



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA



DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA DELL'INFORMAZIONE

CORSO DI LAUREA IN INGEGNERIA BIOMEDICA

**FUNZIONALIZZAZIONE COVALENTE DI BIOCERAMICI CON PEPTIDI
BIOADESIVI**

Relatore: Prof.ssa *Dettin Monica*

Laureando/a: Casagrande Riccardo

Correlatore: Prof./Dott. *Zamuner Annj*

ANNO ACCADEMICO 2021– 2022

Data di laurea 14/03/2022

Riassunto

Il successo di un costrutto ingegnerizzato si basa sulla solidità strutturale, biocompatibilità e bioattività dello *scaffold*.

In questa tesi verrà riassunta la mia esperienza presso il laboratorio della Professoressa Dettin Monica a seguito della Dottorssa Zamuner Annj, durante la quale è stata prodotta della ardistonite arricchita con stronzio e magnesio, è stata funzionalizzata covalentemente con la sequenza peptidica D2HVP, sempre sintetizzata in laboratorio tramite sintesi su fase solida, e sono stati eseguiti dei test per verificare l'adesione tra il peptide ed il bioceramico.

Indice

1	Introduzione	1
1.1	Ingegneria tessutale	1
1.2	Tessuto osseo	2
1.3	Ingegneria tessutale applicata al tessuto osseo	3
1.4	Lo <i>Scaffold</i>	3
1.4.1	Ardistonite arricchita con Sr e Mg	4
1.5	Segnali biochimici.....	4
1.5.1	Peptidomimetica.....	5
1.5.2	Metodi per la stabilizzazione dei peptidi	5
1.5.2.1	Stabilizzazione di peptidi con l'uso di D-amminoacidi.....	6
1.5.3	D2HVP	6
1.6	Funzionalizzazioni biochimiche	6
1.6.1	Funzionalizzazione covalente	6
1.7	Scopo della tesi	7
2	Materiali e metodi	9
2.1	Materiali.....	9
2.1.1	Reagenti	9
2.1.2	Sequenza peptidica utilizzata	10
2.2	Strumenti.....	10
2.3	Metodi.....	12
2.3.1	Preparazione soluzioni.....	12
2.3.2	Sintesi peptidica su fase solida:.....	12
2.3.3	Chimica Fmoc	12
2.3.4	Resina	13
2.3.5	Processo di sintesi peptidica automatizzata	14
2.3.6	Test alla piperidina:	15

2.3.7 Sblocco del peptide dalla resina	16
2.3.8 Cromatografia	16
2.3.9 MALDI-TOF	17
2.3.10 Ossidazione	18
2.3.11 Sinterizzazione del ceramico.....	18
2.3.12 Funzionalizzazione del ceramico	19
3 Parte sperimentale	21
3.1 Sintesi peptidica	21
3.2 Sblocco del peptide:	22
3.3 Cromatografia	23
3.4 Ossidazione	24
3.5 Purificazione del peptide	25
3.5.1 Prima corsa semipreparativa in fase inversa	25
3.5.2 Analisi delle frazioni raccolte nella prima semipreparativa	26
3.5.2 Seconda corsa semipreparativa in fase inversa	27
3.5.4 Analisi delle frazioni raccolte nella seconda semipreparativa.....	28
3.5.5 Riunione delle frazioni per la funzionalizzazione.....	29
3.6 Sinterizzazione del bioceramico	30
3.7 Funzionalizzazione del bioceramico	32
3.7.1 Silanizzazione del bioceramico.....	32
3.7.2 Funzionalizzazione covalente del bioceramico.....	32
4 Risultati.....	33
Bibliografia	35
Ringraziamenti	39

Capitolo 1

1 Introduzione

1.1 Ingegneria tessutale

Per ingegneria tessutale s'intende la pratica di sviluppare protesi per dare una soluzione al problema di tessuti o organi danneggiati che non preveda tecniche di medicina e chirurgia tradizionale. Questa nuova frontiera della medicina è volta ad aumentare l'efficacia del trattamento, diminuire l'impatto sull'organismo del paziente ed i tempi di recupero, semplificando al contempo le procedure.

Sebbene il tentativo di utilizzare materiali di varia natura per sostituire elementi malati o danneggiati all'interno dell'organismo fosse già una pratica comune nell'antichità, il termine è stato coniato alla fine degli anni '80.

I primi esempi di ingegneria tessutale sono riscontrabili agli inizi degli anni '60 dalle analisi fatte da Wichterle e Lím su plastiche ed *hydrogel* e il loro contatto con l'ambiente biologico umano¹, proseguendo con Charles Hull e la sua invenzione della stampa 3D nel 1986, evolutasi poi nel bioprinting. I primi tentativi di produzione di organi e tessuti *in vitro* risalgono agli inizi del 1990, arrivando ai primi trapianti di organi completamente ricreati *ex-vivo* a partire da cellule autologhe del paziente nel 2006, come ad esempio il trapianto di vesciche su soggetti che dovevano sottoporsi ad augmentazione².

Dalla fine del XX secolo l'ingegneria tessutale si è differenziata in tre approcci diversi alla creazione di nuovo tessuto (*Figura 1*). Il primo si avvale di cellule staminali totipotenti o pluripotenti, il secondo sfrutta la cultura *in vitro* di cellule su un substrato decellularizzato, mentre il terzo prevede la creazione di uno *scaffold* che promuova la proliferazione cellulare ed assicuri il suo successivo dissolvimento.

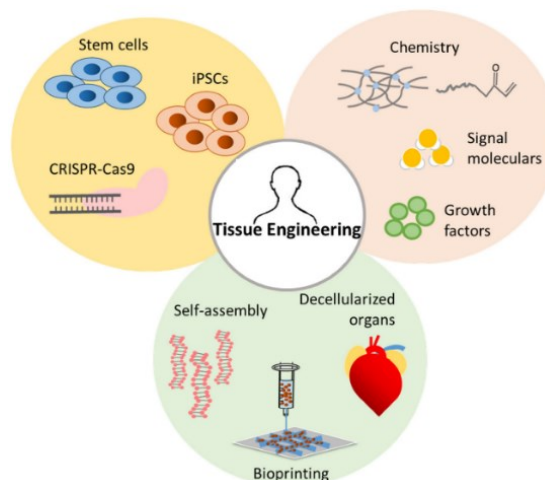


Figura 1: I tre diversi approcci all'ingegneria tessutale.

I primi due metodi sfruttano cellule staminali *in vitro* e, ad oggi, la loro applicazione risulta ancora troppo poco affidabile a causa degli alti costi di produzione e della difficoltà nella gestione della loro differenziazione (Figura 2). Per questi motivi, le soluzioni odierne prevedono l'utilizzo di cellule somatiche, ormai incapaci di differenziarsi e con attività biologiche specifiche³. Le cellule somatiche possono essere allogeniche o autologhe. Le prime sono cellule immunogeniche umane o animali, il cui utilizzo in medicina rigenerativa è poco utilizzato e prevede l'assunzione di terapie immunodepressive per evitare rigetto. Le seconde sono cellule appartenenti al paziente ed il loro utilizzo è preferibile se la loro attività rimane sufficientemente alta da permettere lo sviluppo di nuovi tessuti³⁻⁴.

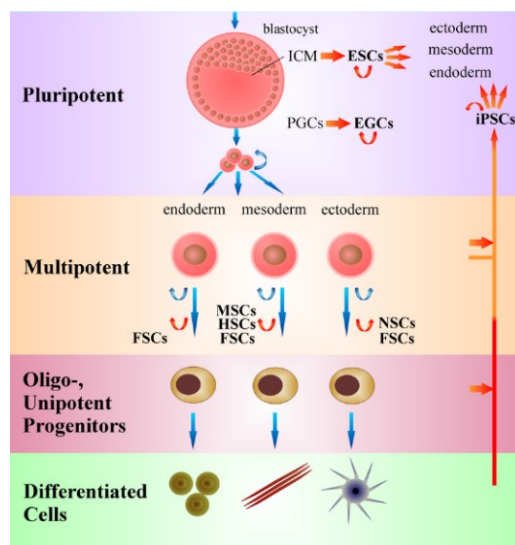


Figura 2: La diversificazione delle cellule staminali in cellule somatiche.

1.2 Tessuto osseo

Il tessuto osseo è un tessuto connettivo mineralizzato costituito per il 69% da matrice inorganica (fosfato di calcio, carbonato di calcio, fosfato di magnesio e fluoruro di calcio) organizzata in cristalli di idrossiapatite, per il 22% da matrice organica e per il restante 9% da acqua. Il tessuto osseo svolge funzione di sostegno, locomozione e protezione dei tessuti molli. Il tessuto osseo contiene osteoblasti, osteoclasti ed osteoni che concorrono al mantenimento della struttura ossea⁵. Gli osteoblasti sono cellule in grado di generare nuovo tessuto osseo sotto forma di lamelle concentriche, gli osteoclasti sono cellule plurinucleate capaci di rilasciare enzimi idrolitici lisosomiali atti a riassorbire la matrice ossea, mentre gli osteoni sono osteoblasti inattivi che hanno terminato lo sviluppo del tessuto osseo e che fungono da sensori per verificare il corretto comportamento meccanico dell'osso. Queste tre cellule concorrono al continuo rimodellamento del tessuto controllato da fattori locali (quali fattori di crescita e citochinesi) e sistemici (calcitonina ed estrogeni)⁵. Risulta fondamentale che l'azione di osteoblasti, osteoclasti ed osteociti sia coordinata al fine di permettere un buon mantenimento del tessuto

ed un adeguato recupero da possibili traumi: una demolizione troppo aggressiva da parte degli osteoclasti può causare uno squilibrio che porta alla perdita di osso o ad un nuovo tessuto incapace di sostenere carichi intensi (osteoporosi), viceversa un'eccessiva attività degli osteoblasti può portare alla formazione di tessuto osseo troppo duro, limitando le capacità di movimento delle articolazioni (osteopetrosi)⁶.

1.3 Ingegneria tessutale applicata al tessuto osseo

Nel campo del sistema scheletrico, l'ingegneria tissutale si interessa di fornire soluzioni in grado di supportare la normale attività delle cellule ossee. Sfruttando il biomimetismo di materiali ceramici contenenti fattori biochimici, quali proteine di adesione e fattori di crescita, si può fornire agli osteoblasti una struttura su cui aderire e generare nuovo tessuto osseo, sostituendo man mano lo *scaffold* sul quale aderiscono (Figura 3)⁷.

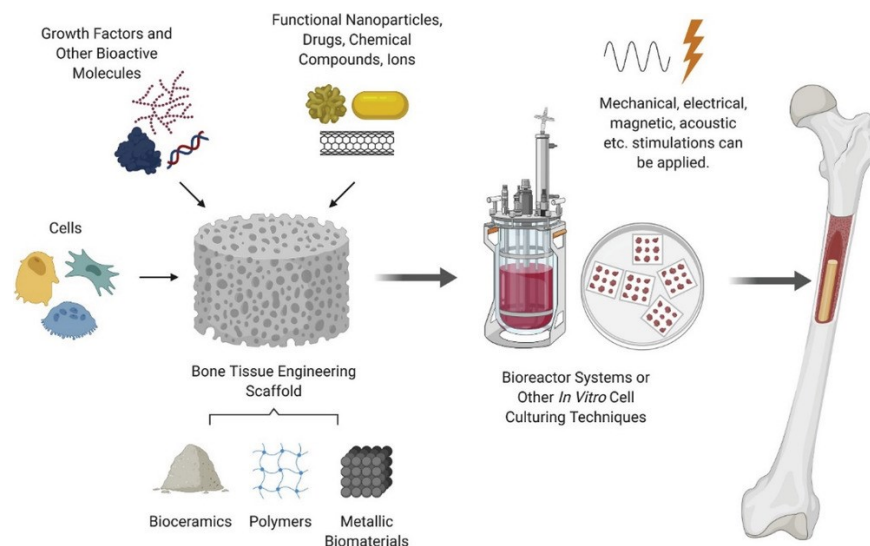


Figura 3: Ingegneria tessutale applicata al tessuto osseo.

1.4 Lo Scaffold

Lo *scaffold* funge da microambiente extracellulare atto al supporto e alla stimolazione della rigenerazione di tessuto da parte di cellule fungendo da piattaforma di supporto per cellule trapiantate o per richiamare e trattenere assieme cellule autologhe con appropriate qualità meccaniche e biologiche⁷. Lo scaffold deve essere selezionato accuratamente in base alle seguenti proprietà:

- Capacità meccaniche: in base all'impiego, deve garantire adeguata resistenza meccanica, rigidità e flessibilità;
- Biocompatibilità: il materiale non deve essere riconosciuto come elemento non-self dall'organismo per evitare reazioni infiammatorie o di rigetto;

- Proprietà superficiali: lo *scaffold* deve presentare una superficie con porosità tale da permettere alle cellule selezionate di aderire ad essa;
- Porosità: il substrato deve presentare canali interni sufficientemente grandi ed interconnessi da permettere l'insediamento delle cellule all'interno del suo volume e il trasporto di nutrimento e scarti dell'attività biologica;
- Biorisorbibilità: deve poter essere smaltito dall'organismo una volta terminata la sua funzione di supporto allo sviluppo cellulare, se così non fosse si rischierebbero reazioni infiammatorie, rigetto, dolore e discontinuità nel comportamento meccanico.

