

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIMICHE
DIPARTIMENTO DI FISICA E ASTRONOMIA

TESI DI LAUREA MAGISTRALE

IDROGELI SUPRAMOLECOLARI A BASE DI PEPTIDI AUTO-
ASSEMBLANTI, RICCHI IN TRIPTOFANO, COMPOSITI CON
NANOTUBI DI CARBONIO PER APPLICAZIONI BIOMEDICHE

RELATRICE: Miriam Mba Blázquez

CONTRORELATRICE: Alberta Ferrarini

LAUREANDA: Aurora Brusegan

ANNO ACCADEMICO 2021/2022

INDICE

▪ ABBREVIAZIONI	iii
▪ RIASSUNTO	v
▪ ABSTRACT	vii
▪ CAPITOLO 1 -Introduzione	1
1.1 Idrogel, idrogel supramolecolari e idrogel nanocompositi	1
1.2 Interazioni non covalenti	2
1.3 Peptidi: generalità	5
1.4 Peptidi corti auto-assemblanti	10
1.5 Fattori che definiscono il <i>self-assembly</i>	12
1.6 Nanotubi di carbonio	13
1.7 Obiettivi	15
▪ CAPITOLO 2 – Metodi	16
2.1 Sintesi peptidica in fase solida	16
2.1.1 Resine	17
2.1.2 Strategia dei gruppi protettori	18
2.1.3 Attivazione della funzione carbossilica	19
2.1.4 Loading test	21
2.1.5 Kaiser test	22
2.2 Analisi del dicroismo circolare	22
2.3 Reologia	24
▪ CAPITOLO 3 – Risultati e discussione	26
3.1 Studio delle catene peptidiche	26
3.2 Sintesi del peptide Ac-EFEFE-NH ₂	29
3.3 Sintesi del peptide H-WKWEW-OH	33
3.4 Sintesi del peptide Ac-IKVAVWKWEW-OH	39
3.5 Studi di gelazione dei peptidi	43
3.5.1 Gelazione del peptide Ac-EFEFE-NH ₂	43
3.5.2 Gelazione del peptide H-WKWEW-OH	48
3.6 Studi di gelazione in presenza dei nanotubi di carbonio	52
▪ CAPITOLO 4 – CONCLUSIONI	55
▪ CAPITOLO 5 – Parte sperimentale	57
4.1 Materiali, strumenti e metodi	57
4.1.1 Reagenti	57
4.1.2 Strumentazioni e metodi	58
4.2 Strategia di sintesi dei peptidi	61
4.2.1 Sintesi e caratterizzazione di Ac-EFEFE-NH ₂	63
4.2.2 Sintesi e caratterizzazione di H-WKWEW-OH	65
4.2.3 Sintesi e caratterizzazione di Ac-IKVAVWKWEW-OH	66
4.3 Formazione degli idrogeli	68
4.4 Dispersione dei nanotubi di carbonio	70
▪ BIBLIOGRAFIA	71
▪ APPENDICE	74

Abbreviazioni

2-CTC	2-clorotritil cloruro
Ac ₂ O	Anidride acetica
ACN	Acetonitrile
Ala	Alanina
Boc	Terz-butilossicarbonile
COSY	Spettroscopia di correlazione
DCM	Diclorometano
DIPEA	Diisopropiletilenammina
DMF	Dimetilformammide
DMSO-d ₆	Dimetilsolfossido deuterato
ESI	Ionizzazione elettrospray
Et ₂ O	Etere etilico
FIA	Analisi con iniezione di flusso
Fmoc	9-fluorenilmetilossicarbonile
FT-IR	Spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier
Glu	Acido glutammico
HBTU	(O-benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio esafluorofosfato
HCl	Acido cloridrico
HOBt	1-idrossibenzotriazolo
Ile	Isoleucina
Lys	Lisina
MBHA	Metilbenzidrilammina
MS	Spettrometria di massa
Nle	Norleucina
NMR	Risonanza magnetica nucleare
Phe	Fenilalanina
PBS	Buffer fosfato salino
R _f	Fattore di ritenzione
SPPS	Sintesi peptidica in fase solida
^t Bu	Terz-butile
TEM	Microscopia elettronica a scansione
TFA	Acido trifluoroacetico
THF	Tetraidrofurano
TIPS	Triisopropilsilano
Trp	Triptofano
UV	Ultravioletto
Val	Valina
Vis	Visibile

Riassunto

I peptidi corti auto-assemblanti sono dei candidati attraenti per la realizzazione di biomateriali a base di idrogel supramolecolari poiché biocompatibili, biodegradabili, facili da sintetizzare e capaci di svolgere funzioni biologiche. Si prestano ad essere, ad esempio, ottimi candidati per la creazione di *scaffolds* per l'ingegneria tissutale. Gli idrogel a base peptidica, tuttavia, non sono caratterizzati da proprietà meccaniche adatte al supporto cellulare in quanto sono solitamente troppo deboli e non riescono a sopportare lo sforzo meccanico. In questo senso, è possibile migliorare le loro proprietà meccaniche combinandoli con nanostrutture di carbonio. L'inclusione delle nanostrutture non solo migliora le prestazioni a livello meccanico ma conferisce anche nuove proprietà agli idrogel, come la conduttività elettrica o la capacità di *self-healing*, e ciò favorisce ad esempio la crescita di cellule cardiache e/o neuronali.

In questo progetto di tesi sono stati sintetizzati con successo tre differenti peptidi, due pentapeptidi : Ac-EFEFE-NH₂ (1) e WKWEW (2), ed un decapeptide: Ac-IKVAVWKWEW (3). I tre sistemi sono stati purificati, laddove necessario, al fine di renderli adatti al tipo di applicazione per cui sono stati progettati. Una volta eseguita la purificazione è stato possibile studiare i sistemi tramite analisi NMR, IR e dicromismo circolare. Lo step seguente è stato quello di testare la loro capacità di gelazione, verificando quale fosse la minima concentrazione necessaria ad ottenere un gel compatto e osservando in quali condizioni tali gel si costituissero (pH, temperatura e sali). Una volta ottenuti i gel si è passati allo studio della gelazione in presenza delle nanostrutture di carbonio: dopo la creazione di una dispersione omogenea di nanotubi sono stati realizzati gel compatti; infine, sono stati testati e confrontati i gel con e senza nanotubi tramite studi di reologia in modo da verificare se il rinforzo fosse efficace.

Abstract

Self-assembling short peptides are attractive candidates for biomaterials based on supramolecular hydrogels because they are biocompatible, biodegradable, easy to synthesize and capable of performing biological functions. They lend themselves to being, for example, excellent candidates for the creation of scaffolds for tissue engineering. Peptide-based hydrogels, however, do not have mechanical properties suitable for cellular support as they are usually too weak and cannot withstand mechanical stress. It is therefore possible to improve their mechanical properties by combining them with carbon nanostructures. The inclusion of the nanostructures not only improves the mechanical performance but also gives the hydrogels new properties, such as electrical conductivity or self-healing capacity, which favors for example the growth of cardiac and/or neuronal cells.

In this thesis project, three different peptides were successfully synthesized, two pentapeptides: Ac-EFEFE-NH₂ (1) and WKWEW (2), and one decapeptide: Ac-IKVAVWKWEW (3). The three systems were purified, where necessary, to make them suitable for the type of application for which they were designed. Once the purification had been carried out, it was possible to study the systems by NMR, IR and circular dichroism analysis. The next step was to test their gelation capacity, verifying the minimum concentration required to obtain a gel and observing the conditions under which the gels were formed (pH, temperature, and salts). Once the gels were obtained, we moved on to the study of gelation in the presence of carbon nanostructures: after the creation of a homogeneous dispersion of nanotubes, compact gels were made; finally, the two types of gels were tested and compared by means of rheology studies to verify whether the reinforcement was effective.

▪ CAPITOLO 1- INTRODUZIONE

1.1 IDROGEL, IDROGEL SUPRAMOLECOLARI E IDROGEL NANOCOMPOSITI

I gel sono materiali soffici (*soft materials*) composti da una fase solida che forma una struttura tridimensionale in grado di inglobare grandi quantità di solvente; essi presentano delle proprietà intermedie tra lo stato solido e lo stato liquido, dal punto di vista meccanico un materiale viene definito gel quando la componente elastica prevale sulla componente viscosa. Quando il solvente inglobato all'interno della struttura è l'acqua si parla di idrogeli^{1,2}. Il reticolo tridimensionale che si costituisce può formarsi sia grazie a interazioni covalenti che non-covalenti. Se il reticolo è costituito da legami di tipo covalente si parla di idrogel chimico; l'instaurazione di questa tipologia di legami fa sì che la struttura reticolata sia forte e permanente. Se il reticolo è costituito da interazioni non covalenti si parla di idrogel fisico; in questo caso dato che le interazioni sono deboli e reversibili, anche il materiale sarà caratterizzato da una natura reversibile e potrà essere formato o sciolto semplicemente cambiando le condizioni ambientali.

Tradizionalmente gli idrogel si ottengono a partire da polimeri sintetici (come il polietilenglicole) o naturali (come l'alginato o la cellulosa)³. Più recentemente sono stati studiati gli idrogel supramolecolari, questi sistemi sono composti da piccole molecole (gelante a basso peso molecolare o *low molecular weight gelator*, LMWG) che, in un processo di auto-assemblaggio, sono in grado di formare architetture supramolecolari ordinate e spesse, dando luogo a una rete tridimensionale fibrosa che intrappola il solvente strutturando il gel⁴⁻⁶. Le forze coinvolte nel processo di auto-assemblaggio e gelazione sono interazioni deboli non-covalenti, di conseguenza sia l'assemblaggio che il di-assemblaggio possono essere controllati volontariamente tramite il cambiamento dei fattori ambientali, come ad esempio il pH, la temperatura, la forza ionica, luce o ultrasuoni^{7,8}. Normalmente tutti i gel supramolecolari sono termoreversibili e la temperatura alla quale avviene la transizione gel-liquido si definisce come T_{gel} .

Esistono diverse tipologie di molecole in grado di formare gel supramolecolari⁶, tra queste, i peptidi a catena corta risultano essere particolarmente interessanti⁹⁻¹¹. Queste biomolecole e i loro derivati possono essere sintetizzate facilmente utilizzando tecniche ben conosciute allo stato dell'arte, possiedono una chimica supramolecolare ben nota, offrono una grande versatilità poiché esistono una gran varietà di amminoacidi naturali e sintetici disponibili in commercio e sono in principio biocompatibili. Il grande vantaggio dell'uso di queste molecole deriva dalla possibilità di modificare a piacimento le loro proprietà, il loro auto-assemblaggio e le loro funzioni tramite il design della sequenza amminoacidica.

Gli idrogel a base peptidica hanno diverse caratteristiche che li rendono adatti per applicazioni biomediche, in particolare la loro biocompatibilità, la biodegradazione, le proprietà meccaniche, la porosità e l'idrofilia. I gel nanocompositi permettono di modulare e migliorare queste caratteristiche, oltre ad essere in grado di conferirne nuove proprietà. Nanoparticelle di oro, nanoparticelle magnetiche, silica, ceramiche, polimeri o nanostrutture di carbonio sono stati utilizzati per creare nuovi idrogel ibridi¹². In questo contesto, il numero di pubblicazioni riguardanti gli idrogel nanocompositi contenenti nanotubi di carbonio (CNTs) è aumentato notevolmente negli ultimi anni, questo perché i CNTs hanno una alta superficie disponibile ed eccellenti proprietà meccaniche, termiche ed elettroniche. Gli idrogel nanocompositi di questa categoria presentano un miglioramento delle proprietà meccaniche e della conduttività elettrica, ampliando nettamente lo spettro di possibili applicazioni¹³.

1.2 INTERAZIONI NON COVALENTI

Le interazioni non covalenti hanno un grande impatto nella chimica e nella fisica e sono le principali responsabili di molte caratteristiche della materia, basti pensare alla formazione stessa della fase dell'acqua e di tutte le sue proprietà, ma in particolar modo i loro effetti sono predominanti nell'ambito delle biodiscipline. Tali interazioni sono responsabili della formazione delle principali biomacromolecole, come ad esempio il DNA, l'RNA e le proteine; ma queste interazioni giocano un ruolo fondamentale anche nei processi di riconoscimento molecolare, come l'auto-assemblaggio, in cui le forze in gioco guidano

l'associazione spontanea delle unità costitutive grazie al reciproco riconoscimento delle stesse. Mentre i legami covalenti nascono dalla condivisione delle *shell* elettroniche incomplete e si instaurano ad una distanza interatomica di circa 2 Å o meno, le interazioni non covalenti operano su distanze nettamente maggiori e nascono dalla presenza di una diversa fonte attrattiva¹⁴. Le interazioni non covalenti, se considerate individualmente, sono considerate interazioni deboli; infatti, hanno un range di energie inferiori a 10-20kJ/mol, ovvero un ordine di grandezza al di sotto rispetto le interazioni covalenti; tuttavia, il loro contributo collettivo influenza fortemente la macroscale poiché la cooperazione porta ad operare a energie maggiori, simili a quelle dei legami covalenti. È possibile classificare queste interazioni in diversi gruppi, di particolare interesse per questo lavoro sono: le interazioni elettrostatiche, le interazioni di Van der Waals, il legame idrogeno, l'effetto idrofobico e l'interazione π - π .

Interazioni elettrostatiche

Si tratta di interazioni che si instaurano fra ioni dotati di carica o in cui la carica viene indotta per effetto della polarizzazione molecolare; fra queste rientrano le interazioni fra ioni, fra ione e dipolo e fra dipoli indotti. L'interazione fra ioni risulta essere quella più forte, è isotropa ed opera a lungo, nasce dall'instaurarsi di un potenziale coulombiano fra due cariche e può essere sia di tipo attrattivo che repulsivo. Le interazioni ione-dipolo e dipolo-dipolo sono più deboli rispetto la precedente, anch'esse possono essere attrattive o repulsive ed hanno un raggio d'azione inferiore. L'interazione ione-dipolo si crea, per esempio, quando una molecola carica viene immersa in una soluzione polare; l'interazione fra dipoli si instaura fra molecole che possiedono un dipolo permanente, agisce sul corto raggio e tendenzialmente genera allineamento dei dipoli stessi.

Interazioni di Van der Waals

Sono interazioni deboli dovute alla presenza di dipoli transienti che si creano fra molecole non cariche, tali legami si instaurano fra le molecole, anche uguali fra loro, per effetto delle fluttuazioni statistiche della distribuzione di carica elettronica. Questo tipo forze sono ben rappresentate dal potenziale di Lennard-Jones in cui si considerano l'attrazione e la repulsione delle molecole in funzione della loro distanza, trattandosi di forze deboli esse si instaurano sul corto raggio: si avrà attrazione fino alla distanza di contatto,

successivamente, se la distanza si riduce ulteriormente, si osserva l'insorgere di una repulsione causata dalla sovrapposizione delle nuvole elettroniche. A questa categoria appartengono anche le forze di dispersione di London, queste nascono dalla polarizzazione istantanea delle molecole che a cascata genera una polarizzazione indotta con ciò che le circonda, si tratta dunque legami ione-dipolo indotto, dipolo-dipolo indotto oppure tra dipoli indotti.

Legame idrogeno

Il legame idrogeno può instaurarsi sia fra molecole cariche che fra molecole prive di carica, è un tipo di legame che funge da ponte fra due atomi in cui viene condiviso l'idrogeno: un atomo sarà covalentemente legato ad esso, tipicamente un atomo molto elettronegativo come azoto, ossigeno oppure zolfo, e prenderà il nome di donatore, mentre l'altro atomo, che interagirà con l'H è detto accettore. È un legame fortemente direzionale la cui forza dipende dall'elettronegatività stessa degli atomi, dall'angolo di legame e dalla distanza fra gli atomi che lo condividono: si tratta di un legame forte nel caso in cui entrambi gli atomi che lo condividono siano molto elettronegativi, mentre assumerà un carattere molto più debole qualora si formi in presenza di alogeni o con atomi che non hanno carattere di una base forte, ad esempio $C-H \cdots X$. Questo tipo di legame è alla base dei sistemi biologici; esso si instaura fra il gruppo carbonilico della catena principale e il gruppo amminico della catena principale delle strutture peptidiche portando alla formazione dei *network* 3D α -elica e β -foglietto.

Effetto idrofobico

Si tratta di un'interazione di origine entropica che si verifica quando delle molecole apolari vengono a trovarsi a contatto con delle molecole d'acqua o con un solvente polare, queste specie si aggregano all'interno della soluzione rompendo i legami idrogeno presenti in modo da escludere l'acqua al fine di avere con essa il minor contatto possibile. Queste forze giocano un ruolo fondamentale nei sistemi biologici, basti pensare alla costituzione della struttura del DNA oppure al ripiegamento delle proteine, e la loro forza è fortemente influenzata da tre fattori: temperatura; numero di atomi di carbonio nella specie idrofoba e forma della specie.^{15,16}

Interazione π - π

Si tratta di un'interazione di tipo elettrostatico appartenente alla classe dei legami non covalenti, essa si instaura fra anelli aromatici delle molecole in cui solitamente uno risulta essere elettrone-ricco e l'altro elettrone-povero, anche se è stato possibile osservare l'instaurarsi dell'interazione fra la stessa tipologia di anelli. La disposizione spaziale dei sistemi può essere varia, tuttavia le conformazioni spaziali tipiche che si raggiungono si possono categorizzare secondo tre modalità generali: interazione "faccia a faccia", interazione "a facce sfalsate" ed interazione a T (bordo-faccia)¹⁷. La differente disposizione che assumono i sistemi si deve al tentativo di massimizzare l'interazione minimizzando il costo energetico per distanziare densità elettroniche dello stesso segno. La disposizione "faccia a faccia" è osservabile quando uno degli anelli aromatici possiede sostituenti elettrone-attrattori in grado di invertire la polarità del momento quadrupolare dell'anello benzenico, altrimenti la disposizione tipica che si osserva è quella a facce sfalsate. La disposizione a T invece si instaura tra gli idrogeni di un anello aromatico e la densità elettronica centrale dell'anello aromatico, questo tipo di interazione rappresenta un caso particolare di interazione C-H... π ¹⁸.

1.3 PEPTIDI : GENERALITÀ

I peptidi sono molecole a basso peso molecolare, solitamente inferiore ai 5000 dalton, costituiti da una catena di α -amminoacidi uniti da legame peptidico, ovvero un legame chimico di tipo ammidico che si instaura fra il gruppo α -carbossilico di un amminoacido con il gruppo α -amminico del successivo (Figura 1).

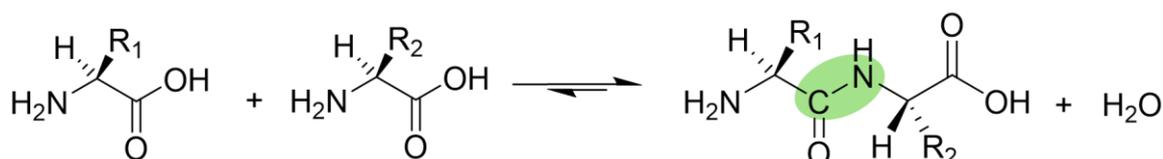


Figura 1 schema del legame peptidico

Esistono 20 amminoacidi naturali, oltre a quelli sintetici, con i quali è possibile costruire le catene peptidiche; la differenza tra questi due gruppi risiede principalmente nella stereochimica delle molecole poiché, ad eccezione della glicina, nelle strutture è presente un carbonio chirale, questo fa sì che possa esistere una coppia di enantiomeri per ogni

molecola: uno appartenente alla serie L e l'altro appartenente alla serie D. Tutti gli amminoacidi naturali sono L-amminoacidi (Figura 1.2).

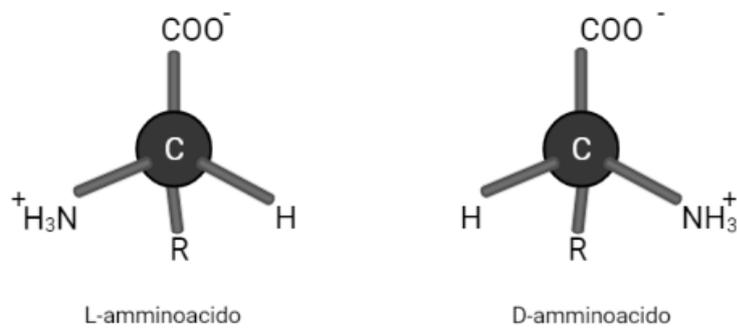
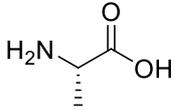
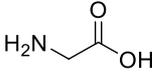
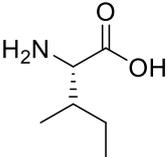
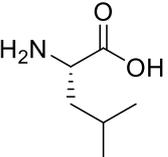
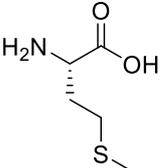
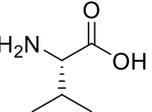
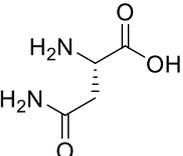
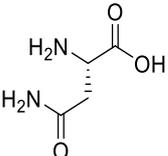
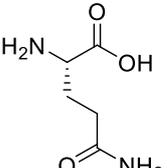
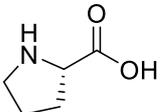
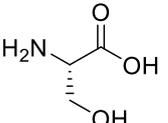
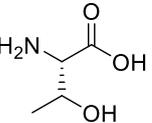
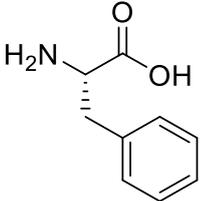
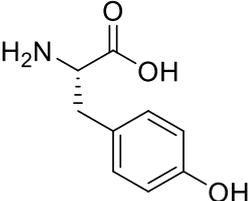
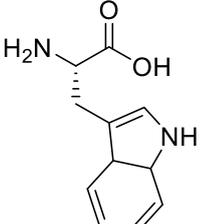
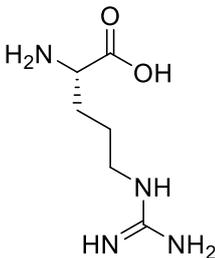
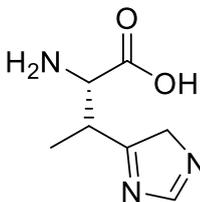
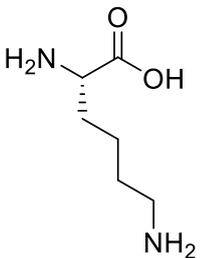
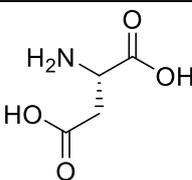
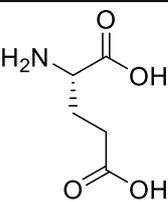


Figura 1.2 enantiomeri D/L degli amminoacidi.

È possibile suddividere questi ultimi in cinque macrocategorie: amminoacidi non polari, amminoacidi polari ma non carichi, amminoacidi aromatici, amminoacidi carichi positivamente e amminoacidi carichi negativamente.

Tabella 1. Elenco degli amminoacidi naturali suddivisi per macrocategorie.

AMMINOACIDI NON POLARI					
Alanina [Ala, A]	Glicina [Gly, G]	Isoleucina [Ile, I]	Leucina [Leu, L]	Metionina [Met, M]	Valina [Val, V]
					
AMMINOACIDI POLARI, NON CARICHI					
Asparagina [Asn, N]	Cisteina [Cys, C]	Glutamina [Gln, Q]	Prolina [Pro, P]	Serina [Ser, S]	Treonina [Thr, T]
					
AMMINOACIDI AROMATICI					
Fenilalanina [Phe, F]	Tirosina [Tyr, Y]	Triptofano [Trp, W]			
					
AMMINOACIDI CARICHI POSITIVAMENTE					
Arginina [Arg, R]	Istidina [His, H]	Lisina [Lys, L]			
					
AMMINOACIDI CARICHI NEGATIVAMENTE					
Acido aspartico [Asp, D]			Acido Glutammico [Glu, E]		
					

Una volta costituita la catena è possibile identificare diversi ordini di organizzazione strutturale (Figura 1.3), i quali portano alla formazione delle complesse architetture tridimensionali tipiche dei sistemi proteici:

- struttura primaria: si tratta della basilare sequenza amminoacidica che costituisce la catena
- struttura secondaria: si tratta della conformazione che le catene assumono nello spazio, le tipiche strutture osservabili sono α -elica e β -foglietto
- struttura terziaria: si tratta del ripiegamento che la catena assume nello spazio tridimensionale
- struttura quaternaria: si tratta dell'associazione delle varie catene tramite legami non covalenti nello spazio, essa porta alla costituzione dei network 3D.

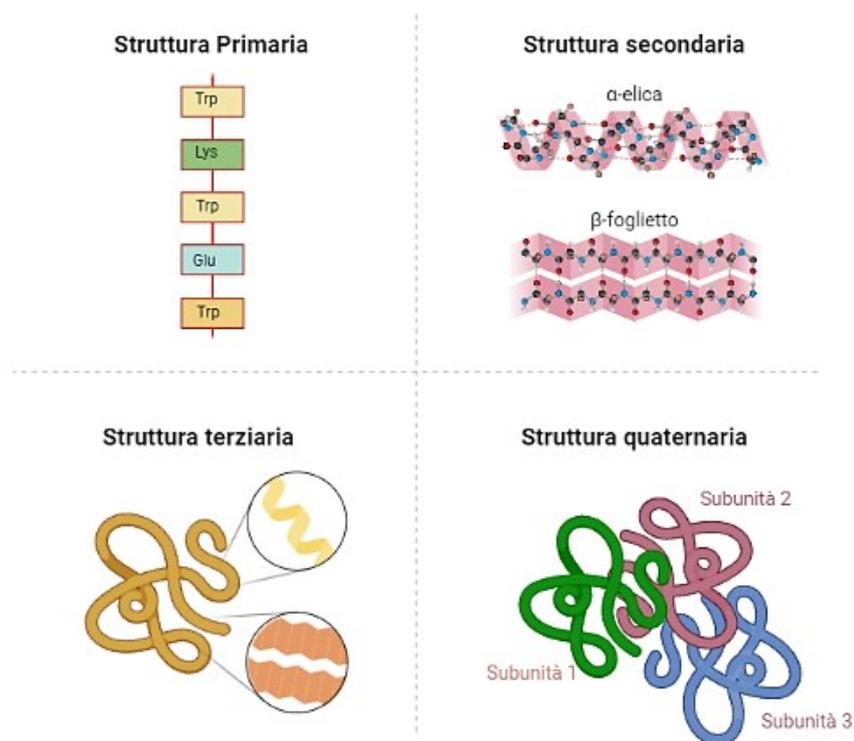


Figura 1.3 rappresentazione grafica delle varie strutture.

Le strutture secondarie si formano grazie ai legami idrogeno che si instaurano fra i gruppi C=O ed NH degli amminoacidi della stessa catena o di catene differenti, fungendo da ponti tra queste. La struttura α -elica è tipicamente costituita da 3.6 amminoacidi per giro, i legami a ponte d'idrogeno sono intramolecolari, unidirezionali e paralleli all'asse, e si

instaurano fra il gruppo carbonilico dell'amminoacido n e il gruppo amminico dell'amminoacido $n+4$, la conformazione assunta tipicamente è quella destrorsa ma in presenza di catene corte è possibile che assumano conformazione sinistrorsa (Figura 1.4 A); il β -foglietto è una struttura costituita da filamenti- β allineati l'uno vicino all'altro in modo tale che i legami a ponte d'idrogeno si instaurino fra i gruppi carbonilici e amminici di amminoacidi posti su catene adiacenti, i filamenti sono pieghettati e possono assumere conformazione parallela, antiparallela oppure mista e le catene laterali punteranno alternativamente al di sotto e al di sopra del piano (Figura 1.4 B).

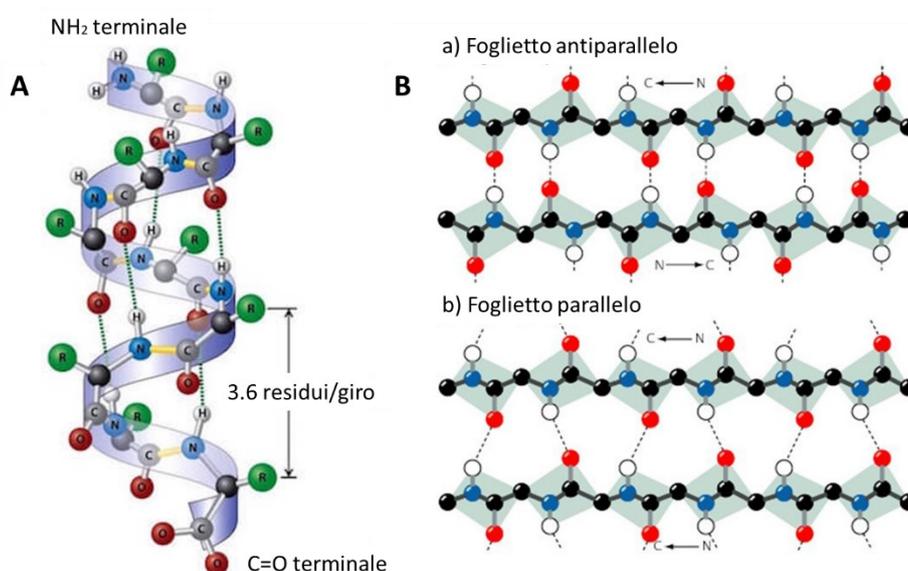


Figura 1.4 A) Rappresentazione grafica della struttura α -elica **B)** Rappresentazione grafica delle strutture β -foglietto antiparallele e parallele.

