GA	✓	✓	-	-	-
MimeTi_Sol.Ca1+T+GA	✓	✓	-	-	-
MimeTi_Sol.Ca2+T+GA	✓	✓	-	-	-
MimeTi_TRIS/HCl+GA	✓	✓	-	-	-
MimeTi_H2O+GA	✓	✓	-	-	-
MimeTi_Ca1_TRIS/HCl+GA	✓	✓	-	-	-
MimeTi_Ca2_TRIS/HCl+GA	✓	✓	-	-	-
Liscio TQ	✓*	-	-	-	-
Liscio UV	✓	✓	-	-	-
Liscio_SBF+GA	✓	✓	-	-	-
Liscio_Sol.Ca+GA	✓	✓	-	-	-
Liscio_Sol.Ca1+T+GA	✓	✓	-	-	-
Liscio_Sol.Ca2+T+GA	✓	✓	-	-	-
Liscio_TRIS/HCl+GA	✓	✓	-	-	-
Liscio_H2O+GA	✓	✓	-	-	-
MimeTi_SBF+TPH	✓	-	✓	✓	✓
MimeTi_SBF+PPH	✓	-	✓	✓	✓

4.11 Test cellulari

I test sono realizzati per valutare la risposta biologica al materiale di cellule sane e tumorali. Sono stati utilizzati campioni MimeTi non funzionalizzati, MimeTi_SBF+TPH, preparati in condizioni sterili, e campioni vetro puro. Il materiale plastico della piastra di coltura è stato utilizzato come controllo.

I test cellulari sono stati svolti da personale specializzato presso il dipartimento delle Scienze della Salute, Università del Piemonte Orientale (UPO), Novara.

4.11.1 Cellule

Sono state utilizzate due tipologie di cellule, rappresentative di un tessuto sano e uno tumorale. Il modello tessutale sano ha previsto l'utilizzo di cellule di pre-osteoblasti fetali umani (hFOB 1.19, ATCC CRL- 11372, Manassas, USA), le cellule tumorali utilizzate sono cellule di osteosarcoma umano (U2OS, ATCC HTB-96, Manassas, USA) [175].

U2OS sono state coltivate nel mezzo di coltura di Dulbecco modificato (DMEM, Sigma-Aldrich), per le hFOB è stata utilizzata la miscela DMEM: Ham's F12 (50:50, Sigma-Aldrich). A entrambi i *media* sono stati aggiunti 10% di siero fetale bovino (FBS, Sigma-Aldrich) e 1% di antibiotici (penicillina/streptomina). Alla coltura di hFOB è stato ulteriormente aggiunto 0,3 mg/ml di neomicina (G418 salt, Sigma-Aldrich). Le cellule U2OS sono state coltivate a 37 °C e 5% di CO₂ mentre le cellule HFOB a una temperatura di 34 °C per promuovere la proliferazione e non il differenziamento [VIII].

4.11.2 Valutazione citotossicità

Su ogni campione sono state inizialmente seminate 10×10^4 cellule. Il numero cellulare è stato ottenuto effettuando almeno un distacco cellulare (passaggio). Tolto il mezzo di coltura, si è effettuato un lavaggio in buffer salino (PBS) prima di utilizzare la tripsina come agente per il distacco. Passati cinque minuti si disattiva l'enzima con siero bovino (FBS) e si centrifuga per separare le cellule dal liquido soprannatante.

La sopravvivenza cellulare è stata valutata a 1, 3, 5, 7 giorni attraverso saggio colorimetrico metabolico con bromuro di 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT, Sigma Aldrich). È stata misurata la densità ottica a 570 nm tramite spettrofotometro (SpectraCount, Packard Bell) considerando il valore delle cellule coltivate sulla piastra di controllo come 100% di sopravvivenza cellulare. Gli esperimenti sono realizzati in triplicato.

4.11.3 Valutazione danni al DNA

Diversi marcatori cellulari sono stati utilizzati per valutare eventuali danni al DNA. I marcatori scelti sono stati la γ -H2ax, 53BP1, ciclina B1.

La rilevazione dei marcatori avviene attraverso fluorescenza. Specifici anticorpi primari sono utilizzati per interagire con i biomarker: anti-53BP1 (Abcamab36823, Cambridge, UK, 1:800 in PBS contenente 2% siero caprino e 1% BSA) anti-ciclina B1 (Abcamab181593, Cambridge, UK, 1:250 in PBS contenente 2% siero caprino e 1% BSA) e anti- γ -H2ax che lega l'istone fosforilato negli ultimi nove residui, inclusa la serina fosforilata [178]. Gli anticorpi sono aggiunti a temperatura ambiente per 4 h. Sono stati poi aggiunti gli opportuni anticorpi secondari (AlexaFluo488, Immunological Science, Roma, Italia, 1:400 in PBS) e utilizzato il 4',6-diamidin-2-fenilindolo (DAPI; Sigma-Aldrich) per visualizzare i nuclei. La falloidina è stata utilizzata per identificare i filamenti di F-actina del citoscheletro cellulare [179]. I campioni sono analizzati con un microscopio a fluorescenza (Leica AF 6500; Leica Microsystems, Basel, Svizzera).

4.12 Analisi statistica dei dati

L'analisi statistica dei dati è stata effettuata utilizzando il metodo ANOVA a singolo fattore reso disponibile dalla Social Science Statistics [IX]. Si è utilizzato tale metodo per valutare l'indipendenza statistica dei risultati ottenuti del test di F&C. Il livello di significatività preso in considerazione è pari a un $p < 0.05$.

Capitolo 5

Risultati e Discussione

5.1 Analisi sulle soluzioni di funzionalizzazione

I valori di pH delle soluzioni con GA a 37 °C e a temperatura ambiente variano a seconda delle caratteristiche del solvente (Tabella 5.1). Le soluzioni contenenti un tampone (SBF + GA, Sol. Ca1+t+GA, Sol. Ca2+t+GA, TRIS/HCl + GA) hanno pH medio 7,15-7,26 a 37 °C che aumenta al diminuire della temperatura. Le soluzioni prive di tampone (Sol. Ca + GA, H₂O + GA) presentano valori di pH acidi legati all'azione acidificante di GA.

Tabella 5.1: Valori di pH delle soluzioni con GA calcolati a 37 °C e a temperatura ambiente con relativo colore.

Soluzione	pH		Colore
	37 °C	Tamb	
SBF + GA	7,15 ± 0,01	7,37 ± 0,02	Blu
Sol. Ca + GA	3,34 ± 0,02	3,35 ± 0,01	Trasparente
Sol. Ca1 + t + GA	7,20 ± 0,08	7,46 ± 0,07	Blu
Sol. Ca2 + t + GA	7,19 ± 0,04	7,43 ± 0,05	Blu
TRIS/HCl + GA	7,26 ± 0,08	7,52 ± 0,01	Verde
H ₂ O + GA	3,36	3,31	Trasparente

La colorazione delle soluzioni è legata alle differenti interazioni tra soluto e solvente (Fig. 5.1). La colorazione blu di SBF + GA, Sol. Ca1+t+GA, Sol. Ca2+t+GA è dovuta alla formazione di composti calcio-gallati. È ipotizzata un'interazione tra l'acido gallico e gli ioni Ca²⁺, caratterizzata dalla formazione di prodotti blu-neri, meccanismo noto per altri ioni metallici come gli ioni ferro [29]. L'assenza di colorazione in Sol. Ca + GA e H₂O + GA suggerisce che il complesso Ca/GA avvenga solo in seguito alla deprotonazione dei gruppi ossidrilici di GA, la quale avviene a pH maggiori rispetto alle condizioni acide delle soluzioni in questione [31].

La soluzione TRIS/HCl + GA ha una colorazione verde, differente rispetto alle altre soluzioni. L'assenza di ioni Ca²⁺ o di altri elettroliti, come ioni Mg²⁺ e Na⁺, non permette la formazione di complessi metallici, quindi la colorazione è legata al comportamento chimico di GA [180].

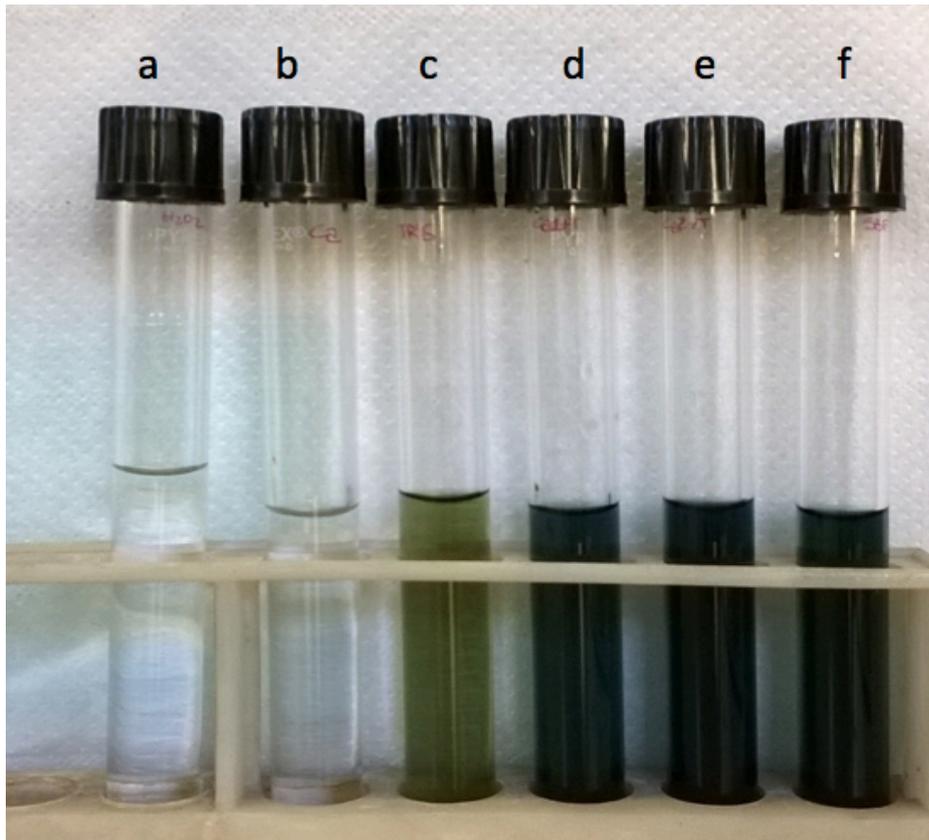


Fig. 5.1: Colorazioni delle soluzioni con GA: a) $H_2O + GA$; b) Sol. Ca +GA; c) TRIS/HCl + GA; d) Sol. Ca1+t+GA; e) Sol. Ca2+t+GA; f) SBF + GA.

La colorazione è stata indagata anche attraverso la spettrografia UV-vis (Fig. 5.2). Si nota come si possano identificare tre comportamenti differenti negli spettri, concordatamente a quanto si evidenzia semplicemente con un'indagine visiva. Le soluzioni trasparenti (Sol. Ca + GA, $H_2O + GA$) sono caratterizzate da uno spettro di assorbanza piatto per quasi tutta la regione indagata. Un picco è localizzabile alla lunghezza d'onda di 300-310 nm e può essere associato all'assorbanza di GA in soluzione acquosa, considerando anche la sua presenza nelle altre soluzioni [181]. Le soluzioni Sol. Ca1+t+GA, Sol. Ca2+t+GA, SBF+GA hanno un picco relativo intorno ai 660 nm, associato all'intervallo della colorazione blu [X].

Il colore verde può avere due picchi di assorbanza, uno intorno a 800 nm un altro intorno ai 400 nm [XI]. Lo spettro di TRIS/HCl +GA, pur non avendo alcun picco a 800 nm, mostra un andamento differente, rispetto agli altri spettri, nell'intorno dei 400 nm, riconducibile proprio alla sua colorazione.

Spettro UV-vis soluzioni + GA

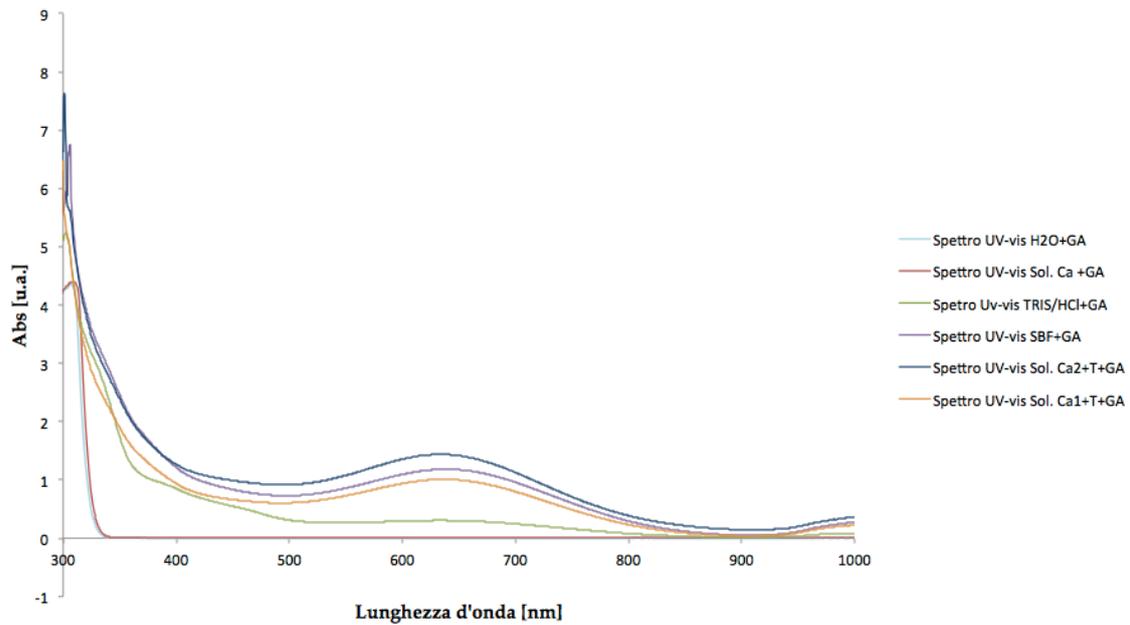


Fig. 5.2: Spettri UV-vis delle soluzioni con GA.

5.1.1 Test di F&C sulle soluzioni

Dal test F&C sulle soluzioni con GA diluite 1:30 in acqua bidistillata, si sono ottenute le concentrazioni equivalenti corrette di GA delle diverse soluzioni (Fig. 5.3). Il test non è stato effettuato su H₂O+GA, dato che per la calibrazione della prova sono state utilizzate soluzioni acquose di GA, pertanto sarebbe risultato ridondante effettuare la misura di concentrazione equivalente di GA, su una soluzione acquosa a concentrazione nota (1 mg/ml).