Gli *scaffold* utilizzati in campo scheletrico sono costituiti da materiali ceramici contenenti fosfato di calcio, componente fondamentale del tessuto osseo corticale, come idrossiapatite e β -trifosfato di calcio (TCP)⁵⁻⁸. Questi materiali sono altamente porosi e se arricchiti di polimeri bioattivi rappresentano un substrato efficace per l'adesione degli osteoblasti⁹.

1.4.1 Ardistonite arricchita con Sr e Mg

L'ardistonite ($\text{Ca}_2\text{ZnSi}_2\text{O}_7$) rappresenta un'ottima opzione come *scaffold* per il suo elevato biomimetismo e la semplice procedura di produzione, basata su sinterizzazione di polveri. Per questa tesi è stata utilizzata ardistonite dopata con stronzio e magnesio ($\text{Ca}_{1.4}\text{Sr}_{0.6}\text{Zn}_{0.85}\text{Mg}_{0.15}\text{Si}_2\text{O}_7$): questa ceramica presenta ulteriori vantaggi nell'applicazione biologica grazie alle proprietà degli ioni dopanti: il magnesio ha la capacità di stimolare l'attività degli osteociti, mentre lo stronzio diminuisce la velocità di riassorbimento del substrato incrementando la densità ceramica del PbTiO_3 ¹⁰⁻¹¹.

1.5 Segnali biochimici

I segnali biochimici si differenziano in fattori di crescita, proteine di adesione, citochine, chemochine ed ormoni.

I fattori di crescita sono delle proteine specializzate nello stimolare la proliferazione e la differenziazione delle cellule. Queste proteine possono essere prodotte dalle cellule stesse su cui agiscono (autocrine) o da altre cellule (paracrine)¹².

Le proteine di adesione hanno la funzione di reclutare e trattenere cellule specifiche per permetterne l'adesione al substrato¹³, tra questa tipologia di proteine le più importanti sono la fibronectina, la laminina e la vitronectina.

La vitronectina è una glicoproteina presente nel sangue e nella matrice extracellulare e si lega a glicosamminoglicani, collagene, plasminogeno e recettori per urochinasi. Legandosi con il sito di inibizione-1 del plasminogeno, la vitronectina può regolare la degradazione della matrice extracellulare inibendone la proteolisi¹⁴.

1.5.1 Peptidomimetica

La peptidomimetica si basa sull'utilizzo di molecole peptidomimetiche (*Figura 4*), ovvero analoghi dei peptidi bioattivi¹⁵. Le modifiche che forniscono i peptidomimetici possono riguardare:

- La struttura interna basata su legami non peptidici. Modifica utile per aumentare la resistenza alla proteolisi e quindi il tempo di emivita del peptide all'interno dell'organismo;
- L'inserimento di β -amminoacidi o amminoacidi a configurazione D;
- La variazione della rigidità delle catene laterali, per aumentarne o diminuirne l'attività e le interazioni con l'ambiente biologico.

Questi composti possono essere utilizzati in sostituzione del peptide di cui mimano le caratteristiche, aumentando, inibendo o modificando gli effetti del peptide originale¹⁶.

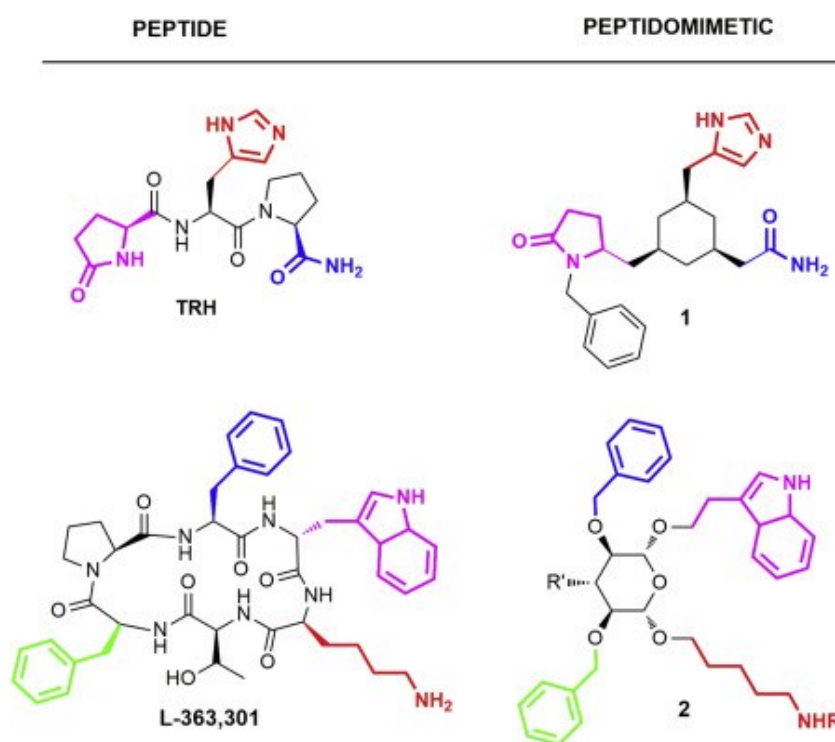


Figura 4: Esempio di peptidomimetica: i gruppi più esterni (colorati) sono identici al peptide originale, ma la struttura centrale è stata variata.

1.5.2 Metodi per la stabilizzazione dei peptidi

L'utilizzo di molecole peptidomimetiche è da preferirsi all'utilizzo di proteine in quanto più economici, stabili e solubili.

I metodi principali per la stabilizzazione dei peptidi si basano sulla modifica della geometria interna, ad esempio utilizzando molecole cicliche, β -amminoacidi o amminoacidi a configurazione invertita.

1.5.2.1 Stabilizzazione di peptidi con l'uso di D-amminoacidi

I peptidi costituiti da amminoacidi di tipo D hanno una emivita molto maggiore rispetto ai più comuni ed economici isomeri L¹⁷⁻¹⁸, il loro concatenamento porta alla formazione di un peptide D-retro-inverso (*Figura 5*). Un peptide retro-inverso è un peptide lineare la cui sequenza di amminoacidi è al contrario rispetto al peptide originale e i centri chirali degli amminoacidi sono anch'essi invertiti rispetto agli amminoacidi del peptide originale.

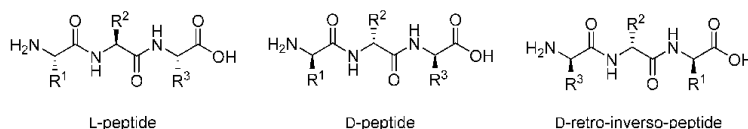


Figura 5: Esempio di peptide retro-inverso.

1.5.3 D2HVP

Per questa tesi è stato sintetizzato il peptide D2HVP, dimero retro-inverso del peptide HVP, in grado di legarsi con i glicosamminoglicani di membrana degli osteoblasti e permettere la loro adesione allo *scaffold* di ardistonite arricchita attraverso una funzionalizzazione biochimica.

1.6 Funzionalizzazioni biochimiche

Per rendere bioattiva la superficie dell'impianto è necessario funzionalizzarlo con adeguati segnali biochimici. L'arricchimento della superficie può essere ottenuto mediante adsorbimento, veicolazione mediante carrier o funzionalizzazione covalente.

1.6.1 Funzionalizzazione covalente

La catena peptidica può essere legata direttamente allo *scaffold* o si può utilizzare uno spaziatore, opzione che permette una maggiore mobilità delle biomolecole e migliora la loro capacità di interazione con le cellule e il legame può generarsi in una parte qualsiasi della catena (funzionalizzazione aspecifica) o in un sito particolare (funzionalizzazione specifica) (*Figura 6*).

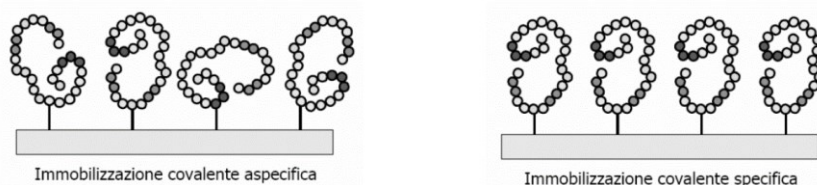


Figura 6: Tipologie di funzionalizzazione covalente.

Per questa tesi è stata effettuata una funzionalizzazione covalente specifica tra il peptide D2HVP e lo scaffold ceramico utilizzando l'acido 7-amino-eptanoico come spaziatore.

1.7 Scopo della tesi

In questa tesi sono stati riassunte le procedure per la sinterizzazione dell'ardistonite arricchita con stronzio e magnesio, e per la sintesi del D2HVP. Si è tentato di verificare se fosse possibile ottenere buone rese di reazione funzionalizzando covalentemente il bioceramico con reazioni effettuate in ambiente acquoso.

Capitolo 2

2 Materiali e metodi

2.1 Materiali

Nel paragrafo seguente si elencheranno i principali materiali utilizzati nell'esperienza.

2.1.1 Reagenti

Reagenti forniti da *Biosolve* (Dieuze, Francia):

- Piperidina;
- Diclorometano (DCM);
- Acido trifluoroacetico (TFA);
- N-etil-diisopropilammina (DIPEA).

Reagenti forniti da Millipore Corporation (Merck KGaA, Darmstadt, Germania):

- Etanolo.

Reagenti forniti da *Novabiochem* (Merck KGaA, Darmstadt, Germania):

- Amminoacidi Fmoc-protetti;
- Resina Rink Amide MBHA;
- Etilciano-(idrossiammino)-acetato (Oxima Pure);
- 1-[Bis(dimetilammino)-metilene]-1H-1,2,3,-triazolo[4,5-b]piridinio3-ossido esafluorofosfato (HATU).

Reagenti forniti da *Sigma-Aldrich* (Merck KGaA, St. Louis, Missouri, USA):

- Metanolo;
- $C_2H_6N_4O_2$;
- ZnO;
- N-metil-2-pirrolidone (NMP);
- Acetonitrile;
- Acido acetico;
- Dimetilformammide (DMF);
- Trietossisilano (TES).

Reagenti forniti da *VWR Chemicals* (Radnor, Pennsylvania, USA):

- Acetone.

Reagenti forniti da *Industrie Bitossi (Vinci, Italia)*:

- CaCO_3 ;
- SrCO_3 ;
- $\text{Mg}(\text{OH})_2$.

2.1.2 Sequenza peptidica utilizzata

Per questa tesi è stata sviluppata la sequenza peptidica D2HVP attraverso sintesi su fase solida:

- Peso molecolare: 2646 Da;
- Sequenza: H-Ser-X-Tyr-Gly-Lys-Arg-Asn-Arg-His-Arg-Phe-Tyr-Gly-Lys-Arg-Asn-Arg-His-Arg-Phe – NH_2 . Dove X è acido 7-amminoeptanoico.

2.2 Strumenti

Si elencano gli strumenti utilizzati:

- Sintetizzatore automatico modello *Syro I*, fornito da *MultisynTech* (Witten, Germania);
- Liofilizzatore modello *FreeZone 2.5 Liter Benchtop*, fornito da *Labconco* (Kansas City, Missouri, USA);
- Spettrofotometro UV/Vis modello *Lambda 2*, fornito da *Perkin Elmer* (Waltham, Massachusetts, USA);
- Evaporatore rotante (*rotavapor*) modello *Laborota-4000-Efficient*, fornito da *Heidolph Instruments* (Schwabach, Germania);
- Bilancia analitica modello *Mettler AE250*, fornita da *Mettler Toledo* (Ohio, USA)
- Distillatore d'acqua da laboratorio modello *Stuart D4000*, fornito da *Norrscope* (Chelmsford, Essex, Regno Unito);
- Sistema di purificazione dell'acqua modello *Milli-Q Integral for Ultrapure Water*, fornito da *Merck KGaA* (Darmstadt, Germania);
- Bagno ad ultrasuoni modello *Microstirrer*, fornito da *Velp Scientifica* (Usmate Velate, Italia);
- Agitatore magnetico modello *Microstirrer*, fornito da *Velp Scientifica* (Usmate Velate, Italia);
- Centrifuga da banco modello *Rotina 380*, fornita da *Hettich GmbH & Co* (Tuttlingen, Germania);
- Essiccatore sottovuoto fornito da *Kartell Labware* (Noviglio, Italia);

- Sistema RP-HPLC “analitica” (Figura 7) costituito da:
 - Pompa binaria HPLC modello *Waters 600E*, fornito da *Waters Corporation* (Milford, Massachusetts, USA);
 - Auto campionatore modello *Waters 2707* fornito da *Waters Corporation* (Milford, Massachusetts, USA);
 - Rilevatore un UV/VIS multicanale a lunghezza d'onda programmabile modello *Waters 2489*, fornito da *Waters Corporation* (Milford, Massachusetts, USA);
 - Computer dotato del software di gestione dei dati *cromatografici Empower Pro*, sviluppato da *Waters Corporation* (Milford, Massachusetts, USA);



Figura 7: Tipologie di funzionalizzazione covalente.