La particolare capacità di organizzarsi in maniera spontanea in strutture tridimensionali ordinate e stabili grazie alla formazione di legami non covalenti, in particolar modo di legami idrogeno e forze di Van der Waals, rende questi sistemi, noti come peptidi auto-assemblanti, interessanti per applicazioni nelle biodisipline. Grazie ad una serie di step gerarchici i peptidi auto-assemblanti sono in grado di strutturare una rete 3D capace di inglobare al suo interno grandi quantità di acqua. Queste impalcature che possono interfacciarsi agevolmente con i sistemi viventi poiché in grado di riprodurre bene la matrice extracellulare: i gel costituiti sono caratterizzati da un tessuto soffice; inoltre, sono biodegradabili e biocompatibili¹⁹. L'auto-assemblamento può avvenire in maniera

del tutto spontanea oppure può essere “forzato” dando un *input* al sistema, ad esempio variazione di temperatura, variazione di pH, ecc.

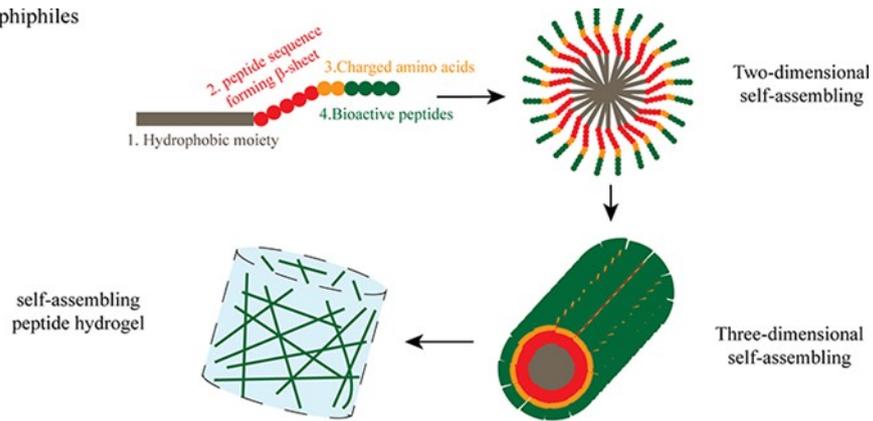
1.4 PEPTIDI CORTI AUTO-ASSEMBLANTI

In questo lavoro di Tesi interessano particolarmente i peptidi a catena corta; costituiti al massimo da 10 residui amminoacidici. Questi risultano più facili da progettare, sintetizzare e modificare rispetto agli omologi a catena più lunga.

Peptidi anfifilici e peptidi ionici complementari costituiscono le principali classi di sistemi auto-assemblanti. I peptidi anfifilici (Figura 1.5 A) sono caratterizzati da una struttura in cui si possono riconoscere quattro domini principali: il primo è il dominio idrofobico, il secondo è una sequenza amminoacidica che assembla per formare strutture secondarie tipo foglietto β , il terzo è il dominio carico in cui si inseriscono amminoacidi che possiedono una carica per aumentare la solubilità in acqua ed infine il dominio bioattivo²⁰. Questi peptidi formano fibre con cuore idrofobico e superficie esterna ricca di gruppi attivi generando un sistema stabile e allo stesso tempo funzionale. I peptidi ionici complementari (Figura 1.5 B) sono caratterizzati da un’alternanza di carica ionica secondo motivi regolari e un’alternanza di gruppi idrofili e idrofobi, in tal modo si favorisce la formazione di strutture di tipo β -foglietto che andranno a generare le fibre costituenti il gel²¹.

Peptide Amphiphiles

A



Self-complementary ionic peptide

B

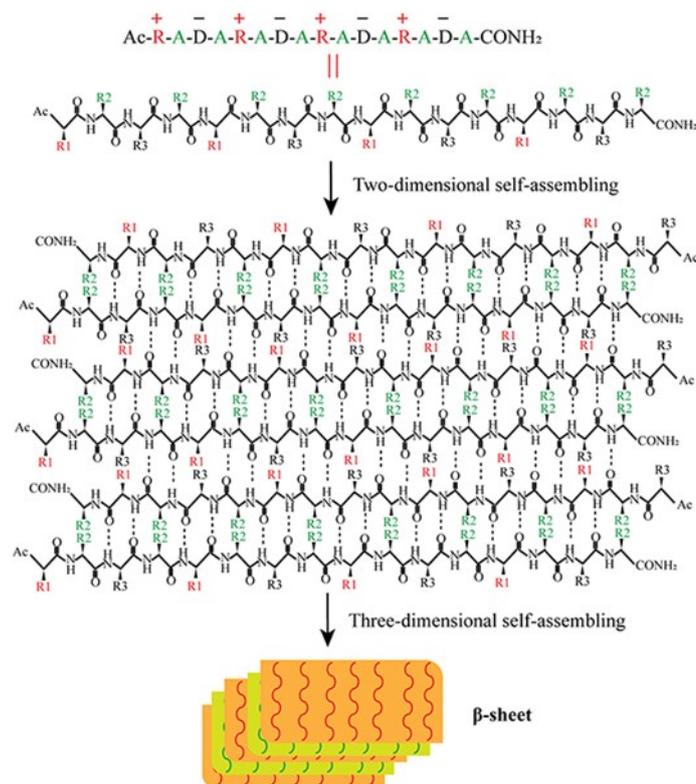


Figura 1.5 A) Rappresentazione grafica dei peptidi anfifilici **B)** Rappresentazione grafica dei peptidi ionici complementari [Riferimento bibliografico articolo²²].

Dalla prima generazione di peptidi auto-assemblanti ad oggi, per quanto concerne il campo delle applicazioni in medicina rigenerativa, sono state fatte una serie di innumerevoli funzionalizzazioni strutturali allo scopo di perfezionare la biomimesi di queste architetture sintetiche: esse sono in grado di riprodurre un microambiente favorevole all'adesione, alla migrazione e alla proliferazione delle cellule. Tuttavia, questi materiali presentano delle scarse proprietà meccaniche, solitamente non sono in grado di

tollerare sforzi elevati, basti pensare che il solo spostamento del sistema a volte è sufficiente a distruggere l'architettura. Per questo motivo si è pensato di utilizzare una serie di rinforzi che potessero migliorare le proprietà meccaniche dei materiali senza dare problemi di citotossicità: i candidati migliori, al momento, sono risultati essere i sistemi a base di carbonio, dunque nanotubi, grafene e nanorods^{23,24}.

1.5 FATTORI CHE DEFINISCONO IL SELF-ASSEMBLY

Esistono due principali categorie di fattori che influenzano la capacità di idrogelazione dei peptidi e sono fattori di tipo chimico e fattori di tipo ambientale. Di fondamentale importanza risulta essere il design stesso del peptide poiché questo andrà a caratterizzare le proprietà chimiche e meccaniche del materiale e le sue abilità di costituire idrogeli per mezzo del *self-assembly*. Le proprietà chimiche della struttura peptidica e la sua capacità di gelazione sono fortemente influenzate dalla struttura della catena stessa, variando in maniera considerevole quando si modifica la sequenza amminoacidica. L'arrangiamento degli amminoacidi nella catena influenza la solubilità del sistema: residui idrofobici ed idrofilici, eventuali alchilazioni all'N-terminale e amidazioni al C-terminale contribuiscono a migliorare il *self-assembly* del gel, mentre la lunghezza della catena provoca significativi cambiamenti sul numero di interazioni intermolecolari e *cross-link* fisici che si instaurano fra le catene nel sistema. La concentrazione del peptide rappresenta un fattore critico nella formazione dei gel: si parla di *minimum gelation concentration* (MGC) ed è la minima quantità di materiale da utilizzare necessaria a costituire idrogeli stabili, al di sotto di questo valore non si avrà formazione di gel^{22,25}.

I fattori di tipo ambientale possono essere visti come input che spingono il sistema alla gelazione e ve ne sono numerosi, i principali sono:

- Cambiamento del pH, grazie ad effetti di protonazione/deprotonazione sui gruppi acidi o basici delle catene laterali modificando il pH è possibile indurre la gelazione o la solubilizzazione.
- Modulazione della forza ionica, l'aggiunta di cationi o anioni, la loro concentrazione e valenza hanno effetti sul processo di gelazione. Questi ioni schermano le cariche presenti, ad esempio, nelle catene laterali e di conseguenza hanno un effetto sulle interazioni tra molecole di peptidi.

- Cambiamento della temperatura, alzando o abbassando la temperatura durante il processo di self-assembly si modifica la velocità di costituzione delle fibre favorendo la formazione di strutture ordinate.
- Sonicazione, durante il processo di self-assembly la sonicazione è un metodo agile che consente di rompere possibili legami intramolecolari locali favorendo così il riarrangiamento degli stessi a costituire fibre migliori
- Altri fattori, tra gli altri fattori che possono indurre il processo di gelazione ritroviamo l'irraggiamento luminoso, in cui un sistema dotato di gruppi fotoreattivi è in grado di formare gel stabili come risposta alla luce incidente; oppure, la presenza di enzimi.

1.6 NANOTUBI DI CARBONIO

I nanotubi di carbonio sono una forma allotropica sintetica del carbonio e sono stati osservati per la prima volta nel 1991 da Iijima²⁶; essi sono costituiti da un corpo cilindrico formato da carboni ibridizzati sp^2 arrangiati in strutture esagonali, l'architettura è dunque unidimensionale ed il diametro dei sistemi solitamente è compreso tra 0,8nm e 10nm, mentre la lunghezza è dell'ordine di qualche μm . Pensando ad un foglio di grafene, è possibile ottenere da esso un nanotubo se lo si avvolge su se stesso; per caratterizzare ogni nanotubo è necessario conoscere il vettore chirale $C_h = na_1 + ma_2$ e l'angolo di arrotolamento (θ) (Figura 1.6)., queste variabili definiscono la direzione di arrotolamento in rapporto all'asse del nanotubo e permettono di predire proprietà chimico-fisiche del sistema, come conducibilità elettrica e assorbimento della radiazione elettromagnetica.

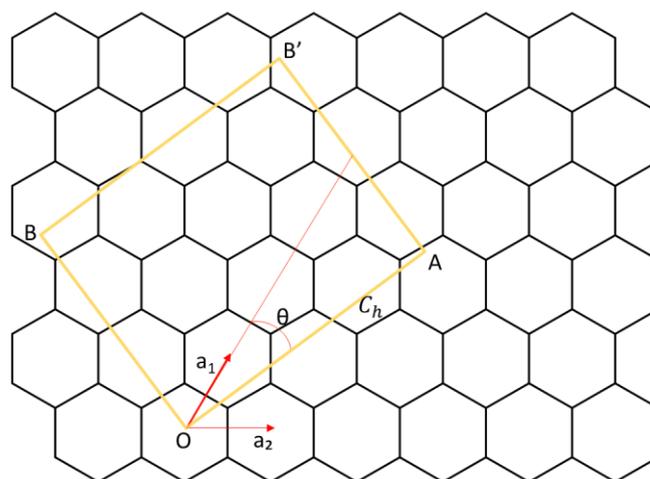


Figura 1.6 Rappresentazione grafica del vettore chirale e dell'angolo θ su un foglio di grafene.

Esistono due categorie principali di nanotubi di carbonio: i nanotubi a parete singola (*SWCNT, single wall-carbon nanotubes*) e i nanotubi a parete multipla (*MWCNT, multi wall-carbon nanotubes*) (Figura 1.7). I SWCNT sono cilindri singoli costituiti da un'unica parete superficiale, mentre i MWCNT sono cilindri concentrici coassiali in cui il diametro aumenta con l'aumentare degli strati.

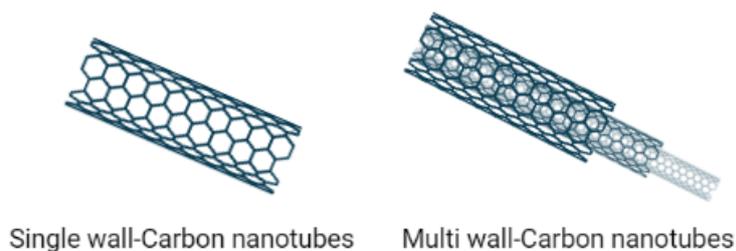


Figura 1.7 Rappresentazione delle differenti strutture dei nanotubi di carbonio.

Ciò che rende i nanotubi delle strutture molto interessanti per numerose applicazioni in ambiti molto diversi tra loro sono le peculiari proprietà che li caratterizzano: in termini di proprietà meccaniche essi si presentano eccezionalmente leggeri e altrettanto resistenti e flessibili, essi possiedono un modulo di Young nell'ordine dei TPa ed una resistenza alla trazione cento volte superiore all'acciaio; in termini di proprietà termiche essi sono caratterizzati da un'ottima conduzione lungo l'asse e un buon livello di isolamento alle pareti; infine, a seconda della loro struttura essi possono comportarsi, dal punto di vista elettrico, come conduttori metallici, con una conduttività lungo l'asse mille volte superiore rispetto il rame, oppure come materiali semiconduttori. È stato dimostrato che quando gli indici (n,m) del vettore chirale rispettano la regola $(n - m) = 3 * N$, con N numero naturale, allora il nanotubo avrà un comportamento di tipo metallico, in tutti gli altri casi sarà un semiconduttore. Molti lavori teorici e sperimentali si sono concentrati sulla ricerca della relazione che lega la struttura atomica a quella elettronica del nanotubo e alle proprietà di trasporto dello stesso²⁷.

Data la particolare combinazione di proprietà che caratterizza tali strutture negli ultimi decenni c'è stato un incremento della ricerca su questi materiali per applicazioni nella biomedicina, in particolare nei campi di bio-sensing, diagnostica e terapia. In parallelo alla ricerca è stata aperta una forte discussione sulla tossicità di questi sistemi, allo stato attuale si scontrano due correnti di pensiero: coloro che sostengono la neutralità dei

nanotubi per l'organismo e coloro che sostengono che sia dannosi sia per l'uomo che per l'ambiente. La tossicità dei nanotubi deriva essenzialmente da composizione, morfologia, concentrazione e interazione con l'organismo²⁸, ed è particolarmente evidente quando questi sono utilizzati come radicali liberi, per esempio per *drug delivery*. È stato osservato che la presenza di nanotubi nell'organismo umano provoca diversi tipi di risposta infiammatoria, ad esempio citotossicità, stress ossidativo cellulare oppure formazione di specie reattive dell'ossigeno²⁹. La strategia attuale per evitare l'incorrere di problemi di tossicità è quella di utilizzare i nanotubi come materiali compositi all'interno di una matrice biocompatibile. Molto studi sono stati aperti sull'immobilizzazione delle strutture a base di carbonio all'interno di un gel, favorendo interazioni non covalenti con i costituenti dello stesso, mantenendo bassa la concentrazione dei nanotubi all'interno della matrice gelatinosa è stato possibile creare materiali compositi funzionali sia per la crescita che per la differenziazione cellulare³⁰.

1.7 OBIETTIVI

In questo lavoro di tesi i nanotubi di carbonio sono stati scelti come rinforzo per gli idrogeli a base di peptidi, non solo per le eccellenti proprietà meccaniche ma anche per le interessanti proprietà elettriche; lo scopo era di strutturare un materiale composito che fosse un grado di replicare la naturale matrice extracellulare per costituire uno scaffold efficace per la crescita di neuriti, perciò il gel doveva presentare una certa resistenza e doveva possedere un mezzo per condurre gli impulsi elettrici in maniera unidirezionale.

▪ CAPITOLO 2- METODI

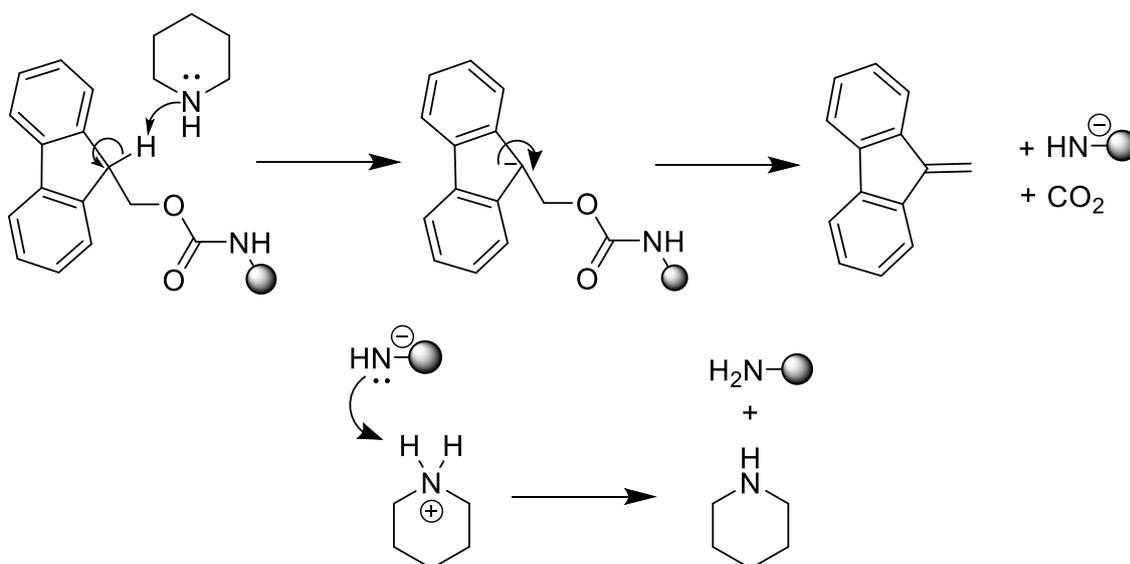
2.1 SINTESI PEPTIDICA IN FASE SOLIDA

La sintesi dei peptidi in fase solida (“Solid Phase Peptide Synthesis”, SPPS) è una strategia sintetica consolidata ed estremamente versatile, caratterizzata dal fatto che le molecole vengono temporaneamente legate ad un supporto solido insolubile nel processo di accrescimento della catena. Tale metodo di sintesi è stato sviluppato nel 1963 da Merrifield ³¹, e consente di ottenere, sfruttando una serie di passaggi fondamentali ripetuti ciclicamente, peptidi molto puri e con buone rese (attorno all’80-90%). Il supporto utilizzato è una resina polimerica funzionalizzata con un linker sulla quale viene fatta crescere la catena peptidica, in maniera sequenziale, dal C-terminale all’N-terminale. Si tratta di una tecnica vantaggiosa poiché è possibile lavorare con un eccesso di reagenti che consentono di portare a termine le reazioni, l’eccesso viene poi smaltito per semplice lavaggio con solventi organici; inoltre, le tempistiche di reazione sono basse e l’utilizzo di gruppi protettori ortogonali evita l’incorrere di reazioni parassite; invece, un limite importante della tecnica è la possibile formazione di sequenze incomplete (per mancanza di residui o troncate) difficilmente separabili dal prodotto d’interesse poiché simili ad esso. Gli step chiave per ottenere la sequenza peptidica sono:

- 1) aggancio del primo amminoacido, protetto all’N-terminale, al linker della resina
- 2) rimozione del gruppo protettore α -amminico dell’amminoacido legato
- 3) attivazione della funzione α -carbossilica dell’amminoacido successivo, anch’esso protetto
- 4) reazione di *coupling*
- 5) ripetizione ciclica dei passaggi da 2 a 4 fino a completamento della sequenza
- 6) distacco dal supporto

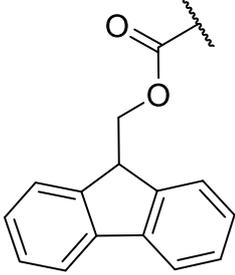
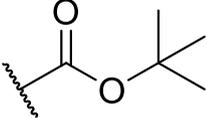
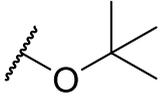
2.1.2 Strategia dei gruppi protettori

Per evitare l'incorrere di reazioni parassite dovute alla presenza di gruppi reattivi sulle catene laterali dell'amminoacido o l'eventuale racemizzazione dei prodotti si utilizzano dei gruppi protettori in modo tale da bloccare le funzioni che non devono reagire. Solitamente si usano carbammati per proteggere il gruppo amminico dell'amminoacido, nel nostro caso 9-fluorenilmetilossicarbonile (Fmoc), e Boc o ^tBu per proteggere funzioni rispettivamente amminiche o carbossiliche delle catene laterali. È importante che i gruppi protettori delle catene laterali risultino stabili nelle condizioni di deprotezione dell'ammina, passaggio necessario alla formazione del legame peptidico; perciò, vengono utilizzati gruppi con reattività ortogonale in modo tale che l'uno possa essere rimosso senza intaccare l'altro. Infatti, è possibile rimuovere lo Fmoc in condizioni basiche, tipicamente con piperidina al 20% (Schema 2.1), mentre Boc e ^tBu vengono rimossi in condizioni acide, solitamente per trattamento con TFA.



Schema 2.1 Meccanismo di deprotezione del gruppo Fmoc con piperidina.

Tabella 2 Struttura e caratteristiche principali dei gruppi protettori utilizzati nella Fmoc-SPPS .

Gruppo protettore	Utilizzo
	<p>Gruppo protettore Fmoc.</p> <p>Questo gruppo è utilizzato per proteggere le funzioni amminiche degli amminoacidi, la sua rimozione avviene in condizioni basiche e dunque non disturba il linker della resina, che invece è acido labile.</p>
	<p>Gruppo protettore Boc.</p> <p>Nel caso specifico è stato utilizzato per proteggere le ammine delle catene laterali degli amminoacidi in modo che non fossero coinvolte in reazioni parassite. Viene rimosso in condizioni acide.</p>
	<p>Gruppo protettore tBu</p> <p>Questo gruppo è stato utilizzato per proteggere i gruppi carbossilici delle catene laterali degli amminoacidi in modo che non fossero coinvolti in reazioni parassite; anche questo può essere rimosso in condizioni acide.</p>

2.1.3 Attivazione della funzione carbossilica

Per riuscire ad ottenere la formazione del legame peptidico nella reazione di *coupling* degli amminoacidi è necessario attivare la funzione carbossilica della molecola da accoppiare al sistema catena-resina, per farlo ci sono diversi metodi ma il più comune per la SPPS prevede l'attivazione in situ del gruppo funzionale. In questo lavoro di Tesi, per l'attivazione si è sfruttato 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio esafluorofosfato (HBTU) come agente attivante in presenza di N-idrossibenzotriazolo (HOBT) (Figura 2.2) e di una base costituita da un'ammina terziaria la N-N-diisopropiletilammina (DIPEA).

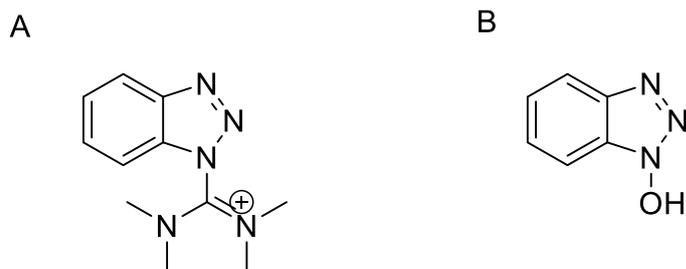
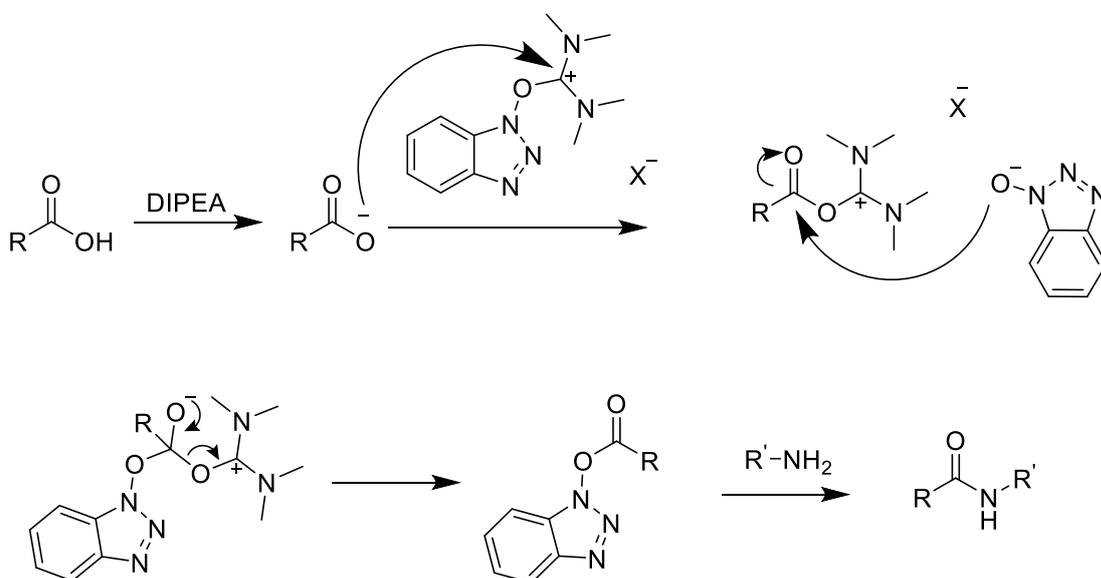


Figura 2.2 (A) struttura dell'HBTU (B) struttura dell'HOBT.

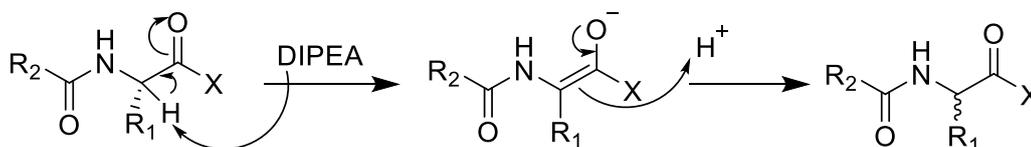
Il meccanismo di formazione del legame peptidico mediato da HBTU si mostra nello Schema 2.2. La base e l'HBTU sono necessari a far sì che la funzione carbossilica si attivi in modo che possa avvenire l'aggancio all'ammina libera della catena: la DIPEA strappa il protone dell'acido carbossilico, a questo punto lo ione carbossilato attaccherà l'HBTU generando un intermedio molto reattivo, l'aciluronio, il quale dopo aver formato l'estere attivo con ^-OBt , subirà un attacco nucleofilo da parte dal gruppo amminico della catena generando il legame peptidico.



Schema.2.2 Meccanismo di formazione del legame peptidico mediato da HBTU.

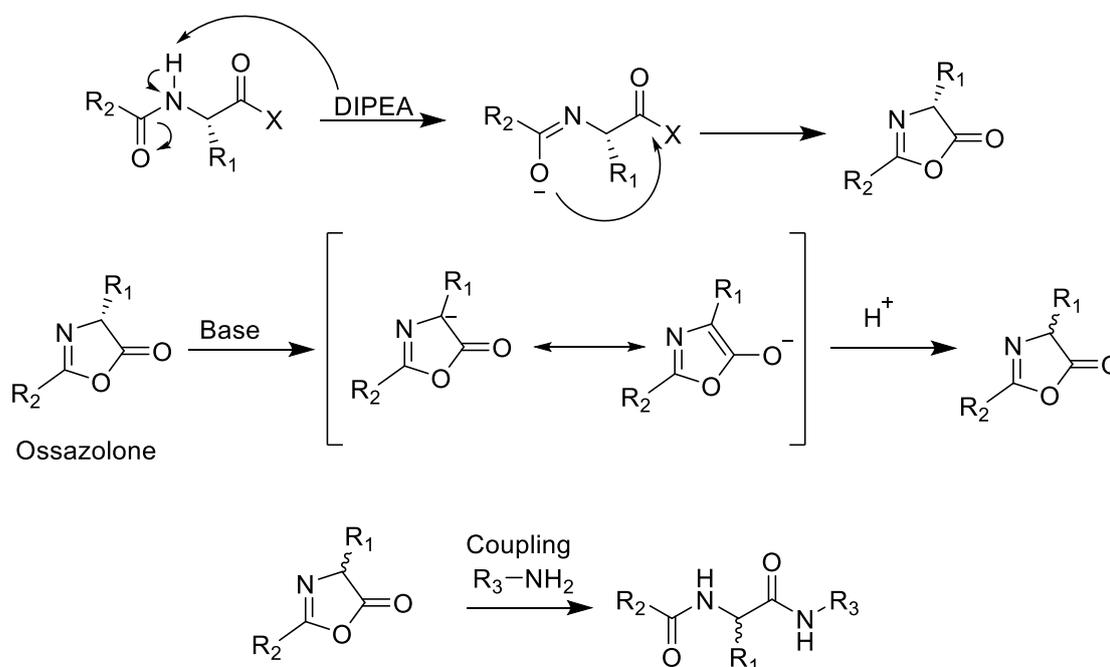
L'HOBT è necessario non solo a velocizzare la reazione di attivazione del gruppo, ma anche ad impedire la racemizzazione dell'amminoacido che può avvenire seguendo due strade: per enolizzazione diretta o per formazione di ossazolone. Entrambi sono meccanismi promossi da una base. L'enolizzazione diretta per tautomeria cheto-enolica (Schema 2.3)

è il meccanismo proposto nel caso di amminoacidi protetti col gruppo Fmoc. Solitamente si trascura questo processo poiché molto lento.



Schema 2.3 Meccanismo di racemizzazione per enolizzazione diretta.