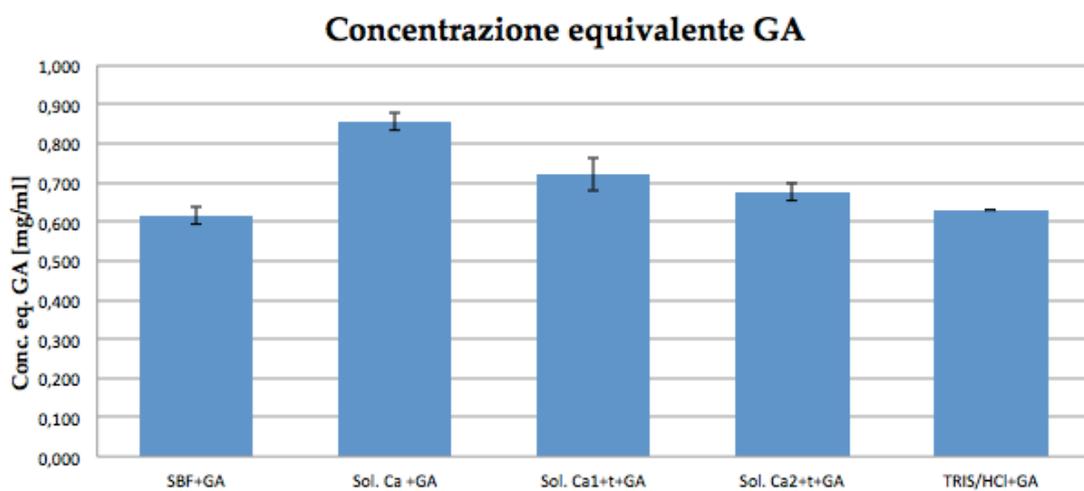


Fig. 5.3: Concentrazione equivalente di GA delle diverse soluzioni, ottenuta dal test di F&C.

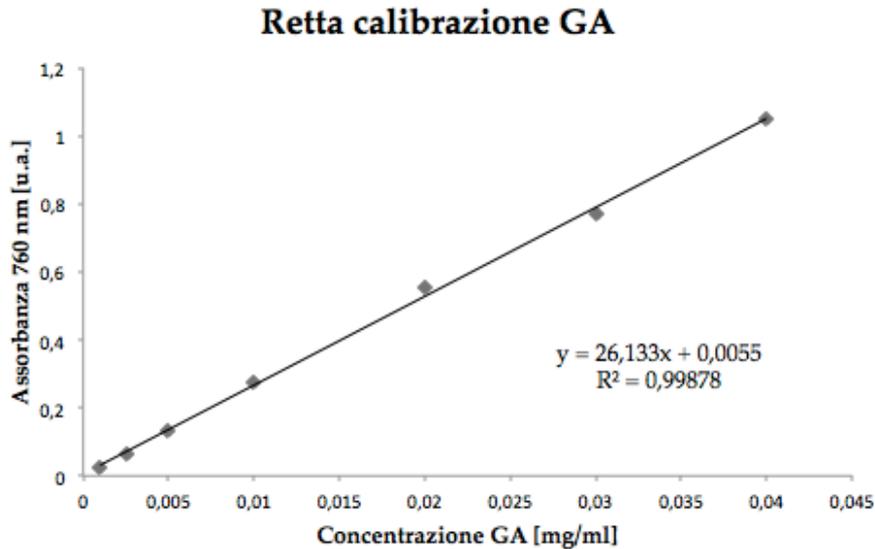


Fig. 5.4: *Retta di calibrazione per GA.*

Misurando l'assorbanza delle soluzioni, è possibile risalire alla concentrazione equivalente di GA tramite la retta di calibrazione (Fig. 5.4).

Nonostante tutte le soluzioni abbiano una concentrazione nota di GA pari a 1mg/ml, i valori ottenuti sono differenti. Questo è dovuto al fatto che la misura della concentrazione è legata alla misura dell'assorbanza a 760 nm, che a sua volta è influenzata dal potere riducente dell'acido benzoico. GA non ha quindi lo stesso comportamento in differenti soluzioni.

Il valore ottenuto per TRIS/HCl+GA (0,63 mg/ml), lascia ipotizzare un ruolo del pH come fattore che influenza l'attività riducente di GA. La concentrazione equivalente maggiore si trova in Sol. Ca, pari a $0,86 \pm 0,02$ mg/ml. Ciò può indicare come il pH acido e l'assenza di complessi calcio-gallati non limitino la disponibilità di GA a reagire con il reattivo F&C. In Sol. Ca1+t+GA, Sol. Ca2+t+GA la formazione dei complessi Ca/GA potrebbe inibire l'attività riducente del polifenolo. Analogo discorso per la soluzione SBF+GA, nella quale la maggior complessità di composizione può aver influito sulla concentrazione equivalente finale.

5.2 Analisi sui campioni di Ti6Al4V

5.2.1 Angolo di contatto

La misura dell'angolo di contatto permette di avere velocemente informazioni sull'avvenuta modifica di una superficie osservando la variazione della bagnabilità.

I campioni di Ti6Al4V lucidati presentano un angolo di contatto pari a 77° [176], valore che decresce a seguito di diversi trattamenti. Il trattamento chimico aumenta la bagnabilità superficiale con un angolo di contatto medio di $54,15^\circ \pm 2,95$; fatto attribuibile all'esposizione di gruppi ossidrilici.

L'esposizione a irraggiamento UV diminuisce il valore sia del campione Liscio UV a $72,59^\circ \pm 1,99$ sia di MimeTi UV ($1,75^\circ \pm 2,74$), poiché riduce la contaminazione carboniosa superficiale (Fig. 5.5) [182].

I campioni MimeTi funzionalizzati con le differenti soluzioni di GA presentano una spiccata idrofilicità (Fig. 5.6). I valori maggiori rispetto a MimeTi UV possono essere attribuiti a un aumento della contaminazione carboniosa e alla funzionalizzazione con GA. È possibile un'esposizione superficiale di specie idrofobiche come l'anello benzenico, che causano un aumento dell'angolo di contatto. Un angolo di contatto circa nullo è stato misurato per i campioni funzionalizzati in due passaggi: MimeTi_Ca1_TRIS/HCl+GA, MimeTi_Ca2_TRIS/HCl+GA.

I campioni lucidati funzionalizzati presentano valori di angolo di contatto statisticamente superiori rispetto ai MimeTi, con valori medi fra il $39,90^\circ$ e $50,58^\circ$ (Fig. 5.7), pur aumentando la bagnabilità rispetto al Liscio UV.

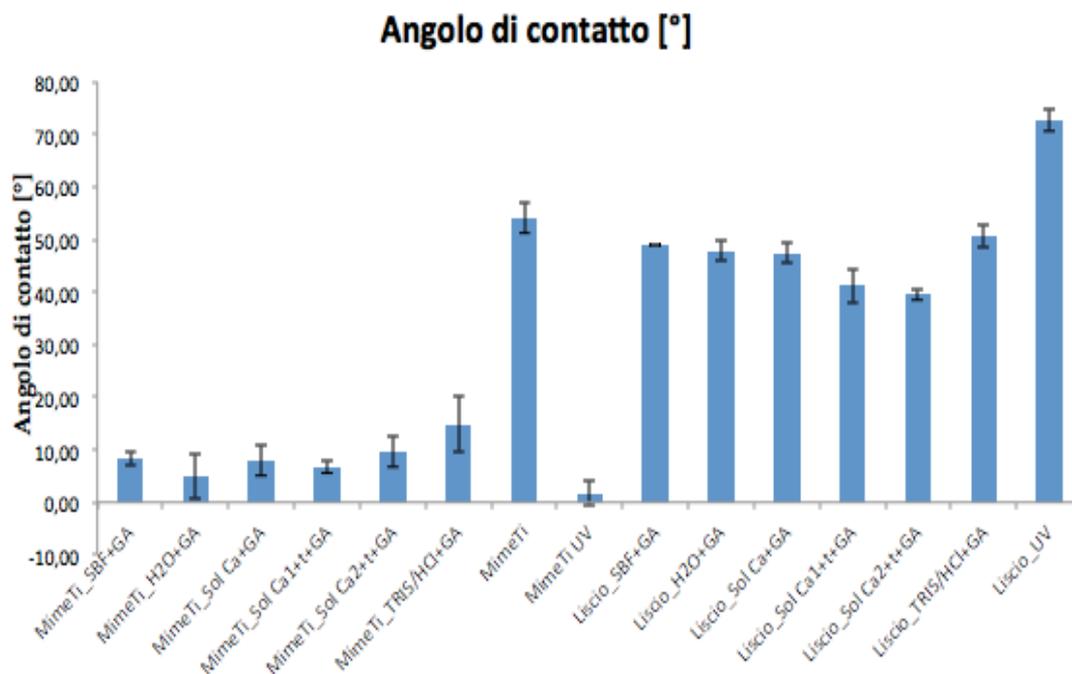


Fig. 5.5: Confronto bagnabilità tra campioni MimeTi e Liscio.

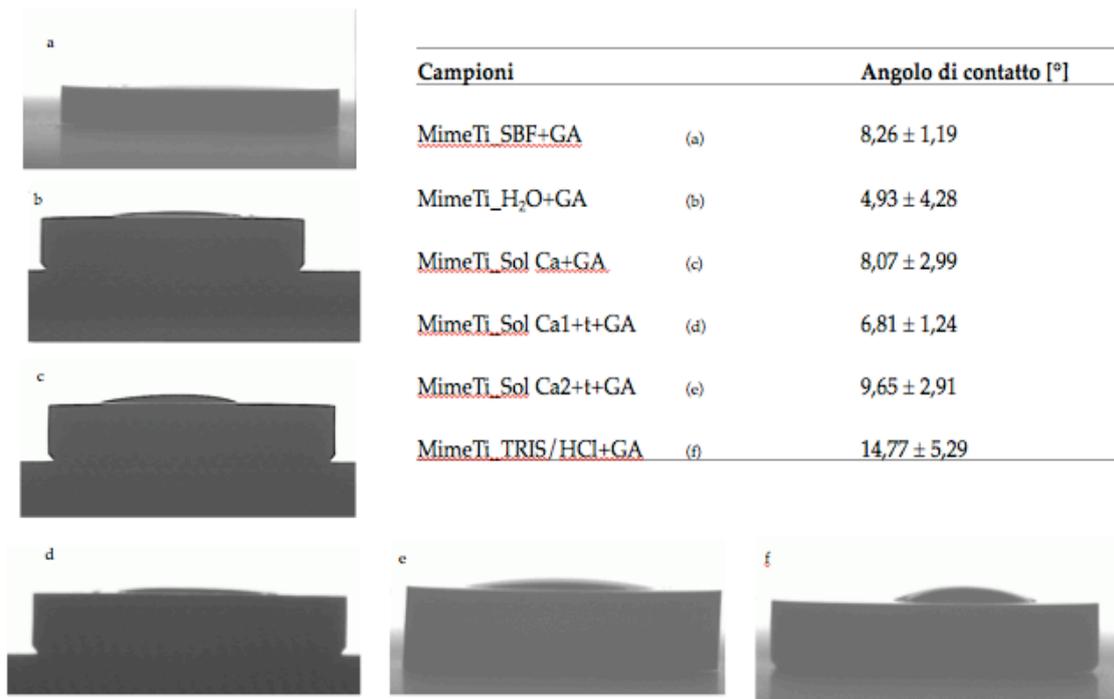


Fig. 5.6: Tabella con angoli di contatto di MimeTi funzionalizzato e relative immagini: a) *MimeTi_SBF+GA*; b) *MimeTi_H₂O+GA*; c) *MimeTi_Sol. Ca+GA*; d) *MimeTi_Sol. Ca1+t+GA*; e) *MimeTi_Sol. Ca2+t+GA*; f) *MimeTi_TRIS/HCl+GA*.



Fig. 5.7: Tabella con angoli di contatto di Ti6Al4V liscio funzionalizzato e relative immagini: a) *Liscio_SBF+GA*; b) *Liscio_H₂O+GA*; c) *Liscio_Sol. Ca+GA*; d) *Liscio_Sol. Ca1+t+GA*; e) *Liscio_Sol. Ca2+t+GA*; f) *Liscio_TRIS/HCl+GA*.

5.2.2 Misurazione del pH

Il pH a 37 °C delle soluzioni con GA dopo la funzionalizzazione dei campioni di Ti6Al4V non subisce modifiche rispetto al valore misurato precedentemente per le soluzioni alle medesime condizioni (Tabella 5.2).

Tabella 5.2: Valori di pH delle soluzioni con GA dopo la funzionalizzazione dei campioni.

Campione	pH					
	SBF+GA	H2O+GA	Sol. Ca +GA	Sol.Ca1+t+GA	Sol. Ca2+t+GA	TRIS/HCl+GA
MimeTi	7,15 ± 0,01	3,37 ± 0,01	3,36 ± 0,03	7,20 ± 0,06	7,18 ± 0,05	7,31 ± 0,09
Liscio	7,14 ± 0,01	3,36 ± 0,01	3,33 ± 0,01	7,22 ± 0,06	7,22 ± 0,03	7,30 ± 0,01

5.2.3 F&C per campioni massivi

Osservando i risultati del test F&C su MimeTi (Fig. 5.8), si nota come sia possibile tracciare un andamento medio rispetto all'avvenuta funzionalizzazione, considerando la presenza in soluzione di cationi metallici.

MimeTi_SBF + GA, MimeTi_Sol. Ca²⁺+GA mostrano una concentrazione equivalente di GA statisticamente indipendente rispetto a quella misurata per MimeTi_TRIS/HCl+GA. Ciò suggerisce che la presenza di ioni bivalenti sia necessaria per mediare la funzionalizzazione con polifenoli della superficie metallica. La sola deprotonazione delle molecole di GA non è sufficiente, tanto più se confrontati i risultati tra MimeTi_Sol. Ca+GA e MimeTi_TRIS/HCl+GA. In questo caso, nonostante la che il pH della soluzione Sol. Ca+GA sia tale da non permettere la deprotonazione di GA, la concentrazione ottenuta è superiore rispetto al MimeTi in tampone, presumibilmente per la presenza di Ca²⁺.

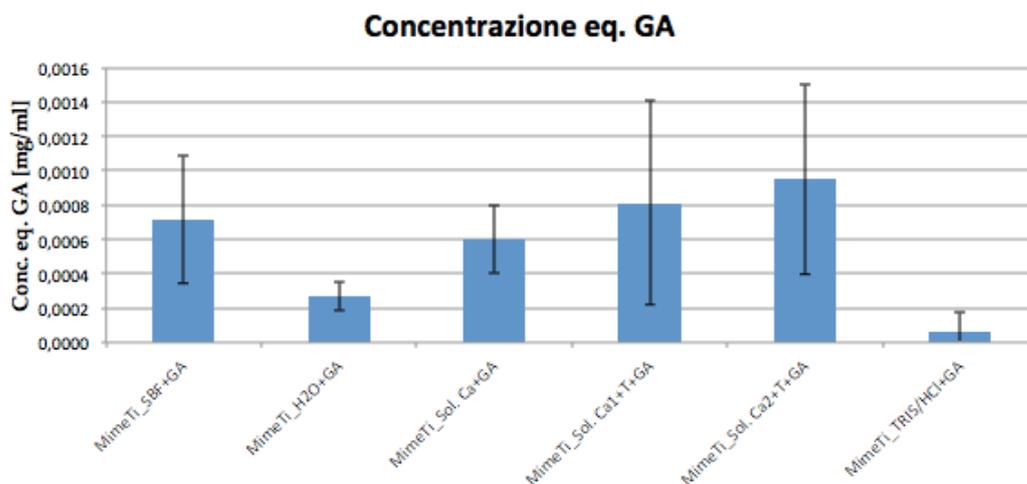


Fig. 5.8: Concentrazione equivalente GA su campioni MimeTi.