- Sistema RP-HPLC “semipreparativa” costituito da:
 - Sistema di pompaggio multisolvente HPLC modello *Waters 600E*, fornito da *Waters Corporation* (Milford, Massachusetts, USA);
 - Rilevatore UV/VIS multicanale a lunghezza d’onda programmabile modello *Waters 2487*, fornito da *Water corporation* (Milford, Massachusetts, USA);
 - Registratore su carta modello *BD40/BD41* distribuito dalla *Carlo Erba Strumentazione* e prodotto da *Zipp & Zonen* (Delft, Olanda).

2.3 Metodi

2.3.1 Preparazione soluzioni

Saranno necessari 3 reagenti:

- 40% Piperidina in DMF;
- *Dipea* in NMP (concentrazione 1.8 N);
- Oxima e HATU in DMF (concentrazione 0.45 M).

2.3.2 Sintesi peptidica su fase solida:

I peptidi sono molecole organiche costituite da due o più aminoacidi legati da un legame peptidico (ammidico) tra il gruppo carbossilico di un aminoacido ed il gruppo amminico dell'amminoacido successivo¹⁷. La sintesi di peptidi come il D2HVP è ottenuta mediante sintesi su fase solida (*Solid Phase Peptides Synthesis*, SPPS), procedura inventata nel 1963 da Bruce Merrifield e basata su *coupling* sequenziali di aminoacidi a partire da una resina insolubile. L'utilizzo di un supporto insolubile permette la rimozione dei reagenti in eccesso attraverso dei semplici lavaggi e per questo motivo ci si può avvalere di sintetizzatori automatici, effettuando i *coupling* con una quantità di aminoacido in eccesso²⁰.

2.3.3 Chimica Fmoc

Per sintetizzare i peptidi, si ricorre all'utilizzo di aminoacidi protetti da un gruppo Fmoc (Fluorenilmetilossicarbonil cloruro) (*Figura 8*) al terminale amminico ed altri gruppi protettori alle catene laterali. Questi gruppi aggiuntivi svolgono la funzione di bloccare la reattività del gruppo amminico dell'amminoacido attraverso legami covalenti labili in ambiente acido (per i gruppi protettori laterali) o basico (per lo Fmoc). È possibile allungare la catena peptidica trattandola con una base, causando la deprotezione del gruppo Fmoc e promuovendo la creazione di un legame tra il gruppo amminico del peptide il gruppo carbossilico dell'amminoacido successivo (*Figura 9*).

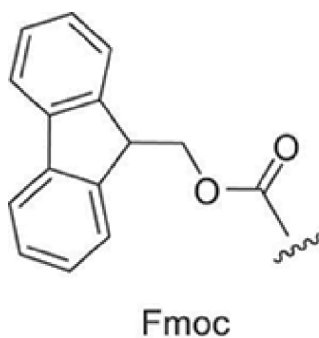


Figura 8: Gruppo protettore Fmoc.

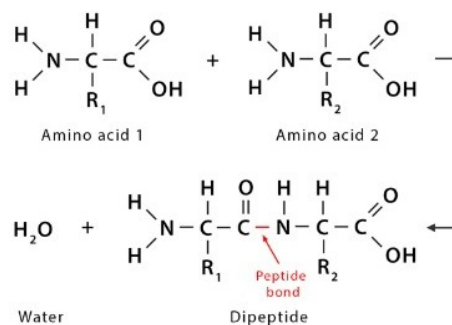


Figura 9: Esempio di legame peptidico.

Una volta generato il peptide desiderato, si può proseguire con la sua separazione dal supporto solido e dai gruppi protettori delle catene laterali²¹.

Il processo di sintesi ha inizio con il primo *coupling* tra il gruppo carbossilico del primo amminoacido ad uno dei siti amminici della resina, impedendo il legame con altri terminali dell'amminoacido utilizzando gruppi protettori come lo Fmoc o il Boc. Si procede poi con la deprotezione del gruppo amminico della catena e si effettua il *coupling* con l'amminoacido successivo. Si ripete quest'ultimo passaggio fino al completamento della catena peptidica desiderata ed infine si effettua una deprotezione dei gruppi protettivi laterali e della resina con risciacqui in ambiente acido.

2.3.4 Resina

Come supporto solido, vengono generalmente utilizzate resine polimeriche o poliacrilammidiche: queste hanno la proprietà di rigonfiarsi fino a raggiungere un volume pari a 10 volte quello iniziale, se entrano in contatto con solventi come N,N-dimetilformammide (DMF), N-metil-2-pilipirrone (NMP) e diclorometano (DCM).

In questo elaborato si è utilizzata come resina la *Rink Amide MBHA* (Figura 10), essa ha una funzionalità amminica che, a seguito dello sblocco del gruppo protettore (Fmoc), permette la reazione con il gruppo carbossilico dell'amminoacido da agganciare.

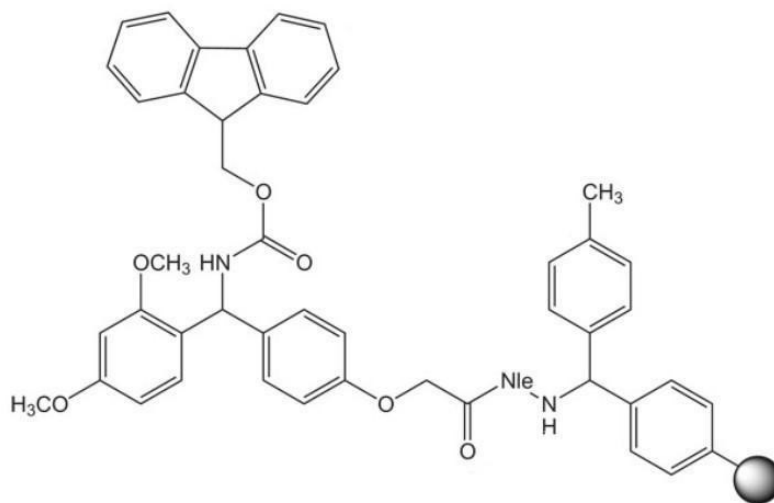


Figura 10: Resina Rink Amide MBHA.

2.3.5 Processo di sintesi peptidica automatizzata

Ogni ciclo di sintesi effettuata con sintetizzatore automatico *Syro I* prevede i seguenti passaggi (Figura 11):

- Deprotezione del gruppo Fmoc:
 - Si utilizza 1 mL di soluzione al 40% di piperidina in DMF per 3 minuti, intervallando ogni minuto con un'agitazione di 15 secondi;
 - Si tratta la resina con 0,9 mL di DMF e 0,9 mL di soluzione al 40% di piperidina in DMF per 12 minuti, intervallando ogni 3 minuti con un'agitazione di 15 secondi;
 - Si eseguono 6 cicli di lavaggi, in cui si utilizzano 2,2 mL di DMF ad ogni lavaggio;
- Attivazione del gruppo carbossilico:
 - Si aggiunge nel reattore 1 mL di soluzione amminoacido in DMF a 0.62 M, 1,4 mL di soluzione HBTU/Oxima pure in DMF e 0,625 mL di soluzione 2 M di DIPEA in NMP, lasciando agire per 45 minuti e agitando per 15 secondi ogni 3 minuti di reazione;
 - Si effettuano 5 cicli di lavaggi, utilizzando 3 mL di DMF ad ogni lavaggio.

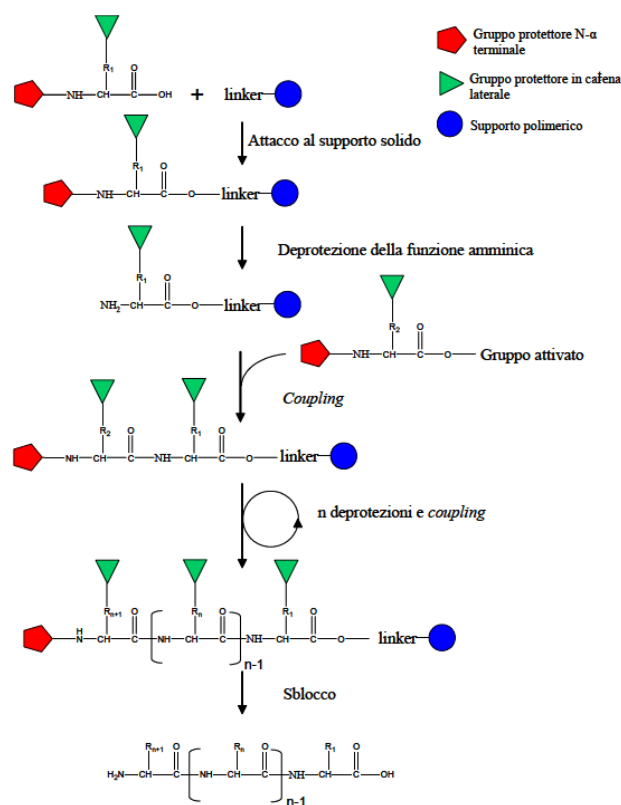


Figura 11: ciclo di sintesi peptidica.

2.3.6 Test alla piperidina:

La procedura che permette di determinare quale sia la resa di funzionalizzazione della resina (*loading*) è detta anche "test alla Piperidina" e si avvale di una lettura spettrofotogrammetrica a 301 nm.

Si procede producendo N-(9-fluorenilmetil)-piperidina:

- Si estrae una piccola quantità di resina dal reattore di sintesi, lavando più volte con metanolo in provetta, centrifugando ad ogni lavaggio e rimuovendo il surnatante;
- Si essicca la resina in una campana a vuoto per almeno un'ora;
- Si preleva un quantitativo compreso tra 4-8 mg e lo si trasferisce in una provetta;
- Si tratta con 0,5 mL di una soluzione al 20% di piperidina in DMF e si lascia agire per 15 minuti mescolando manualmente di tanto in tanto per garantire che tutta la resina entri in contatto con la soluzione;
- si diluisce con DMF fino a raggiungere un volume di 50 mL, si mescola e si lascia riposare per far depositare la resina sul fondo;
- Si procede a prelevare una piccola quantità di prodotto.

Al contempo, si tara lo spettrometro utilizzando una soluzione di bianco prelevando 0.5 ml di piperidina 20% in DMF e portandola a 50 ml con DMF.

Si prepara il bianco prelevando 0.5 ml di piperidina 20% in DMF e portandola a 50 ml con DMF e si procede con l'analisi dell'assorbanza del campione.

Si può procedere con l'analisi e il confronto tra sostituzione teorica e sperimentale, determinando la percentuale di resa di funzionalizzazione:

- Sostituzione teorica: $S_t = \frac{1000}{PM_{res} + PM_{amm}}$

Con PM_{res} peso molecolare della resina e PM_{amm} peso molecolare dell'amminoacido;

- Sostituzione sperimentale: $S_{sp} = \frac{Abs_{301} \times V_{soluzione} [mL]}{\epsilon \times peso [gr]}$

con ϵ coefficiente di estinzione molare ($7800 M^{-1} cm^{-1}$);

- $Resa = \frac{S_{sp}}{S_t} \times 100$.

2.3.7 Sblocco del peptide dalla resina

Terminata la sintesi ed effettuato lo sblocco dello Fmoc dell'ultimo amminoacido, si prosegue con lo sblocco del peptide dalla resina e dai gruppi protettori laterali utilizzando una soluzione acida:

- Si fa seccare la resina nel reattore sotto vuoto per 2 ore;
- Si aggiunge alla resina una soluzione di 0,125 mL di acqua MilliQ, 0,125 mL di TES e 4,75 mL di TFA;
- Si lascia la miscela in agitazione magnetica per 1 ora e 30 minuti;
- Si separa la resina dalla soluzione attraverso filtrazione e si riduce il volume della soluzione in evaporatore rotante;
- Si fa precipitare il peptide grezzo utilizzando etere dietilico freddo (-4°C) e lo si filtra su gooch G4;
- Si fa essiccare il peptide grezzo per circa 2 ore e successivamente lo si liofilizza.