La formazione dell'intermedio ciclico ossazolone incorre solitamente quando il carbossile viene attivato come cloruro di acile. Il processo è catalizzato dalla base e porta alla perdita dell'informazione stereochimica del centro chirale con conseguente formazione del prodotto racemo (Schema 2.4).



Schema 2.4 Meccanismo di racemizzazione tramite ossazolone.

2.1.4 Loading test

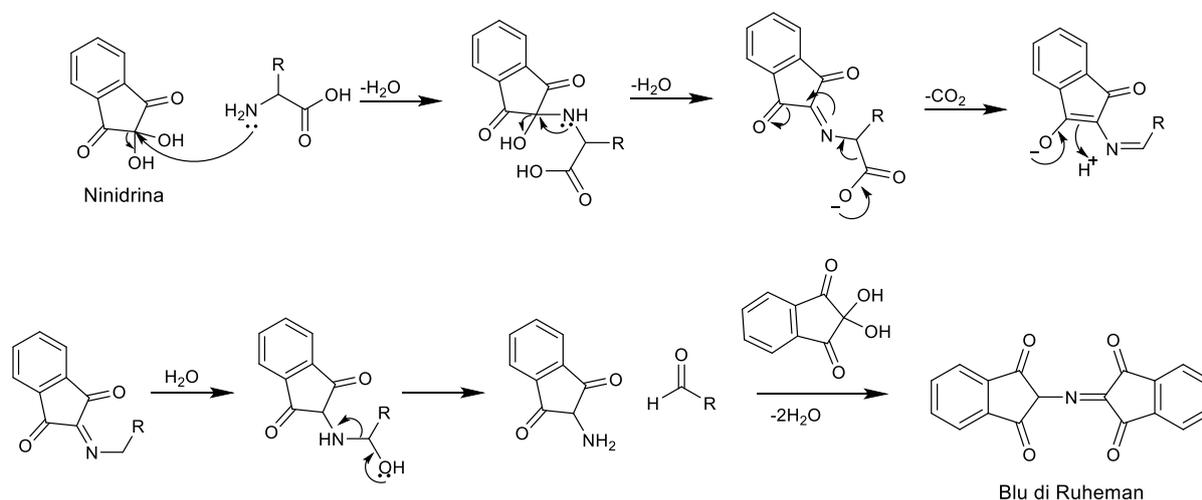
Questo particolare test è stato eseguito subito dopo l'attacco del primo amminoacido alla resina, lo scopo era riuscire a verificare quale fosse l'effettivo potenziale di caricamento rispetto quello dichiarato; il caricamento di una resina si misura in mmol/g di resina e ci fornisce la stima della quantità di prodotto che si può potenzialmente ottenere dalla reazione. Per eseguire il test è sufficiente rimuovere il gruppo protettore Fmoc da una quantità nota di resina, gli addotti che si creano risultano essere fluorescenti, perciò è

sufficiente eseguire un'analisi UV-Vis per stimarne la concentrazione e ricavare il valore di *loading* sfruttando la legge di Lambert-Beer.

$$A = \varepsilon_{\lambda} b C$$

2.1.5 Kaiser test

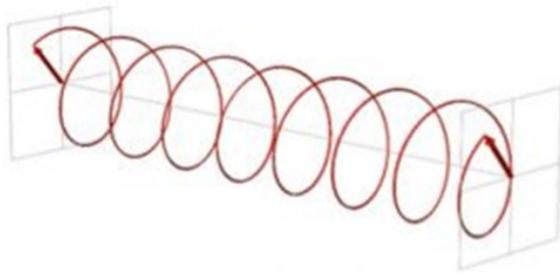
Alla fine di ogni *coupling* è stato effettuato un kaiser test, ovvero un test colorimetrico che ci consente, in maniera empirica, di stabilire se i siti di reazione hanno reagito in maniera efficace, questo perché il sistema assume una colorazione nel caso in cui fossero presenti ammine primarie libere; nel caso in cui il sistema avesse contenuto siti liberi esso si sarebbe colorato di blu/violetto, in caso contrario non si sarebbero osservati cambiamenti (Schema 2.5).



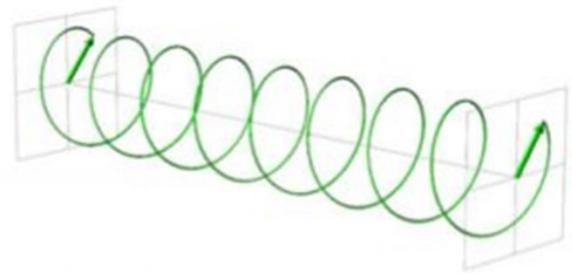
Schema 2.5 Meccanismo di reazione della ninidrina con il gruppo amminico primario di un amminoacido.

2.2 ANALISI DEL DICROISMO CIRCOLARE

La luce piano-polarizzata può essere descritta come il prodotto di due componenti circolarmente polarizzate, di eguale magnitudine, ma con diversa rotazione: destrorsa (R) oppure sinistrorsa (L). Il dicroismo circolare è un fenomeno di assorbimento in cui una molecola chirale risponde in maniera differente alle due componenti circolarmente polarizzate della luce, con questo termine ci si riferisce altresì alla tecnica spettroscopica che si basa su questo principio. Alle due componenti luminose è associato un vettore campo elettrico che descrive, in ambedue i casi, un percorso elicoidale (Figura 2.3).



Luce circolarmente polarizzata destra (R)



Luce circolarmente polarizzata sinistra (L)

Figura 2.3 Rappresentazioni del percorso elicoidale destrorso (R) e sinistrorso (L).

Tramite lo strumento si fanno passare le differenti radiazioni attraverso il campione, in tal modo sarà possibile osservare una differenza di propagazione delle onde all'interno del mezzo materiale; la risposta ottica prodotta consentirà la determinazione delle caratteristiche strutturali del composto in esame. Ciò che lo strumento misura concretamente è la differenza di assorbimento $\Delta A = A_L - A_R$ tra le componenti L ed R, la quale viene riportata solitamente in termini di ellitticità (θ) in gradi³²; è possibile ottenere uno spettro completo misurando in dicroismo in funzione della lunghezza d'onda (λ).

I peptidi e le proteine sono macromolecole otticamente attive, i cromofori di interesse che solitamente restituiscono una risposta ottica sono il legame peptidico, amminoacidi con catene laterali contenenti gruppi aromatici oppure legame disolfuro, motivo per cui il range delle lunghezze d'onda del lontano UV (180nm-250nm) è quello che tipicamente viene studiato; infatti, il segnale che viene registrato avrà una corrispondenza caratteristica con la struttura secondaria che i sistemi assumono³³. Nella Figura 2.4 si riportano i tipici segnali dicroici che vengono registrati per le strutture α -elica, β -foglietto e *random coil*.

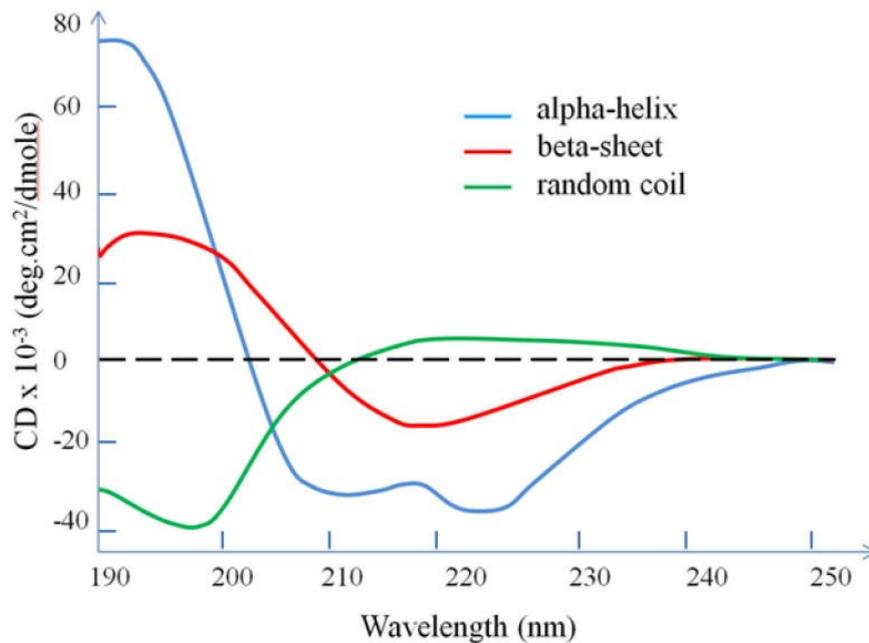


Figura 2.4 Segnali tipici delle strutture α -elica, β -foglietto e *random coil* in uno spettro di dicroismo circolare.

2.3 REOLOGIA

La reologia (dal greco reo, "scorrere" e logia, "teoria") è una branca della scienza che si occupa di studiare le deformazioni della materia (solida e fluida) quando questa, per effetto dell'azione di forze esterne, è sottoposta a sforzi. La reometria è la branca di tale materia di studi che si riferisce alle tecniche messe in atto per misurare le proprietà reologiche di un materiale. In questo lavoro di Tesi è stato impiegato un reometro (Figura 2.5) in regime oscillatorio in quanto questo tipo di analisi consente di misurare la deformabilità di un materiale.

I solidi sono materiali elastici che subiscono una deformazione (*strain*) istantanea in risposta ad uno sforzo (*stress*) applicato; i liquidi sono materiali viscosi in cui si osserva scorrimento per effetto dell'applicazione di uno sforzo di taglio. I materiali viscoelastici, come gli idrogeli, sono materiali complessi che possono esibire sia le caratteristiche tipiche dei solidi sia quelle dei fluidi; la deformazione che li caratterizza è dovuta alla somma della componente elastica e della componente viscosa del materiale. Per caratterizzare il comportamento viscoelastico degli idrogeli vengono condotti test in oscillazione basati sull'applicazione di sollecitazioni la cui intensità varia sinusoidalmente nel tempo.

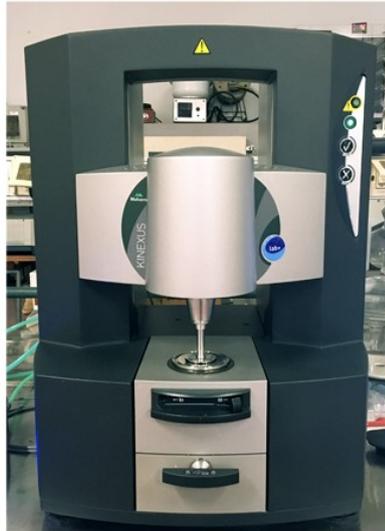


Figura 2.5 Reometro Kinexus Lab+ utilizzato in questo lavoro di tesi per condurre i test.

In questo caso il materiale viene disposto tra due geometrie o piatti. Il piatto inferiore è fisso, mentre quello superiore è mobile e può ruotare in entrambe direzioni; il movimento oscillatorio del piatto superiore imprime una deformazione sinusoidale sul campione, il quale viene monitorato misurando l'intensità della risposta ed il suo sfasamento (δ) rispetto allo stimolo applicato. Dallo studio dei campioni si ricavano i valori di G' e G'' che rappresentano rispettivamente lo *storage modulus* e il *loss modulus* del materiale; G' è la componente in fase che indica l'energia immagazzinata dal sistema e poi restituita; invece, G'' è la componente fuori fase relazionata all'energia dissipata durante lo scorrimento viscoso. È possibile condurre diversi test sui campioni in modo da valutare le differenti caratteristiche del sistema, in questo lavoro sono stati condotti test di *amplitude sweep* e *frequency sweep*. L'*amplitude sweep* è un test reometrico in cui si applica uno stimolo la cui intensità massima varia costantemente ad ogni ciclo, esso serve a determinare il regime viscoelastico lineare (LVR) all'interno del quale vanno eseguiti poi gli altri test. La regione viscoelastica lineare rappresenta il range di stress o deformazione all'interno della quale tutti i parametri reologici misurati sono caratteristici del sistema indipendentemente dalle condizioni di analisi. Il *frequency sweep* è un test in cui si applica uno stimolo la cui frequenza varia con il tempo. Tutti gli altri parametri, intensità massima dello stimolo e temperatura di analisi, rimangono costanti. Il test si esegue all'interno della regione lineare registrando così lo spettro viscoelastico del materiale dal quale sarà possibile determinare il comportamento del materiale.

■ CAPITOLO 3- RISULTATI E DISCUSSIONE

3.1 STUDIO DELLE CATENE PEPTIDICHE

L'obiettivo di questo lavoro di tesi è generare idrogel supramolecolari a base peptidica con potenziali applicazioni come *scaffolds* per l'ingegneria tissutale e studiare l'effetto che ha l'incorporazione dei nanotubi di carbonio nei sistemi sulla morfologia e sulle proprietà meccaniche. Sono stati sintetizzati tre peptidi rappresentati nella Figura 3.1 considerando i seguenti requisiti fondamentali:

1. Peptidi a catena corta, per facilitare e velocizzare la sintesi.
2. Peptidi auto-assemblanti, con tendenza a formare strutture 1D tramite β -sheet
3. Processo di autoassemblaggio in acqua, se possibile a pH fisiologico
4. Peptidi con residui aromatici in grado di interagire con i nanotubi di carbonio
5. Introduzione di segnali che favoriscano la funzione biologica

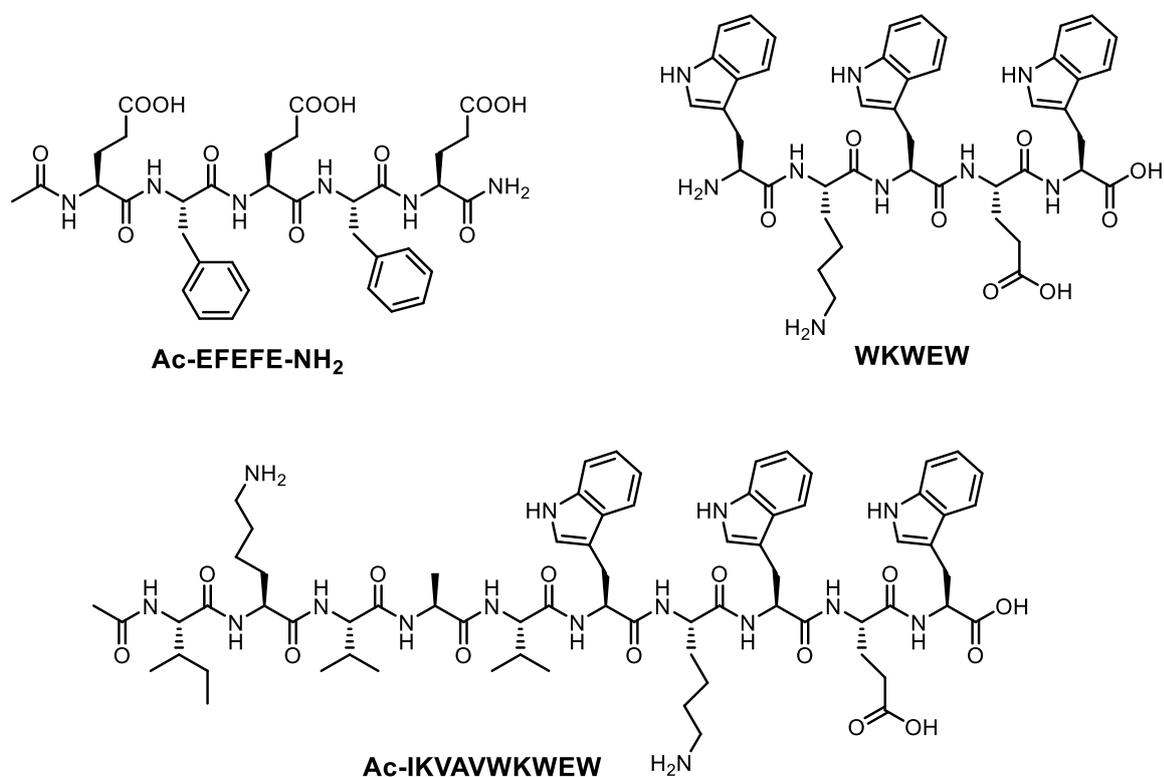


Figura 3.1 Struttura dei peptidi sintetizzati in questo lavoro di Tesi.

Ac-EFEFE-NH₂. Questo peptide è stato sintetizzato poiché sequenze contenenti il motivo centrale (Glu-Phe)_n funzionalizzate con cromofori al N-terminale erano già note nel laboratorio di ricerca per la loro capacità di formare idrogeli e disperdere in acqua CNTs (Anna Fortunato, Gels 2021)³⁴⁻³⁷. In questo caso si è deciso di sintetizzare il pentapeptide Ac-EFEFE-NH₂. Gli stremi N- e C-terminali sono stati bloccati rispettivamente per acetilazione e amidazione. Il peptide è solubile a pH basico, dove si ha una carica netta negativa dovuta alla deprotonazione degli acidi carbossilici presenti nelle catene laterali degli acidi glutammici (Figura 3.2). Il peptide alterna nella sua sequenza amminoacidi polari (Glu) e apolari (Phe), ciò dovrebbe favorire la formazione di strutture supramolecolari di tipo β -sheet a pH acido, ovvero quando il peptide ha una carica netta uguale a zero.

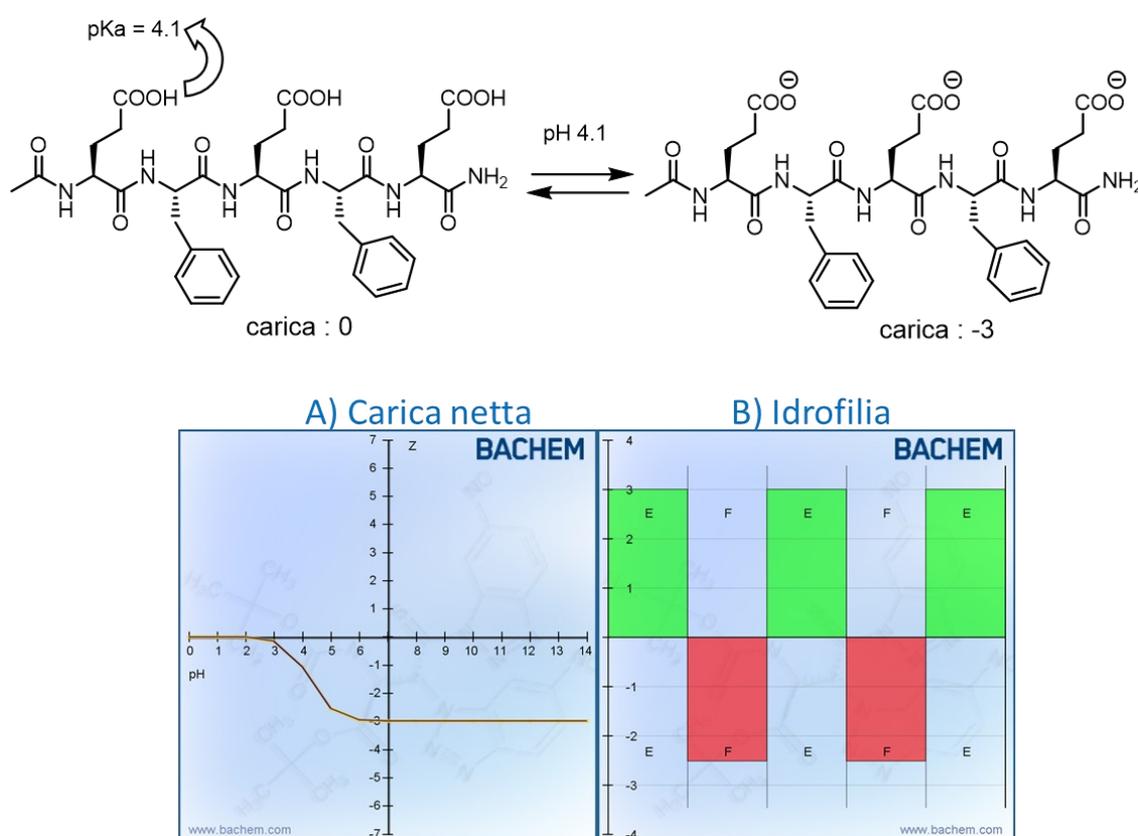


Figura 3.2 A) Carica netta di AcEFEFE-NH₂ in funzione del pH. B) Idrofilia: in su residui idrofilici, in giù residui idrofobici, verde residuo acido, rosso residuo aromatico (sito web: <https://www.bachem.com/knowledge-center/peptide-calculator/>).

WKWEW. In questo caso si mantiene l'alternanza di amminoacidi polari / apolari, ma uno degli amminoacidi polari è una lisina, mentre l'altro è un acido glutammico. In questo modo il peptide dovrebbe avere una carica netta uguale a zero a pH fisiologico (Figura 3.3) e l'auto-assemblaggio dovrebbe essere favorito dalle interazioni ioniche tramite la formazione di strutture β -sheet antiparallele. Si tratta quindi di un peptide ionico auto-assemblante. Come amminoacido aromatico è stato scelto il triptofano che, secondo la letteratura, è l'amminoacido aromatico con cui si instaurano le interazioni più forti con nanotubi di carbonio³⁸.

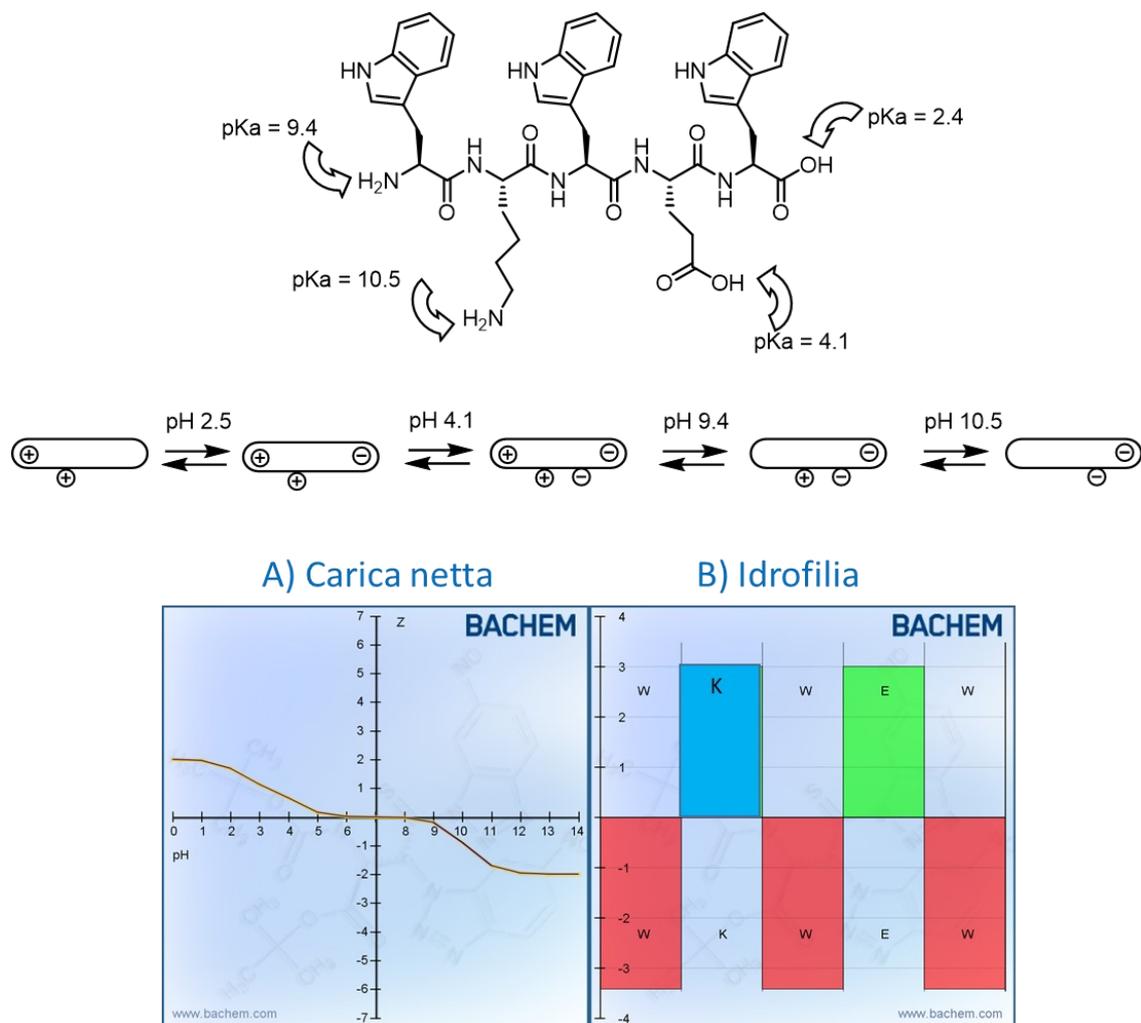
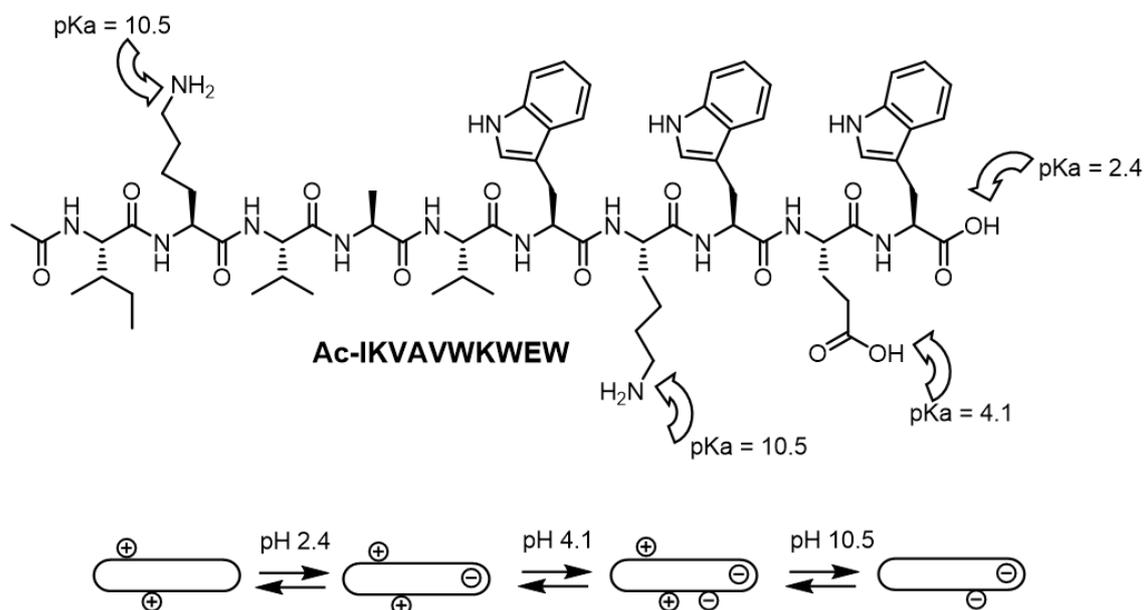


Figura 3.3 A) Carica netta di WKWEW in funzione del pH. B) Idrofilia: in su residui idrofili, in giù i-residui drofobi, verde residuo acido, rosso residuo aromatico, blue residuo basico (sito web: <https://www.bachem.com/knowledge-center/peptide-calculator/>).

Ac-IKVAVWKWEW-OH. La sequenza IKVAV, nota per essere in grado di promuovere e dirigere la crescita di neuriti³⁹ è stata aggiunta al N-terminale del peptide WKWEW;

inoltre, il peptide è stato acetilato al N-terminale per mantenere una carica netta zero a pH fisiologico (Figura 3.4). Esso è stato preparato per dare co-assemblaggio con la sequenza WKWEW.



A) Carica netta

B) Idrofilia

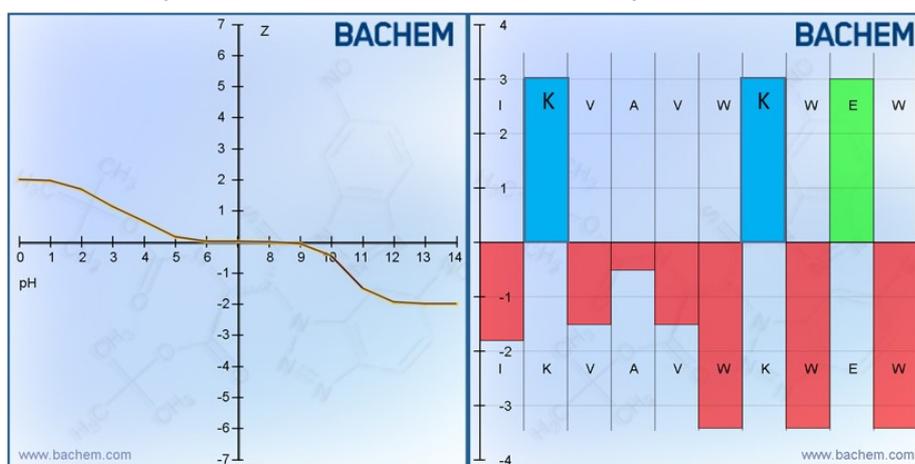


Figura 3.4 A) Carica netta del peptide AcIKVAVWKWEW in funzione del pH. B) Idrofilia: in su residui idrofili, in giù residui idrofobi, verde residuo acido, rosso residuo aromatico, blue residuo basico (**sito web:** <https://www.bachem.com/knowledge-center/peptide-calculator/>).