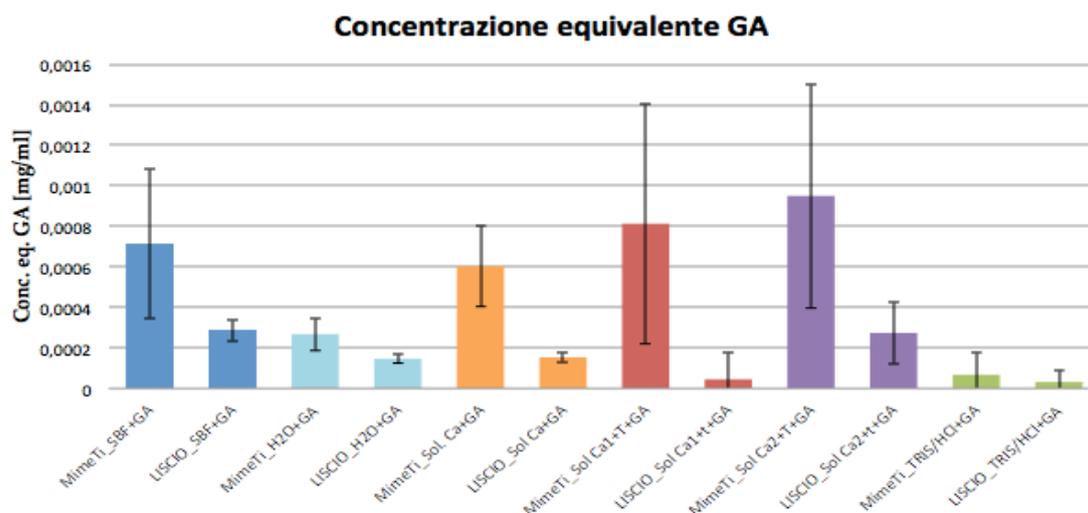


Fig. 5.9: Confronto concentrazione equivalente di GA sulla superficie dei campioni.

L'elevata variabilità di alcuni campioni mostra la necessità di approfondire la riproducibilità della funzionalizzazione superficiale.

L'efficacia del trattamento chimico è riscontrabile confrontando i risultati dei campioni MimeTi e Liscio (Fig. 5.9).

Confrontando i risultati fra i campioni MimeTi_Sol.Ca1+t+GA, MimeTi_Sol.Ca2+t+GA e i campioni funzionalizzati in due fasi MimeTi_Ca1_TRIS/HCl+GA, MimeTi_Ca2_TRIS/HCl+GA, si può comprendere meglio il ruolo svolto da Ca^{2+} nel legame superficie/GA.

Osservando l'andamento dei valori medi, l'adsorbimento superficiale di calcio non ha incrementato la funzionalizzazione con la molecola polifenolica. Nel caso di MimeTi_Ca2_TRIS/HCl+GA si ha una differenza statisticamente rilevante con la concentrazione di MimeTi_Sol.Ca2+t+GA (Fig. 5.10).

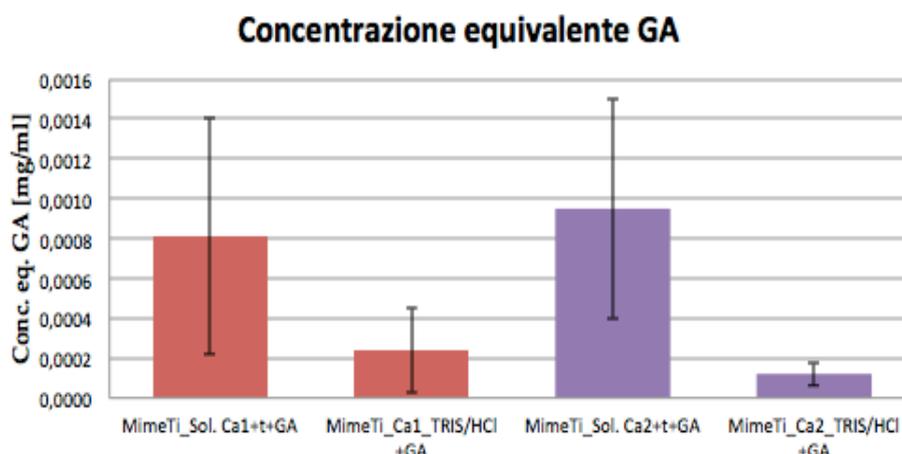


Fig. 5.10: Confronto concentrazione equivalente di GA nei campioni funzionalizzati con il calcio, in uno o due passaggi.

Tale risultato suggerisce che per mediare l'interazione fra superficie e GA, sia necessaria la presenza in soluzione di cationi metallici, in accordo con quanto riportato da Geißler et al. [153]. Gli autori indicano come la polimerizzazione in soluzione delle molecole polifenoliche (pirogallolo e TA) favorisca l'interazione con il substrato in titanio. Nel reticolo superficiale è stata rilevata la presenza di Na e Mg (elementi presenti nel buffer utilizzato), ipotizzando quindi un ruolo nella formazione del film funzionalizzante.

Si può quindi ipotizzare un ruolo di ioni bivalenti (Ca^{2+} e Mg^{2+}) come mediatori di polimerizzazione. Sul ruolo di Mg^{2+} ulteriori accertamenti dovranno essere eseguiti. Dai risultati ottenuti, il ruolo di Na^+ pare non sia principale. Considerando SBF, la concentrazione di Na^+ è pari a 142 mM, di molto superiore a quella di Ca^{2+} (2,5 mM) [173]. Se gli ioni Na^+ svolgessero un ruolo principale nella formazione di un reticolo di GA, i campioni funzionalizzati in SBF+GA dovrebbero presentare risultati significativamente migliori rispetto a quelli verificati.

5.3 Confronto MimiTi funzionalizzati con GA, TPH, PPH

È stato misurato l'angolo di contatto di MimeTi funzionalizzato con GA, TPH e PPH in soluzione SBF (Fig. 5.11).

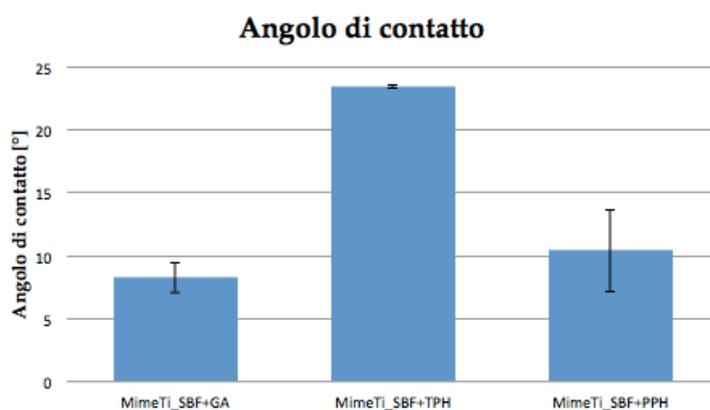


Fig. 5.11: Angolo di contatto MimeTi funzionalizzato in SBF con GA, TPH, PPH.

La minor bagnabilità di MimeTi_SBF+TPH ($23,40 \pm 0,14$) rispetto MimeTi_SBF+GA ($8,26 \pm 1,19$) e MimeTi_SBF+PPH ($10,40 \pm 3,25$), è legata alla maggior complessità delle molecole e il maggior numero di anelli aromatici.

5.3.1 Analisi XPS

La composizione chimica dello strato superficiale dei campioni può dare informazioni sulla qualità della funzionalizzazione del materiale con polifenoli (Tabella 5.3). Le basse percentuali di Ti indicano l'avvenuto rivestimento con molecole fenoliche, anche se nel campione MimeTi_SBF+GA, il livello maggiore di Ti, O, Ca può derivare dall'esposizione dell'ossido del materiale, dovuto a un non completo rivestimento.

La presenza di C sulla superficie è dovuta oltre che ai composti fenolici, all'inevitabile contaminazione carboniosa riscontrabile sulla superficie di materiali reattivi [11, 62].

Tabella 5.3: Percentuale atomica degli elementi nei campioni analizzati tramite XPS.

Elementi	MimeTi	MimeTi_SBF+GA	MimeTi_SBF+TPH	MimeTi_SBF+PPH
	[%at]			
O	60,7	48,3	28,5	24,8
C	20,7	38,2	68,5	74,1
Ti	16,2	10,3	1,1	0,7
Ca	-	2,6	0,8	0,5
altri	2,3	0,6	1,0	-

Osservando nel dettaglio gli spettri nella regione del carbonio (Fig. 5.12), si nota la presenza di un picco principale intorno ai 284,7 eV dovuto ai legami C-C, C-H e alle contaminazioni accidentali carboniose. I contributi a 286,13 - 286,31 eV e 288,11-288.62 eV possono essere ricondotti rispettivamente ai legami C-O, C=O [11, 62].

Nello spettro del campione funzionalizzato con GA, si osservano due contributi aggiuntivi a 289,36 eV e 292 eV (Fig. 5.12 a). Il primo picco è dovuto a un gruppo carbossilico [183, 184], mentre la delocalizzazione elettronica dovuta alla transizione π - π^* (HOMO-LUMO) è la causa della presenza del picco satellite a 292 eV [185]. Tali picchi non sono riscontrabili nei campioni funzionalizzati con TPH e PPH: avendo percentuale atomica di C superiore rispetto al MimeTi_SBF + GA, il fondo scala è differente e i contributi satellite risultano non significativi.

Gli spettri ad alta risoluzione della regione dell'ossigeno (Fig. 5.13) mostrano come il campione MimeTi_SBF+GA abbia un elevato contributo a 530 eV, dovuto all'esposizione di ossido metallico superficiale [186], come già ipotizzato in precedenza. I campioni MimeTi_SBF+TPH e MimeTi_SBF+PPH presentano un

contributo significativo a 532,93-533,26 eV tipico del gruppo $-OH$ (Fig. 5.13 b,c) [187,188]. Un elevato numero di gruppi ossidrilici testimonia l'avvenuta funzionalizzazione. Il contributo a 531,5 eV è invece riferito al legame C-O [XII].

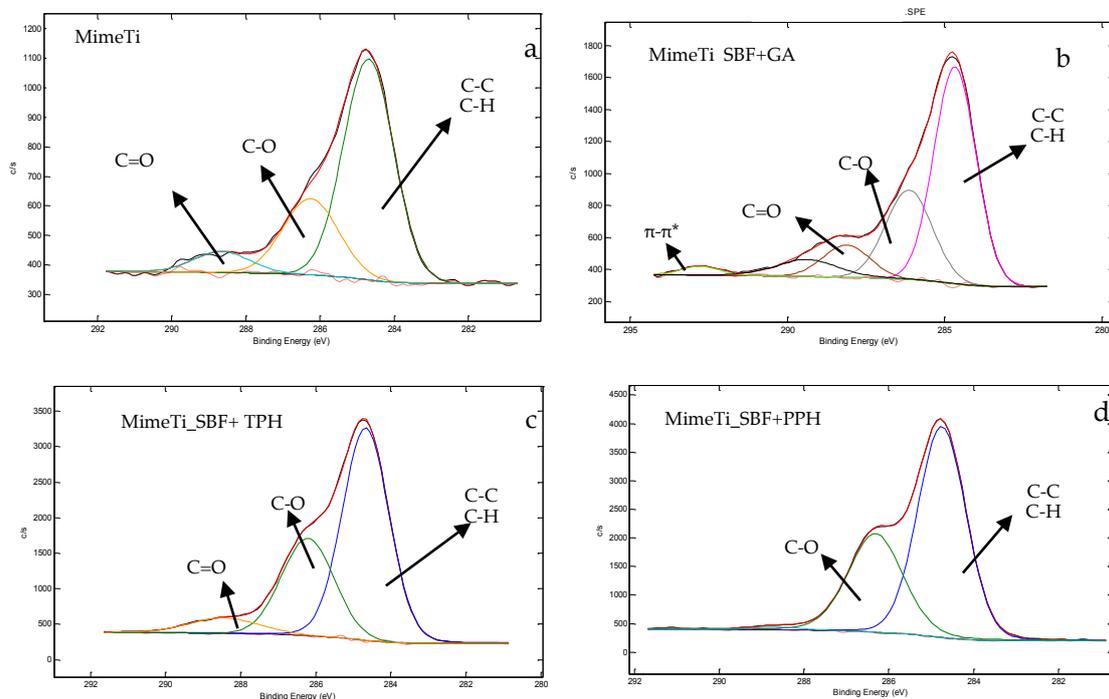


Fig. 5.12: Dettaglio dell'analisi XPS nella regione C per: a) MimeTi; b) MimeTi_SBF+GA; c) MimeTi_SBF+TPH; d) MimeTi_SBF+PPH.

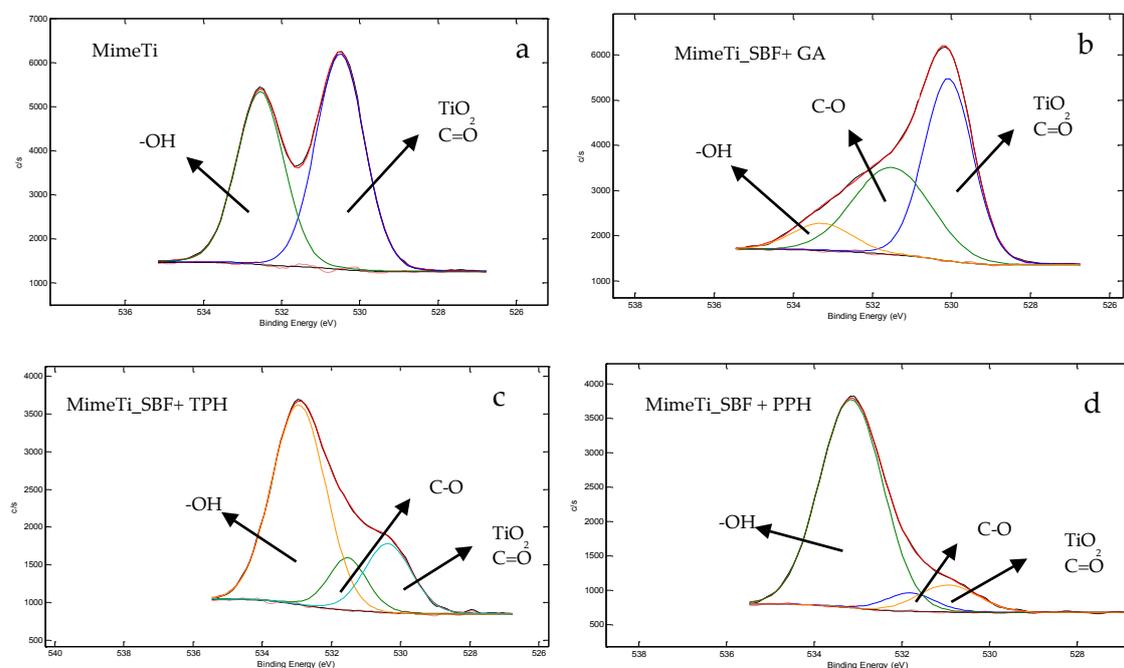


Fig. 5.13: Dettaglio dell'analisi XPS nella regione O per: a) MimeTi; b) MimeTi_SBF+GA; c) MimeTi_SBF+TPH; d) MimeTi_SBF+PPH.

5.3.2 Analisi fluorescenza

Le immagini a fluorescenza mostrano la distribuzione dei polifenoli sulla superficie dei campioni (Fig. 5.14).