2.3.8 Cromatografia

Per determinare la purezza del peptide sintetizzato e per purificarlo ci si avvale della HPLC (*High-Performance Liquid Chromatography*) analitica e semipreparativa su fase inversa.

Le componenti basilari di un sistema HPLC sono qui di seguito elencate e riportate in *Figura 12*:

- serbatoi contenenti la fase mobile (0,05% di TFA in H₂O MilliQ e 0,05% di TFA in acetonitrile), opportunamente degasate con elio ed in modalità di eluizione a gradiente;
- una pompa ad alta pressione per generare e gestire la portata desiderata della fase mobile;
- un iniettore che introduce il campione all'interno del flusso della fase mobile in modo da poter trasportare il campione all'interno della colonna;
- una colonna contenente del materiale impaccato (fase stazionaria) che effettua la separazione;
- un detector che rileva i diversi composti quando eluiscono dalla colonna;
- un computer che traduce il segnale elettrico generato dal detector in un cromatogramma.

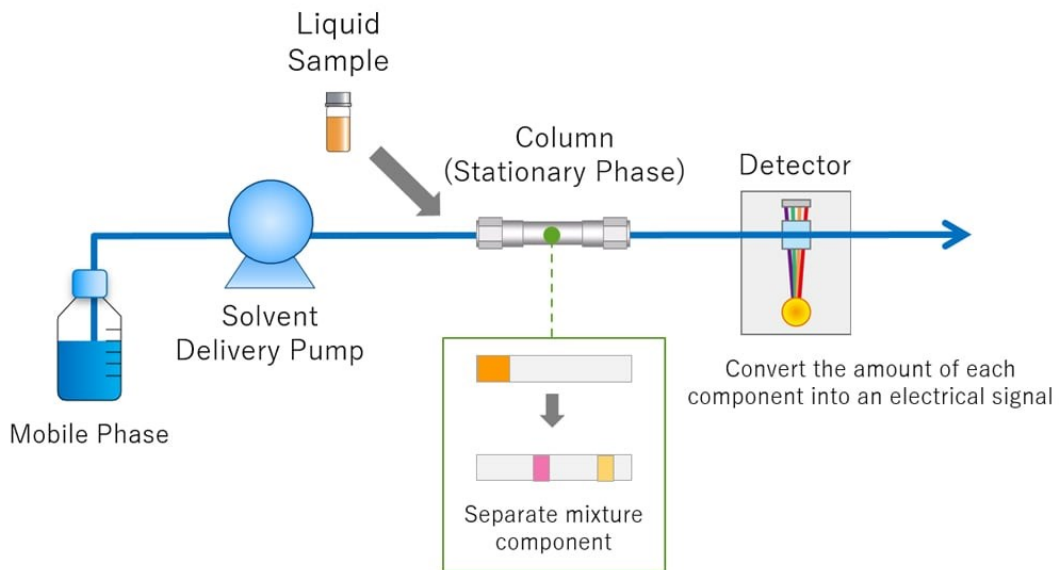


Figura 12: Componenti fondamentali dell'HPLC analitica.

2.3.9 MALDI-TOF

Per l'analisi del peptide sintetizzato durante questo lavoro di tesi è stato utilizzato lo spettrometro MALDI-TOF (Figura 13), strumento che utilizza una tecnica di ionizzazione detta *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization* (MALDI) in cui l'eccitazione delle molecole del campione viene effettuata tramite un raggio laser, e con un analizzatore di tipo TOF (*time of flight*, cioè tempo di volo) il quale seleziona gli ioni in base al loro rapporto massa/carica e al tempo che essi impiegano per percorrere l'analizzatore.

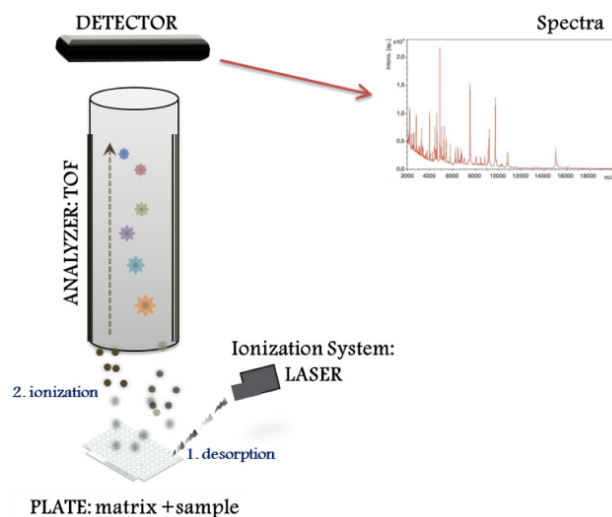


Figura 13: Funzionamento del MALDI-TOF.

2.3.10 Ossidazione

Il peptide D2HVP puro deve essere sottoposto ad una reazione di ossidazione (*Figura 14*) per convertire la serina N-terminale in un gruppo OHC-CO- (detto α -oxo-aldehyde), necessario per effettuare la funzionalizzazione covalente del ceramico.

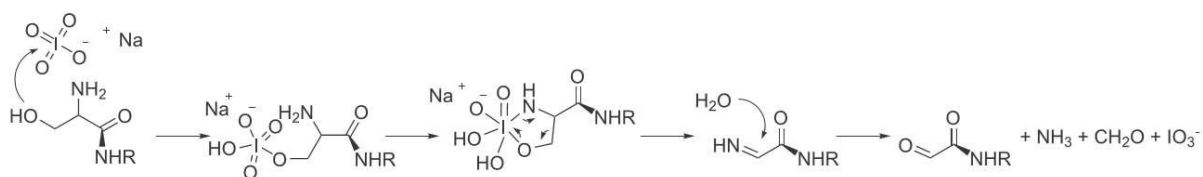


Figura 14: reazione di ossidazione del peptide.

In questo lavoro di tesi si è fatto sciogliere il peptide S-X-D2HVP in sodio periodato in modo tale da raggiungere una concentrazione finale di 2.5 mM. Si è lasciato reagire sotto agitazione magnetica per 4 minuti a temperatura ambiente, è stato poi filtrato con un filtro PVDF per poi essere immediatamente purificato ed isolato tramite cromatografia RC HPLC semipreparativa. Questo processo porta ad una diminuzione del peso molecolare pari a 31 Da.

2.3.11 Sinterizzazione del ceramico

Dieci grammi di ardistonite arricchita con magnesio e stronzio è stata preparata mettendo in un becher:

- 15 mL di isopropanolo, utilizzato come solvente;
- 6,39 g di H62C, polimero che funge da precursore ceramico;
- 4,17g di CaCO₃;
- 2,06g di ZnO;
- 2,64g di SrCO₃;
- 1,76g di Mg(OH)₂;
- 0,1 g di C₂H₆N₄O₂, agente che funge da attivante (detto “foaming agent”).

Si lascia la soluzione a riposo a 60°C fino alla completa evaporazione dell’isopropanolo, successivamente si separa la soluzione in pozzetti da 1.8g e si immettono in forno per la ceramizzazione secondo la seguente procedura (*Figura 15*):

- Volumizzazione, si mantengono 350°C per 30 minuti;
- Ceramizzazione, 1100°C per 1 ora, con un aumento di temperatura di 0.3°C/min con stazionamento per 3 ore a 550°C e 2 ore a 880°C.
- Raffreddamento, a -2°C/min.

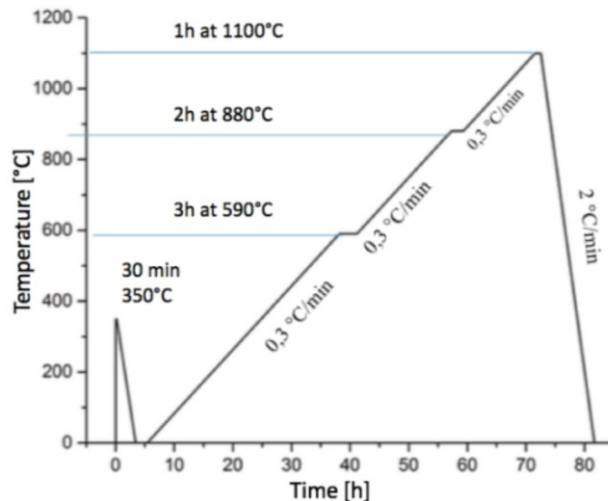


Figura 15: Schema di sinterizzazione del bioceramico

Terminato il raffreddamento, si utilizza della carta abrasiva per eliminare le pareti lisce e aumentare la porosità del ceramico.

2.3.12 Funzionalizzazione del ceramico

Prima di poter essere funzionalizzato, il bioceramico deve essere silanizzato utilizzando la seguente procedura (Figura 13):

- Si immerge il bioceramico in una soluzione al 2% di APTES ((3-aminopropyl)triethoxysilane) in acetone a 40°C per una notte;
- Si effettuano 3 lavaggi con acetone e 3 lavaggi con acqua MilliQ per 3 minuti, per rimuovere l'APTES e l'acetone in eccesso;
- Si mette il bioceramico 10 minuti in una stufa a 100°C per l'asciugatura.

Per la funzionalizzazione si crea una soluzione 1 μM di D2HVP e 3mg/mL di NaCNBH_3 (riducente che facilita la coesione tra peptide e ceramico), si porta al volume desiderato con un tampone salino a pH 7,4, vi si immerge il bioceramico e si lascia riposare una notte a temperatura ambiente (Figura 16).

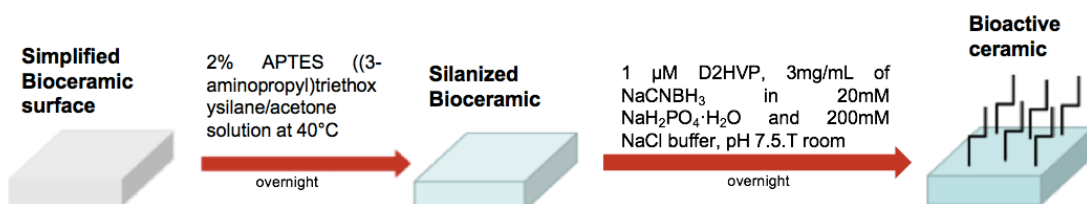


Figura 16: Silanizzazione e funzionalizzazione covalente del bioceramico.

Terminata la funzionalizzazione, si effettuano 3 lavaggi con acqua MilliQ.

Capitolo 3

3 Parte sperimentale

In questo capitolo verrà riassunto il lavoro sperimentale effettuato durante questo progetto, divisibile nei seguenti punti:

- Sintesi peptidica;
- Sblocco del peptide;
- Cromatografia analitica, di massa del grezzo e semipreparativa;
- Ossidazione;
- Purificazione del peptide presso HPLC semipreparative su fase inversa;
- Sinterizzazione del ceramico;
- Funzionalizzazione del ceramico;
- Caratterizzazione del biomateriale tramite spettroscopia Raman.

3.1 Sintesi peptidica

Il peptide D2HVP è stato ottenuto tramite sintesi su fase solida utilizzando il sintetizzatore automatico Syro I (*Figura 17*) e una scala di sintesi di 0,125 mMoli di gruppi funzionali su 240 mg di resina.

Per ogni *coupling* sono stati utilizzati 5 equivalenti di Fmoc-amminoacido, 5 equivalenti di HATU/Oxyma Pure e 10 equivalenti di DIPEA.

Per la sintesi del peptide è stata seguita la procedura riportata di seguito:

- Sono stati pesati i quantitativi richiesti degli amminoacidi;
- Sono stati effettuati tre lavaggi della resina con DMF;
- È stato effettuato un doppio *coupling* con l'amminoacido Fmoc-Phe-OH;
- La resa della reazione di funzionalizzazione è stata determinata tramite Test alla Piperidina ed è risultata pari al 100%;
- Si è continuata la sintesi con sintetizzatore Syro I, effettuando *coupling* singoli per le restanti condensazioni; ogni condensazione ha una durata di 45 minuti;
- La rimozione del gruppo protettore Fmoc è stata ottenuta trattando il peptide in crescita su resina con una soluzione al 40% di piperidina in DMF per 3 minuti, seguita da un trattamento con piperidina al 20% in DMF per 12 minuti;
- L'attivazione del gruppo carbossilico dell'amminoacido N- α -Fmoc protetto, nelle reazioni di condensazione, è stata ottenuta trattando 1 mL di soluzione di amminoacido (5 equivalenti) con l'aggiunta di 1,4 mL di soluzione 0,45 M di HBTU/Oxyma Pure in DMF (5 equivalenti) e 0,625 mL di DIPEA 2,5 M in NMP (10 equivalenti).



Figura 17: Sintetizzatore automatico Syro I.

Al termine della sintesi, il peptide protetto su resina è stato lavato abbondantemente con DCM e seccato in campana da vuoto per 1 ora e 30 minuti.