3.2 SINTESI DEL PEPTIDE AC-EFEFE-NH₂

Il primo composto ad essere stato sintetizzato è stato il pentapeptide costituito da acido glutammico e fenilalanina Ac-EFEFE-NH₂. Tale peptide è stato preparato utilizzando come resina la Rink-ammide MBHA secondo il processo della SPPS descritto nel dettaglio nella

parte sperimentale. Partendo da 2g di resina sono stati attaccati i cinque amminoacidi in successione attraverso l'uso di una miscela attivante contenente HBTU/HOBt/DIPEA, mentre l'N terminale della catena è stato acetilato per trattamento con una miscela Ac₂O/DIPEA/DMF. Il distacco è avvenuto utilizzando una miscela di TFA/TIPS/H₂O in rapporto 95/2.5/2.5. Il profilo HPLC ottenuto per il peptide mostra la presenza d'impurezze molto idrofobe che danno picchi dopo i 13 minuti (Figura 3.5 A). Allo scopo di eliminare queste impurezze il peptide è stato lavato con THF e poi riprecipitato in etere etilico. Il nuovo profilo HPLC mostra che il peptide così trattato è più pulito (Figura 3.5 B). Lo spettro ESI-MS del composto ottenuto mostra un picco a m/z 763.2 corrispondente all'ione [M+Na]⁺ tuttavia è possibile osservare la presenza di altri picchi a m/z 304.3, 353.2 e 862.3 non identificabili (Figura 3.6).

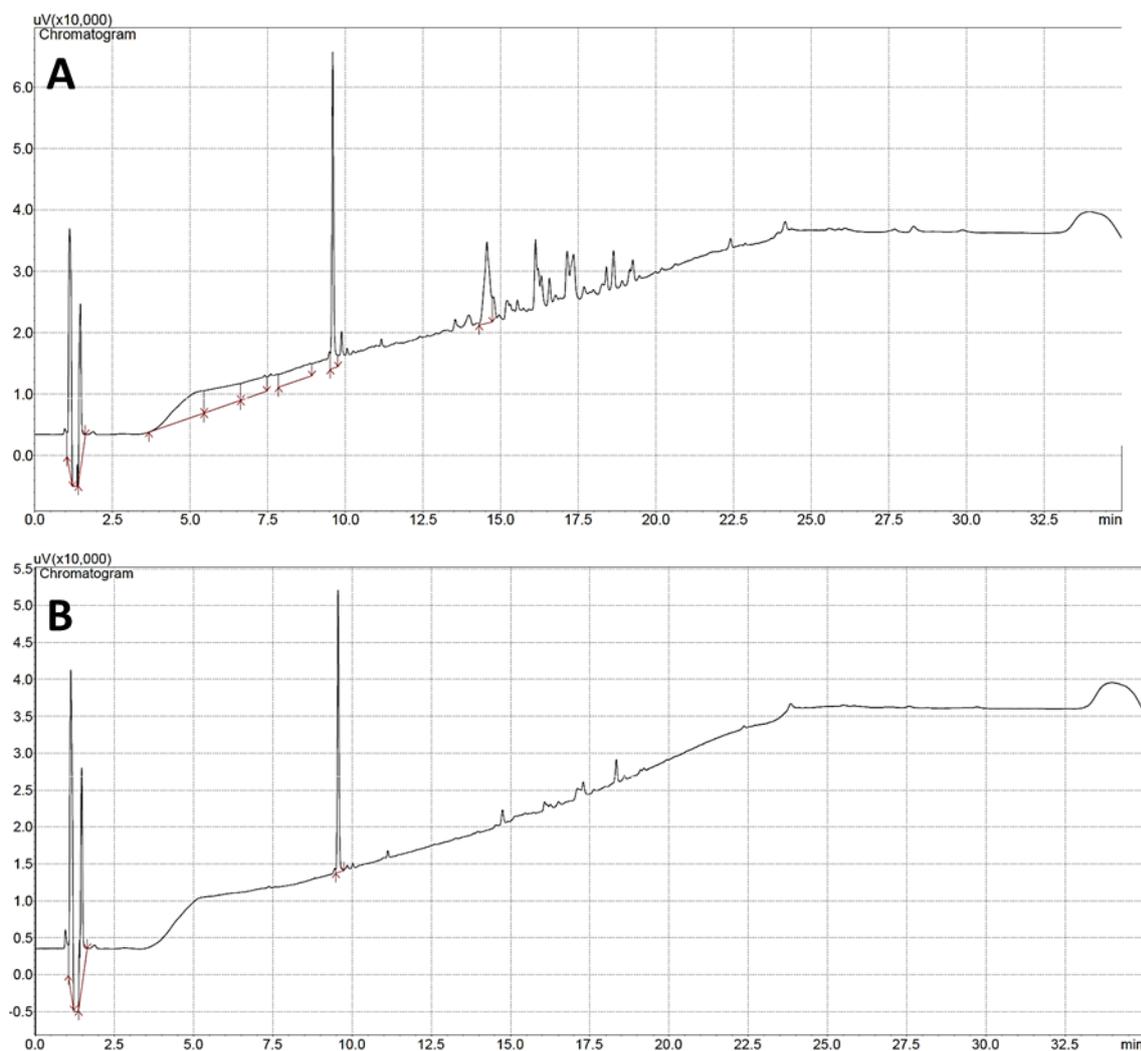


Figura 3.5 HPLC del peptide Ac-EFEFE-NH₂ prima (A) e dopo (B) lavaggio con THF

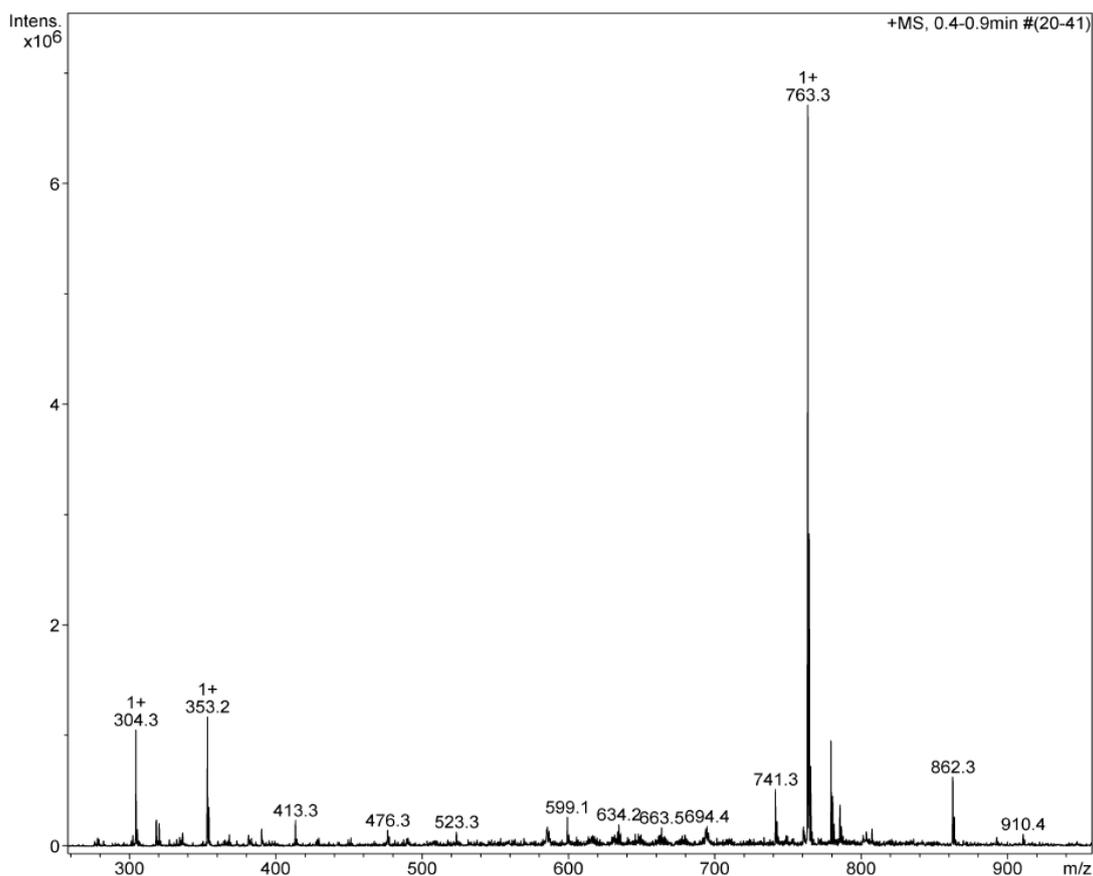


Figura 3.6 ESI-MS del peptide Ac-EFEFE-NH₂.

Ulteriori caratterizzazioni sono state fatte attraverso FT-IR e NMR mono e bidimensionale. Osservando lo spettro ¹H-NMR (Figura 3.7) possiamo vedere a 12.04 ppm il segnale relativo ai tre protoni degli acidi carbossilici appartenenti all'acido glutammico; nella zona a 8 ppm abbiamo invece i 5 protoni ammidici della catena, mentre subito dopo tra 7.40 e 7.00 ppm abbiamo i segnali caratteristici dei gruppi aromatici e dell'ammide al C-terminale. Tra 4.75 e 4.00 ppm troviamo i segnali dei protoni in α, mentre i segnali al di sotto di 4.00 ppm sono associabili ai protoni delle catene laterali. Il singoletto a 1.80 ppm corrisponde al CH₃ del gruppo acetile al N-terminale. Infine, è possibile distinguere i protoni in posizione β dei due diversi amminoacidi poiché quelli dell'acido glutammico non sono vicini a gruppi funzionali, dunque non sono deschermati e appaiono nella zona vicino a 1.5 ppm, mentre quelli della fenilalanina sono deschermati dall'anello aromatico, sono quelli nella zona tra 3 e 2.5ppm. I protoni in γ dell'acido glutammico, data la loro

posizione accanto al gruppo funzionale C=O saranno leggermente deschermati, perciò si trovano nella zona a 2ppm.

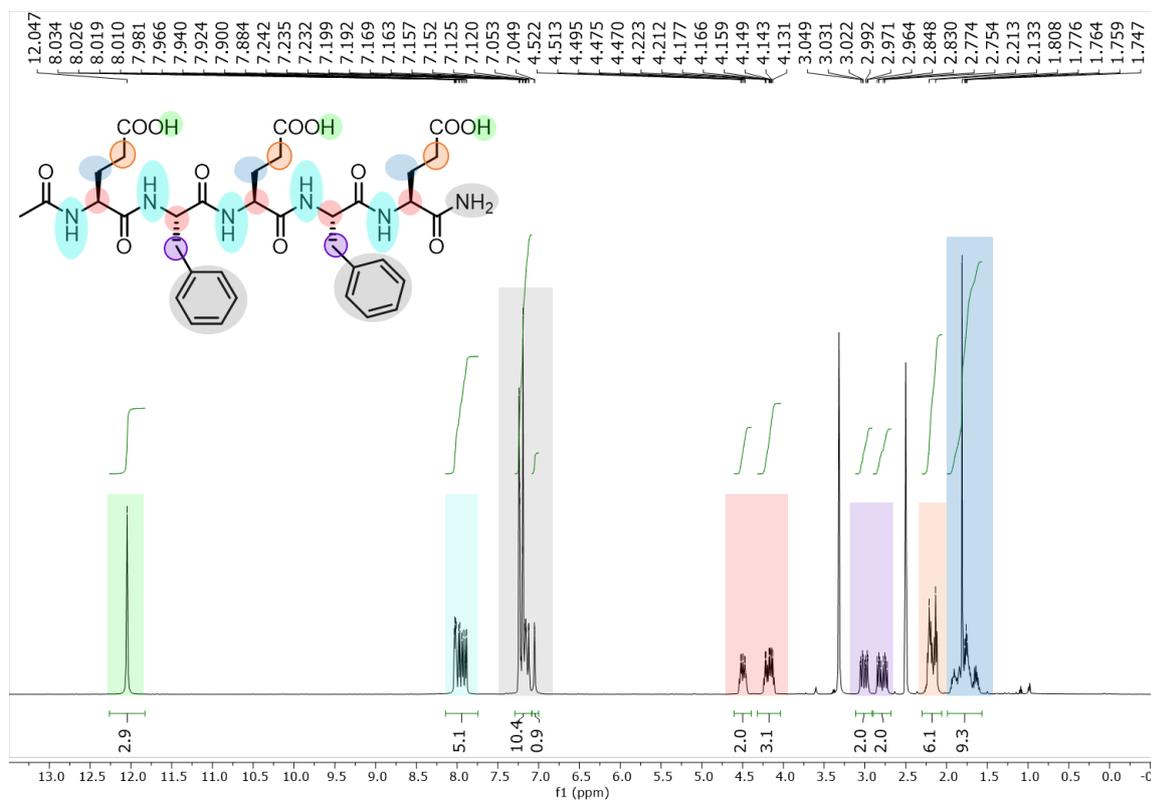


Figura 3.7 ^1H NMR (500 MHz, DMSO-d_6) di **Ac-FEFEF-NH₂**.

È stata condotta un'analisi termogravimetrica (Figura 3.8), sottoponendo il peptide ad una rampa di temperature, da temperatura ambiente fino a 1000°C con un aumento lineare nel tempo, è stato possibile osservare che il composto risulta essere stabile fino alla temperatura di circa 200°C, osservando però una lieve degradazione riscontrabile più chiaramente dalla derivata della curva (in rosso), successivamente una volta oltrepassati i 200°C il materiale decompone velocemente fino a 400°C, a questo punto la degradazione rallenta, al raggiungimento dei 1000°C la curva non giunge a zero, questo indica che non tutto il composto è vaporizzato nel processo.

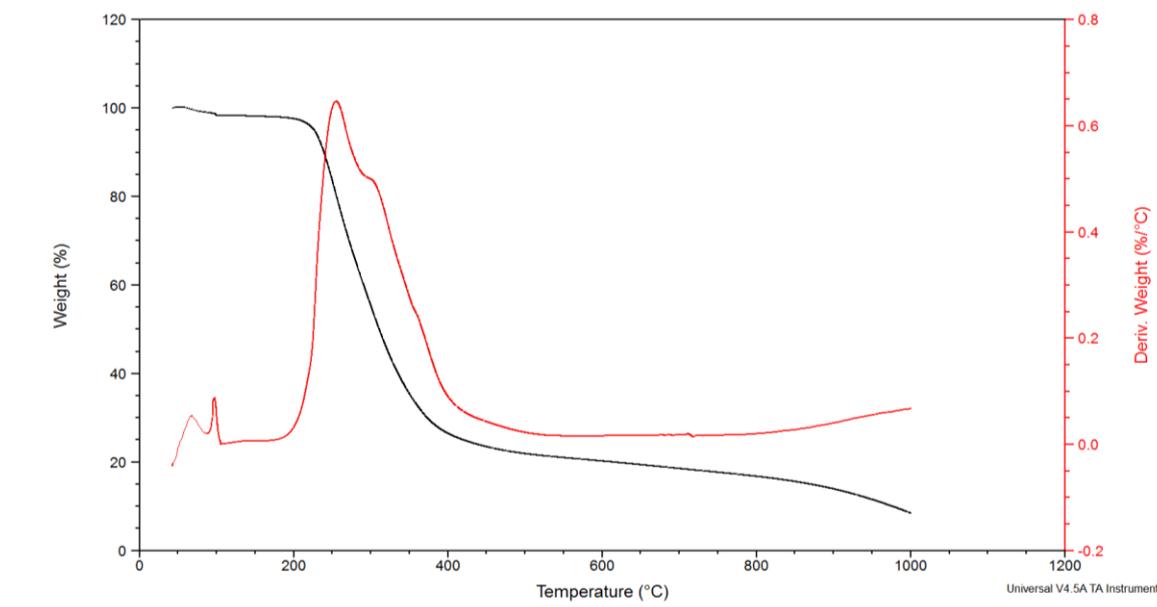


Figura 3.8 Analisi termogravimetrica del peptide Ac-EFEFE-NH₂.

3.3 SINTESI DEL PEPTIDE H-WKWEW-OH

Il pentapeptide WKWEW è stato sintetizzato tramite SPPS seguendo le procedure descritte dettagliatamente nella parte sperimentale. In particolare, è stata impiegata la resina 2-CTC e una miscela contenente HBTU/HOBt/DIPEA come attivanti per le reazioni di coupling. In un primo momento il peptide è stato staccato dalla resina seguendo la procedura generale, cioè per trattamento con TFA/TIPS/H₂O in rapporto 95/2.5/2.5. L'analisi ESI-MS del peptide ottenuto ha mostrato i picchi a m/z 834.4 e 417.7 attribuibili agli ioni $[M+H]^+$ e $[M+2H]^{2+}$, ma anche altre due picchi a m/z 890.5 e 946.6 (Figura 3.8). Questi picchi hanno una differenza di 56 e 112 con lo ione molecolare, che può essere riconducibile a uno (56) o due (112) frammenti di tipo *terz*-butile. Molto probabilmente, questi sottoprodotti derivano dalla *terz*-butilazione della catena laterale del triptofano durante il processo di distacco⁴⁰. Durante questo processo il TFA non contribuisce solo a separare il peptide dalla resina, ma rimuove anche il gruppo protettore dell'anello indolico del triptofano, esso resta esposto a specie fortemente elettrofile, come il catione *terz*-butile, e può reagire irreversibilmente alchilando la posizione 2 dell'indolo, come mostrato nello Schema 3.1.

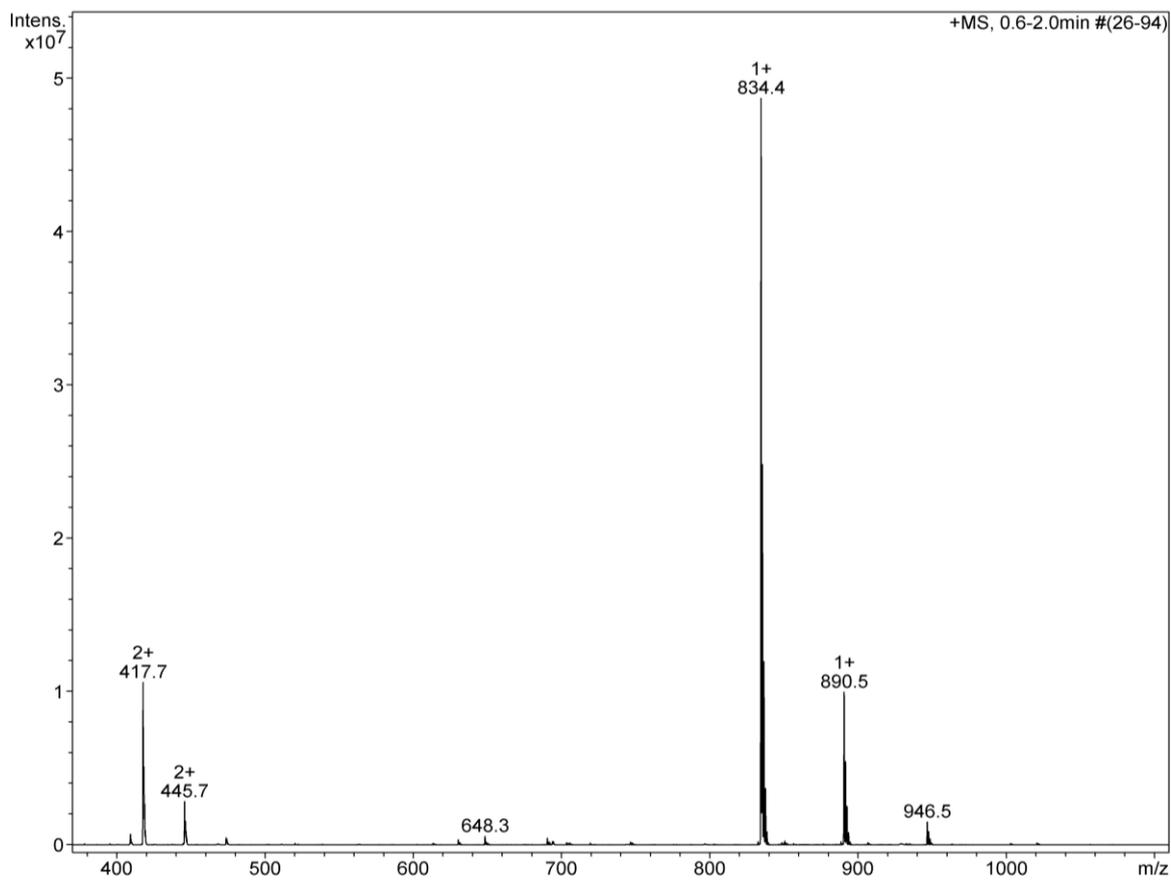
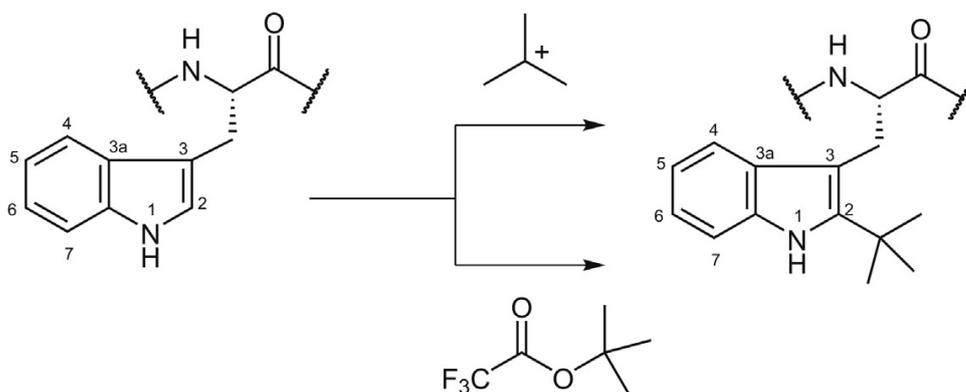


Figura 3.9 ESI-MS del peptide WKWEW ottenuto dopo il distacco con TFA/TIPS/H₂O.



Schema 3.1. Possibili reazioni di alchilazione della catena laterale del triptofano durante il distacco.

La reazione di *terz*-butilazione dovrebbe essere minimizzata dall'utilizzo del gruppo protettore Boc nella catena laterale del triptofano⁴¹, ciò indica, molto probabilmente, che la sequenza peptidica sintetizzata è particolarmente sensibile a questo tipo di reazioni. È stato fatto un tentativo di purificazione del composto, ma data la difficoltà di separazione delle catene si è deciso di ripetere la sintesi cambiando la miscela utilizzata per il distacco,

introducendo come *scavenger* il ditioneitolato (DTT). I tioli alifatici sono noti per la loro capacità di ridurre reazioni parallele durante il processo di separazione; in particolare, l'1,2-etanoditiolo (EDT) (Figura 3.10) annulla efficacemente reazioni parassite che affliggono l'indolo del triptofano durante lo stacco; tuttavia, l'EDT è molto maleodorante, perciò è stato scelto di non utilizzarlo dato che era possibile sostituirlo con DTT che risulta essere ugualmente efficace ma meno maleodorante⁴².

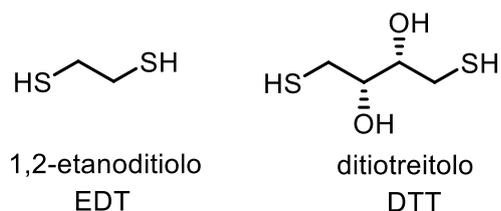


Figura 3.10 Strutture degli scavengers EDT e del DTT.

Utilizzando la miscela TFA/TIPS/DTT/H₂O, in rapporto 88:2:5:5, si è ottenuto un solido di colore bianco candido e molto vaporoso. L'analisi ESI-MS (Figura 3.11) mostra il picco a 834.4 corrispondente al [M+H]⁺ e una serie di picchi con una differenza di massa di +44 Da a m/z 878.4, 922.4 e 966.4. Questa progressione indica la presenza di gruppi COOH legati all'azoto indolico, l'origine di essi si deve alla parziale rimozione del gruppo protettore Boc. Infatti, nel caso del triptofano la rimozione di questo gruppo protettore con TFA procede in due passaggi di reazioni (Schema 3.2). Prima si forma il derivato B che è molto stabile, mentre nel secondo passaggio avviene la decarbossilazione per rigenerare l'anello indolico.

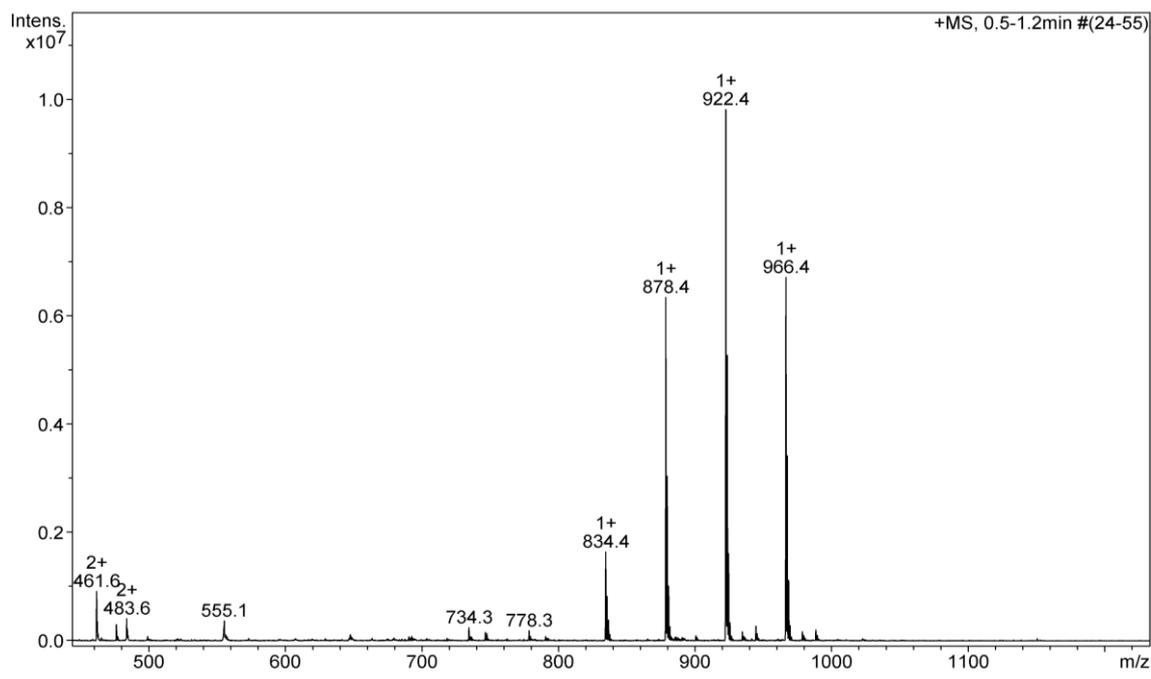
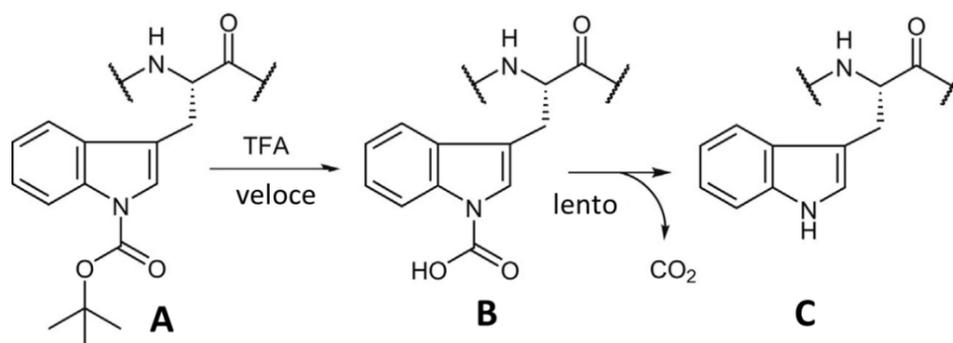


Figura 3.11 ESI-MS del peptide WKWEW ottenuto dopo il distacco con TFA/TIPS/DTT/H₂O



Schema 3.2 Meccanismo in due stadi della rimozione del gruppo protettore Boc dal triptofano.

Studi in letteratura hanno osservato che per rimuovere questi gruppi fosse sufficiente liofilizzare il campione in presenza di uno 0,1% di acido acetico. Fatto questo passaggio la nuova analisi di massa (Figura 3.12 A) mostra i due picchi principali a m/z 834.4 e 417.7 corrispondenti agli ioni $[M+H]^+$ e $[M+2H]^{2+}$. Un picco molto debole a m/z 890.5 indica ancora la presenza del prodotto di mono *terz*-butilazione. Il profilo HPLC (Figura 3.12 B) dimostra che il composto ha una purezza adeguata per i nostri scopi e non è necessaria la purificazione.