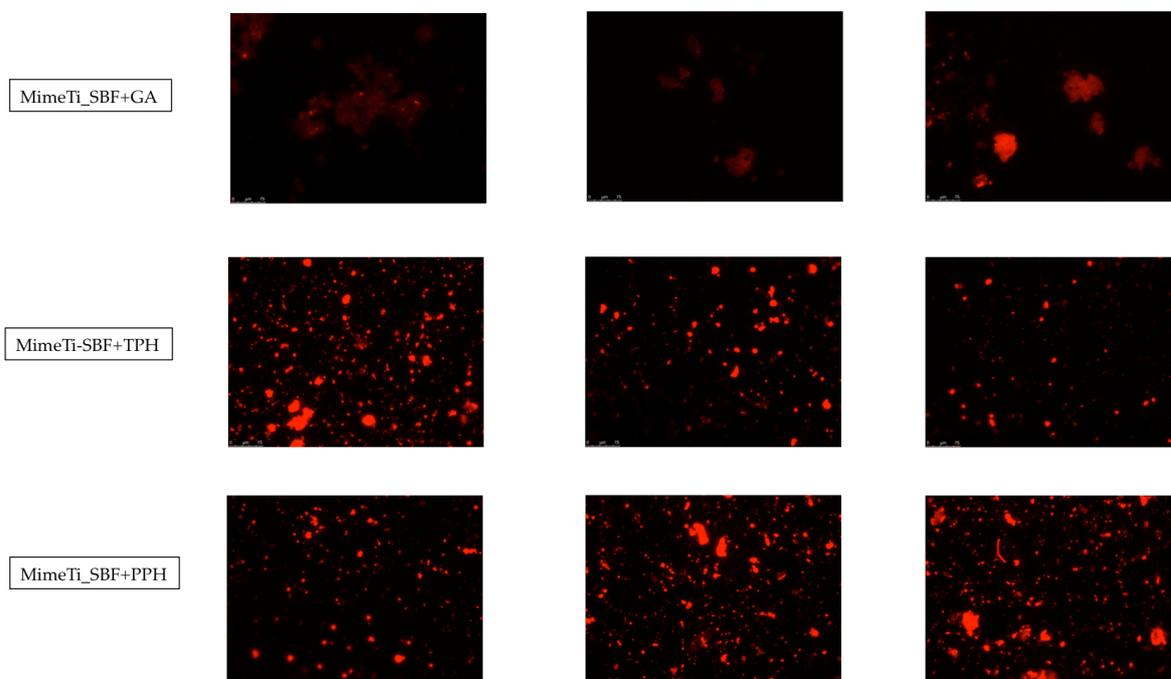


Fig. 5.14: Immagini a fluorescenza di *MimeTi_SBF+GA*, *MimeTi_SBF+TPH*, *MimeTi_SBF+PPH*.

In accordo con i risultati ottenuti dall'analisi XPS, il campione *MimeTi_SBF+GA* mostra una distribuzione non uniforme, con ampie zone di superficie non funzionalizzate mentre in altre sono presenti dei *cluster*. *MimeTi_SBF+TPH* e *MimeTi_SBF+PPH* invece mostrano una distribuzione più uniforme su tutta la superficie con piccoli agglomerati di dimensioni ridotte rispetto a GA. La differenza può essere dovuta alla differente dimensione delle molecole.

5.3.3 Potenziale zeta

La misura del potenziale zeta in funzione del pH è riportata in Fig. 5.15. Il trattamento chimico permette di esporre specie acide sulla superficie di Ti6Al4V garantendo una carica superficiale negativa a *MimeTi* non funzionalizzato [177]. Il plateau in ambiente alcalino indica un'omogeneità delle specie superficiali che risultano deprotonate oltre i pH fisiologici. Un aumento della carica negativa superficiale è riscontrato a pH 9 probabilmente dovuto alla presenza di gruppi OH di acidità differente rispetto a quelli principali [177].

Comportamento analogo si può osservare in *MimeTi_SBF+PPH*; presenta una carica superficiale negativa maggiore rispetto a *MimeTi* dovuta alla

funzionalizzazione con i polifenoli. Nel range acido la carica superficiale negativa tende a ridursi al diminuire del pH. Verso pH 3 il potenziale zeta è sovrapponibile a quello di MimeTi, probabilmente per la raggiunta neutralità delle molecole del rivestimento.

Nelle curve dei substrati funzionalizzati è riscontrabile una discontinuità a pH 5,5 ~ 5,7, valori circa ai quali iniziano le misurazioni nei due range. Questa discontinuità può essere considerata un artefatto dovuto alle misurazioni effettuate in tempi diversi e alla possibilità che l'esposizione acida abbia modificato in parte il rivestimento polifenolico. L'alterazione della misura è comunque inferiore ai 10 mV pertanto può considerarsi trascurabile [177].

Osservando la curva di titolazione dei campioni MimeTi_SBF+GA e MimeTi_SBF+TPH si nota un comportamento differente. Entrambe le curve presentano in range acido, al diminuire del pH, un picco relativo dovuto alla diminuzione della carica superficiale, rispettivamente a 5,1 e 4,7. A pH più acidi si inverte la tendenza e il modulo del potenziale zeta torna ad aumentare, per poi repentinamente diminuire tra pH 3,8- 3,5. A pH ~ 3,0 il potenziale zeta di MimeTi_SBF+GA presenta un andamento simile a MimeTi e MimeTi_SBF+PPH, mentre in MimeTi_SBF+TPH è riscontrabile un plateau e poi una lieve riduzione.

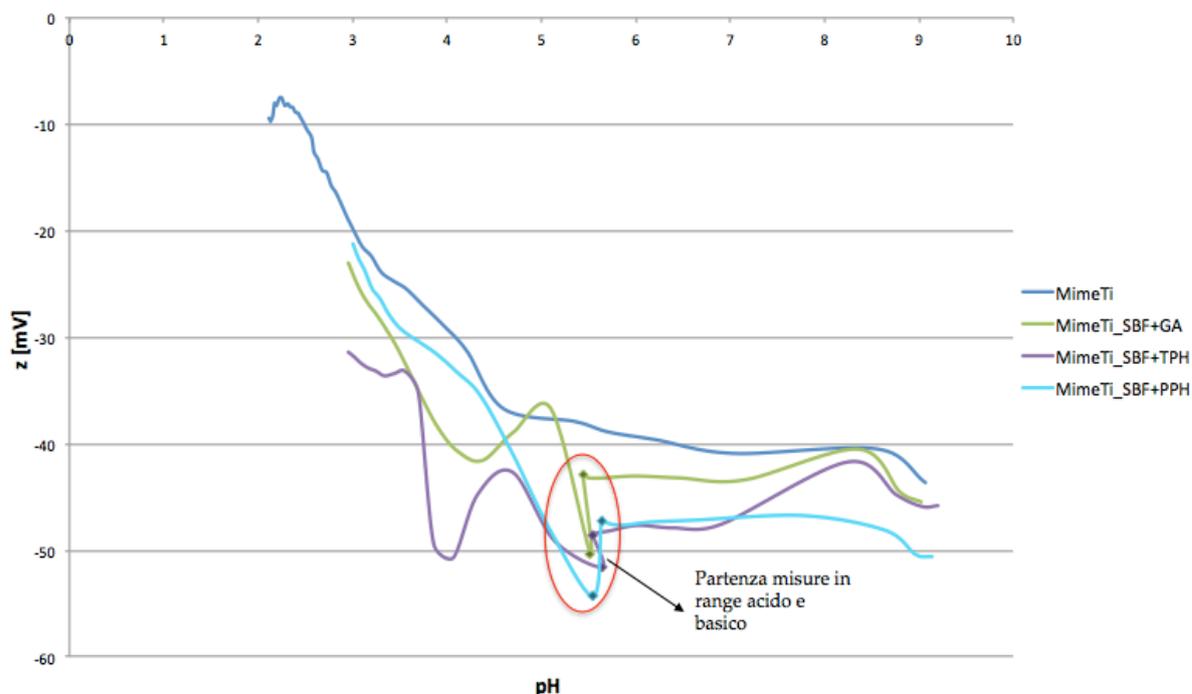


Fig. 5.15: Curve del potenziale zeta per titolazioni acide e basiche dei campioni MimeTi_SBF+GA, MimeTi_SBF+TPH, MimeTi_SBF+PPH e MimeTi [177].

La riduzione della carica negativa può essere ricondotta alla diminuzione di specie dissociate sulla superficie e all'avvicinarsi della pK_a delle molecole. Il seguente aumento del modulo del potenziale zeta può essere legato a una reattività tra le molecole e il substrato. Il plateau in MimeTi_SBF+TPH può esser legato alla maggior complessità delle molecole presenti, che possono presentare un maggior acidità rispetto a GA.

Nella curva in range basico si nota un primo plateau fino a circa pH fisiologico, per poi assistere a un trend verso carica positiva con massimo a pH 8,3, legato alla decomposizione o auto-ossidazione dei polifenoli in range fortemente alcalino[177, 189]. Il successivo aumento di carica negativa è associabile, come già detto in precedenza, alla presenza di gruppi OH di acidità differente rispetto a quelli principali.

Sui campioni è stato effettuato il test di F&C per campioni massivi per vedere se l'esposizione ad ambienti alcalini abbia alterato il rivestimento superficiale. Le concentrazioni equivalenti di GA risultano nulle per MimeTi funzionalizzato con GA, TPH ed molto basse (0,0002 mg/ml) per PPH.

5.3.3.1 Spettro UV-vis al variare del pH

Al fine di indagare meglio il comportamento dei polifenoli in range acido, sono stati acquisiti gli spettri UV-vis delle soluzioni dei polifenoli naturali in acqua bidistillata al pH naturalmente raggiunto, 3 e 5 valutando l'eventuale modifica della colorazione delle soluzioni (Fig. 5.16).

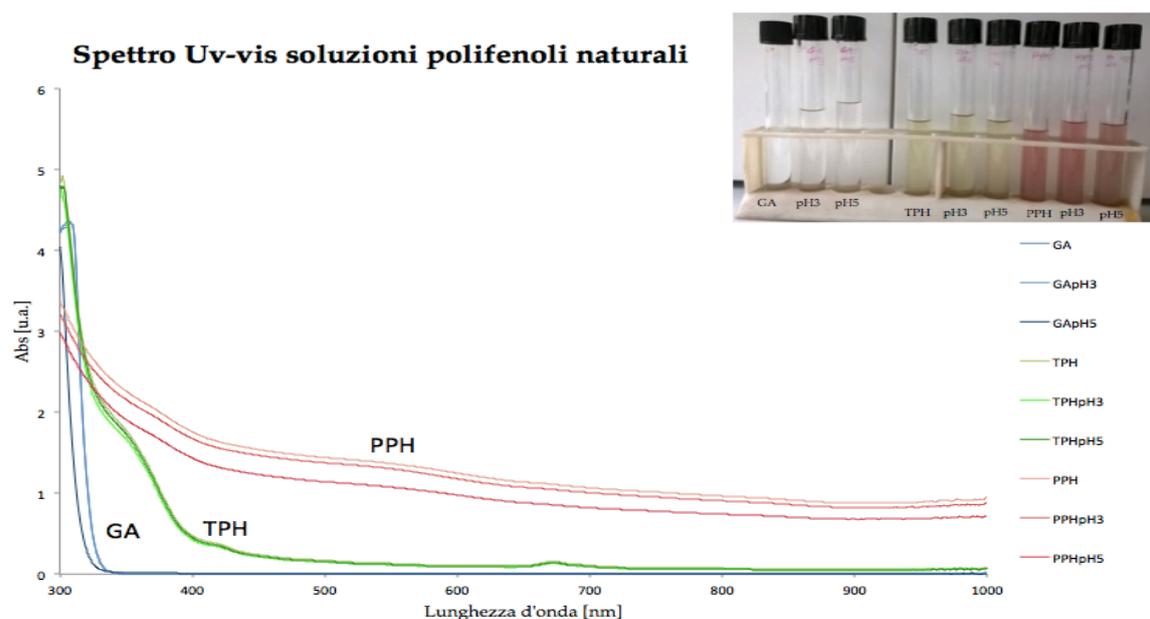


Fig. 5.16: Spettri UV-vis delle soluzioni con polifenoli a pH naturale, 3 e 5 con relativo colore.

Gli spettri ottenuti mostrano differenze tra le soluzioni di GA, TPH, PPH. Confrontando le soluzioni a diversa titolazione, non si notano cambiamenti significativi sia all'analisi UV-vis che a una semplice osservazione visiva. Per tanto i gruppi coinvolti nella deprotonazione nel range indagato, non producono la variazione di colorazione riscontrabile a pH maggiormente alcalini.

5.4 Test cellulari

La sopravvivenza cellulare a 1, 3, 5 e 7 giorni è riportata in Fig. 5.17. I campioni MimeTi mostrano un'interessante riduzione della vitalità per le cellule U2OS, testimone di un importante effetto antitumorale del titanio trattato chimicamente. Parallelamente alla mortalità tumorale si registra anche una riduzione, se pur contenuta, della vitalità delle cellule sane. Tale riduzione della conta delle cellule sane potrebbe essere correlata a una contaminazione superficiale ma ulteriori accertamenti sono necessari per valutare opportunamente l'azione del substrato.

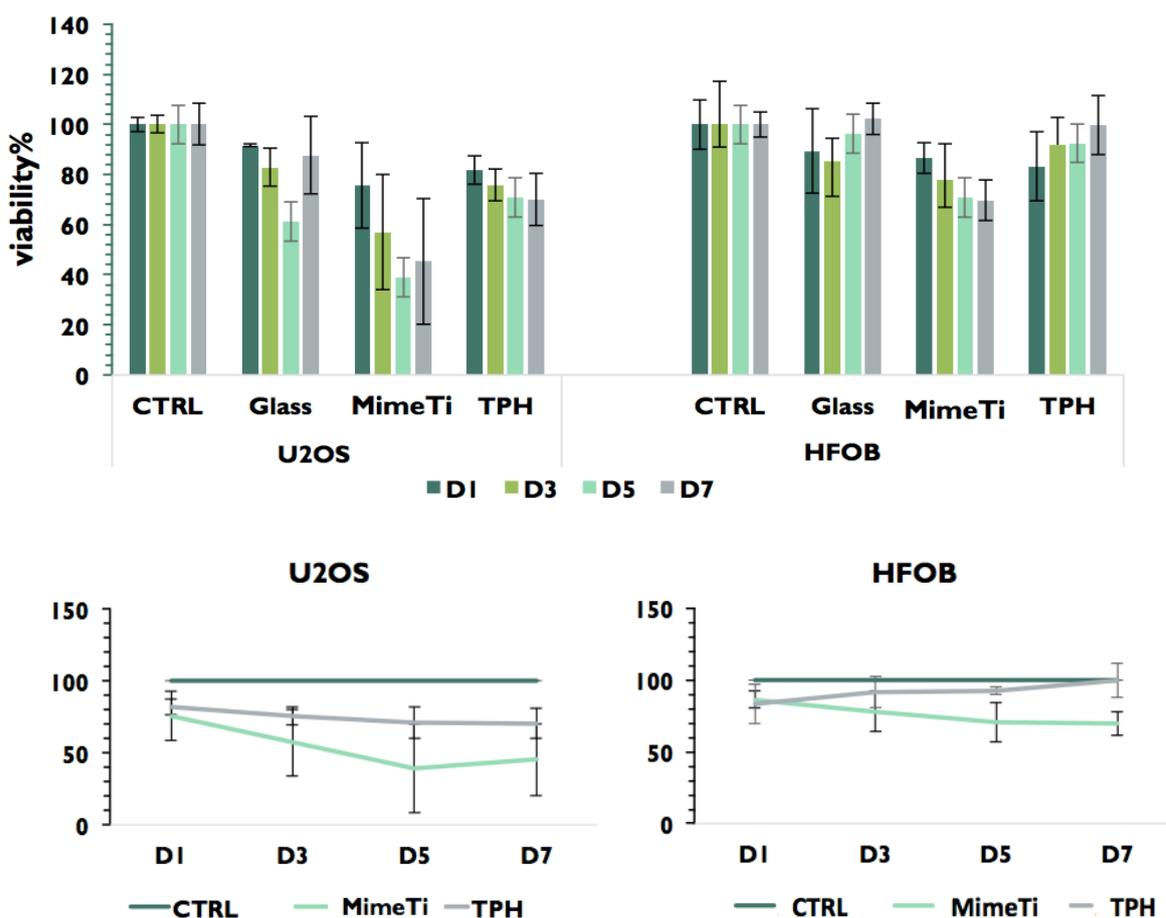


Fig. 5.17: Tassi di sopravvivenza cellulare a 1, 3,5 e 7 giorni del controllo, su vetro, MimeTi e MimeTi_SBF+TPH (TPH).