3.2 Sblocco del peptide:

Per la deprotezione dei gruppi laterali e simultaneo sblocco del peptide dalla resina, si è proceduto aggiungendo a ciascun reattore di sintesi una soluzione di 5 mL composta da:

- 4,75 mL TFA;
- 0,125 mL TES;
- 0,125 mL di H₂O MilliQ.

La soluzione è stata lasciata a reagire in agitazione magnetica a temperatura ambiente per 1 ora e 30 minuti. Al termine della reazione il contenuto del reattore è stato drenato in un pallone da 50 mL e la resina è stata lavata 3 volte con TFA recuperando i lavaggi nel pallone. La soluzione recuperata si è portata a piccolo volume tramite *Rotavapor* ed il peptide è stato recuperato tramite precipitazione con etere dietilico freddo (-4°C) e conseguente filtrazione su Gooch G4. Il precipitato è stato seccato in campana da vuoto per 30 minuti e pesato: risultano sintetizzati 60 mg di peptide.

3.3 Cromatografia

È stata effettuata un'analisi HPLC utilizzando un campione di 0,6 mg di peptide disciolto in 0,125 ml di MilliQ per verificare il grado di omogeneità del peptide grezzo (*Figura 18*).

Le condizioni con cui si è svolta l'analisi sono:

- Colonna: Vydac C₁₈ (5 μm, 300 Å, 4,6×250 mm);
- Volume di iniezione: 125 μL;
- Flusso: 1 mL/min;
- Eluente A: 0,05% TFA in H₂O MilliQ;
- Eluente B: 0,05% TFA in acetonitrile;
- Gradiente: dallo 10% al 25% di B in 30 minuti;
- Lettura dell'assorbanza (λ) a 214 nm

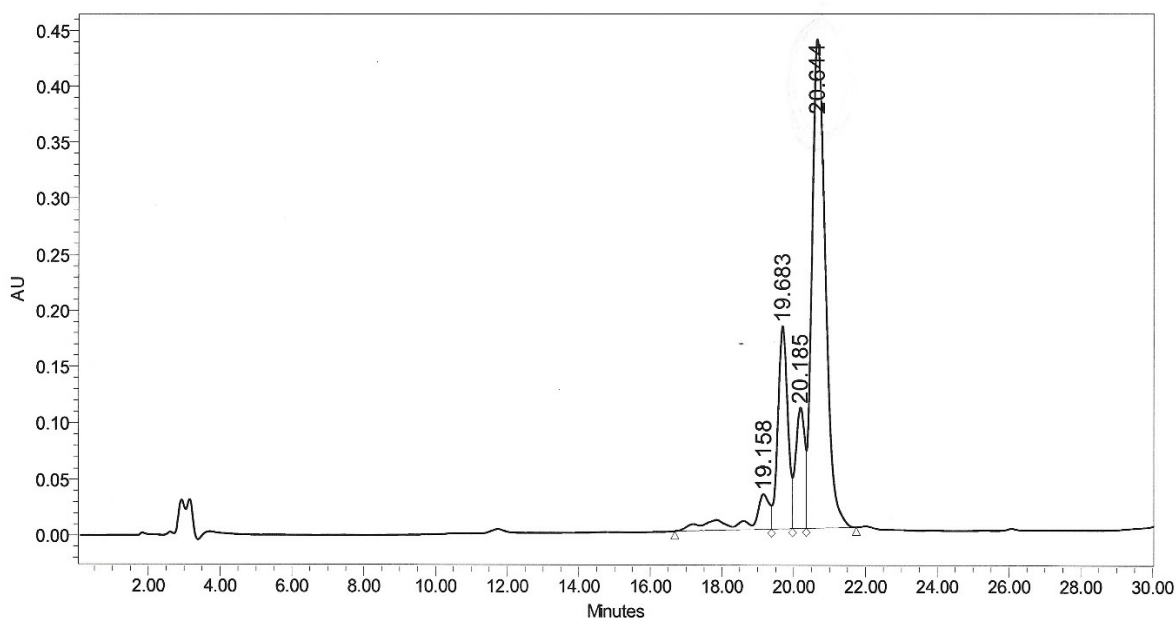


Figura 18: HPLC analitica del peptide grezzo. Colonna: Vydac C₁₈ (5 μm, 300 Å, 4,6×250 mm); Volume di iniezione: 125 μL; Flusso: 1 mL/min; Eluente A: 0,05% TFA in H₂O MilliQ; Eluente B: 0,05% TFA in acetonitrile; Gradiente: dallo 10% al 25% di B in 30 minuti; Lettura dell'assorbanza (λ) a 214 nm.

Per accertare l'identità del picco principale del peptide grezzo, si è eseguita un'analisi di massa MALDI (*Figura 19*).

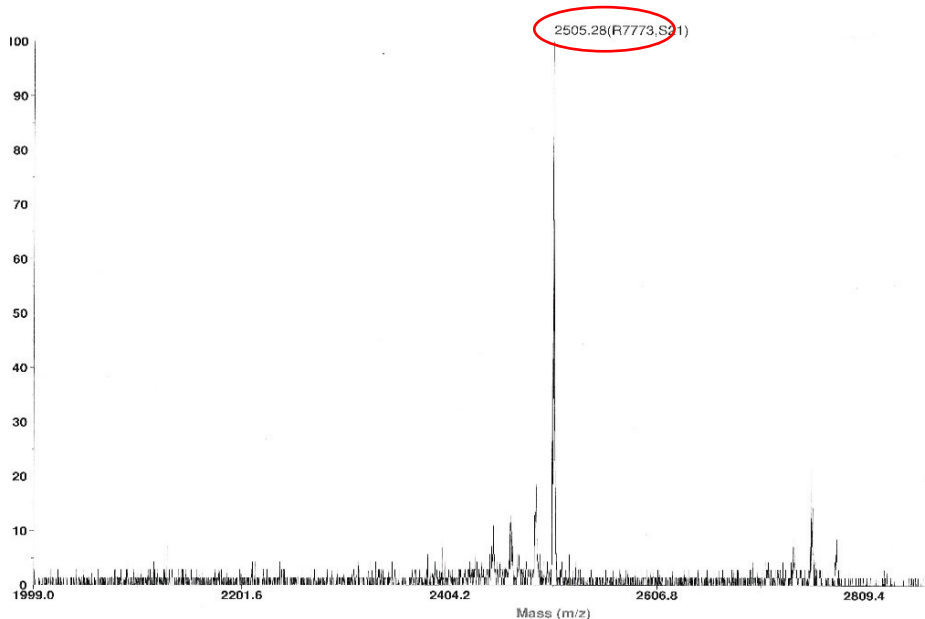


Figura 19: Spettrofotogrammetria di massa del peptide grezzo.

Dai risultati della massa MALDI risulta un peso molecolare di 2505 Da invece di 2646 Da. La differenza di 141 Da è dovuta all'assenza di una serina all'interno della catena peptidica.

3.4 Ossidazione

Si è quindi proceduto all'ossidazione del peptide:

- Si sono fatti sciogliere 20 mg peptide in acqua MilliQ con una concentrazione di 1mg/mL;
- Si è aggiunto alla soluzione 10,79 mg di sodio periodato per ottenere una concentrazione molare di 2.5 mM;
- Si è lasciato reagire sotto agitazione magnetica per 4 minuti a temperatura ambiente;
- La soluzione è stata filtrata con un filtro PVDF ed il peptide è stato immediatamente purificato ed isolato tramite cromatografia HPLC semipreparativa con le seguenti modalità:
 - Colonna: Zorbax 300 SB (5 μ m; 300 Å, 9.4×250 mm);
 - Flusso: 1 mL/min;
 - Eluente A: 0,05% TFA in H₂O MilliQ;
 - Eluente B: 0,05% TFA in acetonitrile;
 - Gradiente: da 0% a 10% in 2 minuti poi 10% al 25% di B in 30 minuti.

Completata la procedura, si è preceduto con un'analisi di massa MALDI per verificare l'esito della reazione di ossidazione (*Figura 20*), che comporta una perdita di peso molecolare pari a 31 Da dovuta alla sostituzione della serina N-terminale con il gruppo OHC-CO-.

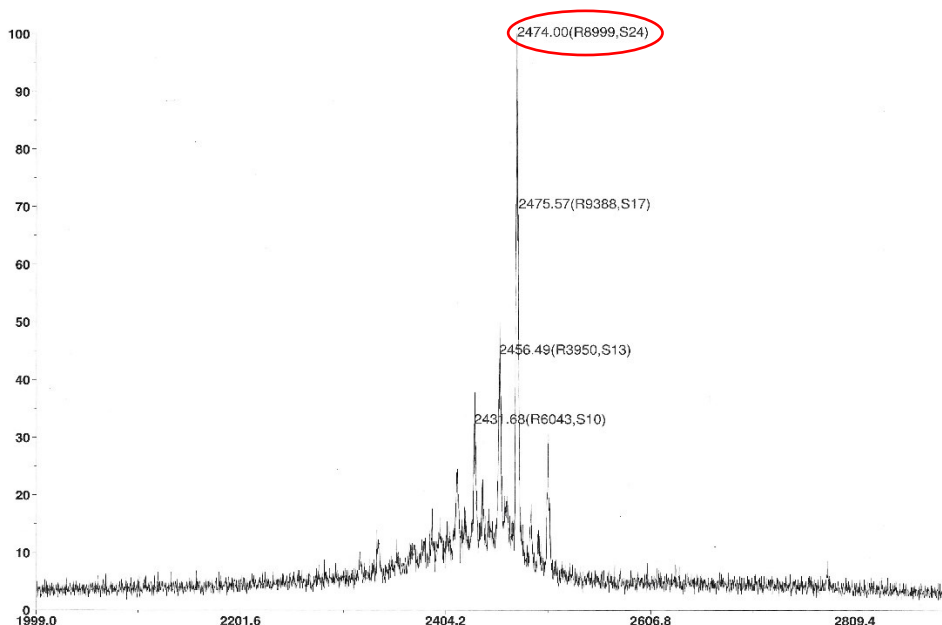


Figura 20: Spettrofotogrammetria di massa del peptide ossidato.

Dall'analisi risulta che la massa molecolare è quella attesa (massa teorica senza serina interna: 2472 Da, massa sperimentale: 2474 Da).

3.5 Purificazione del peptide

3.5.1 Prima corsa semipreparativa in fase inversa

Sono stati disciolti 30 mg di peptide purificato ed ossidato in 15 mL di MilliQ ed è stata effettuata una cromatografia semipreparativa (*Figura 21*) con le seguenti modalità:

- Colonna: Zorbax 300 SB (5 μ m; 300 Å, 9.4×250 mm);
- Flusso: 4 mL/min;
- Eluente A: 0,05% TFA in H₂O MilliQ;
- Eluente B: 0,05% TFA in acetonitrile;
- Gradiente: da 0% a 10% in 2 minuti poi 10% al 25% di B in 45 minuti;
- Lettura dell'assorbanza (λ) a 214 nm;
- Velocità della carta: 0,5 cm/min.

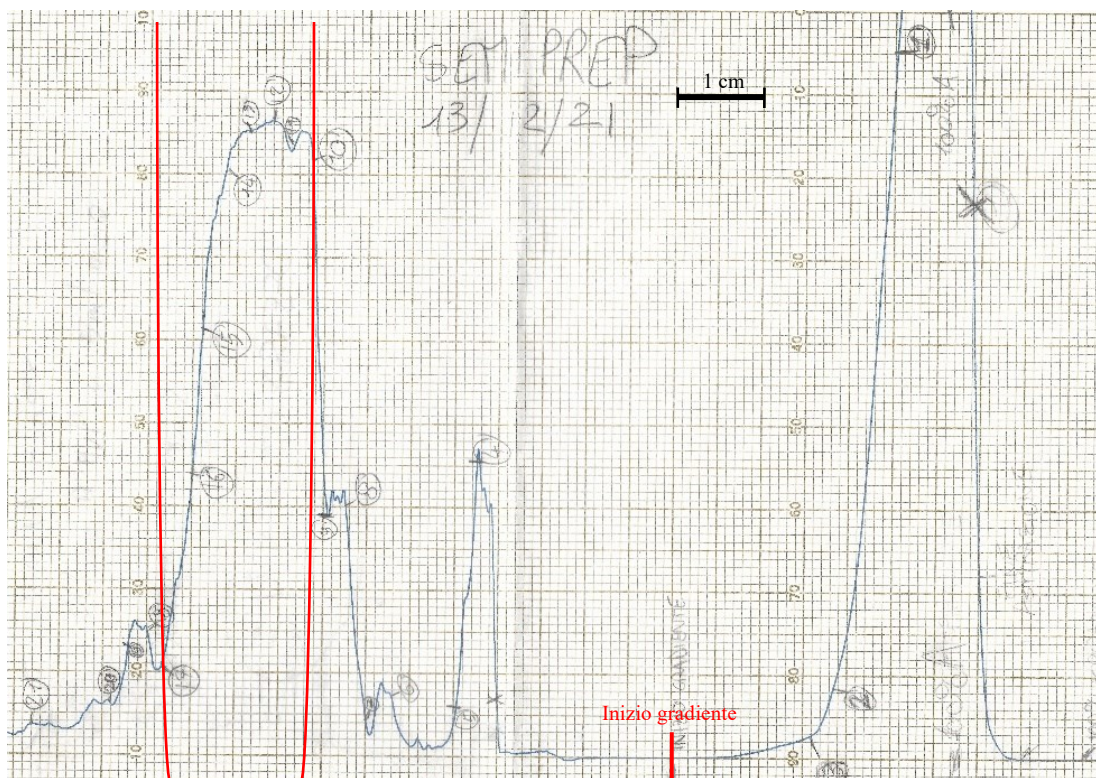


Figura 21: Prima semipreparativa. Colonna: Zorbax 300 SB (5 μm ; 300 \AA , 9.4 \times 250 mm); Flusso: 4 mL/min; Eluente A: 0,05% TFA in H_2O MilliQ; Eluente B: 0,05% TFA in acetonitrile; Gradiente: da 0% a 10% in 2 minuti poi 10% al 25% di B in 45 minuti; Lettura dell'assorbanza (λ) a 214 nm; Velocità della carta: 0,5 cm/min.