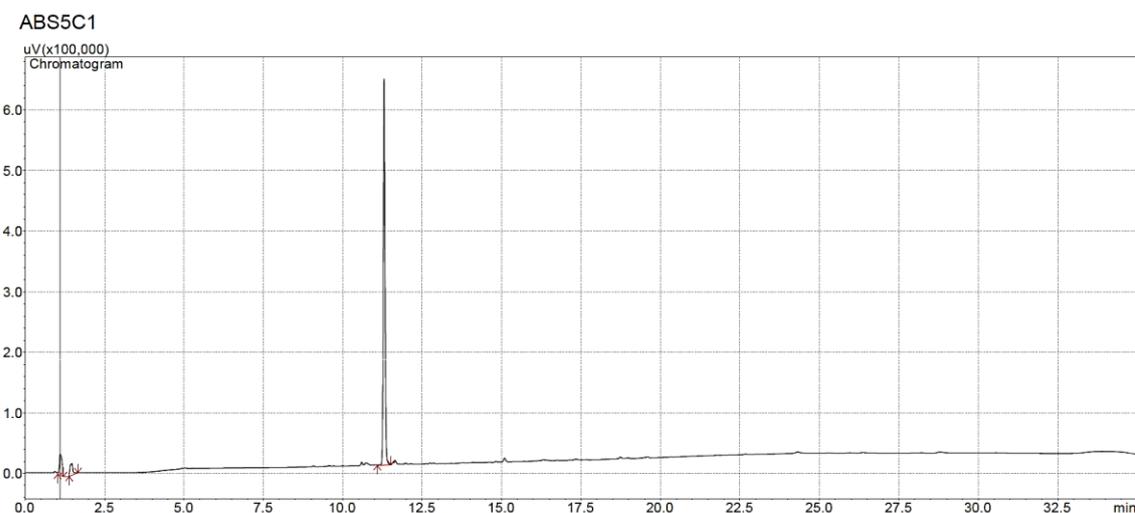
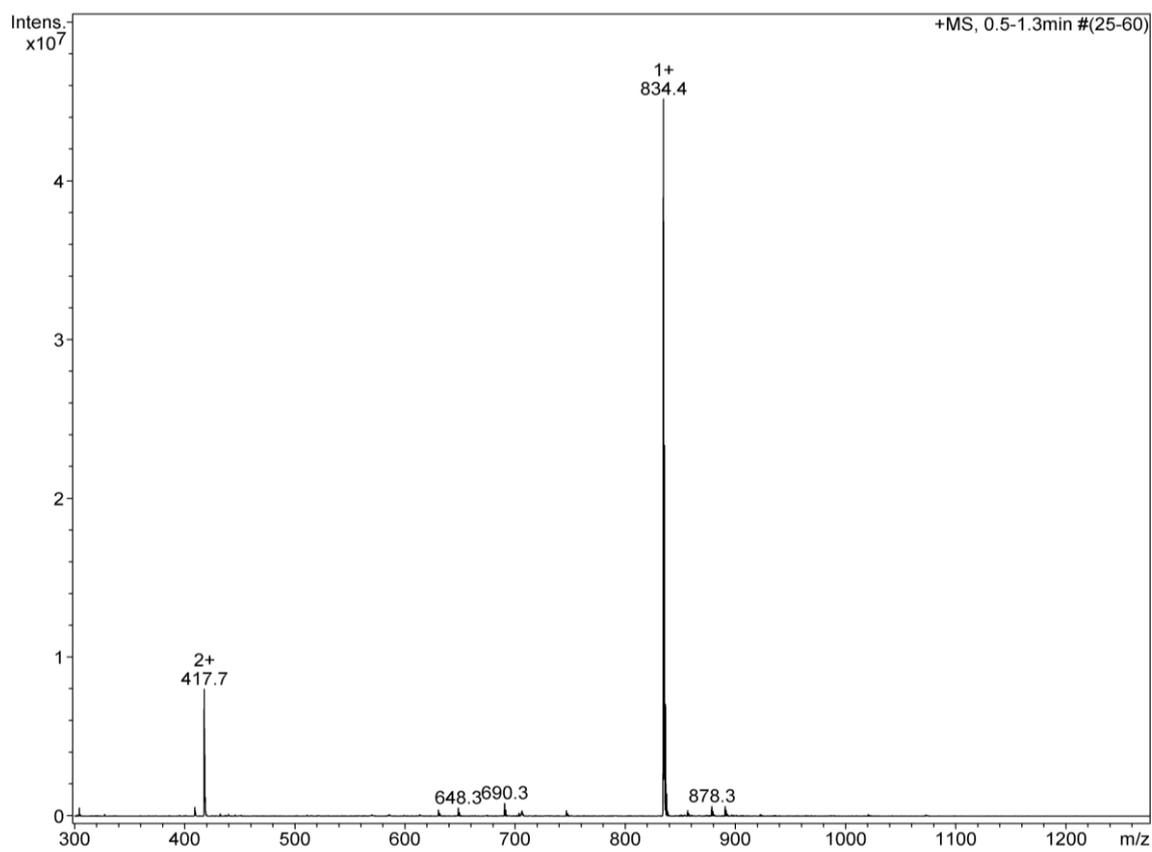


Figura 3.12 (A) ESI-MS del peptide WKWEW liofilizzato in presenza di acido acetico. (B) HPLC di WKWEW

Le caratterizzazioni del peptide WKWEW sono state completate con l'analisi FT-IR e NMR mono e bidimensionale. Nello spettro ^1H NMR (Figura 3.13) si notano i segnali dei tre NH indolici che danno luogo a 3 singoletti sopra 10.50 ppm, mentre che i protoni aromatici danno segnali fra 7.75 e 6.75 ppm. I quattro protoni ammidici della catena peptidica danno luogo a tre segnali fra 9 e 8 ppm, mentre i segnali attorno ai 4.5 ppm corrispondono

agli protoni in α dove il segnale più schermato corrisponde all' H^α del triptofano al C-terminale. I protoni alifatici delle catene laterali danno luogo a segnali sotto i 3.5 ppm. A 1.256 ppm si distingue inoltre un singoletto, che potrebbe essere assegnato a un *terz*-butile, confermando la presenza di una piccola percentuale di composto mono *terz*-butilato.

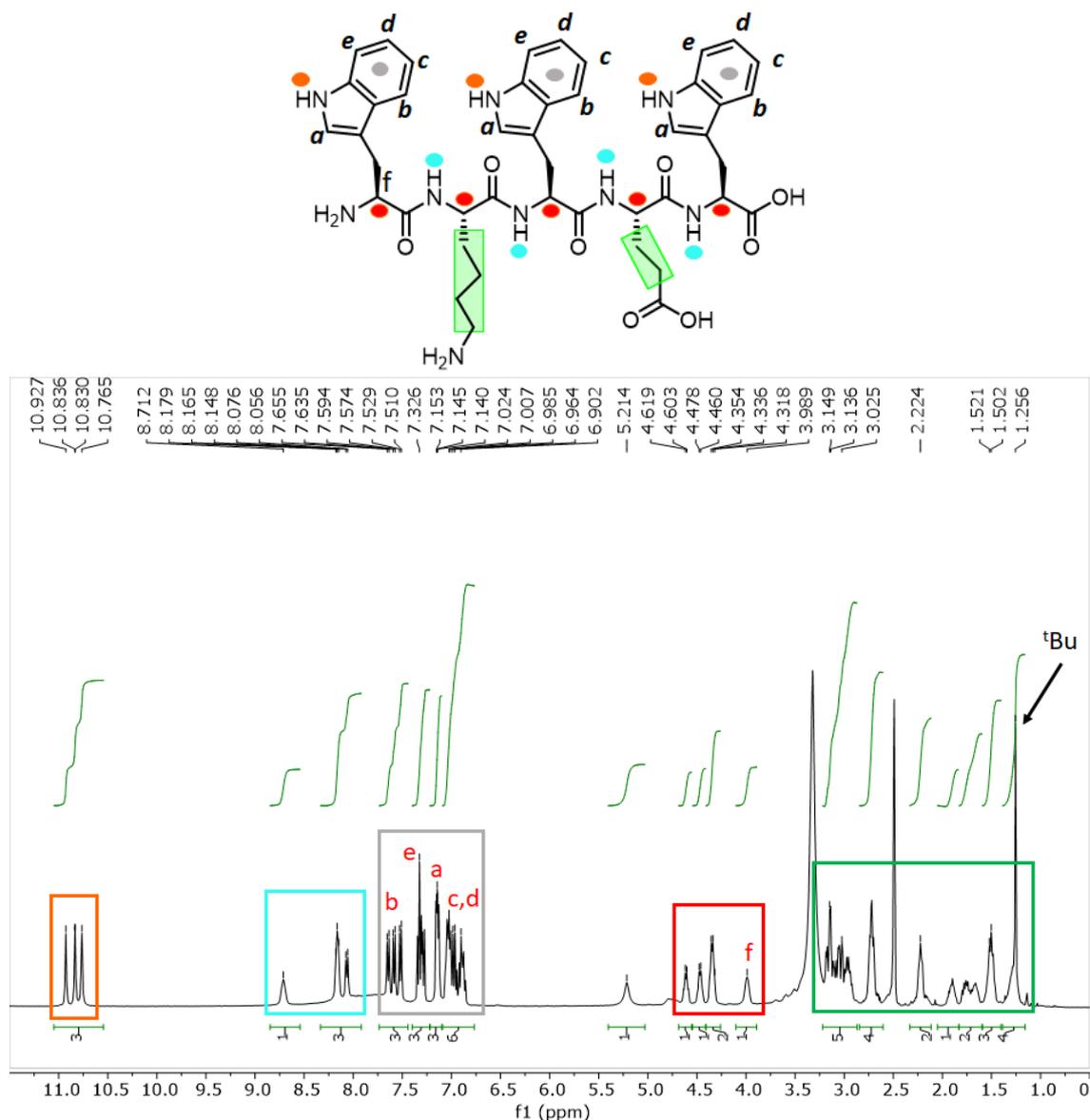


Figura 3.13 Spettro 1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) del peptide **WKWEW**.

Come nel caso precedente, è stata condotta un'analisi termogravimetrica (Figura 3.14) del materiale utilizzando la medesima rampa di temperature: si osserva che questo peptide decompone più velocemente rispetto al precedente, esso risulta essere stabile fino a circa 100°C e successivamente vi è una rapida degradazione del composto fino a

400°C, oltre questa temperatura si osserva una degradazione più lenta fino che però porta alla completa vaporizzazione, la curva infatti raggiunge lo zero, indice che non è presente massa residua.

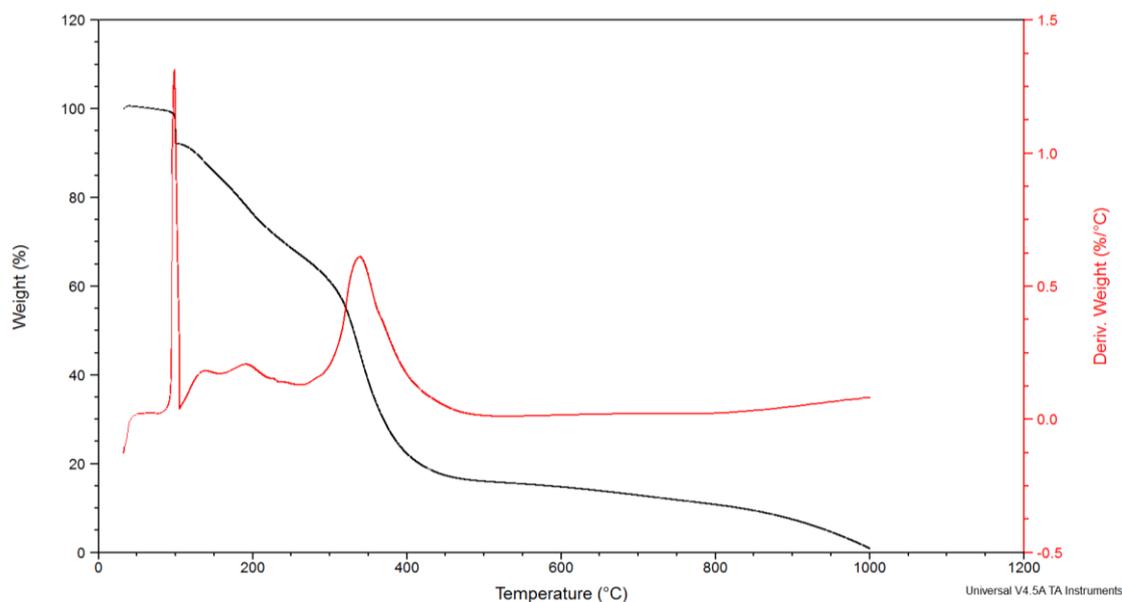


Figura 3.14 Analisi termogravimetrica del peptide WKWEW.

3.4 SINTESI DEL PEPTIDE AC-IKVAVWKWEW-OH

Il peptide Ac-IKVAVWKWEW è stato sintetizzato tramite SPPS come descritto nella parte sperimentale. Si è utilizzata la resina 2-CTC e una miscela di HBTU/HOBt/DIPEA come attivante. Il peptide è stato staccato dalla resina per trattamento con TFA/TIPS/H₂O 95/2.5/2.5. Nel profilo HPLC si osservano due picchi principali a 11.10 e 12.10 minuti (Figura 3.14 A). L'analisi ESI-MS mostra gli ioni $[M+H]^+$ e $[M+2H]^{2+}$ a m/z 1386.9 e 693.9, rispettivamente (Figura 3.13 B). Non si osserva la formazione di prodotti di *terz*-butilazione, ma si osservano i picchi a m/z 1273.8 e 637.3 corrispondenti alla sequenza troncata senza il residuo di isoleucina $[M-Ile+H]^+$ e $[M-Ile+2H]^{2+}$.

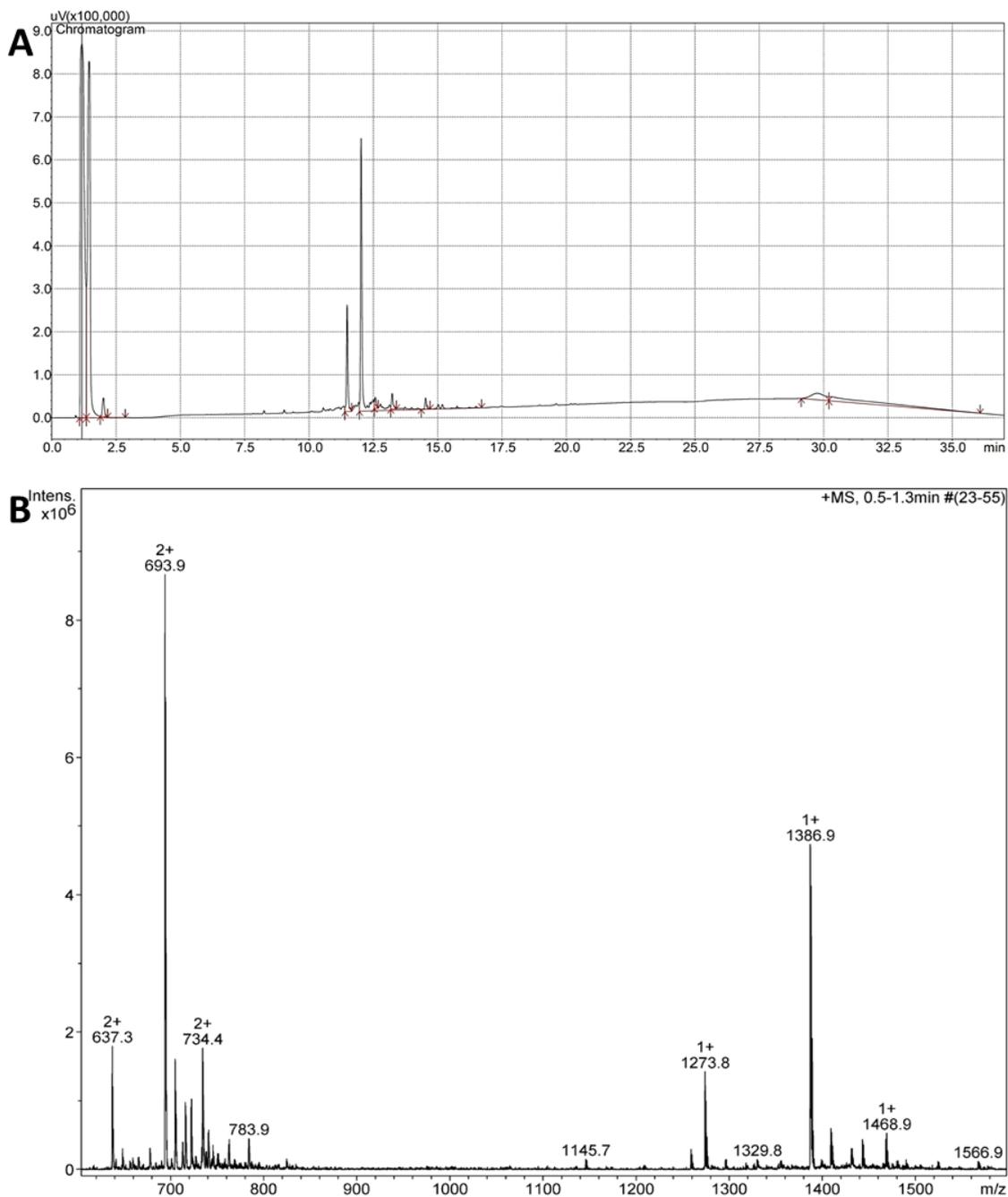


Figura 3.14 (A) HPLC e (B) ESI-MS del peptide Ac-IKVAVWKWEW non purificato.

Il peptide è stato purificato su colonne pre-impaccate di C18 utilizzando come eluente un gradiente di ACN+0.1% TFA/H₂O +0.1% TFA. Si è iniziato con un 30% di acetonitrile, per poi seguire con un 35% finché tutto il primo picco è eluito e poi si è passati al 40% per fare eluire il secondo picco. L'analisi ESI-MS delle frazioni a permesso confermare che il picco a 12.10 minuti corrisponde a quello del peptide target. Il profilo HPLC (Figura 3.15 A) dimostra che dopo questa purificazione si è ottenuto il composto con una purezza

adeguata per i nostri scopi. L'analisi ESI-MS mostra gli ioni $[M+H]^+$ e $[M+2H]^{2+}$ a m/z 1386.9 e 693.9, rispettivamente (Figura 3.15 B) ma si può ancora osservare un picco a m/z 637.3 corrispondenti alla sequenza troncata.

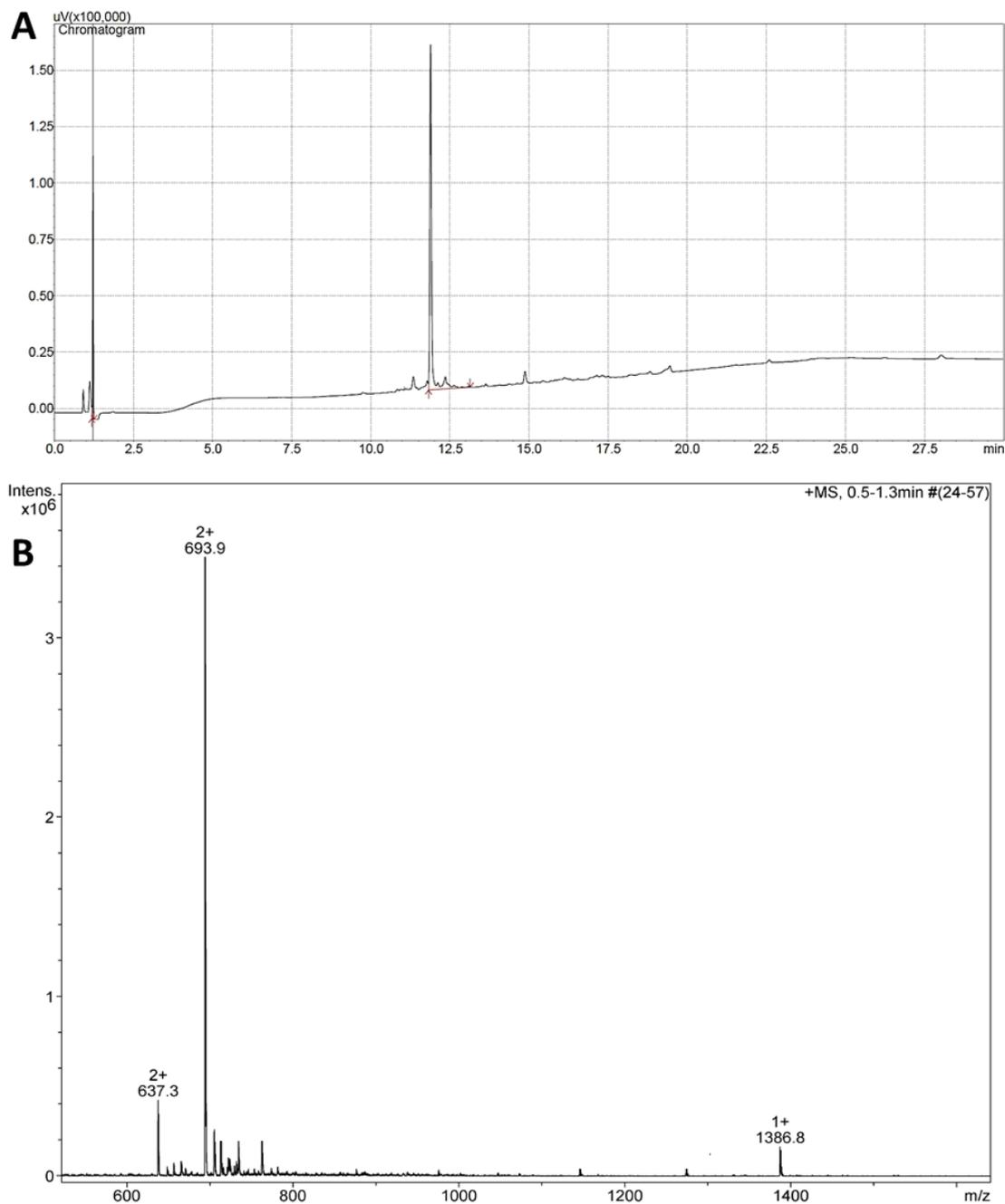


Figura 3.15 (A) HPLC e (B) ESI-MS del peptide Ac-IKVAVWKWEW purificato

Le successive caratterizzazioni sono state l'FT-IR e l'NMR. Lo spettro 1H NMR si mostra nella Figura 3.16. Rispetto allo spettro del pentapeptide WKWEW, il peptide Ac-

IKVAVWKWEW si caratterizza per l'apparizione di nuovi segnali sotto 1 ppm che corrispondono alle catene laterali degli amminoacidi valina e isoleucina; inoltre, si distingue a 1.83 ppm il singoletto dell'acetile al N-terminale. Il resto gli spettri sono del tutto analoghi: si notano i segnali dei tre NH indolici che danno luogo a 2 singoletti sopra 10.50 ppm, mentre i protoni aromatici e i protoni ammidici danno segnali fra 8.50 e 6.75 ppm. I segnali immediatamente sopra ai 4.5 ppm corrispondono agli H α . I protoni alifatici delle catene laterali danno luogo a segnali sotto i 3.5 ppm.

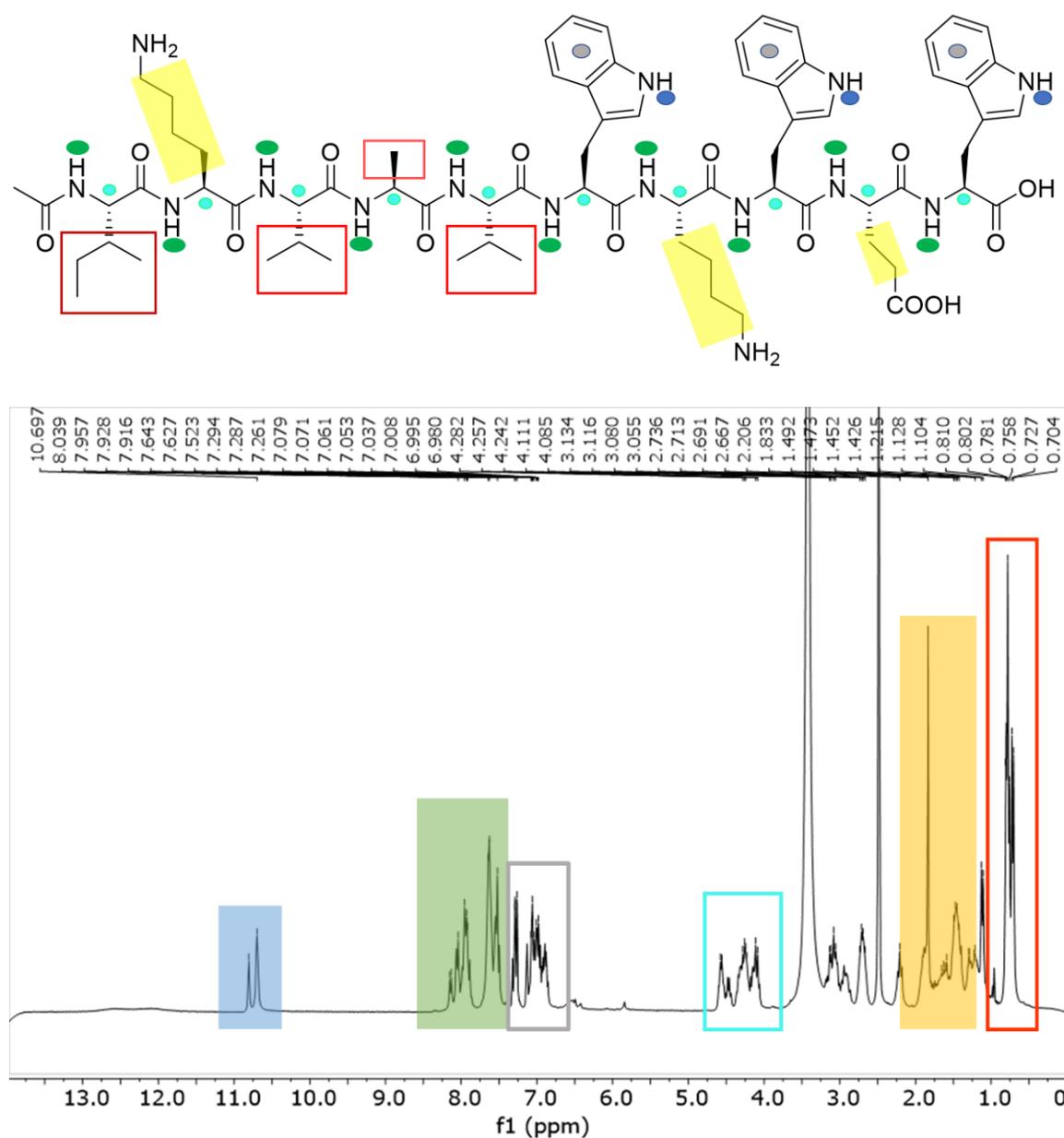


Figura 3.16 ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) del peptide Ac-IKVAVWKWEW purificato.

Anche per questo peptide l'analisi termogravimetrica ha rivelato una stabilità fino a circa 100°C, oltre questa temperatura si osserva una degradazione più lenta fino a quasi 400°C dove in maniera molto rapida la maggior parte della massa viene vaporizzata, da circa 500°C fino al termine della rampa si ha un nuovo rallentamento nella degradazione del materiale; anche in questo caso la curva non raggiunge lo zero.

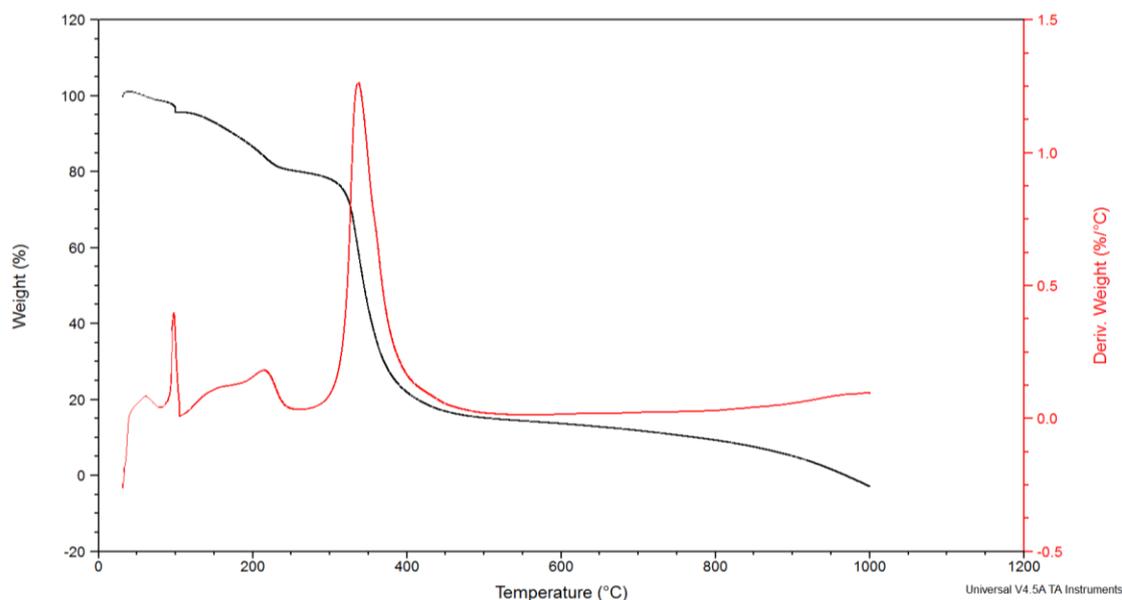


Figura 3.17 Analisi termogravimetrica del peptide Ac-IKVAVWKWEW.

3.5 STUDI DI GELAZIONE DEI PEPTIDI

Dopo la sintesi, purificazione e caratterizzazione dei tre composti siamo passati agli studi sul *self-assembly*. Per esaminare la capacità di assemblaggio sono stati condotti, per ogni composto, test sulla formazione dei gel supramolecolari, questo tipo di processo, tipicamente reversibile, è stato promosso fornendo al sistema un *input*. In particolare, vista la presenza di gruppi sensibili al pH nelle catene laterali, sono stati studiati due tipi di *input*: cambiamenti di pH e concentrazione salina.