I risultati ottenuti per MimeTi_SBF+TPH mostrano una ridotta capacità antitumorale se confrontati con il MimeTi privo di funzionalizzazione. La funzionalizzazione può aver mascherato gli effetti del substrato non compensati dal ridotto quantitativo di polifenoli superficiali. Se l'attività contro le cellule tumorali risulta non significativa, TPH mostra effetti protettivi nei confronti delle cellule HFOB: si riscontra un incremento relativo della conta delle cellule sane. Pertanto la funzionalizzazione con TPH mostra una citotossicità selettiva, per quanto limitata, per le cellule tumorali. Tale dato può essere confrontato con lavori precedenti del gruppo di ricerca, anche se l'attività antitumorale riscontrata risultò quantitativamente più significativa [175].

5.4.1 Valutazione danni DNA

Il DAPI (colorazione blu) permette di individuare la presenza delle cellule e la loro posizione legandosi selettivamente al DNA del nucleo cellulare [190]. La presenza di γ -H2ax (rosso, Fig. 5.18) e 53BP1 (verde, Fig. 5.18) co-localizzati all'interno dei nuclei cellulari è un indicatore dell'avvenuto danneggiamento del DNA. Nello specifico, entrambi i fattori sono legati al danno del doppio filamento di DNA (DSB) [178, 191]. Tale presenza è maggiormente riscontrabile nelle cellule U2OS a contatto con MimeTi. Il meccanismo di danneggiamento del DNA da parte di MimeTi non è ancora noto.

È visibile un elevato livello di 53BP1 nelle cellule HFOB in presenza di TPH. Il ruolo di 53BP1 a livello citoplasmatico non è ben definito, potrebbe influenzare l'omeostasi mitocondriale [192]. La presenza di TPH può aver favorito reazioni di ossidoriduzione e quindi coinvolto i meccanismi mitocondriali (Fig. 5.18).

Comunque le cellule HFOB in contatto con TPH, considerando anche la precedente valutazione sulla sopravvivenza cellulare, non mostrano segnali di sofferenza cellulare, dato valutabile anche per l'assenza di ciclina B1 nucleare e la forte adesione e spreading cellulare osservabili dalla visualizzazione della F-actina (rosso, Fig. 5.19).

L'elevata concentrazione di ciclina B1 si lega al ritardo di ingresso della fase G2 dovuto al danneggiamento del DNA [193], in particolare se localizzata a livello nucleare [175].

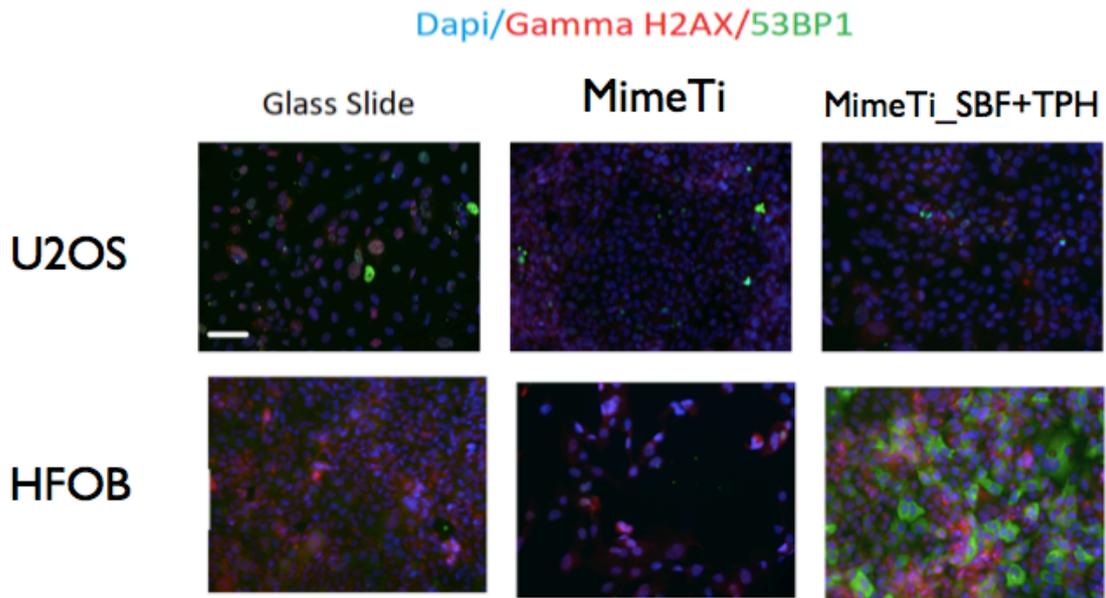


Fig. 5.18: Immagini a fluorescenza sulla valutazione danni al DNA. In blu nuclei cellulari, in rosso la γ -H2ax, in verde 53BP1.

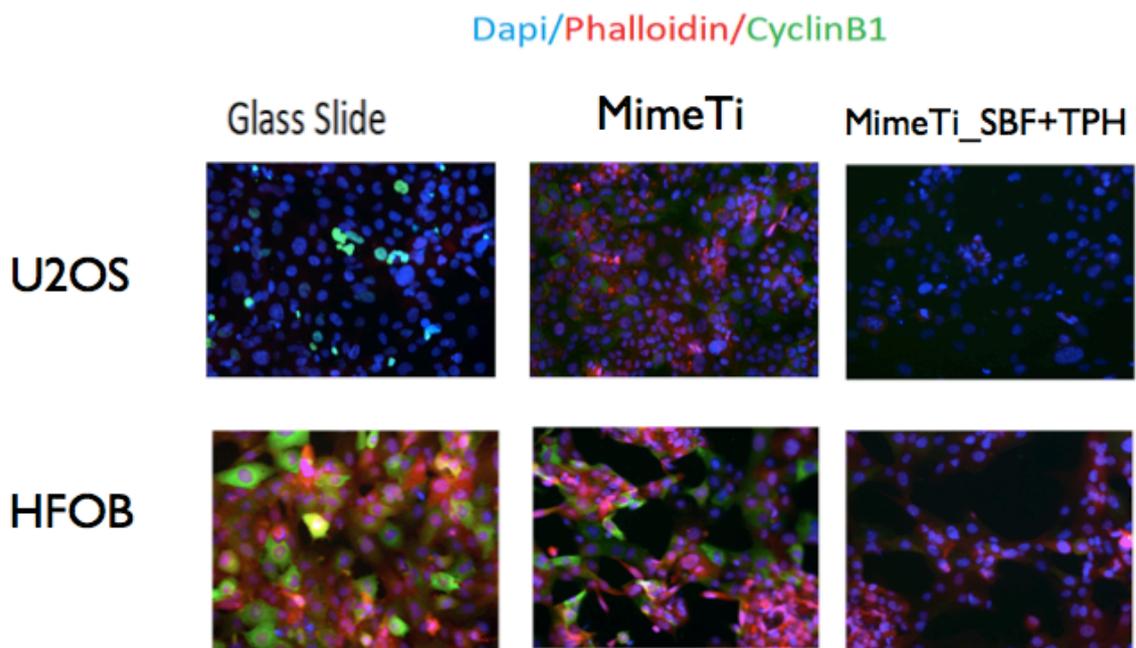


Fig. 5.19: Immagini a fluorescenza sulla valutazione danni al DNA. In blu nuclei cellulari, in rosso F-actina, in verde ciclina B1.

Conclusioni

L'acido gallico (GA) e polifenoli naturali estratti da tè verde (TPH) e vinacce di uva rossa (PPH) sono stati utilizzati per la funzionalizzazione della lega Ti6Al4V. Sei differenti soluzioni di GA sono state utilizzate per determinare i fattori che influenzano la funzionalizzazione di campioni trattati chimicamente (MimeTi) e lucidati (Liscio). Il test di Folin&Ciocalteu per campioni massivi ha permesso di determinare come la presenza di ioni Ca^{2+} in soluzione e la relativa formazione di complessi calcio/gallato influenzi la concentrazione equivalente di GA superficiale. In particolare i campioni MimeTi_SBF+GA, MimeTi_Sol. Ca^{2+} +GA sono risultati statisticamente indipendenti ($p < 0.05$) dal campione MimeTi_TRIS/HCl+GA, campione funzionalizzato in assenza di cationi metallici. Il preventivo adsorbimento di calcio sulla superficie non è risultato efficace nell'incrementare la funzionalizzazione.

La misura dell'angolo di contatto permette di avere velocemente informazioni sull'avvenuta modifica della superficie osservando la variazione della bagnabilità. La presenza delle biomolecole sui campioni è stata verificata attraverso l'analisi XPS e a fluorescenza. Inoltre la misura del potenziale zeta ha permesso di studiare il comportamento della funzionalizzazione a diversi pH di esposizione.

È stata valutata la risposta biologica di cellule tumorali di osteosarcoma umano U2OS e di cellule primarie sane HFOB al contatto con campioni trattati chimicamente privi di funzionalizzazione (MimeTi) e funzionalizzati con polifenoli del tè verde (MimeTi_SBF+TPH). I campioni MimeTi hanno mostrato un elevato effetto antitumorale e un modesto effetto citotossico verso le cellule sane. I meccanismi di azione sul DNA devono essere approfonditi. Il contatto con TPH ha prodotto solo una limitata riduzione della vitalità delle cellule cancerose, risultando però un fattore protettivo nei confronti delle cellule sane. Risulta necessario valutare l'incremento della concentrazione superficiale di polifenoli per approfondire le meccaniche d'azione.

Ringraziamenti

Ringrazio la Prof.ssa Silvia Spriano per avermi dato l'opportunità di sviluppare l'argomento trattato in questa tesi.

Un ringraziamento particolare alla Dott.ssa Sara Ferraris e alla Dott.ssa Martina Cazzola per avermi seguito e aiutato nella attività sperimentale.

Un ringraziamento al Dott. Andrea Cochis e alla Dott.ssa Rita Sorrentino per l'ospitalità presso il dipartimento Scienze della Salute, Università Piemonte Orientale (UPO), Novara nel quale si sono svolti i test cellulari *in vitro*.

Bibliografia

- [1] K. B. Pandey and S. I. Rizvi, "Plant Polyphenols as Dietary Antioxidants in Human Health and Disease", *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, vol. 2, no. 5, pp. 270–278, 2009.
- [2] F. Shahidi and M. Naczek, *Phenolics in food and nutraceuticals*. CRC Press, 2004.
- [3] S. S. Duffey and M. J. Stout, "Antinutritive and toxic components of plant defense against insects," *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, vol. 32, no. 1, pp. 3–37, 1996.
- [4] N. Verma and S. Shukla, "Impact of various factors responsible for fluctuation in plant secondary metabolites," *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, vol. 2, no. 4, pp. 105–113, 2015.
- [5] E. Haslam, *Plant polyphenols: vegetable tannins revisited*. Cambridge University Press, 1989.
- [6] M. F.-F. Chong, R. Macdonald, and J. A. Lovegrove, "Fruit polyphenols and CVD risk: a review of human intervention studies," *British Journal of Nutrition*, vol. 104, pp. S28-S39, 2010.
- [7] S. Losada-Barreiro and C. Bravo-Díaz, "Free radicals and polyphenols: The redox chemistry of neurodegenerative diseases," *European Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 133, pp. 379–402, 2017.
- [8] A.-N. Li, S. Li, Y.-J. Zhang, X.-R. Xu, Y.-M. Chen, and H.-B. Li, "Resources and Biological Activities of Natural Polyphenols," *Nutrients*, vol. 6, no. 12, pp. 6020–6047, 2014.
- [9] G. Ferrazzano, I. Amato, A. Ingenito, A. Zarrelli, G. Pinto, and A. Pollio, "Plant Polyphenols and Their Anti-Cariogenic Properties: A Review," *Molecules*, vol. 16, no. 12, pp. 1486–1507, 2011.
- [10] S. Quideau, D. Deffieux, C. Douat-Casassus, and L. Pouységu, "Plant Polyphenols: Chemical Properties, Biological Activities, and Synthesis," *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 50, no. 3, pp. 586–621, 2011.
- [11] X. Zhang, S. Ferraris, E. Prenesti, and E. Verné, "Surface functionalization of bioactive glasses with natural molecules of biological significance, Part I: Gallic acid as model molecule," *Applied Surface Science*, vol. 287, pp. 329–340, 2013.
- [12] F. Shahidi, *Handbook of antioxidants for food preservation*. Woodhead Publ./Elsevier, 2015.
- [13] R. Tsao, "Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols," *Nutrients*, vol. 2, no. 12, pp. 1231–1246, 2010.

- [14] D. Raffa, B. Maggio, M. V. Raimondi, F. Plescia, and G. Daidone, "Recent discoveries of anticancer flavonoids," *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2017.
- [15] S. P. Soundarya, V. Sanjay, A. H. Menon, S. Dhivya, and N. Selvamurugan, "Effects of flavonoids incorporated biological macromolecules based scaffolds in bone tissue engineering," *International Journal of Biological Macromolecules*, 2017.
- [16] S. Parasuraman, A. A. David, and R. Arulmoli, "Overviews of biological importance of quercetin: A bioactive flavonoid," *Pharmacognosy Reviews*, vol. 10, no. 20, p. 84, 2016.
- [17] H. Chaaban, I. Ioannou, C. Paris, C. Charbonnel, and M. Ghoul, "The photostability of flavanones, flavonols and flavones and evolution of their antioxidant activity," *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, vol. 336, pp. 131–139, 2017
- [18] M.M. Garazd, Y.L. Garadz and V.P. Khilya, "Neoflavones. 1. Natural Distribution and Spectral and Biological Properties," *Chemistry of Natural Compounds*, vol. 39, pp. 54-121, 2003.
- [19] D. D. Rio, A. Rodriguez-Mateos, J. P. Spencer, M. Tognolini, G. Borges, and A. Crozier, "Dietary (Poly)phenolics in Human Health: Structures, Bioavailability, and Evidence of Protective Effects Against Chronic Diseases," *Antioxidants & Redox Signaling*, vol. 18, no. 14, pp. 1818–1892, Oct. 2013.
- [20] D. J. Zeeb, B. C. Nelson, K. Albert, and J. J. Dalluge, "Separation and Identification of Twelve Catechins in Tea Using Liquid Chromatography / Atmospheric Pressure Chemical Ionization-Mass Spectrometry," *Analytical Chemistry*, vol. 72, no. 20, pp. 5020–5026, 2000.
- [21] M. J. Kruger, N. Davies, K. H. Myburgh, and S. Lecour, "Proanthocyanidins, anthocyanins and cardiovascular diseases," *Food Research International*, vol. 59, pp. 41–52, 2014.
- [22] A. Ananga, V. Georgiev, J. Ochieng, B. Phills, and V. Tsolov, "Production of Anthocyanins in Grape Cell Cultures: A Potential Source of Raw Material for Pharmaceutical, Food, and Cosmetic Industries," *The Mediterranean Genetic Code - Grapevine and Olive*, Oct. 2013.
- [23] F. Pina, J. Oliveira, and V. D. Freitas, "Anthocyanins and derivatives are more than flavylium cations," *Tetrahedron*, vol. 71, no. 20, pp. 3107–3114, 2015.