3.5.2 Analisi delle frazioni raccolte nella prima semipreparativa

Durante la semipreparativa, con il gradiente di B compreso tra 15% e 18%, le frazioni da 10 a 17 (visibili nel grafico sovrastante all'interno della sezione rossa) sono state selezionate manualmente, unite ed una loro piccola parte (circa 0,6 mg) è stata utilizzata per un'analisi alla HPLC analitica con le seguenti modalità (Figura 22):

- Colonna: Vydac C_{18} (5 μm , 300 \AA , 4,6 \times 250 mm);
- Volume di iniezione: 125 μL ;
- Flusso: 1 mL/min;
- Eluente A: 0,05% TFA in H_2O MilliQ;
- Eluente B: 0,05% TFA in acetonitrile;
- Gradiente: dallo 10% al 25% di B in 30 minuti;
- Lettura dell'assorbanza (λ) a 214 nm.

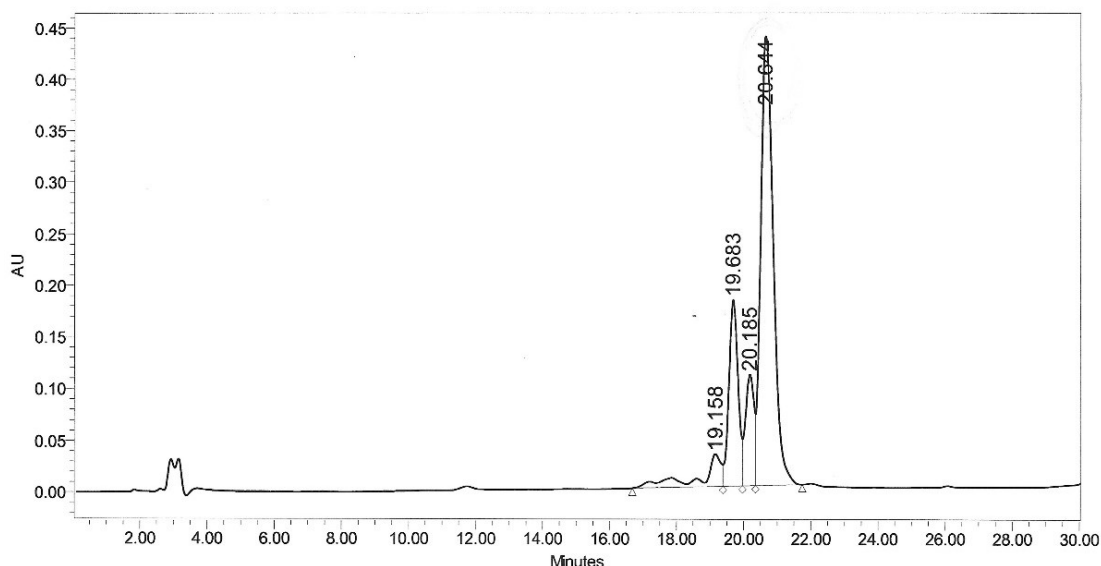


Immagine 22: HPLC analitica sulle frazioni da 10 a 17 della prima semipreparativa. Colonna: Vydac C₁₈ (5 μm, 300 Å, 4,6×250 mm); Volume di iniezione: 125 μL; Flusso: 1 mL/min; Eluente A: 0,05% TFA in H₂O MilliQ; Eluente B: 0,05% TFA in acetonitrile; Gradiente: dallo 10% al 25% di B in 30 minuti; Lettura dell'assorbanza (λ) a 214 nm.

Le frazioni da 10 a 17 sono state riunite e liofilizzate. Il peptide purificato è risultato pari a 6,47 mg. Il grado di omogeneità ricavato dall'interpretazione cromatografica è risultato pari al 63,29%.

3.5.2 Seconda corsa semipreparativa in fase inversa

Le frazioni selezionate della prima semipreparativa sono state disciolte in 10 ml di MilliQ, creando una soluzione a concentrazione 0.647 mg/mL (non 2 mg/mL come per la prima) per aumentare il volume aspirato ed evitare la formazione di bolle d'aria all'interno del macchinario. Si è proseguito con una seconda semipreparativa con le seguenti modalità (*Figura 23*):

- Colonna: Zorbax 300 SB (5 μm; 300 Å, 9.4×250 mm);
- Flusso: 4 mL/min;
- Eluente A: 0,05% TFA in H₂O MilliQ;
- Eluente B: 0,05% TFA in acetonitrile;
- Gradiente: da 0% a 10% in 2 minuti poi 10% al 25% di B in 45 minuti;
- Lettura dell'assorbanza (λ) a 214 nm.
- Velocità della carta: 0,5 cm/min.

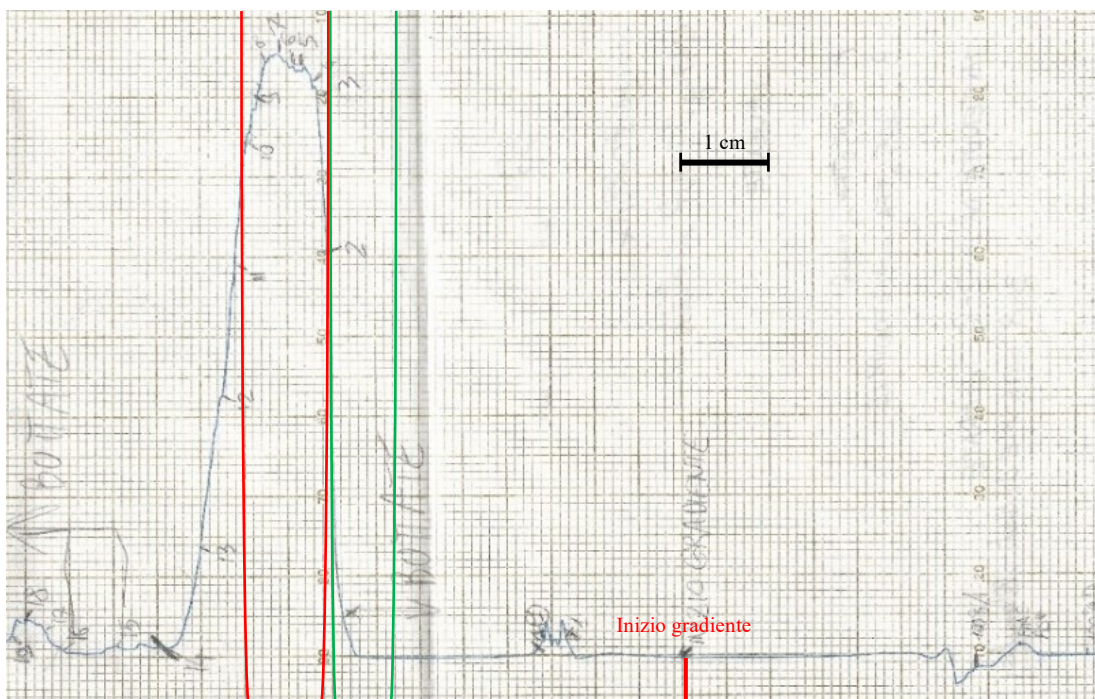


Figura 23: Seconda semipreparativa. Colonna: Zorbax 300 SB ($5\ \mu\text{m}$; $300\ \text{\AA}$, $9,4 \times 250\ \text{mm}$); Flusso: $4\ \text{mL/min}$; Eluente A: $0,05\%$ TFA in H_2O MilliQ; Eluente B: $0,05\%$ TFA in acetonitrile; Gradiente: da 0% a 10% in 2 minuti poi 10% al 25% di B in 45 minuti; Lettura dell'assorbanza (λ) a $214\ \text{nm}$; Velocità della carta: $0,5\ \text{cm/min}$.

3.5.4 Analisi delle frazioni raccolte nella seconda semipreparativa

Terminata la seconda semipreparativa, sono stati rimossi campioni di $0,125\ \text{mL}$ dalle frazioni da 3 a 8 (evidenziate in verde nella *Figura 18*) e sono stati analizzati alla HPLC analitica secondo le seguenti modalità (*Figura 24*):

- Colonna: Vydac C_{18} ($5\ \mu\text{m}$, $300\ \text{\AA}$, $4,6 \times 250\ \text{mm}$);
- Volume di iniezione: $125\ \mu\text{L}$;
- Flusso: $1\ \text{mL/min}$;
- Eluente A: $0,05\%$ TFA in H_2O MilliQ;
- Eluente B: $0,05\%$ TFA in acetonitrile;
- Gradiente: dallo 10% al 25% di B in 30 minuti;
- Lettura dell'assorbanza (λ) a $214\ \text{nm}$.

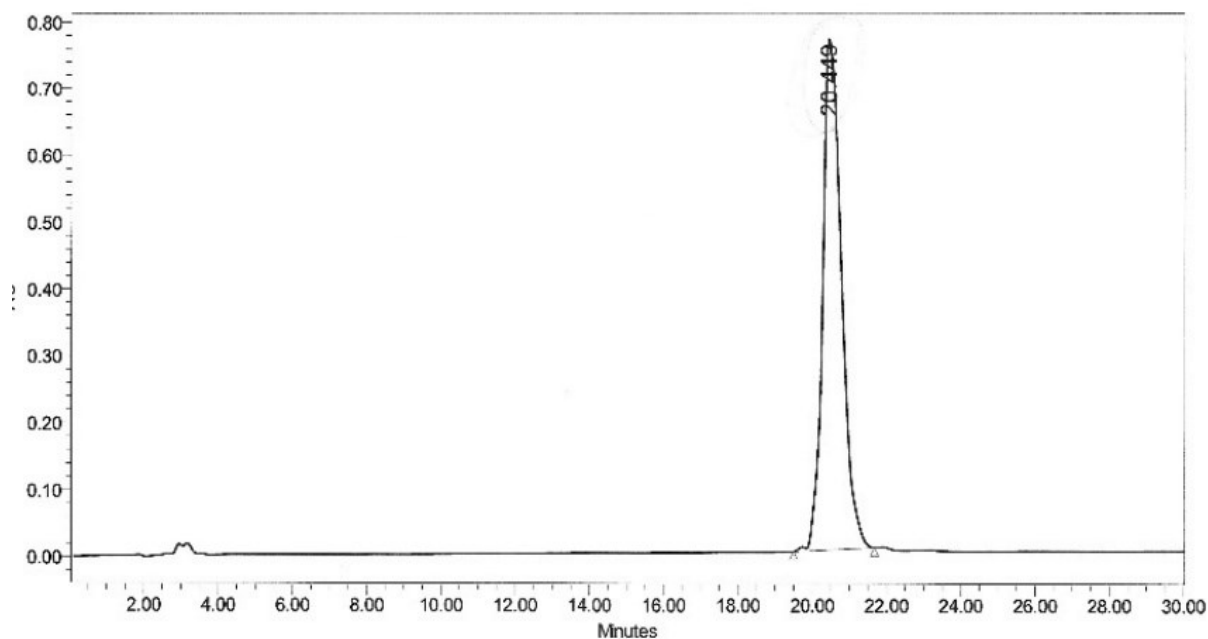


Figura 24: HPLC analitica della frazione 8. Colonna: Vydac C₁₈ (5 μm, 300 Å, 4,6×250 mm); Volume di iniezione: 125 μL; Flusso: 1 mL/min; Eluente A: 0,05% TFA in H₂O MilliQ; Eluente B: 0,05% TFA in acetonitrile; Gradiente: dallo 10% al 25% di B in 30 minuti; Lettura dell'assorbanza (λ) a 214 nm.