3.5.1 Gelazione del peptide Ac-EFEFE-NH₂

I primi test sono stati volti a studiare la formazione di idrogeli tramite cambiamenti di pH. Il peptide Ac-EFEFE-NH₂ è insolubile in acqua milliQ (pH 5) quando le catene laterali degli acidi glutammici sono nella forma neutra. A pH basico invece i gruppi carbossilici delle

catene laterali dell'acido glutammico possiedono una carica negativa e di conseguenza il peptide è solubile. Inoltre, la repulsione elettrostatica tra molecole cariche negativamente inibisce il self-assembly. Quando il pH della soluzione basica si acidifica (pH≈3), per aggiunta HCl 1M, si neutralizza la carica dei gruppi funzionali, permettendo così alle molecole di interagire fra loro e favorendo il processo di self-assembly.

Sono stati eseguiti i primi test per individuare la MGC (Tabella 3.1). In un vial è stata introdotta una quantità nota di peptide in 1 mL di acqua milliQ. Sono stati aggiunti 1.5 equivalenti di NaOH 1N e la miscela è stata sonicata, ottenendo una soluzione trasparente. A questo punto sono stati aggiunti 4-5 equivalenti di HCl 1N. Per verificare velocemente la formazione dei gel si è capovolto il vial, se il contenuto resta fermo sul fondo e non fluisce si conferma la formazione del gel. In queste condizioni si è trovata una MGC del 0.5%. I gel si formano dopo pochi minuti a temperatura ambiente e sono traslucidi. Se invece dopo l'acidificazione la miscela è scaldata a 80 °C per 40 min e dopo lasciata raffreddare lentamente a temperatura ambiente, gli idrogel ottenuti sono trasparenti.

Tabella 3.1. Gelazione di Ac-EFEFE-NH₂ tramite cambiamenti di pH. Il risultato di ogni prova viene indicato con una delle seguenti lettere: S (soluzione); A (aggregato) e G (gel compatto).

Exp	Concentrazione peptide (% m/v)	Concentrazione peptide (mM)	peptide/NaOH molar ratio	peptide/HCl molar ratio	Risultato
1	0.1	1.4	1:3	1/4.5	S
2	0.5	6.8	1:3	1/4.5	G
3	1	13.5	1:3	1/4.5	G

Nei test successivi è stata studiata la formazione degli idrogeli sfruttando il principio dell'effetto salino. Studi precedenti del gruppo di lavoro³⁴ hanno dimostrato come sia possibile ottenere gel da peptidi simili utilizzando una concentrazione di sale tra 5 e 10 volte superiore. Una volta sciolto il peptide a pH basico invece di neutralizzare la carica negativa del peptide viene aggiunto un sale in modo che le cariche negative delle catene laterali possano essere schermate dai cationi introdotti e favorire così il processo di *self-assembly*. I test sono stati condotti utilizzando un sale monovalente (NaCl), uno bivalente (CaCl₂), uno trivalente (FeCl₃) e infine un buffer fosfato salino, tipicamente impiegato nelle culture cellulari. Nel nostro caso è stato osservato che l'aggiunta di sali non ha portato in

nessun caso né alla formazione di idrogeli né alla formazione di soluzioni viscosi (Tabella 3.2).

Tabella 3.2 Gelazione di Ac-EFEFE-NH₂ tramite aggiunta di sali. Il risultato di ogni prova viene indicato con una delle seguenti lettere: S (soluzione); A (aggregato) e G (gel compatto).

Exp.	Concentrazione peptide (% m/v)	Concentrazione peptide (mM)	Sale	Concentrazione sale (mM)	Risultato
1	0.5	6.8	PBS	30.6	S
2	0.5	6.8	NaCl	30.6	S
3	0.5	6.8	CaCl ₂	30.6	S
4	0.5	6.8	FeCl ₃	30.6	S

Sono stati analizzati al microscopio a trasmissione elettronica (TEM) i gel ottenuti a pH acido a una concentrazione di peptide pari a 0.5% e 1% (entrate 2 e 3, Tabella 3.1). L'immagini TEM del gel allo 0.5% mostrano la formazione di strutture fibrillari supramolecolari con lunghezze che variano tra i 500 nm e 1.5 μ m (Figura 3.18 A,B). Il campione con una concentrazione del 1% (Figura 3.18 C) risulta così denso da collassare su stesso al momento della misura, anche se comunque si nota la formazione di strutture fibrillari.

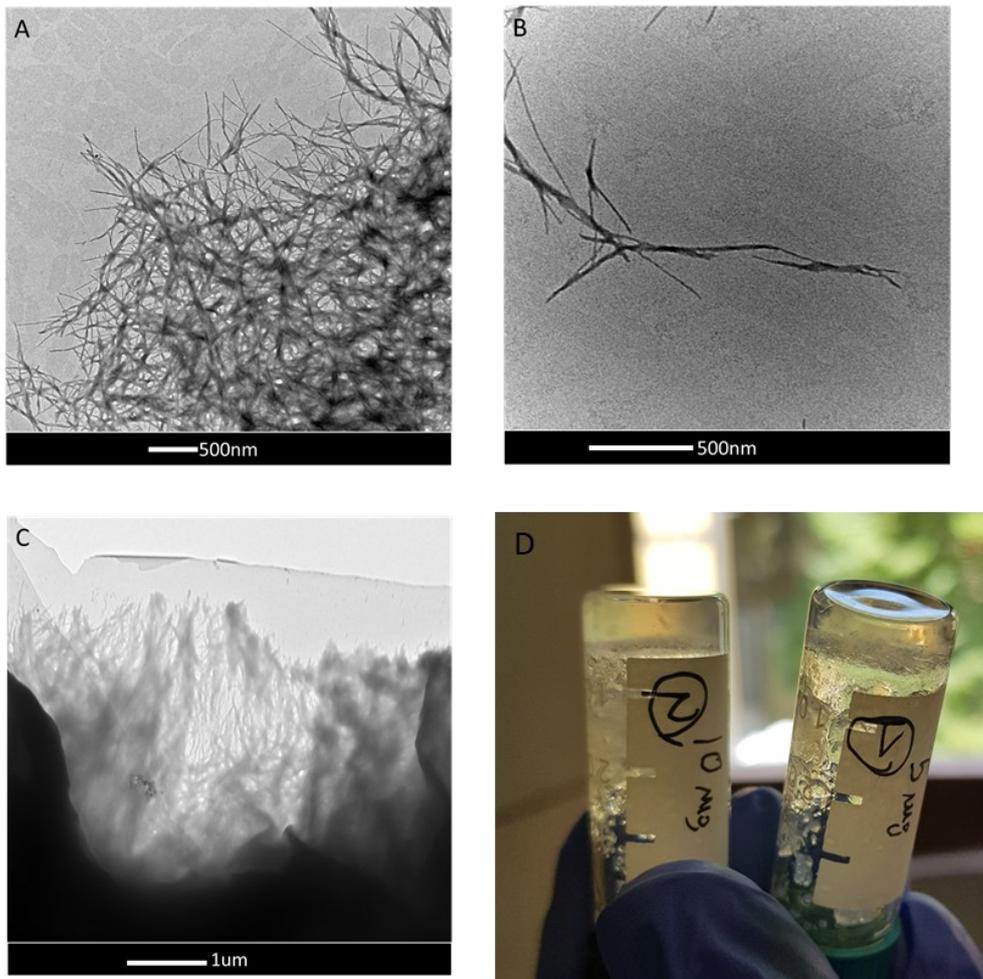


Figura 3.18 Immagini TEM degli idrogel ottenuti da Ac-EFEFE-NH₂ a pH acido con concentrazione 0.5% (A,B) e 1% (C); immagine dei gel ottenuti (D).

Le strutture supramolecolari osservate al TEM si formano molto verosimilmente grazie all'istaurazione di legame idrogeno intermolecolari per costruire strutture di tipo β -foglietto, assieme alle interazioni di tipo π - π *stacking* tra i residui aromatici. Per verificare la formazione di strutture tipo β -foglietto, siamo andati ad analizzare gli spettri IR dei gel, in particolare la zona in cui assorbono i legami peptidici. Gli spettri FT-IR (pastiglia di KBr) della polvere del peptide e la polvere ottenuta dopo la liofilizzazione dell'idrogel (xerogel) sono riportati nella Figura 3.19. L'analisi dei due spettri non rivela differenze significative, ma questo può essere dovuto anche alla metodologia di preparazione del campione. Per avere dati più affidabili bisognerebbe registrare lo spettro FT-IR di una soluzione basica del peptide e confrontarlo con lo spettro IR del xerogel.

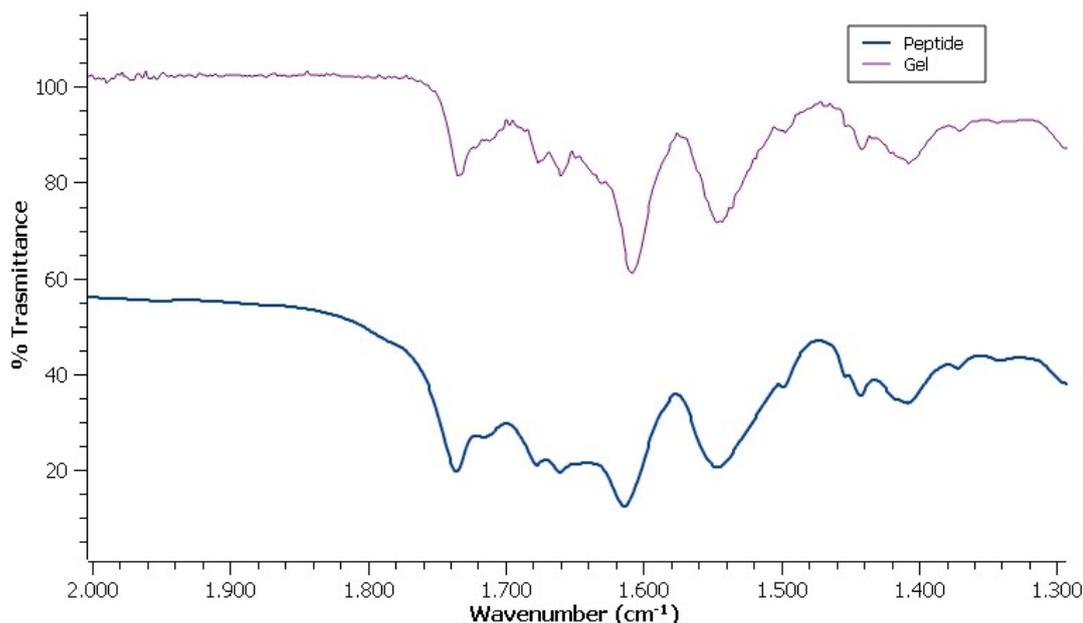


Figura 3.19 Ingrandimento dello spettro IR di confronto fra il peptide Ac-EFEFE-NH₂ e il corrispondente gel.

Dopo aver preparato un gel con concentrazione di peptide al 2% è stata condotta un'analisi reologica per stimare le proprietà meccaniche del gel. I test effettuati sono il frequency sweep (Figura 3.20 A) e l'amplitude sweep (Figura 3.20 B), i risultati hanno evidenziato una grande resistenza meccanica del campione con una buona tolleranza agli sforzi nella regione LVR.

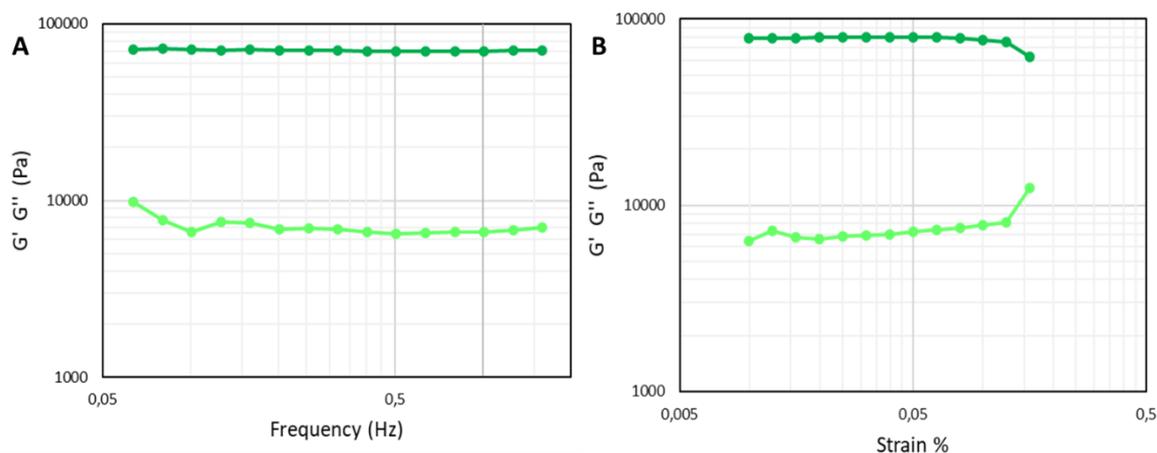


Figura 3.20 A) Frequency sweep **B)** Amplitude sweep del campione gel EFEFE.

3.5.1 Gelazione del peptide H-WKWEW-OH

Il peptide WKWEW possiede nell'intervallo di pH tra 5 e 9 due cariche positive e due negative, risultando una carica netta uguale a zero. Per tanto è possibile l'interazione tra due molecole di peptide tramite interazioni elettrostatiche. Grazie alle cariche il peptide ha una certa solubilità in acqua milliQ. In questi casi la formazione di strutture supramolecolari dipenderà principalmente dalla concentrazione, ma sarà anche possibile utilizzare come *input* la temperatura poiché normalmente ad alte temperature le molecole di gelanti sono solvate meglio, mentre che le basse temperature abbassano la solubilità favorendo il self-assembly. In primis è stata studiata la solubilità del peptide in acqua a diversi pH. È stato osservato che il peptide è solubile in acqua basica (pH>9) anche a una concentrazione del 1%, in acqua acida la solubilità è minore e forma soluzioni viscosi. In questo caso, sono stati testati tre procedure diverse per lo studio del self-assembly in acqua (acqua MQ pH ≈5):

- a. agitando meccanicamente il campione utilizzando il vortex per cinque minuti, lasciando poi a riposare a temperatura ambiente.
- b. sonicando il campione nel bagno a ultrasuoni per cinque minuti e dopo lasciando il campione a riposare a temperatura ambiente.
- c. sonicando il campione nel bagno a ultrasuoni per cinque minuti e poi scaldando fino a 80°C per 40 minuti e lasciando raffreddare lentamente a temperatura ambiente.

Nella Tabella 3.3 sono riportati i risultati dei diversi test. Si osserva che a una concentrazione pari al 0.1% il peptide è solubile e forma soluzioni trasparenti con una viscosità simile a quella dell'acqua. Aumentando la concentrazione a 0.5% si osserva la presenza di precipitati anche dopo sonicazione o riscaldamento della miscela. Al 1% invece si osserva la formazione di gel sia dopo sonicazione sia dopo aver riscaldato a 80°C e lasciato raffreddare. La formazione dei gel non è immediata, almeno 24 ore di maturazione sono necessarie per costituire i gel.

Tabella 3.3 Studi di gelazione di WKWEW in acqua. Metodi (a) vortex 5 minuti (b) sonicazione (c) scaldare fino a 80°C poi raffreddare. Il risultato di ogni prova viene indicato con una delle seguenti lettere: S (soluzione); A (aggregato) e G (gel compatto).

Exp.	Concentrazione peptide (% m/v)	Concentrazione peptide (mM)	Metodo	Risultato
1	0.1	1.2	a	S
2	0.1	1.2	b	S
3	0.1	1.2	c	S
4	0.5	6.0	a	A
5	0.5	6.0	b	A
6	0.5	6.0	c	A
7	1	12.6	a	G
8	1	12.6	b	G
9	1	12.6	c	G

Successivamente è stata studiata la capacità di formare gel in presenza di buffer salino (PBS), lavorando in un intervallo di pH nel quale la carica netta del peptide fosse zero, la forza ionica è stata utilizzata per favorire il *self-assembly*. I risultati dei diversi test sono raccolti nella Tabella 3.4.

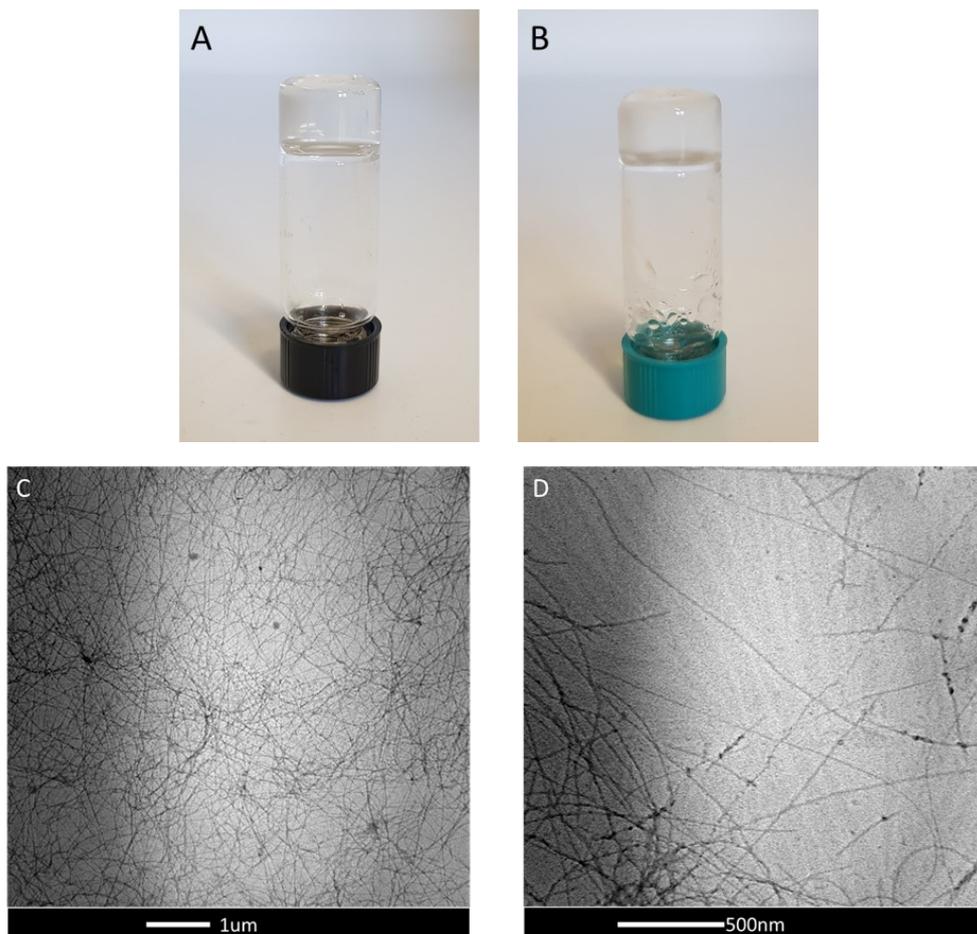
I test sono stati condotti ad una concentrazione del 1%, uguale alla MGC trovata in acqua. Ciò che è stato fatto variare è il rapporto volumetrico tra acqua e PBS al fine di studiare al meglio in quali condizioni si formassero idrogeli.

Tabella 3.4 Studi di gelazione di WKWEW in acqua/PBS. Metodi (a) sonicazione 5 minuti (b) sonicazione e riscaldamento fino a 80°C poi raffreddare. Il risultato di ogni prova viene indicato con una delle seguenti lettere: S (soluzione); A (aggregato) e G (gel compatto).

Exp.	Concentrazione peptide (% m/v)	Concentrazione peptide (mM)	H ₂ O/PBS v/v ratio	NaOH (mM)	HCl (mM)	Metodo	Risultato
1	1	12	0/1	-	-	a	S
2	1	6	1/1	-	-	b	S
3	1	6	1/1	18	-	b	G
4	1	12	1/4	-	-	a	S
5	1	12	4/1	-	-	a	G
6	1	6	4/1	6	-	a	S
7	1	6	4/1	12	-	b	S
8	1	12	9/1	36	-	b	G
9	1	12	9/1	-	36	a	G
10	1.5	9	1/1	13.5	-	b	P

Grazie a questa lunga serie di prove abbiamo ottenuto molte informazioni sul nostro composto. Innanzitutto, non è possibile la formazione di idrogel in solo buffer PBS, ma in miscele H₂O/PBS 4:1 e 9:1. Per favorire la formazione dei gel è possibile utilizzare sia la sonicazione sia un ciclo caldo/freddo, è invece sconsigliato l'uso del vortex. L'aggiunta di un equivalente e mezzo di NaOH 1M favorisce in primis la solubilizzazione del peptide, però l'eccesso di base preclude la formazione dei gel.

È stata eseguita un'analisi TEM su due campioni: il primo con concentrazione 1% in acqua milliQ (Tabella 3.3, entrata 9, Figura 3.21 A,C,D) ed il secondo con uguale concentrazione ma preparato con acqua milliQ e PBS in rapporto 4:1 (Tabella 3.4, entrata 5, Figura 3.21 B,E,F). Anche in questo caso possiamo osservare che in entrambi i campioni c'è un'alta densità di fibre lunghe, che arrivano anche a 2 µm di lunghezza nel gel in sola acqua milliQ. Invece, nel caso del idrogel in H₂O/PBS 4:1, le immagini E ed F sono particolarmente interessanti poiché si può osservare chiaramente la struttura elicoidale delle fibre.



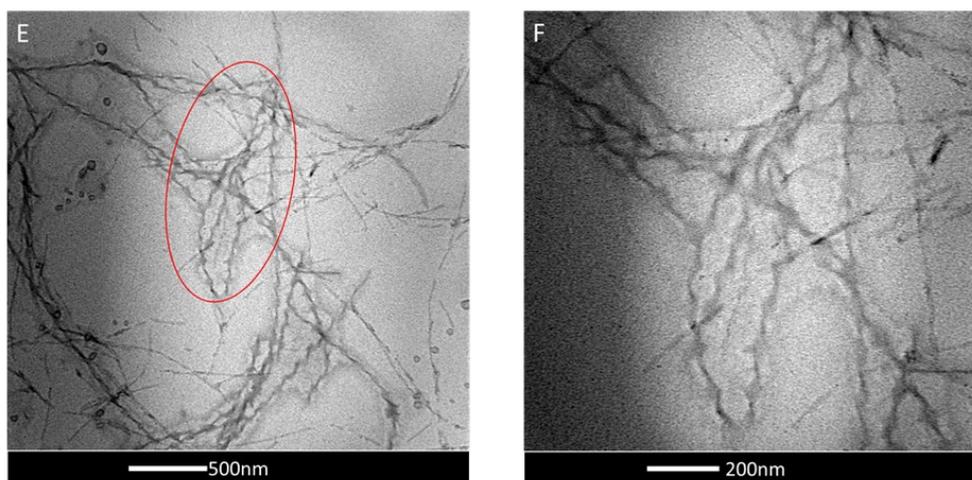


Figura 3.21 Immagini TEM e foto dei gel ottenuti da WKWEW al 1% in acqua (A,C,D) e 1% acqua/PBS (B,E,F).

Anche in questo caso sono stati confrontati gli spettri IR della polvere del peptide con lo xerogel ottenuto dalla liofilizzazione del campione 9 della Tabella 3.3, non trovando differenze significative (Figura 3.22). Come nel caso del peptide Ac-EFEFE-NH₂, sicuramente sarebbe più appropriato registrare lo spettro del peptide in soluzione e non nello stato solido.

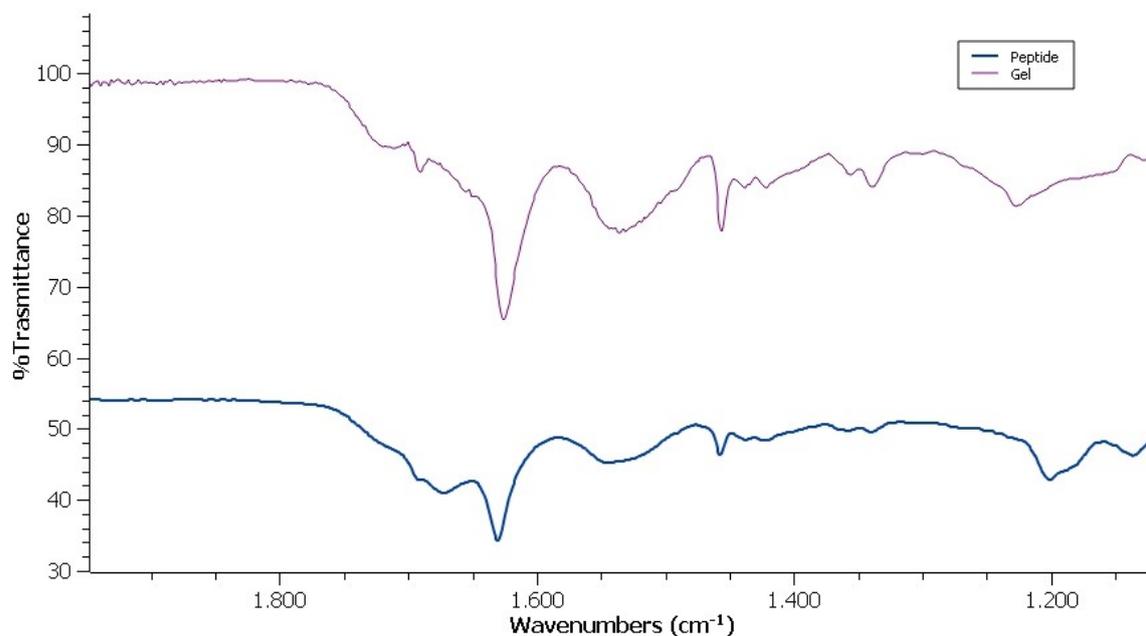


Figura 3.22 Ingrandimento dello spettro IR di confronto fra il peptide WKWEW e il corrispondente xerogel.

Anche per questo campione è stata condotta un'analisi reologica. I risultati si mostrano nella Figura 3.23. Si nota subito che questo gel ha un valore di G' nettamente inferiore al gel di EFEFE.

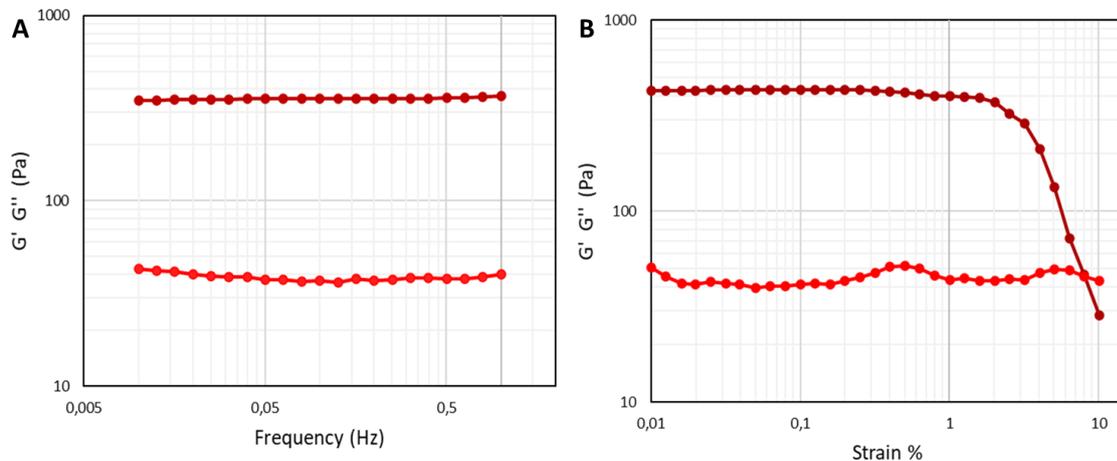


Figura 3.23 A Frequency sweep B Amplitude sweep del campione gel WKWEW.

3.6 STUDI DI GELAZIONE IN PRESENZA DEI NANOTUBI DI CARBONIO

Il primo problema per l'utilizzo di CNTs in applicazioni biomediche è riuscire a disperdere efficientemente i CNT in medio acquoso. Nel nostro caso, per assicurare una dispersione omogenea di CNTs nel idrogel è necessario partire da una dispersione omogenea dei nanotubi in acqua. È stata preparata una soluzione stock del peptide WKWEW allo 0.1%, stabilizzata con due equivalenti e mezzo di base. Per la dispersione è stato utilizzato un rapporto 2:1 di WKWEW / CNTs (CoMoCat SWCNT), la miscela è stata sonicata 1 ora in bagno ad ultrasuoni ottenendo la dispersione mostrata nella Figura 3.21.A. Questa prima dispersione è stata centrifugata prima a 10000 rpm per 45 minuti e dopo a 12300 rpm per 2 cicli da 20 minuti ottenendo la dispersione in Figura 3.21.B, trasparente di colore grigio oscuro e nella quale non si osserva particolato. Per determinare la percentuale di nanotubi dispersi, sono stati liofilizzati 2 mL di questa dispersione ottenendo 2,41 mg di residuo solido che è stato analizzato utilizzando la analisi termogravimetrica (TGA). Le curve ottenute per il peptide, i SWCNTs e il composito WKWEW-SWCNT sono riportate nella Figura 3.21.C. Dai dati si evince che il composito WKWEW-SWCNTs liofilizzato contiene circa il 12% in peso di nanotubi di carbonio.