- [24] S. L. Gaonkar and U. N. Vignesh, "Synthesis and pharmacological properties of chalcones: a review," *Research on Chemical Intermediates*, vol. 43, no. 11, pp. 6043–6077, 2017.
- [25] C. Zhuang, W. Zhang, C. Sheng, W. Zhang, C. Xing and Z. Miao, "Chalcone: A privileged structure in medicinal Chemistry," *Chemical Review*, vol. 117, no. 12, pp. 7762–7810, 2017.
- [26] R. J. Robbins, "Phenolic Acids in Foods: An Overview of Analytical Methodology," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 51, no. 10, pp. 2866–2887, 2003.
- [27] P. Mattila, J. Hellström, and R. Törrönen, "Phenolic Acids in Berries, Fruits, and Beverages," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 54, no. 19, pp. 7193–7199, 2006.
- [28] A. M. Radalla, "Potentiometric studies on ternary complexes involving some divalent transition metal ions, gallic acid and biologically abundant aliphatic dicarboxylic acids in aqueous solutions," *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*, vol. 4, no. 2, pp. 174–182, 2015.
- [29] A. Ponce, L. B. Brostoff, S. K. Gibbons, P. Zavalij, C. Viragh, J. Hooper, S. Alnemrat, K. J. Gaskell, and B. Eichhorn, "Elucidation of the Fe(III) Gallate Structure in Historical Iron Gall Ink," *Analytical Chemistry*, vol. 88, no. 10, pp. 5152–5158, 2016.
- [30] M. Friedman and H. S. Jürgens, "Effect of pH on the Stability of Plant Phenolic Compounds," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 48, no. 6, pp. 2101–2110, 2000.
- [31] J. Huguenin, S. O. S. Hamady, and P. Bourson, "Monitoring deprotonation of gallic acid by Raman spectroscopy," *Journal of Raman Spectroscopy*, vol. 46, no. 11, pp. 1062–1066, Jan. 2015.
- [32] J. Chong, A. Poutaraud, and P. Hugueney, "Metabolism and roles of stilbenes in plants," *Plant Science*, vol. 177, no. 3, pp. 143–155, 2009.
- [33] R. Flamini, F. Mattivi, M. Rosso, P. Arapitsas, and L. Bavaresco, "Advanced Knowledge of Three Important Classes of Grape Phenolics: Anthocyanins, Stilbenes and Flavonols," *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 14, no. 10, pp. 19651–19669, 2013.
- [34] J. Gambini, M. Inglés, G. Olaso, R. Lopez-Grueso, V. Bonet-Costa, L. Gimeno-Mallench, C. Mas-Bargues, K. M. Abdelaziz, M. C. Gomez-Cabrera, J. Vina, and C. Borrás, "Properties of Resveratrol: *In Vitro* and *In Vivo* Studies about

- Metabolism, Bioavailability, and Biological Effects in Animal Models and Humans," *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, vol. 2015, pp. 1–13, 2015.
- [35] G. Giovinazzo and F. Grieco, "Functional Properties of Grape and Wine Polyphenols," *Plant Foods for Human Nutrition*, vol. 70, no. 4, pp. 454–462, Jul. 2015.
- [36] K. M. Kasiotis, H. Pratsinis, D. Kletsas, and S. A. Haroutounian, "Resveratrol and related stilbenes: Their anti-aging and anti-angiogenic properties," *Food and Chemical Toxicology*, vol. 61, pp. 112–120, 2013.
- [37] H. Satake, T. Koyama, S. Bahabadi, E. Matsumoto, E. Ono, and J. Murata, "Essences in Metabolic Engineering of Lignan Biosynthesis," *Metabolites*, vol. 5, no. 2, pp. 270–290, Apr. 2015.
- [38] J.W. Lampe, "Isoflavonoid and Lignan Phytoestrogens as Dietary Biomarkers," *The Journal of Nutrition*, vol. 133, no. 3, pp. 956S-964S, 2003.
- [39] S. M. Mandal, D. Chakraborty, and S. Dey, "Phenolic acids act as signaling molecules in plant-microbe symbioses," *Plant Signaling & Behavior*, vol. 5, no. 4, pp. 359–368, 2010.
- [40] E. Pichersky and D. R. Gang, "Genetics and biochemistry of secondary metabolites in plants: an evolutionary perspective," *Trends in Plant Science*, vol. 5, no. 10, pp. 439–445, 2000.
- [41] G. I. Forrest and D. S. Bendall, "The distribution of polyphenols in the tea plant (*Camellia sinensis*L.)," *Biochemical Journal*, vol. 113, no. 5, pp. 741–755, 1969.
- [42] C. Zhang, C. L.-C. Suen, C. Yang, and S. Y. Quek, "Antioxidant capacity and major polyphenol composition of teas as affected by geographical location, plantation elevation and leaf grade," *Food Chemistry*, vol. 244, pp. 109–119, 2018.
- [43] J. Pérez-Jiménez, V. Neveu, F. Vos, and A. Scalbert, "Identification of the 100 richest dietary sources of polyphenols: an application of the Phenol-Explorer database," *European Journal of Clinical Nutrition*, vol. 64, pp. S113-S120, 2010.
- [44] C. Manach, A. Scalbert, C. Morand, C. Rémésy and L. Jiménez, "Polyphenols: food sources and bioavailability," *The American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 79, pp. 727-747, 2004.
- [45] F.-J. He and J.-Q. Chen, "Consumption of soybean, soy foods, soy isoflavones and breast cancer incidence: Differences between Chinese women and women

- in Western countries and possible mechanisms," *Food Science and Human Wellness*, vol. 2, no. 3-4, pp. 146–161, 2013.
- [46] C. Davis, J. Bryan, J. Hodgson, and K. Murphy, "Definition of the Mediterranean Diet; a Literature Review," *Nutrients*, vol. 7, no. 11, pp. 9139–9153, May 2015.
- [47] F. Sofi, R. Abbate, G. F. Gensini, and A. Casini, "Accruing evidence on benefits of adherence to the Mediterranean diet on health: an updated systematic review and meta-analysis1," *American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 92, no. 5, pp. 1189–1196, Jan. 2010.
- [48] M. Reto, M. E. Figueira, H. M. Filipe, and C. M. M. Almeida, "Chemical Composition of Green Tea (*Camellia sinensis*) Infusions Commercialized in Portugal," *Plant Foods for Human Nutrition*, vol. 62, no. 4, pp. 139–144, 2007.
- [49] G.-C. Yen and H.-Y. Chen, "Relationship between antimutagenic activity and major components of various teas," *Mutagenesis*, vol. 11, no. 1, pp. 37–41, 1996.
- [50] H. Fujiki, "Green tea: Health benefits as cancer preventive for humans," *The Chemical Record*, vol. 5, no. 3, pp. 119–132, 2005.
- [51] H. Wang and K. Helliwell, "Determination of flavonols in green and black tea leaves and green tea infusions by high-performance liquid chromatography," *Food Research International*, vol. 34, no. 2-3, pp. 223–227, 2001.
- [52] S. M. Chacko, P. T. Thambi, R. Kuttan, and I. Nishigaki, "Beneficial effects of green tea: A literature review," *Chinese Medicine*, vol. 5, no. 1, pp. 5-13, 2010.
- [53] E.-Q. Xia, G.-F. Deng, Y.-J. Guo, and H.-B. Li, "Biological Activities of Polyphenols from Grapes," *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 11, no. 2, pp. 622–646, Apr. 2010.
- [54] J. Yu and M. Ahmedna, "Functional components of grape pomace: their composition, biological properties and potential applications," *International Journal of Food Science & Technology*, vol. 48, no. 2, pp. 221–237, Jan. 2012.
- [55] Y. Lu and L. Y. Foo, "The polyphenol constituents of grape pomace," *Food Chemistry*, vol. 65, no. 1, pp. 1–8, 1999.
- [56] A. J. León-González, C. Auger, and V. B. Schini-Kerth, "Pro-oxidant activity of polyphenols and its implication on cancer chemoprevention and chemotherapy," *Biochemical Pharmacology*, vol. 98, no. 3, pp. 371–380, 2015.
- [57] M. D'Archivio, C. Filesi, R. Di Benedetto, R. Gargiulo, C. Giovannini and R. Masella, "Polyphenols, dietary sources and bioavailability," *Annuario Istituto Superiore Sanità*, vol. 43, no. 4, pp. 348–361, 2007.

- [58] M. Fantini, M. Benvenuto, L. Masuelli, G. Frajese, I. Tresoldi, A. Modesti, and R. Bei, "In Vitro and in Vivo Antitumoral Effects of Combinations of Polyphenols, or Polyphenols and Anticancer Drugs: Perspectives on Cancer Treatment," *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 16, no. 5, pp. 9236–9282, 2015.
- [59] H. M. Rawel, K. Meidtner, and J. Kroll, "Binding of Selected Phenolic Compounds to Proteins," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 53, no. 10, pp. 4228–4235, 2005.
- [60] R. Ferrer-Gallego, R. Gonçalves, J. C. Rivas-Gonzalo, M. T. Escribano-Bailón, and V. D. Freitas, "Interaction of phenolic compounds with bovine serum albumin (BSA) and α -amylase and their relationship to astringency perception," *Food Chemistry*, vol. 135, no. 2, pp. 651–658, 2012.
- [61] D.-Y. Kim, S. Shinde, and G. Ghodake, "Tuning stable and unstable aggregates of gallic acid capped gold nanoparticles using Mg^{2+} as coordinating agent," *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 494, pp. 1–7, 2017.
- [62] X. Zhang, S. Ferraris, E. Prenesti and E. Vernè, "Surface functionalization of bioactive glasses with natural molecules of biological significance, part II: Grafting of polyphenols extracted from grape skin," *Applied Surface Science*, vol. 287, pp. 314–348, 2013.
- [63] M. Cazzola, I. Corazzari, E. Prenesti, E. Bertone, E. Vernè, and S. Ferraris, "Bioactive glass coupling with natural polyphenols: Surface modification, bioactivity and anti-oxidant ability," *Applied Surface Science*, vol. 367, pp. 237–248, 2016.
- [64] S. Ferraris, M. Miola, A. Cochis, B. Azzimonti, L. Rimondini, E. Prenesti, and E. Vernè, "In situ reduction of antibacterial silver ions to metallic silver nanoparticles on bioactive glasses functionalized with polyphenols," *Applied Surface Science*, vol. 396, pp. 461–470, 2017.
- [65] Q. Hu and Y. Luo, "Polyphenol-chitosan conjugates: Synthesis, characterization, and applications," *Carbohydrate Polymers*, vol. 151, pp. 624–639, 2016.
- [66] T. E. Douglas, S. Kumari, K. Dziadek, M. Dziadek, A. Abalymov, P. Cools, G. Brackman, T. Coenye, R. Morent, M. Mohan, and A. G. Skirtach, "Titanium surface functionalization with coatings of chitosan and polyphenol-rich plant extracts," *Materials Letters*, vol. 196, pp. 213–216, 2017.

- [67] M. Schieber and N. S. Chandel, "ROS Function in Redox Signaling and Oxidative Stress," *Current Biology*, vol. 24, no. 10, 2014.
- [68] M.-E. Cuvelier, H. Richard, and C. Berset, "Comparison of the Antioxidative Activity of Some Acid-phenols: Structure-Activity Relationship," *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, vol. 56, no. 2, pp. 324–325, 1992.
- [69] M. Leopoldini, T. Marino, N. Russo, and M. Toscano, "Antioxidant Properties of Phenolic Compounds: H-Atom versus Electron Transfer Mechanism," *The Journal of Physical Chemistry A*, vol. 108, no. 22, pp. 4916–4922, 2004.
- [70] N. Wu, Y. Zu, Y. Fu, Y. Kong, J. Zhao, X. Li, J. Li, M. Wink, and T. Efferth, "Antioxidant Activities and Xanthine Oxidase Inhibitory Effects of Extracts and Main Polyphenolic Compounds Obtained from *Geranium sibiricum* L.," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 58, no. 8, pp. 4737–4743, 2010.
- [71] V. Chobot, F. Hadacek, and L. Kubicova, "Effects of Selected Dietary Secondary Metabolites on Reactive Oxygen Species Production Caused by Iron(II) Autoxidation," *Molecules*, vol. 19, no. 12, pp. 20023–20033, Jan. 2014.
- [72] M. Daglia, "Polyphenols as antimicrobial agents," *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 23, no. 2, pp. 174–181, 2012.
- [73] A. Plaper, M. Golob, I. Hafner, M. Oblak, T. Šolmajer, and R. Jerala, "Characterization of quercetin binding site on DNA gyrase," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 306, no. 2, pp. 530–536, 2003.
- [74] K. Forier, K. Raemdonck, S. C. D. Smedt, J. Demeester, T. Coenye, and K. Braeckmans, "Lipid and polymer nanoparticles for drug delivery to bacterial biofilms," *Journal of Controlled Release*, vol. 190, pp. 607–623, 2014.
- [75] H. Ikigai, T. Nakae, Y. Hara, and T. Shimamura, "Bactericidal catechins damage the lipid bilayer," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, vol. 1147, no. 1, pp. 132–136, 1993.
- [76] R. Koech, J. Wanyoko, and F. Wachira, "Antioxidant, antimicrobial and synergistic activities of tea polyphenols," *International Journal of Infectious Diseases*, vol. 21, pp. 971-981, 2014.
- [77] S. Otake, M. Makimura, T. Kuroki, Y. Nishihara, and M. Hirasawa, "Anticaries Effects of Polyphenolic Compounds from Japanese Green Tea," *Caries Research*, vol. 25, no. 6, pp. 438–443, 1991.
- [78] P. W. Taylor, J. M. T. Hamilton-Miller and P. D. Stapleton, "Antimicrobial properties of green tea catechins," *Food science and technology bulletin*, vol. 2, pp. 71-81, 2005

- [79] R. Díaz-Gómez, R. López-Solís, E. Obreque-Slier, and H. Toledo-Araya, "Comparative antibacterial effect of gallic acid and catechin against *Helicobacter pylori*," *LWT - Food Science and Technology*, vol. 54, no. 2, pp. 331–335, 2013.
- [80] R. Díaz-Gómez, H. Toledo-Araya, R. López-Solís, and E. Obreque-Slier, "Combined effect of gallic acid and catechin against *Escherichia coli*," *LWT - Food Science and Technology*, vol. 59, no. 2, pp. 896–900, 2014.
- [81] Â. Luís, F. Silva, S. Sousa, A. P. Duarte, and F. Domingues, "Antistaphylococcal and biofilm inhibitory activities of gallic, caffeic, and chlorogenic acids," *Biofouling*, vol. 30, no. 1, pp. 69–79, 2013.
- [82] Y. Su, L. Ma, Y. Wen, H. Wang, and S. Zhang, "Studies of the in Vitro Antibacterial Activities of Several Polyphenols against Clinical Isolates of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*," *Molecules*, vol. 19, no. 8, pp. 12630–12639, 2014.
- [83] A. Borges, C. Ferreira, M. J. Saavedra, and M. Simões, "Antibacterial Activity and Mode of Action of Ferulic and Gallic Acids Against Pathogenic Bacteria," *Microbial Drug Resistance*, vol. 19, no. 4, pp. 256–265, 2013.
- [84] C. Cueva, S. Mingo, I. Muñoz-González, I. Bustos, T. Requena, R. D. Campo, P. Martín-Álvarez, B. Bartolomé, and M. Moreno-Arribas, "Antibacterial activity of wine phenolic compounds and oenological extracts against potential respiratory pathogens," *Letters in Applied Microbiology*, vol. 54, no. 6, pp. 557–563, 2012.
- [85] C. Papuc, G.V. Goran, C. N. Predescu, V. Nicorescu and G. Stefan, "Plant Polyphenols as Antioxidant and Antibacterial Agents for Shelf-Life Extension of Meat and Meats Products: Classification, Structures, Source and Action Mechanisms," *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, vol. 16, pp. 1243-1268, 2017.
- [86] M. P. Siljander, A. H. Sobh, K. C. Baker, E. A. Baker, and L. M. Kaplan, "Multidrug-Resistant Organisms in the Setting of Periprosthetic Joint Infection-Diagnosis, Prevention, and Treatment," *The Journal of Arthroplasty*, vol. 33, no. 1, pp. 185–194, 2018.
- [87] P. A. Norowski and J. D. Bumgardner, "Biomaterial and antibiotic strategies for peri-implantitis: A review," *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, vol. 88B, no. 2, pp. 530–543, 2009.