3.5.5 Riunione delle frazioni per la funzionalizzazione

Le frazioni comprese tra 8 e 14, tutte di profilo simile, sono state unite contengono lo stesso peptide, sono perciò state unite ed è stata effettuata un'ultima HPLC analitica con le stesse modalità precedenti (Figura 25) per verificare questa ipotesi.

- Colonna: Vydac C₁₈ (5 μm, 300 Å, 4,6×250 mm);
- Volume di iniezione: 125 μL;
- Flusso: 1 mL/min;
- Eluente A: 0,05% TFA in H₂O MilliQ;
- Eluente B: 0,05% TFA in acetonitrile;
- Gradiente: dallo 10% al 25% di B in 30 minuti;
- Lettura dell'assorbanza (λ) a 214 nm.

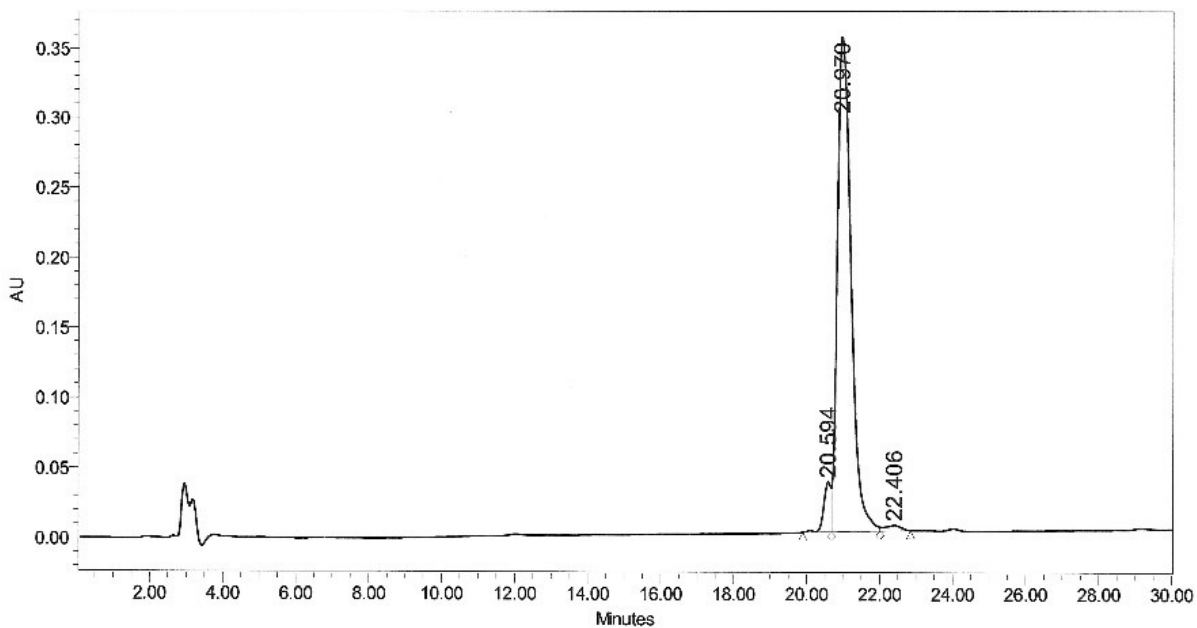


Figura 25: HPLC analitica delle frazioni da 8 a 14. Colonna: Vydac C₁₈ (5 μm, 300 Å, 4,6×250 mm); Volume di iniezione: 125 μL; Flusso: 1 mL/min; Eluente A: 0,05% TFA in H₂O MilliQ; Eluente B: 0,05% TFA in acetonitrile; Gradiente: dallo 10% al 25% di B in 30 minuti; Lettura dell'assorbanza (λ) a 214 nm.

L'analitica ottenuta da un campione del pool (*Figura 22*) conferma un grado di purezza del 93,87%. La resa di funzionalizzazione è risultata pari a 1,1 mg.

3.6 Sinterizzazione del bioceramico

Per la sinterizzazione della ardistonite arricchita con stronzio e magnesio sono stati posti in un becher:

- 15 mL di isopropanolo;
- 6,39 g di H62C;
- 4,17g di CaCO₃;
- 2,06g di ZnO;
- 2,64g di SrCO₃;
- 1,76g di Mg(OH)₂;
- 0.1g di C₂H₆N₄O₂.

La soluzione è stata lasciata per 18 ore a 60°C fino alla completa evaporazione dell'isopropanolo, riconoscibile dal cambio di consistenza della soluzione.

Una volta essiccato completamente, il composto è stato diviso in pozzetti da 1,8 g ciascuno e sono stati effettuate volumizzazione (350°C per 30 minuti) e ceramizzazione (1100°C per 1 ora, con un aumento di temperatura di 0.3°C/min con stazionamento per 3 ore a 550°C e 2 ore a 880°C) per poi subire un raffreddamento a -2°C/min (*Figure 26-27*).

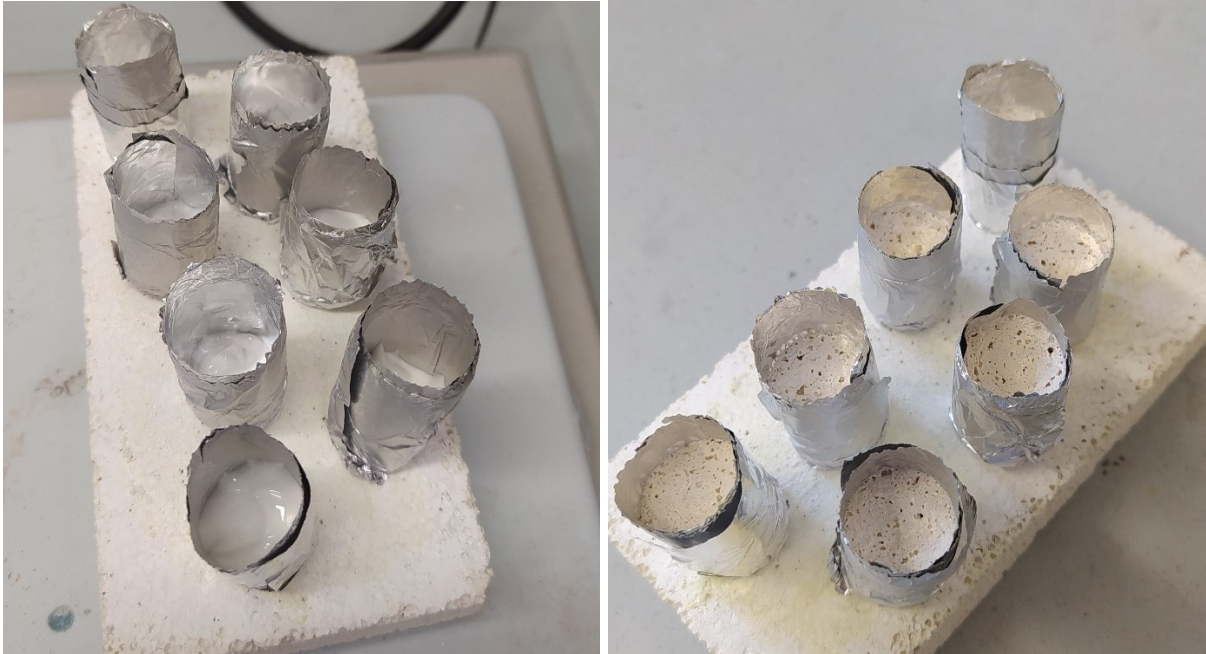


Figure 26-27: Composto preceramico prima e dopo i processi di volumizzazione e ceramizzazione.

Terminato il trattamento di ceramizzazione, si rimuovono i pozzetti e si procede ad una abrasione delle pareti a contatto con i pozzetti con della carta abrasiva per aumentare la porosità del materiale in vista della funzionalizzazione (*Figura 28*).

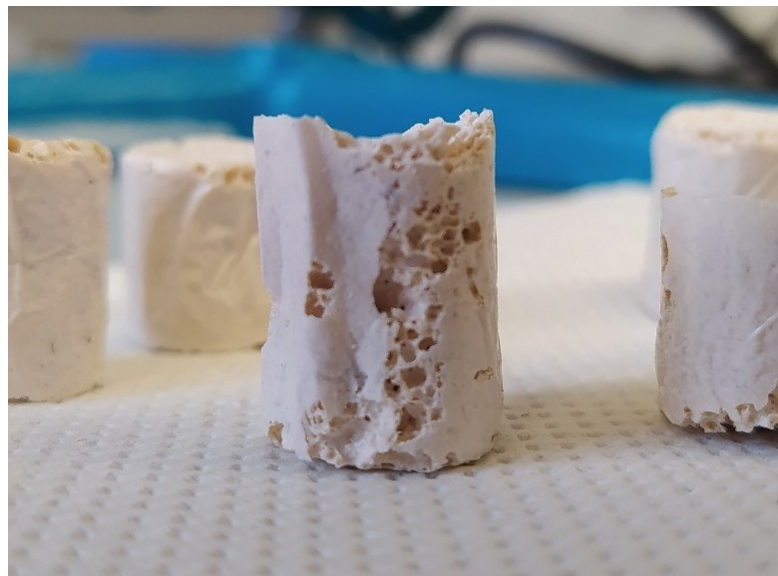


Figura 28: La porosità del bioceramico.

3.7 Funzionalizzazione del bioceramico

3.7.1 Silanizzazione del bioceramico

Sono stati preparati 20 mL di soluzione al 2% di APTES in acetone, vi sono stati immersi i campioni di ardistonite arricchita e sono stati lasciati per 15 ore nella soluzione di reazione a 40°C, dopo sigillazione del contenitore per evitare che l'acetone evaporasse. terminate le 15 ore, i campioni di bioceramico sono stati lavati tre volte in acetone per 3 minuti al fine di rimuovere l'APTES in eccesso e successivamente lavati con le stesse modalità utilizzando acqua MilliQ per rimuovere l'acetone in eccesso.

Terminati i lavaggi, i campioni sono stati fatti asciugare in stufa ad una temperatura di 100°C per 10 minuti e si è proseguito con la funzionalizzazione dei suddetti.

3.7.2 Funzionalizzazione covalente del bioceramico

Sono state disciolte le frazioni mantenute dalla seconda semipreparativa in acqua MilliQ fino a generare una soluzione 1 μM (1,1 mg di peptide in 0.444 mL di MilliQ).

Sono stati preparati 20 mL di un tampone a 20 mM NaH_2PO_4 e 200mM NaCl in H_2O , portando il pH a 7,5 con una soluzione 1N di NaOH.

La soluzione contenente il peptide è stata portata ad un volume di 12 mL con il tampone e sono stati aggiunti 36 mg di riducente (NaCNBH_3), dopodiché si è riempito un multiwell e sono stati immersi i campioni di ardistonite, lasciandoli a riposare per una notte a temperatura ambiente.

Il giorno successivo i campioni sono stati sottoposti a tre lavaggi da 2 minuti in acqua MilliQ e lasciati asciugare a T ambiente (*Figura 27*) e preparati per la spettroscopia Raman.



Figura 29: Campioni di bioceramico funzionalizzati con gli scarti di lavaggio nel becker a sinistra dell'immagine.

4 Risultati

È stato effettuato uno spettro Raman sia sul campione di bioceramico puro che di bioceramico funzionalizzato covalentemente con D2HVP per evidenziare eventuali differenze nello spettro (Figura 30).