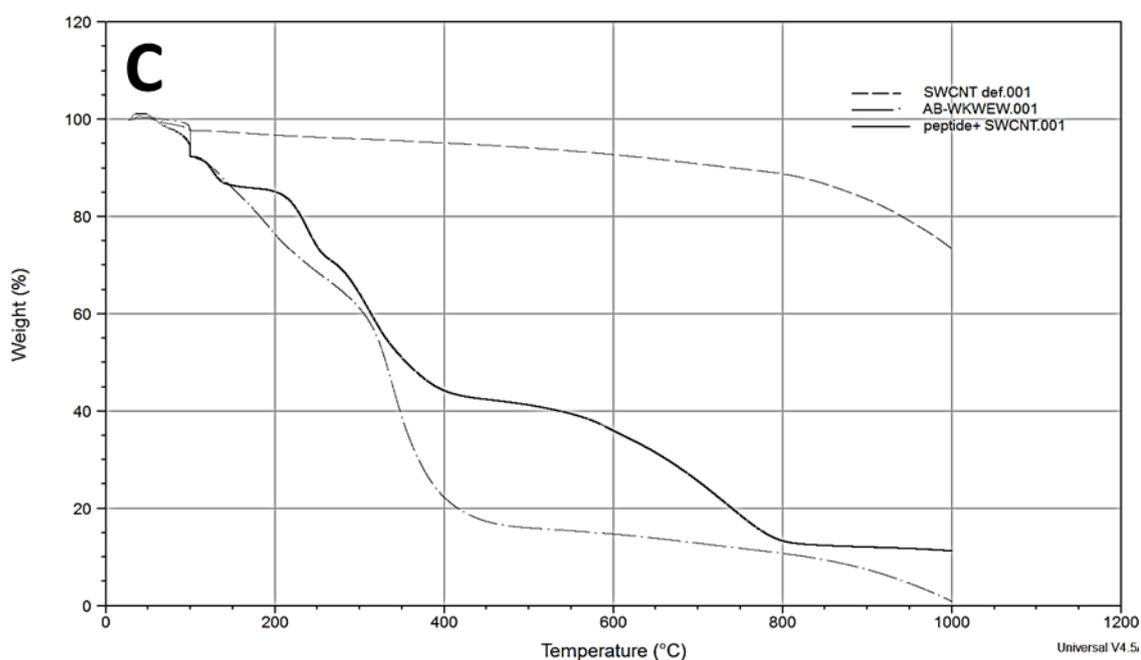
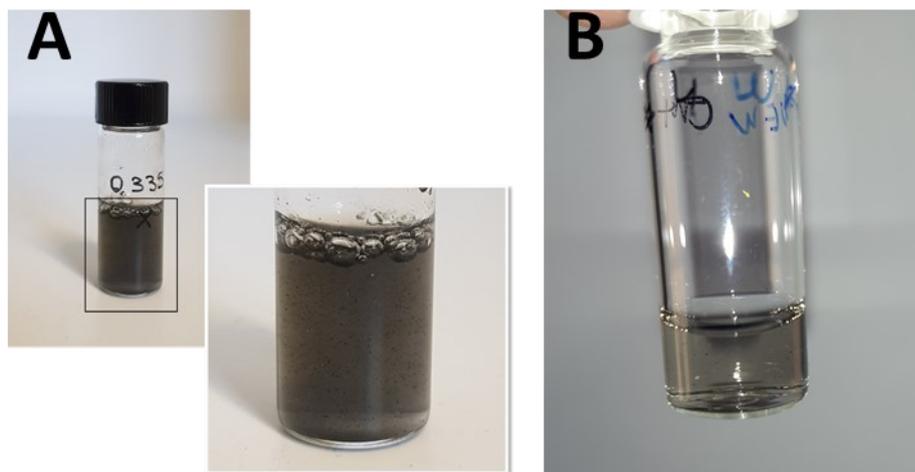


Figura 3.24 Dispersione ottenuta dopo sonicazione della soluzione WKWEW-SWCNT (A). Dispersione ottenuta dopo centrifugazione (B) TGA del peptide WKWEW (- · -), SWCNTs (- - -) e del composito WKWEW-SWCNT (linea solida).

Per formare il corrispondente idrogel contenente i nanotubi, a questa dispersione sono stati aggiunti 10mg/mL di peptide WKWEW, successivamente la miscela è stata sonicata per 5 minuti e lasciata a riposo. Dopo 24 ore, è stato possibile osservare la formazione di un gel compatto di colore grigio.

Dopo essere stati in grado di ottenere gel uniformi con i nanotubi al loro interno, è stato possibile eseguire gli studi reologici sui materiali per determinare quale fosse la resistenza

dei sistemi e verificare se l'inserimento del rinforzo nella matrice fosse efficace migliorandone le proprietà.

I campioni preparati per i test reometrici erano di forma cilindrica del diametro di 20mm e spessore 5mm; sono stati eseguiti due test per ogni campione utilizzando un piatto piano per condurre le analisi: dopo aver verificato quale fosse il range di resistenza lineare del campione, in modo da non far incomberne la rottura involontaria, è stato eseguito il test di *frequency sweep* (Figura 3.25 A), successivamente è stato condotto il test di *amplitude sweep* (Figura 3.25 B); per ogni campione sono state eseguite due prove allo scopo era poter confrontare le proprietà degli idrogeli semplici con quelle degli idrogeli rinforzati. I risultati delle analisi hanno evidenziato che, nonostante la presenza del rinforzo, non si osservano significativi miglioramenti sulle proprietà del materiale, questo può essere dovuto alla bassa concentrazione di rinforzo inserito nel gel.

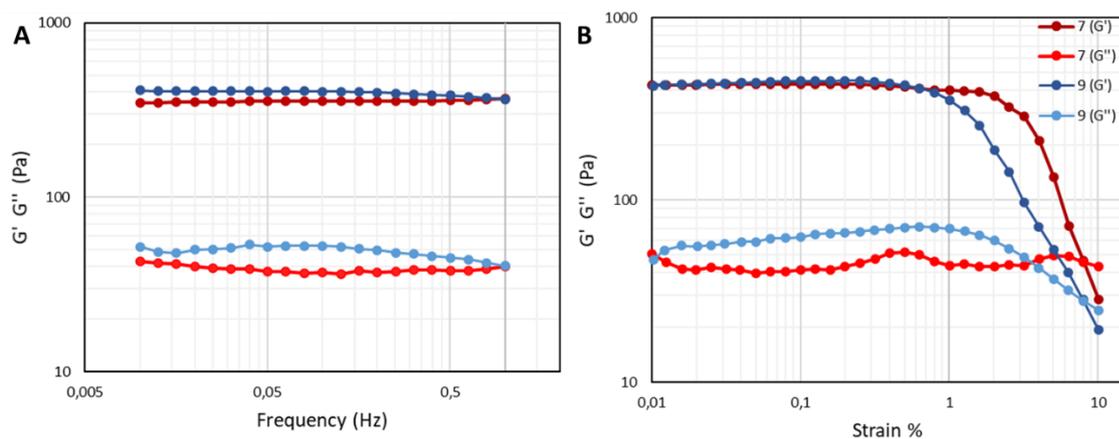


Figura 3.25 A Frequency sweep B Amplitude sweep dei campioni di gel a confronto.

▪ CAPITOLO 4- CONCLUSIONI

In questo progetto di tesi sono stati ideati e sintetizzati tre peptidi: Ac-EFEFE-NH₂ (1); WKWEW (2) e Ac-IKVAVWKWEW (3). I composti sono stati strutturati in maniera tale da essere in grado di auto-assemblarsi spontaneamente andando a formare idrogel. Le catene peptidiche ultracorte sono caratterizzate da sequenze amminoacidiche che presentano l'alternanza di gruppi idrofili, idrofobi e gruppi carichi. I peptidi sono stati sintetizzati con successo attraverso il protocollo standard della sintesi peptidica in fase solida. Le caratterizzazioni NMR, ESI-MS e HPLC delle molecole hanno mostrato la presenza di impurità legate ai composti, perciò, è stato necessario eseguire le purificazioni prima di procedere negli studi di gelazione. In particolare, nel peptide 1 erano presenti impurità derivanti dalla sintesi, poi eliminate per lavaggio meccanico del peptide; nel peptide 2 e nel peptide 3 erano invece presenti sistemi parassiti e la purificazione delle molecole è risultata complessa data la difficoltà nel separare i diversi composti; perciò, il peptide 2 è stato sintetizzato nuovamente modificando la metodologia di distacco, mentre il peptide 3 è stato purificato con l'uso di cartucce C18.

Per ogni peptide sono stati effettuati una serie di test di gelazione: modificando le condizioni ambientali si è cercato di favorire la costituzione di idrogel stabili e compatti. Dagli studi abbiamo osservato che il peptide 1 era in grado di costituire gel molto forti solamente in ambiente acido, mentre il peptide 2 era in grado di assemblare spontaneamente in acqua MQ, utilizzando un mix di acqua e soluzione salina si formavano idrogel forti e trasparenti.

Il passaggio successivo è stato quello di realizzare una dispersione omogenea di nanotubi di carbonio, questa è stata poi utilizzata per formare idrogel rinforzati del peptide 2. Sono state eseguite le caratterizzazioni reologiche sia per gel privi di rinforzo sia per quelli rinforzati e dal confronto dei dati è emerso che i gel con i nanotubi non presentavano un miglioramento efficace delle proprietà meccaniche, ciò probabilmente a causa della bassa quantità di nanotubi utilizzati.

Gli idrogel di peptidi rinforzati sono sistemi promettenti per la creazione di terreni di coltura cellulare, è necessario però continuare gli studi utilizzando maggiori quantità di rinforzo e/o di composto in modo da avere idrogel meccanicamente più forti.

■ CAPITOLO 5- PARTE SPERIMENTALE

4.1 MATERIALI, STRUMENTI E METODI

4.1.1 Reagenti

Sigma-Aldrich

Solventi	DMF anidro, DCM, DCM anidro, Dietiletere
Reagenti	Piperidina, DIPEA, HBTU, HOBt, TFA, TIPS, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Ile(Boc)-OH, Fmoc-Phe-OH, Acido acetico, Sodio cloruro
Nanotubi	CoMoCAT Carbon nanotube-single walled

Iris Biotech

Resine	2-chlorotrityl chloride, Fmoc-Rink-Amide MBHA
Reagenti	HBTU

TCI

Solventi	4-metilpiperidina
Reagenti	Fmoc-Glu(OtB)-OH

CARLO ERBA

Reagenti	DMF HPLC Acetonitrile Metanolo
----------	--------------------------------------

Fluka

Reagenti	Potassio cloruro, Potassio fosfato Sodio fosfato bifasico Ditiotreitolo
----------	-------------------------------------------------------------------------------

4.1.2 Strumentazioni e metodi

Spettrometria di massa

È stato utilizzato uno spettrometro di massa Agilent 1100 Series LC/MSD fornito da sorgente di ionizzazione ad elettrospray (ESI). Le misure sono state realizzate in modalità positiva, tramite iniezione in flusso (FIA, flow injection analysis). I campioni sono stati iniettati a una concentrazione $10^{-5}/10^{-6}$ M in metanolo, acetonitrile o acqua milliQ. La fase mobile è costituita da metanolo, acetonitrile o acqua milliQ contenenti un 0.1% di acido formico.

Spettroscopia NMR

Per la registrazione degli spettri NMR sono stati utilizzati gli strumenti Bruker 300 (300 MHz) e Bruker 500 Avance III (500 MHz). Gli spettri sono stati registrati a 298 K utilizzando come solvente dimetilsolfossido deuterato (99.9%D, Sigma Aldrich). Gli spostamenti chimici (δ , chemical shifts) sono espressi in parti per milione (ppm) utilizzando come riferimento il segnale della frazione non deuterata di solvente. Le molteplicità dei segnali sono espresse come: s (singoletto), d (doppietto), t (tripletto), q (quartetto), dd (doppietto di doppietti), m (multipletto), br (segnale allargato).

Oltre agli spettri monodimensionali di routine come ^1H NMR e ^{13}C NMR, sono stati registrati spettri DEPT-135 e gli spettri bidimensionali COSY e HMQC. Gli spettri di ^{13}C NMR sono stati registrati con disaccoppiamento a banda larga, perdendo così l'informazione sul numero di protoni legati a ogni carbonio. Il DEPT (Distortionless enhancement by polarization transfer) è una tecnica NMR che permette differenziare carboni terziari, secondari e primari. Nello specifico nel DEPT-135 i carboni quaternari non danno segnale, mentre i CH e CH₃ danno segnali negative e i CH₂ segnali positive. La spettroscopia NMR bidimensionale mette invece in correlazione due segnali. La tecnica COSY (Correlation Spettroscopy) permette di correlare due protoni che accoppiano fra di loro. In uno spettro ^1H - ^1H COSY ci sono due assi di frequenza uguali, entrambi per il protone. I picchi lungo la diagonale non forniscono informazione. I picchi simmetricamente disposti al di fuori della diagonale sono picchi di correlazione con coordinate δ_1 , δ_2 . Dunque, indicano che i protoni con spostamento chimico δ_1 e δ_2 accoppiano fra loro. Lo spettro HMQC (Heteronuclear Multiple Quantum Coherence) correla invece un carbonio con i protoni

direttamente legati a esso, grazie all'accoppiamento scalare. I carboni quaternari non danno nessun segnale di correlazione.

Spettroscopia UV-Vis

Gli spettri sono stati registrati con gli strumenti Cary 50; Cary 100 e Cary 5000. Sono state utilizzate celle Hellma in quarzo suprasil con cammino ottico 1 cm o 1 mm a seconda delle esigenze. Gli spettri d'assorbimento dei peptidi sono stati registrati in un Cary 50 nella finestra tra 210 e 500 nm a una concentrazione 10^{-4} M. Gli spettri di assorbimento di campioni contenenti nanotubi di carbonio sono stati registrati in un Cary 5000 nella finestra tra 210 e 1350 nm.

Spettroscopia di emissione

Gli spettri sono stati registrati con lo strumento Varian Cary Eclipse. Sono state utilizzate celle Hellma in quarzo suprasil con cammino ottico 1 cm o 1 mm a seconda delle esigenze.

Spettroscopia IR

Gli spettri IR sono stati registrati in uno spettrofotometro NEXUS 870 FT-IR (Nicolet), nella finestra $400 - 4000 \text{ cm}^{-1}$, con una risoluzione di 2 cm^{-1} e effettuando 20 scansioni. Le misure ATR sono state registrate su cristallo di diamante utilizzando un accessorio ATR Smart iTX della Thermo Scientific. Nel caso dei gel e le dispersioni di nanotubi, queste sono state liofilizzate e la polvere risultante analizzata tramite ATR. Nel caso dei peptidi, sono state preparate pastiglie di KBr

Microscopia elettronica in trasmissione (TEM)

Per le misure TEM è stato utilizzato uno strumento Jeol 300 PX. I campioni sono stati preparati immediatamente prima della misura. Le dispersioni di nanotubi sono state utilizzate come preparate. I gel sono stati diluiti con un volume di acqua milliQ. Una goccia di campione è stata depositata in un retino di rame rivestito di un film di carbone, lo eccesso di campione è stato rimosso con carta da filtro Whatman #50.

Dicroismo circolare

Gli spettri sono stati registrati con uno strumento Jasco J-1500 a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ utilizzando celle di quarzo di cammino ottico 1 mm. I peptidi sono stati sciolti in acqua leggermente basica, a

una concentrazione tale di mantenere il voltaggio sotto i 600 V. Gli spettri sono stati acquisiti tra 210 e 500 nm, con 32 scansioni, velocità 100 nm/min e risposta 1nm. I valori sono espressi in ellitticità molare (gradi x cm² x d mol⁻¹)

$$[\Theta]_T = \left(\frac{Pm \cdot \Theta}{l \cdot c} \right)$$

[Θ] ellitticità osservata, Pm peso molecolare, l lunghezza del cammino ottico in cm, c concentrazione in g/L.

Cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC, High Performance Liquid Chromatography)

Le analisi HPLC sono state eseguite per mezzo dello strumento Shimadzu LC-10AD, con rivelatore UV SPD-20A impostato a 217 nm. Colonna a fase inversa C18 Agilent Eclipse Plus C18. Solvente A: 95% H₂O + 0.1% TFA; solvente B: CH₃CN 95% + 0.1% TFA, flusso di 1mL/min. Il campioni sono stati preparati a una concentrazione di 1 mg/mL e filtrati utilizzando un filtro per siringhe di 2 μm.

Reologia

Gli studi reologici sono stati effettuati in un reometro Kinexus Lab+ a 25 °C utilizzando una geometria piatta di diametro di 20 mm. Campioni di gel di diametro 20 mm sono stati preparati.

Analisi termogravimetrica

L'analisi termogravimetrica è stata eseguita in uno strumento TA instruments. Le misure sono state effettuate sotto azoto con il seguente programma: 10 min a 100 °C, dopo 10 °C/min fino a 1000 °C.

Centrifugazione

Le centrifugazioni sono state eseguite in strumenti Jouan Thermo Scientific IEC CL 10 (centrifugazioni fino a 4500 rpm); Thermo Scientific IEC CL.

Liofilizzazione

I processi di liofilizzazione sono stati eseguiti in uno strumento Lio 5P. I campioni sono stati dispersi in acqua milliQ, congelati utilizzando un bagno di acetone/giaccio secco e poi liofilizzate.

4.2 STRATEGIA DI SINTESI DEI PEPTIDI

Per la sintesi delle catene peptidiche è stata utilizzata una procedura standard manuale: ogni sintesi è stata portata avanti all'interno di un reattore di vetro provvisto di un setto poroso e un rubinetto a doppia via, grazie a questo sistema è stato possibile insufflare azoto, in modo da mantenere le miscele sotto agitazione, e rendere la procedura di lavaggio facile e veloce. Tutte le reazioni sono state eseguite in solventi di grado HPLC o per sintesi peptidica. Il DMF utilizzato per le reazioni veniva posto sotto flusso di azoto a degassare per 30 minuti. Al termine della giornata, dopo aver eseguito tutte le operazioni del caso, la resina veniva lavata abbondantemente con DCM, poi seccata sotto azoto e riposta nel frigo a bassa temperatura, per tale motivo, prima del suo successivo impiego, era necessario riporla sotto cappa fino al naturale raggiungimento della temperatura ambiente. I lavaggi sono stati condotti utilizzando al meno 10 mL/grammo di resina e con forte flusso di azoto per favorire una buona agitazione della resina. Le reazioni sono state eseguite utilizzando un volume di solvente pari a 10 mL/grammo di resina. Dopo ogni lavaggio o reazione il solvente o miscela veniva scaricato prima della seguente operazione. Il loading effettivo della resina è stato determinato dopo l'attacco del primo amminoacido. Dopo ogni *coupling* veniva effettuato un Kaiser test per verificare la avvenuta reazione.

1. *Rigonfiamento (swelling) delle resine*

Introdurre la resina nel reattore, aggiungere DMF e lasciare rigonfiare per 30 min.

Se la reazione seguente fosse in un solvente diverso da DMF, lavare 2xDCM.

2. *Deprotezione del gruppo Fmoc*

Aggiungere al reattore con la resina una soluzione di 4-metilpiperidina al 20% in DMF e mantenere sotto agitazione per 20 min. Scaricare la miscela e aggiungere una seconda porzione della soluzione di 4-metilpiperidina al 20% in DMF e mantenere sotto agitazione altre 20 min. Poi lavare la resina con 3xDMF, 2xDCM e 2xDMF.

3. *Procedura per il coupling con HBTU/HOBt/DIPEA*

Dopo aver rigonfiato la resina ed eliminato il gruppo protettore è stata eseguita la prima reazione di *coupling*. In un vial si prepara una soluzione contenente 3 equiv. di amminoacido (rispetto il *loading* della resina); 2.90 equiv. di HBTU e 2.90 equiv di HOBT in DMF (concentrazione finale 0.25-0.50 M, circa 10 mL/grammo resina). Si aggiungono 9 equiv. di DIPEA e la miscela risultante si aggiunge alla resina nel reattore. Agitare sotto flusso di azoto per 1.5 ore, scaricare il solvente e lavare (3xDMF; 2xDCM; 2xDMF).

4. *Procedura di attacco del primo amminoacido alla 2-CTC*

Dopo il rigonfiamento della resina, questa è stata lavata con DCM. In un vial si prepara una soluzione contenente 1.2 equiv di amminoacido (rispetto il *loading* della resina) e 4 equiv di DIPEA (rispetto le moli dell'amminoacido) in DCM anidro (10 mL/grammo di resina). Agitare sotto flusso di azoto per 1 ora, poi scaricare la miscela e lavare con una soluzione contenente DCM/MeOH/DIPEA in rapporto 17:2:1 per bloccare i siti di reazione (3x10ml rispettivamente per 5-5-10 minuti) ed infine lavare con procedura standard lavare (3xDMF; 2xDCM; 2xDMF).

5. *Acetilazione dell'N-terminale della catena*

Rimuovere il gruppo protettore Fmoc, trattare la resina con una soluzione contenente Ac₂O/DIPEA/DMF in rapporto 1:2:7 per 40 minuti, poi lavare con procedura standard.

6. *Distacco del peptide con TFA al 95%*

Lavare la resina con DCM e Et₂O e seccare sotto azoto. Trattare la resina con una soluzione contenente TFA/TIPS/H₂O 95:2.5:2.5 per due ore e mezza sotto debole flusso di azoto; la miscela è stata raccolta in un pallone e la resina è stata lavata con DCM, anche esso raccolto nel pallone. Sono stati fatti evaporare i solventi tramite uso di un evaporatore rotante, successivamente il composto è stato precipitato in dietilere freddo e lasciato una notte a riposo; infine, è stato centrifugato e liofilizzato.

7. *Distacco del peptide con TFA al 88%*

Lavare la resina con DCM e Et₂O e seccare sotto azoto. Trattare la resina con una soluzione contenente TFA/TIPS/H₂O MQ /Ditiotreitolo in rapporto 88:2:5:5 per un'ora e venti sotto moderato flusso di azoto. La miscela è stata raccolta in un pallone e la resina è stata lavata con DCM, anche esso raccolto nel pallone. Sono

stati fatti evaporare i solventi tramite uso di un evaporatore rotante, successivamente il composto è stato precipitato in dietilere freddo e lasciato una notte a riposo; infine, è stato centrifugato e liofilizzato.

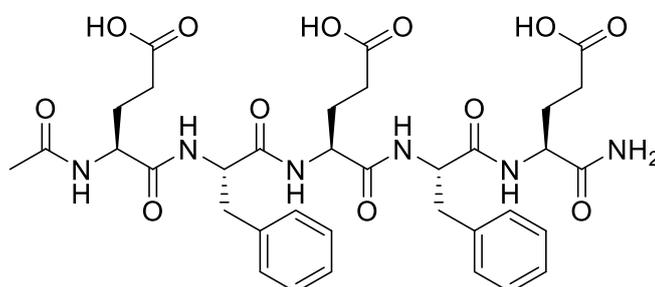
8. Kaiser test

Dopo ogni *coupling* prelevare una piccola porzione di resina, aggiungere qualche goccia di ognuno dei seguenti reagenti: ninidrina, fenolo e piridina; scaldare leggermente e osservare se avviene un cambiamento colorimetrico.

9. Loading test

Prelevare una quantità di resina nota. Rimuovere il gruppo *Fmoc* utilizzando il meccanismo di deprotezione precedentemente descritto, ed infine, raccogliere la miscela in un matraccio e portare a volume con DMF. A questo punto è possibile analizzare la soluzione all'UV-Vis per stimare la quantità di amminoacido caricato sulla resina.

4.2.1 Sintesi e caratterizzazione di Ac-EFEFE-NH₂



Chemical Formula: C₃₅H₄₄N₆O₁₂

Exact Mass: 740,30

Molecular Weight: 740,77

Elemental Analysis: C, 56.75; H, 5.99; N, 11.35; O, 25.92

Sono stati utilizzati 2g di resina Fmoc-Rink-Amide MBHA (loading dichiarato 0.65mmol/g), prima del processo di distacco il peptide è stato acetilato all'N-terminale. Per eseguire i diversi coupling sono state utilizzate le seguenti quantità di reagenti:

Attacco del primo amminoacido: Fmoc-Glu(OtBu)-OH (1.659g, 3.9mmol, 3equiv, 425.47g/mol); HBTU (1.405g, 3.705mmol, 2.85equiv, 379.24g/mol), HOBt (0.567g, 3.705mmol, 2.85equiv, 153.14g/mol), DIPEA (2.04ml, 11.7mmol, 9equiv, 129.24g/mol), DMF (18ml).

Attacco del secondo amminoacido: Fmoc-Phe-OH (1.511g, 3.9mmol, 3equiv, 387.43g/mol); HBTU (1.405g, 3.705mmol, 2.85equiv, 379.24g/mol), HOBt (0.567g,

3.705mmol, 2.85equiv, 153.14g/mol), DIPEA (2.04ml, 11.7mmol, 9equiv, 129.24g/mol), DMF (18ml).

Attacco del terzo amminoacido: Fmoc-Glu(OtBu)-OH (1.659g, 3.9mmol, 3equiv, 425.47g/mol); HBTU (1.405g, 3.705mmol, 2.85equiv, 379.24g/mol), HOBt (0.567g, 3.705mmol, 2.85equiv, 153.14g/mol), DIPEA (2.04ml, 11.7mmol, 9equiv, 129.24g/mol), DMF (18ml).

Attacco del quarto amminoacido: Fmoc-Phe-OH (1.511g, 3.9mmol, 3equiv, 387.43g/mol); HBTU (1.405g, 3.705mmol, 2.85equiv, 379.24g/mol), HOBt (0.567g, 3.705mmol, 2.85equiv, 153.14g/mol), DIPEA (2.04ml, 11.7mmol, 9equiv, 129.24g/mol), DMF (18ml).

Attacco del quinto amminoacido: Fmoc-Glu(OtBu)-OH (1.659g, 3.9mmol, 3equiv, 425.47g/mol); HBTU (1.405g, 3.705mmol, 2.85equiv, 379.24g/mol), HOBt (0.567g, 3.705mmol, 2.85equiv, 153.14g/mol), DIPEA (2.04ml, 11.7mmol, 9equiv, 129.24g/mol), DMF (18ml).

Resa: 87% (0.840g).

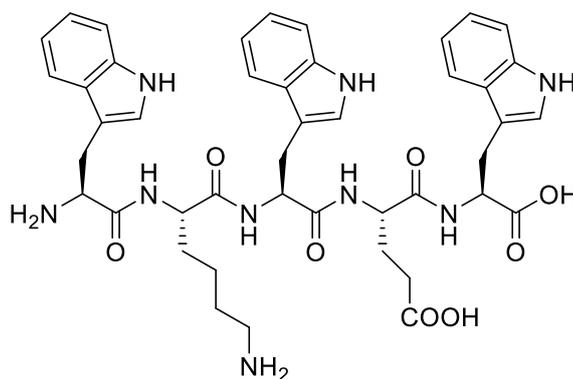
ESI-MS: (FIA: MeOH+0,1%HCOOH m/z): 763.3 [M+Na]⁺.

HPLC (A: H₂O+0,1%TFA; B: ACN+0,1%TFA): t_R= 9.18, Gradiente: t=0.01 B=5%; t=25 B=95%; t=30 B=95%; t=35 B=5%; t=35.01 STOP

¹H-NMR(500 MHz, DMSO-d₆): δ 12.06 (s, 3H, COOH), 8.022 (d, 1H, NH), 8.030 (d, 1H, NH), 7.974 (d, 1H, NH), 7.932 (d, 1H, NH), 7.892 (d, 1H, NH), 7.242-7.120 (m, 10H, CH aromatici), 7.053 (s, 1H, NH₂), 7.049 (s, 1H, NH₂), 4.522-4.470 (m, 2H, α-CH), 4.223-4.131 (m, 3H, α-CH), 3.040 (dd, 1H, CH₂ Phe), 2.982 (dd, 1H, CH₂ Phe), 2.825 (dd, 1H, CH₂ Phe), 2.750 (dd, 1H, CH₂ Phe), 2.247-2.096 (m, 6H, γ-CH₂ Glu), 1.949-1.539 (m, 6H, γ-CH₂ Glu), 1.808 (s, 3H, CH₃ Ac).

IR (KBr): ν (cm⁻¹) 3317, 3089, 3033, 2944, 2865, 1737, 1675, 1660, 1613, 1546, 1442, 1409, 1294, 1273, 1172, 792, 743, 700, 648, 549, 501.

4.2.2 Sintesi e caratterizzazione di H-WKWEW-OH



Chemical Formula: $C_{44}H_{51}N_9O_8$

Exact Mass: 833,39

Molecular Weight: 833,95

Elemental Analysis: C, 63.37; H, 6.16; N, 15.12; O, 15.35

Sono stati utilizzati 0.6g di resina 2-CTC (loading dichiarato 1.60mmol/g, loading calcolato 0.615mmol/g). Per eseguire i diversi coupling sono state utilizzate le seguenti quantità di reagenti:

Attacco del primo amminoacido: Fmoc-Trp(Boc)-OH (0.556g, 1.056mmol, 1.1equiv, 425.47g/mol); DIPEA (0.74ml, 4.22mmol, 4equiv, 129.24g/mol), DCM anidro (4.5ml).