- [88] D. S. Trentin, D. B. Silva, A. P. Frasson, O. Rzhapishevskaya, M. V. D. Silva, E. D. L. Pulcini, G. James, G. V. Soares, T. Tasca, M. Ramstedt, R. B. Giordani, N. P. Lopes, and A. J. Macedo, "Natural Green Coating Inhibits Adhesion of Clinically Important Bacteria," *Scientific Reports*, vol. 5, no. 8287, pp. 1-10, 2015.
- [89] T. S. Sileika, D. G. Barrett, R. Zhang, K. H. A. Lau, and P. B. Messersmith, "Colorless Multifunctional Coatings Inspired by Polyphenols Found in Tea, Chocolate, and Wine," *Angewandte Chemie*, vol. 125, no. 41, pp. 10966–10970, 2013.
- [90] L. Đudarić, A. Fužinac-Smojver, D. Muhvić, and J. Giacometti, "The role of polyphenols on bone metabolism in osteoporosis," *Food Research International*, vol. 77, pp. 290–298, 2015.
- [91] S. P. Soundarya, V. Sanjay, A. H. Menon, S. Dhivya, and N. Selvamurugan, "Effects of flavonoids incorporated biological macromolecules based scaffolds in bone tissue engineering," *International Journal of Biological Macromolecules*, 2017.
- [92] S. Srivastava, R. Bankar, and P. Roy, "Assessment of the role of flavonoids for inducing osteoblast differentiation in isolated mouse bone marrow derived mesenchymal stem cells," *Phytomedicine*, vol. 20, no. 8-9, pp. 683–690, 2013.
- [93] C.-L. Shen, J. K. Yeh, C. Samathanam, J. J. Cao, B. J. Stoecker, R. Y. Dagda, M.-C. Chyu, D. M. Dunn, and J.-S. Wang, "Green tea polyphenols attenuate deterioration of bone microarchitecture in female rats with systemic chronic inflammation," *Osteoporosis International*, vol. 22, no. 1, pp. 327–337, 2010.
- [94] L. M. N. D. Amorim, S. R. Vaz, G. Cesário, A. S. G. Coelho, and P. B. Botelho, "Effect of green tea extract on bone mass and body composition in individuals with diabetes," *Journal of Functional Foods*, vol. 40, pp. 589–594, 2018.
- [95] B. Tang, H. Yuan, L. Cheng, X. Zhou, X. Huang, and J. Li, "Effects of gallic acid on the morphology and growth of hydroxyapatite crystals," *Archives of Oral Biology*, vol. 60, no. 1, pp. 167–173, 2015.
- [96] C. C. Tangney and H. E. Rasmussen, "Polyphenols, Inflammation, and Cardiovascular Disease," *Current Atherosclerosis Reports*, vol. 15, no. 5, 2013.
- [97] M. M. Dohadwala and J. A. Vita, "Grapes and Cardiovascular Disease," *The Journal of Nutrition*, vol. 139, no. 9, pp. 1788S-1793S, 2009.
- [98] K. B. Pandey and S. I. Rizvi, "Anti-oxidative action of resveratrol: Implications for human health," *Arabian Journal of Chemistry*, vol. 4, no. 3, pp. 293–298, 2011.

- [99] G. Mann, D. Rowlands, F. Li, P. Dewinter, and R. Siow, "Activation of endothelial nitric oxide synthase by dietary isoflavones: Role of NO in Nrf2-mediated antioxidant gene expression," *Cardiovascular Research*, vol. 75, no. 2, pp. 261–274, 2007.
- [100] R. Andriantsitohaina, C. Auger, T. Chataigneau, N. Étienne-Selloum, H. Li, M. C. Martínez, V. B. Schini-Kerth, and I. Laher, "Molecular mechanisms of the cardiovascular protective effects of polyphenols," *British Journal of Nutrition*, vol. 108, no. 09, pp. 1532–1549, 2012.
- [101] H. M. Hügel, N. Jackson, B. May, A. L. Zhang, and C. C. Xue, "Polyphenol protection and treatment of hypertension," *Phytomedicine*, vol. 23, no. 2, pp. 220–231, 2016.
- [102] P. Bhardwaj and D. Khanna, "Green tea catechins: defensive role in cardiovascular disorders," *Chinese Journal of Natural Medicines*, vol. 11, no. 4, pp. 345–353, 2014.
- [103] F. Ferk, M. Kundi, H. Brath, T. Szekeres, H. Al-Serori, M. Mišík, P. Saiko, R. Marculescu, K.-H. Wagner, and S. Knasmueller, "Gallic Acid Improves Health-Associated Biochemical Parameters and Prevents Oxidative Damage of DNA in Type 2 Diabetes Patients: Results of a Placebo-Controlled Pilot Study," *Molecular Nutrition & Food Research*, 1700482, pp. 1-9, 2018.
- [104] S. Yousuf, F. Atif, M. Ahmad, N. Hoda, T. Ishrat, B. Khan, and F. Islam, "Resveratrol exerts its neuroprotective effect by modulating mitochondrial dysfunctions and associated cell death during cerebral ischemia," *Brain Research*, vol. 1250, pp. 242–253, 2009.
- [105] M. Caruana, R. Cauchi, and N. Vassallo, "Putative Role of Red Wine Polyphenols against Brain Pathology in Alzheimer's and Parkinson's Disease," *Frontiers in Nutrition*, vol. 3, 2016.
- [106] Y.-J. Wang, P. Thomas, J.-H. Zhong, F.-F. Bi, S. Kosaraju, A. Pollard, M. Fenech, and X.-F. Zhou, "Consumption of Grape Seed Extract Prevents Amyloid- β Deposition and Attenuates Inflammation in Brain of an Alzheimer's Disease Mouse," *Neurotoxicity Research*, vol. 15, no. 1, pp. 3–14, 2009.
- [107] Q. Wang, J. Guo, P. Jiao, H. Liu, and X. Yao, "Exploring the Influence of EGCG on the β -Sheet-Rich Oligomers of Human Islet Amyloid Polypeptide (hIAPP1–37) and Identifying Its Possible Binding Sites from Molecular Dynamics Simulation," *PLoS ONE*, vol. 9, no. 4, 2014.

- [108] K. Sárközi, A. Papp, E. Horváth, Z. Máté, E. Hermes, G. Kozma, Z. P. Zomborszki, I. Kálomista, G. Galbács, and A. Szabó, "Protective effect of green tea against neuro-functional alterations in rats treated with MnO₂ nanoparticles," *Journal of the Science of Food and Agriculture*, vol. 97, no. 6, pp. 1717–1724, 2016.
- [109] B. Dasgupta and J. Milbrandt, "Resveratrol stimulates AMP kinase activity in neurons," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 104, no. 17, pp. 7217–7222, 2007.
- [110] F. Zhang, J.-S. Shi, H. Zhou, B. Wilson, J.-S. Hong, and H.-M. Gao, "Resveratrol Protects Dopamine Neurons Against Lipopolysaccharide-Induced Neurotoxicity through Its Anti-Inflammatory Actions," *Molecular Pharmacology*, vol. 78, no. 3, pp. 466–477, 2010.
- [111] A. Ebrahimi and H. Schluesener, "Natural polyphenols against neurodegenerative disorders: Potentials and pitfalls," *Ageing Research Reviews*, vol. 11, no. 2, pp. 329–345, 2012.
- [112] V. N. Zinov'Eva and A. A. Spasov, "Mechanisms of the anticancer effects of plant polyphenols. I. Blockade of initiation of carcinogenesis," *Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry*, vol. 5, no. 2, pp. 113–123, 2011.
- [113] V. N. Zinov'Eva and A. A. Spasov, "Mechanisms of the anticancer effects of plant polyphenols. II. Suppression of tumor growth," *Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry*, vol. 5, no. 3, pp. 231–240, 2011.
- [114] K.-J. Min and T. K. Kwon, "Anticancer effects and molecular mechanisms of epigallocatechin-3-gallate," *Integrative Medicine Research*, vol. 3, no. 1, pp. 16–24, 2014.
- [115] A. Khafif, "Quantitation of chemopreventive synergism between (-)-epigallocatechin-3-gallate and curcumin in normal, premalignant and malignant human oral epithelial cells," *Carcinogenesis*, vol. 19, no. 3, pp. 419–424, Jan. 1998.
- [116] F. Thayyullathil, S. Chathoth, A. Hago, M. Patel, and S. Galadari, "Rapid reactive oxygen species (ROS) generation induced by curcumin leads to caspase-dependent and -independent apoptosis in L929 cells," *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 45, no. 10, pp. 1403–1412, 2008.
- [117] R. Gogada, M. Amadori, H. Zhang, A. Jones, A. Verone, J. Pitarresi, S. Jandhyam, V. Prabhu, J. D. Black, and D. Chandra, "Curcumin induces Apaf-

- 1-dependent, p21-mediated caspase activation and apoptosis," *Cell Cycle*, vol. 10, no. 23, pp. 4128–4137, 2011.
- [118] X.-P. Wang, Q.-X. Wang, H.-P. Lin, and N. Chang, "Anti-tumor bioactivities of curcumin on mice loaded with gastric carcinoma," *Food & Function*, vol. 8, no. 9, pp. 3319–3326, 2017.
- [119] R. Gogada, V. Prabhu, M. Amadori, R. Scott, S. Hashmi, and D. Chandra, "Resveratrol Induces p53-independent, X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein (XIAP)-mediated Bax Protein Oligomerization on Mitochondria to Initiate Cytochrome c Release and Caspase Activation," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 286, no. 33, pp. 28749–28760, 2011.
- [120] J. Cao, J. Han, H. Xiao, J. Qiao, and M. Han, "Effect of Tea Polyphenol Compounds on Anticancer Drugs in Terms of Anti-Tumor Activity, Toxicology, and Pharmacokinetics," *Nutrients*, vol. 8, no. 12, p. 762, 2016.
- [121] Q. Chen, M. G. Espey, A. Y. Sun, C. Pooput, K. L. Kirk, M. C. Krishna, D. B. Khosh, J. Drisko, and M. Levine, "Pharmacologic doses of ascorbate act as a prooxidant and decrease growth of aggressive tumor xenografts in mice," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 105, no. 32, pp. 11105–11109, 2008.
- [122] T.P. Szatrowski and C.F. Nathan, "Production of large amounts of hydrogen peroxide by human tumor cells," *Cancer research*, vol. 51, no. 3, pp. 794-798, 1991.
- [123] A. Gupte and R. J. Mumper, "Elevated copper and oxidative stress in cancer cells as a target for cancer treatment," *Cancer Treatment Reviews*, vol. 35, no. 1, pp. 32–46, 2009.
- [124] H. Y. Khan, H. Zubair, M. F. Ullah, A. Ahmad and S. M. Hadi, "A Prooxidant Mechanism for the Anticancer and Chemopreventive Properties of Plant Polyphenols," *Current Drug Targets*, vol. 13, pp. 1738-1749, 2012.
- [125] S. Khokhar and R. O. Apenten, "Iron binding characteristics of phenolic compounds: some tentative structure–activity relations," *Food Chemistry*, vol. 81, no. 1, pp. 133–140, 2003.
- [126] J. Sedó, J. Saiz-Poseu, F. Busqué, and D. Ruiz-Molina, "Catechol-Based Biomimetic Functional Materials," *Advanced Materials*, vol. 25, no. 5, pp. 653–701, 2012.

- [127] N. R. Perron, J. N. Hodges, M. Jenkins, and J. L. Brumaghim, "Predicting How Polyphenol Antioxidants Prevent DNA Damage by Binding to Iron," *Inorganic Chemistry*, vol. 47, no. 14, pp. 6153–6161, 2008.
- [128] A. Miličević and N. Raos, "Modelling of Protective Mechanism of Iron(II)-polyphenol Binding with OH-related Molecular Descriptors," *Croatica Chemica Acta*, vol. 89, no. 4, 2016.
- [129] M. Leopoldini, N. Russo, S. Chiodo, and M. Toscano, "Iron Chelation by the Powerful Antioxidant Flavonoid Quercetin," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 54, no. 17, pp. 6343–6351, 2006.
- [130] F. Paiva-Martins and M. H. Gordon, "Interactions of Ferric Ions with Olive Oil Phenolic Compounds," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 53, no. 7, pp. 2704–2709, 2005.
- [131] M. Andjelković, J. Vancamp, B. Demeulenaer, G. Depaemelaere, C. Socaciu, M. Verloo, and R. Verhe, "Iron-chelation properties of phenolic acids bearing catechol and galloyl groups," *Food Chemistry*, vol. 98, no. 1, pp. 23–31, 2006.
- [132] L.-L. Lu, Y.-H. Li, and X.-Y. Lu, "Kinetic study of the complexation of gallic acid with Fe(II)," *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, vol. 74, no. 3, pp. 829–834, 2009.
- [133] J. Ren, S. Meng, C. E. Lekka, and E. Kaxiras, "Complexation of Flavonoids with Iron: Structure and Optical Signatures," *The Journal of Physical Chemistry B*, vol. 112, no. 6, pp. 1845–1850, 2008.
- [134] L. Yang, L. Han, J. Ren, H. Wei, and L. Jia, "Coating process and stability of metal-polyphenol film," *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, vol. 484, pp. 197–205, 2015.
- [135] M. Prabakaran, S.-H. Kim, V. Hemapriya, and I.-M. Chung, "Evaluation of polyphenol composition and anti-corrosion properties of *Cryptostegia grandiflora* plant extract on mild steel in acidic medium," *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, vol. 37, pp. 47–56, 2016.
- [136] M. Larif, A. Elmidaoui, A. Zarrouk, H. Zarrok, R. Salghi, B. Hammouti, H. Oudda, and F. Bentiss, "An investigation of carbon steel corrosion inhibition in hydrochloric acid medium by an environmentally friendly green inhibitor," *Research on Chemical Intermediates*, vol. 39, no. 6, pp. 2663–2677, 2012.