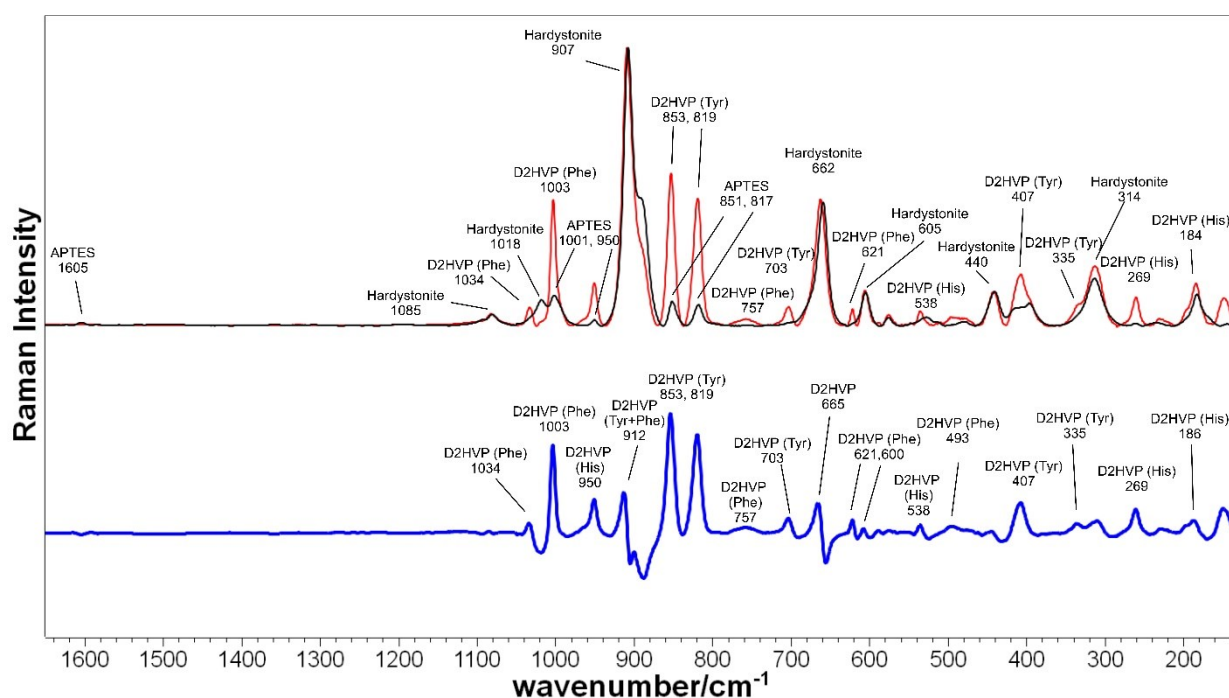


Figura 30: Spettro Raman di pura ardistonite (in nero), ed ardistonite funzionalizzata con D2HVP (in rosso), in blu lo spettro differenza.

Nello spettro differenza nella Figura 30 i picchi positivi sono dovuti alla presenza del peptide D2HVP sulla superficie del bioceramico, mentre i picchi negativi sono dovuti a variazioni strutturali imputabili al supporto di ardistonite e all'APTES²²⁻²³.

L'emissione di fotoni di tipo Raman da parte del D2HVP è dovuta alla presenza all'interno del peptide di D-amminoacidi aromatici, quali istidina, fenilalanina e tirosina.

L'emissione di fotoni Raman da parte della fenilalanina ad una $\lambda=1003$ nm e da parte della tirosina a $\lambda=853$ nm e $\lambda=819$ nm permettono di verificare l'effettiva adesione del peptide sulla superficie bioceramica.

La tirosina presenta un'attività di emissione di elettroni maggiore a 853 nm che a 819 nm, ciò sta a significare che il peptide tende a prolungarsi verso l'esterno, invece che ripiegarsi su sé stesso²⁴.

La conformazione esterna potrebbe favorire l'interazione con le cellule che studi preliminari indicano come estremamente promettente²⁵.

Bibliografia

- 1) Wichterle O., Lim D. Hydrophilic Gels for Biological Use. *Nature* 185, pp. 117–118 (1960). DOI: <https://doi.org/10.1038/185117a0>.
- 2) Dr Atala A., Bauer S. B., Soker S., Yoo J. J., Retik A.B. Tissue-engineered autologous bladders for patients needing cystoplasty. *The Lancet* 367, Issue 9518, pp.1241-1246 (2006). DOI: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(06\)68438-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(06)68438-9).
- 3) Howard D., Buttery L. D., Shakesheff K. M., Roberts S.J. Tissue engineering: strategies, stem cells and scaffolds. *Journal of Anatomy*, Volume 213, Issue 1, pp. 66-72 (2008). DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2008.00878.x>.
- 4) Yao T., Baker M. B., Moroni L. Strategies to Improve Nanofibrous Scaffolds for Vascular Tissue Engineering. *Nanomaterials*, Volume 10, Issue 5, pp. 887 (2020). DOI: <https://doi.org/10.3390/nano10050887>.
- 5) Di Bello C., Bagno A. *Biomateriali, dalla scienza dei materiali alle applicazioni cliniche*. Patron Editore (Bologna, giugno 2016) pp. 153-158.
- 6) Florencio-Silva R., Rodrigues G., *et al.* Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. *BioMed Research International*, Volume 2015, Article ID 421746, 17 pages (2015). DOI: [10.1155/2015/421746](https://doi.org/10.1155/2015/421746).
- 7) Burg K.J.L, Porter S., Kellam J. F. Biomaterial developments for bone tissue engineering. *Biomaterials*, Volume 21, Issue 23, pp. 2347-2359 (2000). DOI: [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(00\)00102-2](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(00)00102-2).
- 8) Zreiqat H., Howlett C. R., Zannettino A., Evans P., Schulze-Tanzil G., Knabe C., Shakibaei M. Mechanisms of magnesium-stimulated adhesion of osteoblastic cells to commonly used orthopaedic implants. *Journal of Biomedical Materials Research*, Volume 62, Issue 2, pp. 175–184 (2002). DOI: <https://doi.org/10.1002/jbm.10270>.

- 9) Black C.R.M., Goriainov, V., Gibbs D. *et al.* “Bone Tissue Engineering”. *Current Molecular Biology Reports*, Issue 1, pp. 132–140 (2015). DOI: <https://doi.org/10.1007/s40610-015-0022-2>.
- 10) Chen T.-Y., Chu S.-Y. & Juang Y.-D. Effects of sintering temperature on the dielectric and piezoelectric properties of Sr additive Sm-modified PbTiO₃ ceramics. *Sensors Actuators A Phys.* Issue 102, pp. 6–10 (2003). DOI: [10.1016/S0924-4247\(02\)00382-5](https://doi.org/10.1016/S0924-4247(02)00382-5).
- 11) Li J. , Liao H., Hermansson L. Sintering of partially-stabilized zirconia and partially-stabilized zirconia-hydroxyapatite composites by hot isostatic pressing and pressureless sintering. *Biomaterials* 17, Issue 18, pp. 1787–1790 (1996). DOI: [https://doi.org/10.1016/0142-9612\(95\)00356-8](https://doi.org/10.1016/0142-9612(95)00356-8).
- 12) Ikada Y. Challenges in tissue engineering. *Journal of the Royal Society Interface*, Issue 3, pp. 589–601 (2006). DOI: <https://doi.org/10.1098/rsif.2006.0124>.
- 13) Hidalgo-Bastida L. A., Cartmell S.H. Mesenchymal Stem Cells, Osteoblasts and Extracellular Matrix Proteins: Enhancing Cell Adhesion and Differentiation for Bone Tissue Engineering *Tissue Engineering Part B: Reviews*, Volume 16, No. 4, pp. 405-412 (2010). DOI: <https://doi.org/10.1089/ten.teb.2009.0714>.
- 14) Schwartz I., Seger D., Shaltiel S. Vitronectin. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, Volume 31, Issue 5, pp. 539-544 (1999). DOI: [https://doi.org/10.1016/S1357-2725\(99\)00005-9](https://doi.org/10.1016/S1357-2725(99)00005-9).
- 15) Liskamp R. M. J. Conformationally restricted amino acids and dipeptides, (non)peptidomimetics and secondary structure mimetics. *Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas*, Volume 113, Issue 1, pp. 1-19 (1994). DOI: <https://doi.org/10.1002/recl.19941130102>.
- 16) Trabocchi A. Principles and applications of small molecule peptidomimetics. *Small Molecule Drug Discovery Methods, Molecules and Application*, pp. 163-195 (2020), ISBN: 9780128183496. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818349-6.00006-6>.

- 17) Liu M., Li X., Xie Z., Xie C., *et al.* D-Peptides as Recognition Molecules and Therapeutic Agents. *The Chemical Record*, Volume 16, Issue 4, pp. 1772-1786 (2016). DOI: <https://doi.org/10.1002/tcr.201600005>.
- 18) Visser R., Rico-Llanos G. A., Pulkkinen H., Becerra J. Peptides for bone tissue engineering. *Journal of Controlled Release*, Volume 244, Part A, pp. 122-135 (2016). DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.10.024>
- 20) Chan W., White P. D. *Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach*. ISBN-10: 0199637253, ISBN-13: 978-019963725, pp. 341 (2020). DOI: [10.1093/oso/9780199637256.001.0001](https://doi.org/10.1093/oso/9780199637256.001.0001).
- 21) Merrifield R. B., Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptid. *Journal of the American Chemical Society*, Volume 85, Issue 14, pp. 2149-2154 (1963). DOI: [10.1021/ja00897a025](https://doi.org/10.1021/ja00897a025).
- 22) Kaminskii A. A., Rhee H., Lux O., *et al.* Many-phonon stimulated Raman scattering and related cascaded and cross-cascaded $\chi^{(3)}$ -nonlinear optical effects in melilite-type crystal $\text{Ca}_2\text{ZnSi}_2\text{O}_7$. *Laser Physics Letters*, Volume 8, Number 12, pp. 859 (2011). DOI: <https://doi.org/10.1002/lapl.201110073>.
- 23) Bisticic L., Volovsek V., Dananic V. Conformational and vibrational analysis of gamma-aminopropyltriethoxysilane. *Journal of Molecular Structure*, Volumes 834–836, pp. 355-363 (2007). DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2006.10.036>
- 24) Webster T, J., Schadler L. S., Siegel R. W., Bizios R. Mechanisms of Enhanced Osteoblast Adhesion on Nanophase Alumina Involve Vitronectin. *Tissue engineering*, Number 3, Volume 73, pp. 291–301 (2001). DOI: <https://doi.org/10.1089/10763270152044152>.
- 25) Zamuner A. *Functionalized Polymer-Derived Bioceramics for Bone Tissue Engineering*. Tesi di dottorato, Padova, 2019, Relatore: Prof.ssa Dettin Monica.

Ringraziamenti

Desidero ringraziare la Professoressa Dettin per la sua grandissima disponibilità nell'accogliermi all'interno del suo laboratorio per effettuare un tirocinio e per avermi fatto sviluppare una tesi trattando un argomento che mi sta molto a cuore.

Ringrazio la Dottoressa Annj Zamuner per la semplicità con la quale è riuscita a guidarmi in questo percorso e ringrazio di cuore anche tutti i ragazzi del laboratorio: Barbara, Leo, Doina, Ilaria ed Elena; per l'infinita pazienza con la quale mi hanno insegnato tutto ciò che potevano trasmettermi sul come muoversi in un laboratorio.

Ringrazio tutti i ragazzi del collegio Casa del Fanciullo di Padova, con i quali per due anni ho condiviso esperienze e serate indimenticabili.

Voglio ringraziare i miei amici Bonnie, Cippo, Riz, Matteo, Alberto, Alessandro e Federico perché attraverso bevute, risate, memes, sessioni di D&D e nottate ai videogames, mi hanno aiutato a distrarmi durante i periodi più stressanti.

Ringrazio il Dottor Urbani, un grande uomo che ha reso possibile tutto questo.

Voglio ringraziare Maddalena, conosciuta durante una sfortunata sessione d'esami, perché mi ha permesso di fare cose che reputavo impossibili e perché, nonostante tutto, non smette mai di credere in me.

Ringrazio i miei cugini, Massimo e Luca, che nonostante il mio iniziale ribrezzo, mi hanno fatto piacere l'informatica.

Ringrazio mio zio Mauro per aver sempre avuto una risposta di una semplicità geniale a qualunque mia domanda, insegnandomi che semplificare un discorso non significa renderlo meno complesso.

Voglio ringraziare mia zia Sandra per aver fatto sbocciare la mia passione per il corpo umano.

Ringrazio di cuore Vincenzo per avermi guidato al mondo universitario, per avermi sempre aiutato durante il mio percorso di studi e per avermi dato un assaggio di quello che sarà il mio futuro.

Ringrazio mia nonna Pierina, una roccia che mi ha sempre sostenuto e dato consigli, e che tutte le volte mi insegna qualcosa in più sul come vivere la vita.

Voglio ringraziare mio papà ed i miei nonni, Mariano e Teresa, per avermi fatto capire che spesso le cose semplici riempiono più di qualunque ricchezza.

Desidero ringraziare Vanni per essermi sempre stato vicino insegnandomi, riprendendomi e facendomi maturare come fossi suo figlio.

Infine, desidero ringraziare mia mamma.

Potrei scrivere di tutti i momenti in cui eri lì ad asciugare le mie lacrime, di tutte le volte in cui mi sono dato per vinto e tu mi hai dato la forza di rialzarmi, di tutte le volte che hai avuto sempre il sorriso in faccia nonostante trattenessi le lacrime, di tutti i viaggi, le telefonate e l'aiuto che mi hai dato.

Potrei scrivere queste e molte altre cose, ma non mi basterebbe nemmeno un libro per elencare tutto ciò che hai fatto per me, ti voglio tanto bene.