- [137] E. Koren, R. Kohen, and I. Ginsburg, "A Cobalt-Based Tetrazolium Salts Reduction Test To Assay Polyphenols," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 57, no. 17, pp. 7644–7650, 2009.
- [138] C. Mucchino and M. Musci, "Extraction of Al, Cu, Fe, Mn, Ni and Zn-polyphenol complexes from black tea infusions by Amberlite resins," *Journal of the Science of Food and Agriculture*, vol. 94, no. 11, pp. 2234–2238, 2014.
- [139] A. S. Azmi, S. H. Bhat, S. Hanif, and S. Hadi, "Plant polyphenols mobilize endogenous copper in human peripheral lymphocytes leading to oxidative DNA breakage: A putative mechanism for anticancer properties," *FEBS Letters*, vol. 580, no. 2, pp. 533–538, 2005.
- [140] K. F. Pirker, M. C. Baratto, R. Basosi, and B. A. Goodman, "Influence of pH on the speciation of copper(II) in reactions with the green tea polyphenols, epigallocatechin gallate and gallic acid," *Journal of Inorganic Biochemistry*, vol. 112, pp. 10–16, 2012.
- [141] B. A. Goodman, J. F. Severino, and K. F. Pirker, "Reactions of green and black teas with Cu(II)," *Food Funct.*, vol. 3, no. 4, pp. 399–409, 2012.
- [142] F. Fazal, A. Rahman, J. Greensill, K. Ainley, S. Hadi, and J. Parish, "Strand scission in DNA by quercetin and Cu(II): identification of free radical intermediates and biological consequences of scission," *Carcinogenesis*, vol. 11, no. 11, pp. 2005–2008, 1990.
- [143] R. K. Feller and A. K. Cheetham, "Fe(III), Mn(II), Co(II), and Ni(II) 3,4,5-trihydroxybenzoate (gallate) dihydrates; a new family of hybrid framework materials," *Solid State Sciences*, vol. 8, no. 9, pp. 1121–1125, 2006.
- [144] S. A. Cherrak, N. Mokhtari-Soulmane, F. Berroukeche, B. Bensenane, A. Cherbonnel, H. Merzouk, and M. Elhabiri, "In Vitro Antioxidant versus Metal Ion Chelating Properties of Flavonoids: A Structure-Activity Investigation," *Plos One*, vol. 11, no. 10, 2016.
- [145] M. McDonald, I. Mila, and A. Scalbert, "Precipitation of Metal Ions by Plant Polyphenols: Optimal Conditions and Origin of Precipitation," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 44, no. 2, pp. 599–606, 1996.
- [146] Y. Ping, J. Guo, H. Ejima, X. Chen, J. J. Richardson, H. Sun, and F. Caruso, "pH-Responsive Capsules Engineered from Metal-Phenolic Networks for Anticancer Drug Delivery," *Small*, vol. 11, no. 17, pp. 2032–2036, Mar. 2015.

- [147] W. Chen, S. Sun, W. Cao, Y. Liang and J. Song, "Antioxidant property of quercetin-Cr(III) complex: The role of Cr(III) ion," *Journal of Molecular Structure*, vol. 918, no. 1-3, pp. 194-197, 2009.
- [148] W. Mortada, I. Kenawy, Y. A. El-Reash, and A. Mousa, "Microwave assisted modification of cellulose by gallic acid and its application for removal of aluminium from real samples," *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 101, pp. 490-501, 2017.
- [149] Y. Oztekin, Z. Yazicigil, A. Ramanaviciene, and A. Ramanavicius, "Polyphenol-modified glassy carbon electrodes for copper detection," *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 152, no. 1, pp. 37-48, 2011.
- [150] L. Kou, R. Liang and W. Qin, "Potentiometric Determination of Total Polyphenols in Green Tea Based on Complexation-Reaction-Induced Response," *International Journal of Electrochemical Science*, vol. 9, pp. 3190-3198, 2014.
- [151] A. Córdoba, M. Satué, M. Gómez-Florit, M. Hierro-Oliva, C. Petzold, S. P. Lyngstadaas, M. L. González-Martín, M. Monjo, and J. M. Ramis, "Flavonoid-Modified Surfaces: Multifunctional Bioactive Biomaterials with Osteopromotive, Anti-Inflammatory, and Anti-Fibrotic Potential," *Advanced Healthcare Materials*, vol. 4, no. 4, pp. 540-549, 2014.
- [152] M. Gomez-Florit, M. A. Pacha-Olivenza, M. C. Fernández-Calderón, A. Córdoba, M. L. González-Martín, M. Monjo, and J. M. Ramis, "Quercitrin-nanocoated titanium surfaces favour gingival cells against oral bacteria," *Scientific Reports*, vol. 6, no. 22444, 2016.
- [153] S. Geißler, A. Barrantes, P. Tengvall, P. B. Messersmith, and H. Tainen, "Deposition Kinetics of Bioinspired Phenolic Coatings on Titanium Surfaces," *Langmuir*, vol. 32, no. 32, pp. 8050-8060, 2016.
- [154] M.J. Lerma-García, M. Avila, E.F. Simo-Alfonso, A. Rios and M. Zougagh, "Synthesis of gold nanoparticles using phenolic acids and its application in catalysis," *Journal of Materials and Environmental Science*, vol. 5, no. 6, pp. 1919-1926, 2014.
- [155] V. Sanna, M. Sechi, N. Pala, P. Manconi, A. Mariani, S. Dedola, M. Rassu, C. Crosio, C. Iaccarino, and G. Dessi, "Single-step green synthesis and characterization of gold-conjugated polyphenol nanoparticles with antioxidant and biological activities," *International Journal of Nanomedicine*, vol. 9, pp. 4935-4951, 2014.

- [156] M.-K. Yeh, D.-S. Hsieh, C.-C. Cheng, and C.-J. Wu, "The preparation and characterization of gold-conjugated polyphenol nanoparticles as a novel delivery system," *International Journal of Nanomedicine*, vol. 7, pp. 1623-1633, 2012.
- [157] E. Rodríguez-León, R. Iñiguez-Palomares, R. Navarro, R. Herrera-Urbina, J. Tánori, C. Iñiguez-Palomares, and A. Maldonado, "Synthesis of silver nanoparticles using reducing agents obtained from natural sources (*Rumex hymenosepalus* extracts)," *Nanoscale Research Letters*, vol. 8, no. 1, p. 318, 2013.
- [158] Y. Park, "A New Paradigm Shift for the Green Synthesis of Antibacterial Silver Nanoparticles Utilizing Plant Extracts," *Toxicological Research*, vol. 30, no. 3, pp. 169–178, 2014.
- [159] K. M. Kumar, B. K. Mandal, and S. K. Tammina, "Green synthesis of nano platinum using naturally occurring polyphenols," *RSC Advances*, vol. 3, no. 12, pp. 4033-4039, 2013.
- [160] H.A. Tang, S. Yang, X.F. Wang and L.F. Wang, "Synthesis, characterization, and biological activities of Pt(II) and Pd(II) complexes with 2',3',4',5,7-pentahydroxy flavone," *Rare metals*, vol. 23, no. 1, pp. 38-42, 2004.
- [161] A. McCalley, S. Kaja, A. Payne, and P. Koulen, "Resveratrol and Calcium Signaling: Molecular Mechanisms and Clinical Relevance," *Molecules*, vol. 19, no. 12, pp. 7327–7340, 2014.
- [162] H. Zhou, M. Yang, S. Hou, and L. Deng, "Mesoporous hydroxyapatite nanoparticles hydrothermally synthesized in aqueous solution with hexametaphosphate and tea polyphenols," *Materials Science and Engineering: C*, vol. 71, pp. 439–445, 2017.
- [163] H. Zhou, M. Yang, S. Hou, X. Ni, Y. Bi, W. Wang, M. G. Kutty, and L. Yang, "Tailoring the morphological features of hydrothermally synthesized mesoporous hydroxyapatite using polyphenols and phosphate sources," *Ceramics International*, vol. 43, no. 15, pp. 12851–12856, 2017.
- [164] C. Wu, J. Chang, and Y. Xiao, *Advanced bioactive inorganic materials for bone regeneration and drug delivery*. CRC Press/Taylor & Francis Group, p. 168, 2013.
- [165] A. Elabbadi, N. Jeckelmann, O. Haefliger, L. Ouali, and P. Erni, "Selective Coprecipitation of Polyphenols in Bioactive/Inorganic Complexes," *ACS Applied Materials & Interfaces*, vol. 3, no. 7, pp. 2764–2771, 2011.

- [166] K.M. Fromm, "Coordination polymer networks with s-block metal ions," *Coordination Chemistry Reviews*, vol. 252, no. 8, pp. 856-885, 2008.
- [167] J. Zhou, L.-F Wang, J.-Y. Wang and N. Tang, "Synthesis, characterization, antioxidative and antitumor activities of solid quercetin rare earth(III) complexes," *Journal of Inorganic Biochemistry*, vol. 83, no. 1, pp. 41-48, 2001.
- [168] K. Durgo, I. Halec, I. Šola and J. Franekić, "Cytotoxic and genotoxic effects of the quercetin/lanthanum complex on human cervical carcinoma cells *in vitro*," *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*, vol. 62, pp. 221-227, 2011.
- [169] M. Kopacz, E. Woźnicka and J. Gruszecka "Antibacterial activity of morin and complexes with La(III), Gd(III) and Lu(III) ions," *Acta Poloniae Pharmaceutica*, vol. 62, no. 1, pp. 65-67, 2005.
- [170] W. Wang and C. Khoon, "Titanium Alloys in Orthopaedics," *Titanium Alloys - Advances in Properties Control*, ed. Jan Sieniawski, InTech, 2013.
- [171] S. Ferraris, S. Spriano, G. Pan, A. Venturello, C. L. Bianchi, R. Chiesa, M. G. Faga, G. Maina, and E. Vernè, "Surface modification of Ti-6Al-4V alloy for biomineralization and specific biological response: Part I, inorganic modification," *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, vol. 22, no. 3, pp. 533-545, 2011.
- [172] D. Pasrija and C. Anandharamakrishnan, "Techniques for Extraction of Green Tea Polyphenols: A Review," *Food and Bioprocess Technology*, vol. 8, no. 5, pp. 935-950, 2015.
- [173] T. Kokubo and H. Takadama, "How useful is SBF in predicting *in vivo* bone bioactivity?," *Biomaterials*, vol. 27, no. 15, pp. 2907-2915, 2006.
- [174] E. A. Ainsworth and K. M. Gillespie, "Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin-Ciocalteu reagent," *Nature Protocols*, vol. 2, no. 4, pp. 875-877, 2007.
- [175] M. Cazzola, E. Vernè, A. Cochis, R. Sorrentino, B. Azzimonti, E. Prenesti, L. Rimondini, and S. Ferraris, "Bioactive glasses functionalized with polyphenols: *in vitro* interactions with healthy and cancerous osteoblast cells," *Journal of Materials Science*, vol. 52, no. 15, pp. 9211-9223, 2017.
- [176] F. Pivano, "Caratterizzazione superficiale e proprietà biologiche di Ti6Al4V funzionalizzato con olio essenziale di menta di Pancalieri", Torino, 2017.
- [177] S. Spriano, S. Ferraris, M. Cazzola, and V. Peretti, "Investigation Of Surface Functionalization And Coatings For Biomedical Applications By Zeta

- Potential And Adsorption Measurements On Solid Surfaces," *Materials and Contact Characterisation VIII*, vol. 116, pp. 379-390, 2017.
- [178] L. J. Kuo and L.-X. Yang, "γ-H2AX – A Novel Biomarker for DNA Double-strand Breaks," *in vivo*, vol. 22, pp. 305-310, 2008.
- [179] J. Vandekerckhove, A. Deboben, M. Nassal and T. Wieland, "The phalloidin binding site of F-actin," *The EMBO Journal*, vol. 4, no. 11, pp. 2815-2818, 1985.
- [180] J. D. Hem, "Reduction and complexing of manganese gallic acid," *Water Supply Paper*, vol. 1667, no. D, 1964.
- [181] H. Song, C. Chen, S. Zhao, F. Ge, D. Liu, D. Shi, and T. Zhang, "Interaction of gallic acid with trypsin analyzed by spectroscopy," *Journal of Food and Drug Analysis*, vol. 23, no. 2, pp. 234–242, 2015.
- [182] C. Klang, "Effects of UV-exposure of titanium-based dental implant materials," Göteborg, 2010.
- [183] L. Cao, Z. Li, K. Su, and B. Cheng, "Hydrophilic Graphene Preparation from Gallic Acid Modified Graphene Oxide in Magnesium Self-Propagating High Temperature Synthesis Process," *Scientific Reports*, vol. 6, no. 1, Nov. 2016.
- [184] X. Wang, Y. Zhang, M. Tang, D. Han, E. Fu, J. Xue, and Z. Zhao, "Synthesis of ultra-thin carbon layers on SiC substrate by ion implantation," *Carbon*, vol. 93, pp. 230–241, 2015.
- [185] S. Mitchell, A. Poulsson, M. Davidson, and R. Bradley, "Orientation and confinement of cells on chemically patterned polystyrene surfaces," *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 46, no. 2, pp. 108–116, 2005.
- [186] P. Babelon, A. Dequiedt, H. Mostéfa-Sba, S. Bourgeois, P. Sibillot, and M. Sacilotti, "SEM and XPS studies of titanium dioxide thin films grown by MOCVD," *Thin Solid Films*, vol. 322, no. 1-2, pp. 63–67, 1998.
- [187] N. Maticiuc, A. Katerski, M. Danilson, M. Krunks, and J. Hiie, "XPS study of OH impurity in solution processed CdS thin films," *Solar Energy Materials and Solar Cells*, vol. 160, pp. 211–216, 2017.
- [188] D. Zemlyanov, E. Savinova, A. Scheybal, K. Doblhofer, and R. Schlögl, "XPS observation of OH groups incorporated in an Ag(111) electrode," *Surface Science*, vol. 418, no. 2, pp. 441–456, 1998.
- [189] R.W. Hemingway and P.E. Laks, *Plant polyphenols: synthesis, properties, significance*, Springer, p. 612, 2013.

- [190] B. I. Tarnowski, F. G. Spinale, and J. H. Nicholson, "DAPI as a Useful Stain for Nuclear Quantitation," *Biotechnic & Histochemistry*, vol. 66, no. 6, pp. 296–302, 1991.
- [191] S. Panier and S. J. Boulton, "Double-strand break repair: 53BP1 comes into focus," *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 15, no. 1, pp. 7–18, 2013.
- [192] C. K. Youn, H. B. Kim, T. T. Wu, S. Park, S. I. Cho, and J.-H. Lee, "53BP1 contributes to regulation of autophagic clearance of mitochondria," *Scientific Reports*, vol. 7, p. 45290, 2017.
- [193] P. Jin, S. Hardy, and D. O. Morgan, "Nuclear Localization of Cyclin B1 Controls Mitotic Entry After DNA Damage," *The Journal of Cell Biology*, vol. 141, no. 4, pp. 875–885, 1998.

Sitografia

- [I] <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Quercetin.svg> accesso 21/02/2018.
- [II] https://en.wikipedia.org/wiki/Gallic_acid#/media/File:Gallic_acid.svg accesso 21/02/2018.
- [III] https://en.wikipedia.org/wiki/Caffeic_acid#/media/File:Kaffees%C3%A4ure.svg accesso 21/02/2018.
- [IV] <https://en.wikipedia.org/wiki/File:Resveratrol.svg> accesso 21/02/2018.
- [V] https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Epigallocatechin_gallate_structure.svg acceso 21/02/2018.
- [VI] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=polyphenol> accesso 11/01/2018.
- [VII] [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Curcumin_structure_\(keto\).svg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Curcumin_structure_(keto).svg) accesso 22/02/2018.
- [VIII] https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CRL-11372.aspx?geo_country=it#characteristics accesso 15/03/2018.
- [IX] <http://www.socscistatistics.com/tests/anova/default2.aspx> accesso 05/03/2018.
- [X] http://www.rsc.org/learn_chemistry/resource/download/res00000941/cmp00000328/pdf accesso 24/02/2018.
- [XI] <https://www2.chemistry.msu.edu/faculty/reusch/virttxtjml/spectrpy/uv-vis/spectrum.htm> accesso 18/02/2018.
- [XII] <http://sites.cardiff.ac.uk/xpsaccess/reference/oxygen/> accesso 24/11/2017.