Attacco del secondo amminoacido: Fmoc-Glu(OtBu)-OH (0.471g, 1.107mmol, 3equiv, 425.47g/mol); HBTU (0.399g, 1.052mmol, 2.85equiv, 379.24g/mol), HOBt (0.161g, 1.052mmol, 2.85equiv, 153.14g/mol), DIPEA (0.58ml, 3.321mmol, 9equiv, 129.24g/mol), DMF (6ml).

Attacco del terzo amminoacido: Fmoc-Trp(Boc)-OH (0.556g, 1.056mmol, 3equiv, 425.47g/mol); HBTU (0.399g, 1.052mmol, 2.85equiv, 379.24g/mol), HOBt (0.161g, 1.052mmol, 2.85equiv, 153.14g/mol), DIPEA (0,58ml, 3,321mmol, 9equiv, 129,24g/mol), DMF (6ml).

Attacco del quarto amminoacido: Fmoc-Lys(Boc)-OH (0.519g, 1.056mmol, 3equiv, 425.47g/mol); HBTU (0.399g, 1.052mmol, 2.85equiv, 379.24g/mol), HOBt (0.161g, 1.052mmol, 2.85equiv, 153.14g/mol), DIPEA (0.58ml, 3.321mmol, 9equiv, 129.24g/mol), DMF (6ml).

Attacco del quinto amminoacido: Fmoc-Trp(Boc)-OH (0.556g, 1.056mmol, 3equiv, 425.47g/mol); HBTU (0.399g, 1.052mmol, 2.85equiv, 379.24g/mol), HOBt (0.161g, 1.052mmol, 2.85equiv, 153.14g/mol), DIPEA (0.58ml, 3.321mmol, 9equiv, 129.24g/mol), DMF (6ml).

Resa: 74% (0.500g).

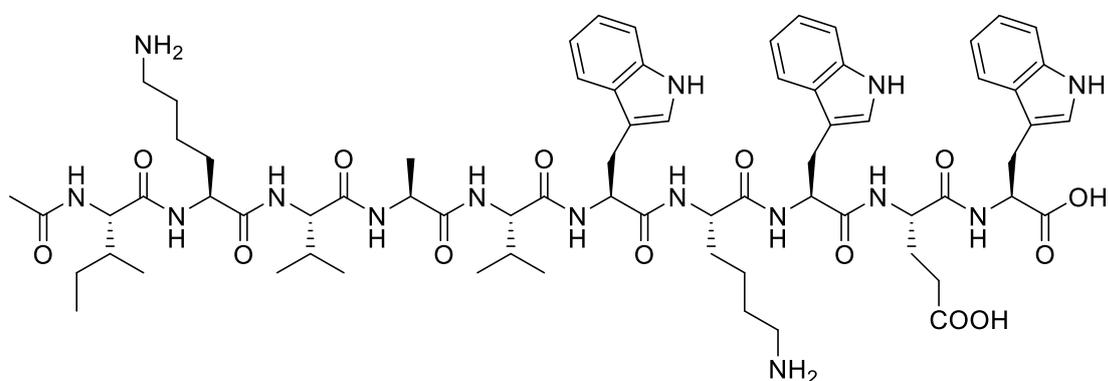
ESI-MS: (FIA: MeOH+0,1%HCOOH m/z): 834.36 [M+H]⁺, 417.7 [M+2H]⁺

HPLC (A: H₂O+0,1%TFA; B: ACN+0,1%TFA): t_R= 11.50, Gradiente: t=0.01 B=5%; t=25 B=95%; t=30 B=95%; t=35 B=5%; t=35.01 STOP

¹H-NMR(500 MHz, DMSO-d₆): δ 10.81 (s, 1H, NH Trp), 10.72 (s, 1H, NH Trp), 10.66 (s, 1H, NH Trp), 8.049 (s, 1H, NH), 8.04 (t, 2H, NH), 7.94 (d, 1H, NH), 7.54 (d, 1H, CH-b), 7.49 (d, 1H, CH-b), 7.43 (d, 1H, CH), 7.22 (m, 3H, CH), 7.12-6.68 (m, 9H, CH aromatici), 4.51 (m, 1H, α-CH), 4.35 (m, 1H, α-CH), 4.24 (d, 2H, α-CH), 3.81 (s, 1H, α-CH), 3.42 (t, 2H, CH), 3.14-2.72 (m, 9H, CH), 2.62 (d, 3H, CH), 2.19-1.92 (m, 4H, CH₂), 1.39 (s, 3H, γ-CH₂ Glu), 1.17 (s, 5H, ^tBu).

IR (KBr): ν (cm⁻¹) 3403, 3272, 3082, 2924, 1671, 1630, 1457, 1437, 1424, 1202, 1136, 833, 795, 743, 721.

4.2.3 Sintesi e caratterizzazione di Ac-IKVAVWKWEW-OH



Chemical Formula: C₇₁H₉₉N₁₅O₁₄

Exact Mass: 1385,75

Molecular Weight: 1386,66

Elemental Analysis: C, 61.50; H, 7.20; N, 15.15; O, 16.15

Sono stati utilizzati 0.5g di resina 2-CTC (loading dichiarato 1.60mmol/g, loading calcolato 0.615mmol/g), alla fine della catena il sistema è stato acetilato all'N-terminale. Per eseguire i diversi coupling sono state utilizzate le seguenti quantità di reagenti:

Attacco del primo amminoacido: Fmoc-Trp(Boc)-OH (0.843g, 1.60mmol, 1equiv, 425.47g/mol); DIPEA (1.34ml, 7.69mmol, 4equiv, 129.24g/mol), DCM anidro (9ml).

Attacco del secondo amminoacido: Fmoc-Glu(OtBu)-OH (2.025g, 0.862mmol, 3equiv, 425.47g/mol); HBTU (0.730g, 1.924mmol, 2.85equiv, 379.24g/mol), HOBt (0.294g, 1.924mmol, 2.85equiv, 153.14g/mol), DIPEA (1.06ml, 6.075mmol, 9equiv, 129.24g/mol), DMF (8ml).

Attacco del terzo amminoacido: Fmoc-Trp(Boc)-OH (1.066g, 2.025mmol, 3equiv, 425.47g/mol); HBTU (0.730g, 1.924mmol, 2.85equiv, 379.24g/mol), HOBt (0.294g, 1.924mmol, 2.85equiv, 153.14g/mol), DIPEA (1.06ml, 6.075mmol, 9equiv, 129.24g/mol), DMF (8ml).

Attacco del quarto amminoacido: Fmoc-Lys(Boc)-OH (0.949g, 2.025mmol, 3equiv, 425.47g/mol); HBTU (0.730g, 1.924mmol, 2.85equiv, 379.24g/mol), HOBt (0.294g, 1.924mmol, 2.85equiv, 153.14g/mol), DIPEA (1.06ml, 6.075mmol, 9equiv, 129.24g/mol), DMF (8ml).

Attacco del quinto amminoacido: Fmoc-Trp(Boc)-OH (1.066g, 2.025mmol, 3equiv, 425.47g/mol); HBTU (0.730g, 1.924mmol, 2.85equiv, 379.24g/mol), HOBt (0.294g, 1.924mmol, 2.85equiv, 153.14g/mol), DIPEA (1.06ml, 6.075mmol, 9equiv, 129.24g/mol), DMF (8ml).

Attacco del sesto amminoacido: Fmoc-Val-OH (0.687g, 2.025mmol, 3equiv, 339.39g/mol); HBTU (0.730g, 1.924mmol, 2.85equiv, 379.24g/mol), HOBt (0.294g, 1.924mmol, 2.85equiv, 153.14g/mol), DIPEA (1.06ml, 6.075mmol, 9equiv, 129.24g/mol), DMF (8ml).

Attacco del settimo amminoacido: Fmoc-Ala-OH (0.630g, 2.025mmol, 3equiv, 311.33g/mol); HBTU (0.730g, 1.924mmol, 2.85equiv, 379.24g/mol), HOBt (0.294g, 1.924mmol, 2.85equiv, 153.14g/mol), DIPEA (1.06ml, 6.075mmol, 9equiv, 129.24g/mol), DMF (8ml).

Attacco dell'ottavo amminoacido: Fmoc-Val-OH (0.687g, 2.025mmol, 3equiv, 339.39g/mol); HBTU (0.730g, 1.924mmol, 2.85equiv, 379.24g/mol), HOBt (0.294g, 1.924mmol, 2.85equiv, 153.14g/mol), DIPEA (1.06ml, 6.075mmol, 9equiv, 129.24g/mol), DMF (8ml).

Attacco del nono amminoacido: Fmoc-Lys(Boc)-OH (0.949g, 2.025mmol, 3equiv, 425.47g/mol); HBTU (0.730g, 1.924mmol, 2.85equiv, 379.24g/mol), HOBt (0.294g, 1.924mmol, 2.85equiv, 153.14g/mol), DIPEA (1.06ml, 6.075mmol, 9equiv, 129.24g/mol), DMF (8ml).

Attacco del decimo amminoacido: Fmoc-Ile-OH (0.716g, 2.025mmol, 3equiv, 353.41g/mol); HBTU (0.730g, 1.924mmol, 2.85equiv, 379.24g/mol), HOBt (0.294g, 1.924mmol, 2.85equiv, 153.14g/mol), DIPEA (1.06ml, 6.075mmol, 9equiv, 129.24g/mol), DMF (8ml).

Resa: 56% (0.616g).

ESI-MS: (FIA: MeOH+0,1% HCOOH m/z): 1386.9 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 693.9 $[\text{M}+2\text{H}]^+$

HPLC (A: $\text{H}_2\text{O}+0,1\%\text{TFA}$; B: $\text{ACN}+0,1\%\text{TFA}$): $t_{\text{R}}= 12.10$, Gradiente: $t=0.01$ B=5%; $t=25$ B=95%; $t=30$ B=95%; $t=35$ B=5%; $t=35.01$ STOP

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO-d_6): δ 12.5 (s, 1H, COOH), 10.8 (s, 1H, NH Trp), 10.7 (s, 2H, NH Trp), 8.14 (d, 1H, NH), 8.05 (d, 2H, NH), 8.01- 7.8 (m, 6H, NH), 7.75-7.43 (m, 12H, NH), 7.36-7.20 (m, 3H, CH aromatici), 7.18-6.80 (m, 11H, CH aromatici), 4.67-4.51 (m, 2H, H^α), 4.51-4.39 (m, 1H, H^α), 4.39-4.00 (m, 8H, H^α), 3.17 (d, 1H, H^β), 3.17 (d, 1H, H^β), 3.13 (d, 1H, H^β), 3.10-2.99 (m, 3H, H^β), 3.17 (d, 1H, H^β), 2.99-2.81 (m, 3H, H^β), 2.80-2.60 (m, 5H, H^β), 2.21 (t, 3H, H^β), 1.83 (s, 3H, Ac), 1.78-1.55 (m, 5H, Y-CH_2), 1.55-1.35 (m, 8H, Y-CH_2), 1.35-1.15 (m, 5H, Y-CH_2), 1.11 (d, 4H, Y-CH_2), 0.87-0.62 (m, 19H, Y-CH_2 Val/Ile)

IR (KBr): ν (cm⁻¹) 3415, 3282, 2967, 2936, 1671, 1629, 1542, 1458, 1204, 1139, 837, 801, 743, 723.

4.3 FORMAZIONE DEGLI IDROGELI

Per la formazione degli idrogeli è stata utilizzata una procedura manuale standard: i gel sono stati preparati all'interno di *vial* da 4ml a temperatura ambiente e lasciati a riposo per almeno 24 ore; i gel per la reologia sono stati preparati all'interno di capsule Petri in modo da facilitare il prelievo del campione.

- 1) Prelevare e pesare una quantità nota di peptide.
- 2) Aggiungere un volume pari 1ml di solvente, eventualmente ripartendolo secondo la proporzione; laddove necessario aggiungere una quantità in equivalenti di NaOH per favorire la solubilizzazione del peptide nel solvente; .
- 3) Indurre la gelazione tramite: a) cambiamento del pH per aggiunta di una quantità in equivalenti di HCl; b) cambiamento della forza ionica per introduzione di soluzioni saline
- 4) Lasciare a riposo per il tempo necessario alla costituzione del gel.

4.3.1 gelazione del peptide Ac-EFEFE-NH₂

Studio della MGC.

Exp.	% w/v	Mol (mM)	NaOH (μl)	HCl (μl)	Risultato
1	0.1	1.35	4.05	6.05	S
2	0.5	6.75	20.3	30.6	G
3	1	13.51	40.5	60.5	G

Studio della gelazione in presenza di sali.

Exp.	% w/v	Mol (mM)	NaOH (μl)	Sale (μl)	Risultato
1	0.5	6.75	20.3	PBS	S
2	0.5	6.75	20.3	NaCl	S
3	0.5	6.75	20.3	CaCl ₂	S
4	0.5	6.75	20.3	FeCl ₃	S

4.3.2 gelazione del peptide H-WKWEW-OH

Studio della MGC.

Exp.	% w/v	Mol (mM)	Metodo	Risultato
1	0.1	1.2	a	S
2	0.1	1.2	b	S
3	0.1	1.2	c	S
4	0.5	6.0	a	A
5	0.5	6.0	b	A
6	0.5	6.0	c	A
7	1	12.6	a	G
8	1	12.6	b	G
9	1	12.6	c	G

Studio della gelazione in presenza di sali.

Exp.	% m/v	Peso (mg)	H2O (μl)	PBS (μl)	H2O /PBS	NaOH (μl)	HCl (μl)	Metodo	Risultato
1	1	10	-	1000	0/1	-	-	a	S
2	1	5	-	500	0/1	-	-	c	A
3	1	5	250	250	1/1	-	-	c	S
5	1	10	250	250	1/1	18	-	c	G
6	1	10	200	800	1/4	-	-	a	S
7	1	10	800	200	4/1	-	-	a	G
8	1	5	400	100	4/1	-	-	b	G
9	1	5	400	100	4/1	-	-	b	G
10	1	5	400	100	4/1	6	-	a	S
11	1	5	400	100	4/1	6	-	b	G
12	1	5	400	100	4/1	6	-	c	G
13	1	5	400	100	4/1	9	-	c	P
14	1	5	400	100	4/1	12	-	c	S
15	1	5	400	100	4/1	12	-	a	S
16	1	10	900	100	9/1	36	-	c	G
17	1	10	900	100	9/1	-	36	a	G
18	1,5	7,5	250	250	1/1	13.5	-	c	A

4.4 DISPERSIONE DEI NANOTUBI DI CARBONIO

Per generare la dispersione dei nanotubi è stata utilizzata la seguente procedura:

- 1) Preparare 10ml di soluzione stock di peptide allo 0,1% e stabilizzarlo con tre equivalenti di NaOH.
- 2) Prelevare lo 0,05% di nanotubi e aggiungerli alla stock.
- 3) Lasciare la soluzione a sonicare nel bagno a ultrasuoni per un'ora a temperatura costante.
- 4) Centrifugare la soluzione per 45 minuti a temperatura costante a 10000 rpm .
- 5) Prelevare il centrifugato ottenuto e ripetere l'operazione di centrifugazione per due cicli da 20 minuti a 12300 rpm a temperatura costante.
- 6) Prelevare il nuovo centrifugato e riporlo in un vial pulito.

■ BIBLIOGRAFIA

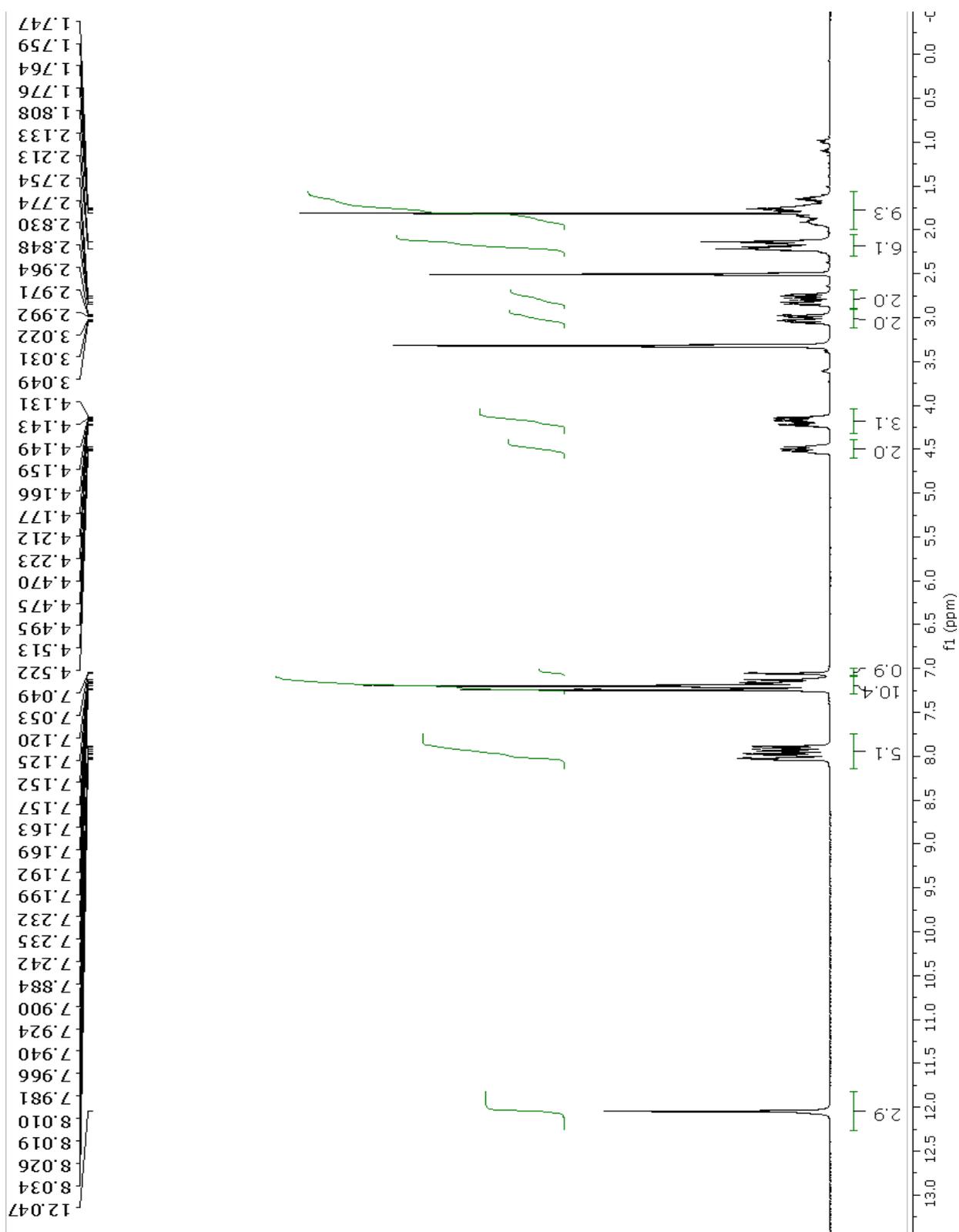
1. Ullah, F., Othman, M. B. H., Javed, F., Ahmad, Z. & Akil, H. M. Classification, processing and application of hydrogels: A review. *Mater. Sci. Eng. C* **57**, 414–433 (2015).
2. Varaprasad, K., Raghavendra, G. M., Jayaramudu, T., Yallapu, M. M. & Sadiku, R. A mini review on hydrogels classification and recent developments in miscellaneous applications. *Mater. Sci. Eng. C* **79**, 958–971 (2017).
3. Laftah, W. A., Hashim, S. & Ibrahim, A. N. Polymer hydrogels: A review. *Polym. - Plast. Technol. Eng.* **50**, 1475–1486 (2011).
4. Zweep, N. & van Esch, J. H. CHAPTER 1. The Design of Molecular Gelators. 1–29 (2013) doi:10.1039/9781849737371-00001.
5. Dong, R., Pang, Y., Su, Y. & Zhu, X. Supramolecular hydrogels: synthesis, properties and their biomedical applications. *Biomater. Sci.* **3**, 937–954 (2015).
6. Du, X., Zhou, J., Shi, J. & Xu, B. Supramolecular Hydrogelators and Hydrogels: From Soft Matter to Molecular Biomaterials. *Chem. Rev.* **115**, 13165–13307 (2015).
7. Panja, S. & Adams, D. J. Stimuli responsive dynamic transformations in supramolecular gels. *Chem. Soc. Rev.* **50**, 5165–5200 (2021).
8. Hoque, J., Sangaj, N. & Varghese, S. Stimuli-Responsive Supramolecular Hydrogels and Their Applications in Regenerative Medicine. *Macromol. Biosci.* **19**, 1–16 (2019).
9. Du, X., Zhou, J. & Xu, B. Supramolecular hydrogels made of basic biological building blocks. *Chem. - An Asian J.* **9**, 1446–1472 (2014).
10. Dasgupta, A., Mondal, J. H. & Das, D. Peptide hydrogels. *RSC Adv.* **3**, 9117–9149 (2013).
11. Fichman, G. & Gazit, E. Self-assembly of short peptides to form hydrogels: Design of building blocks, physical properties and technological applications. *Acta Biomater.* **10**, 1671–1682 (2014).
12. Bhattacharya, S. & Samanta, S. K. Soft-Nanocomposites of Nanoparticles and Nanocarbons with Supramolecular and Polymer Gels and Their Applications. *Chem. Rev.* **116**, 11967–12028 (2016).
13. Adorinni, S., Rozhin, P. & Marchesan, S. Smart hydrogels meet carbon nanomaterials for new frontiers in medicine. *Biomedicines* **9**, 1–22 (2021).
14. Černý, J. & Hobza, P. Non-covalent interactions in biomacromolecules. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **9**, 5291–5303 (2007).

15. Widom, B., Bhimalapuram, P. & Koga, K. The hydrophobic effect. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **5**, 3085–3093 (2003).
16. Southall, N. T., Dill, K. A. & Haymet, A. D. J. A view of the hydrophobic effect. *J. Phys. Chem. B* **106**, 521–533 (2002).
17. Zhuang, W. R. *et al.* Applications of π - π stacking interactions in the design of drug-delivery systems. *J. Control. Release* **294**, 311–326 (2019).
18. Hunter, C. A. & Sanders, J. K. M. The Nature of π - π Interactions. *J. Am. Chem. Soc.* **112**, 5525–5534 (1990).
19. Lopez-Silva, T. L., Leach, D. G., Li, I. C., Wang, X. & Hartgerink, J. D. Self-Assembling Multidomain Peptides: Design and Characterization of Neutral Peptide-Based Materials with pH and Ionic Strength Independent Self-Assembly. *ACS Biomater. Sci. Eng.* **5**, 977–985 (2019).
20. Stendahl, J. C., Rao, M. S., Guler, M. O. & Stupp, S. I. Intermolecular forces in the self-assembly of peptide amphiphile nanofibers. *Adv. Funct. Mater.* **16**, 499–508 (2006).
21. Chen, P. Self-assembly of ionic-complementary peptides: A physicochemical viewpoint. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **261**, 3–24 (2005).
22. Han, C. *et al.* Self-assembling peptide-based hydrogels in angiogenesis. *Int. J. Nanomedicine* **15**, 10257–10269 (2020).
23. Iglesias, D. *et al.* Oxidized Nanocarbons-Tripeptide Supramolecular Hydrogels: Shape Matters! *ACS Nano* **12**, 5530–5538 (2018).
24. Wan, S. *et al.* Self-assembling peptide hydrogel for intervertebral disc tissue engineering. *Acta Biomater.* **46**, 29–40 (2016).
25. Koutsopoulos, S. Self-assembling peptide nanofiber hydrogels in tissue engineering and regenerative medicine: Progress, design guidelines, and applications. *J. Biomed. Mater. Res. - Part A* **104**, 1002–1016 (2016).
26. Science, C. & Assignment, R. Department of Electrical Engineering and Computer Science Massachusetts Institute of Technology Cambridge , Massachusetts 02139. *Electronics* 1–11 (2007).
27. Dai, H. Carbon nanotubes: Opportunities and challenges. *Surf. Sci.* **500**, 218–241 (2002).
28. Saliev, T. The Advances in Biomedical Applications of Carbon Nanotubes. *C* **5**, 29 (2019).
29. Mohanta, D., Patnaik, S., Sood, S. & Das, N. Carbon nanotubes: Evaluation of toxicity at biointerfaces. *J. Pharm. Anal.* **9**, 293–300 (2019).
30. Simon, J., Flahaut, E. & Golzio, M. Overview of carbon nanotubes for

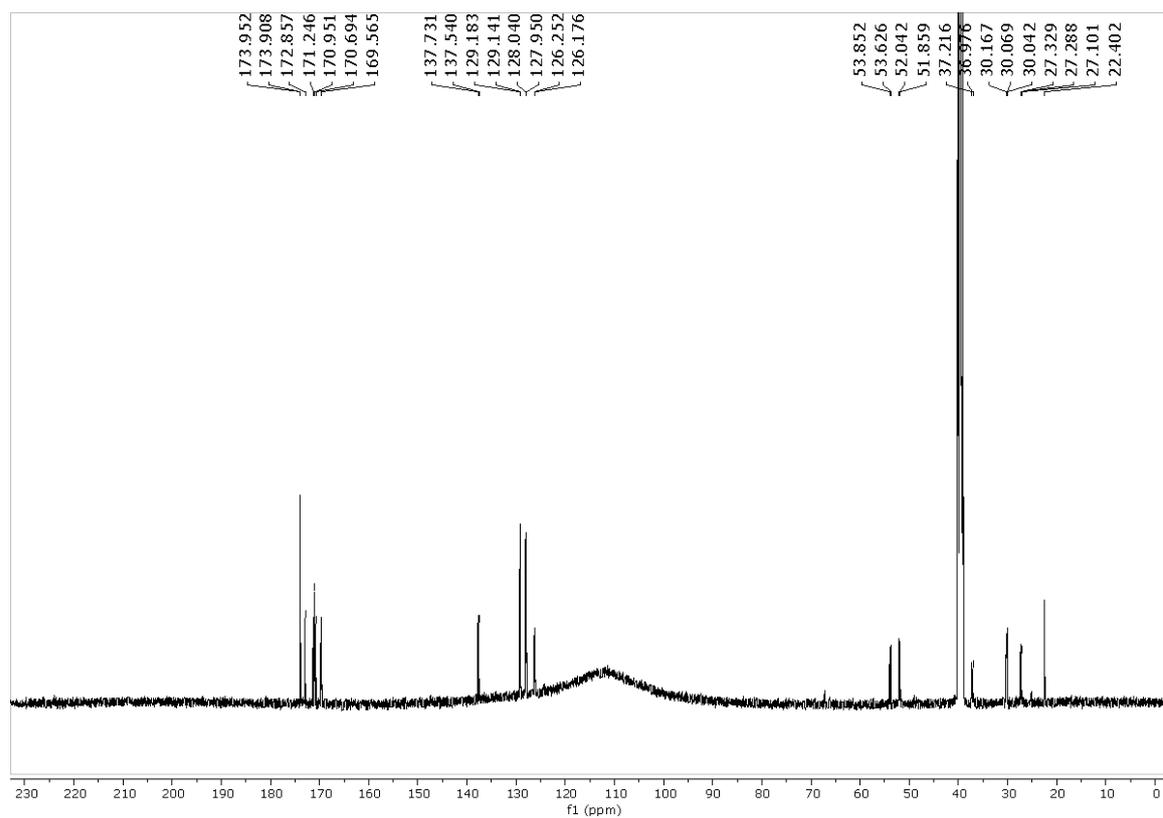
- biomedical applications. *Materials (Basel)*. **12**, 1–21 (2019).
31. Merrifield, R. B. Solid phase peptide synthesis. *Excerpta Med., I.C.S. No.374*, 29–39 (1976).
 32. Kelly, S. M., Jess, T. J. & Price, N. C. How to study proteins by circular dichroism. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* **1751**, 119–139 (2005).
 33. Micsonai, A. *et al.* Accurate secondary structure prediction and fold recognition for circular dichroism spectroscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**, E3095–E3103 (2015).
 34. Fortunato, A. & Mba, M. Metal cation triggered peptide hydrogels and their application in food freshness monitoring and dye adsorption. *Gels* **7**, (2021).
 35. Wang, J. *et al.* Interactions of Glycopolymers with Assemblies of Peptide Amphiphiles via Dynamic Covalent Bonding. *ACS Biomater. Sci. Eng.* **4**, 2061–2066 (2018).
 36. Rapaport, H., Kjaer, K., Jensen, T. R., Leiserowitz, L. & Tirrell, D. A. Two-dimensional order in β -sheet peptide monolayers. *J. Am. Chem. Soc.* **122**, 12523–12529 (2000).
 37. Fortunato, A., Sanzone, A., Mattiello, S., Beverina, L. & Mba, M. The pH- And salt-controlled self-assembly of [1]benzothieno[3,2-b][1]-benzothiophene-peptide conjugates in supramolecular hydrogels. *New J. Chem.* **45**, 13389–13398 (2021).
 38. Xie, H., Becraft, E. J., Baughman, R. H., Dalton, A. B. & Dieckmann, G. R. Ranking the affinity of aromatic residues for carbon nanotubes by using designed surfactant peptides. *J. Pept. Sci.* **14**, 139–151 (2008).
 39. Patel, R. *et al.* Ile-Lys-Val-ala-Val (IKVAV) peptide for neuronal tissue engineering. *Polym. Adv. Technol.* **30**, 4–12 (2019).
 40. Yang, Y. Peptide Global Deprotection/Scavenger-Induced Side Reactions. *Side React. Pept. Synth.* 43–75 (2016) doi:10.1016/B978-0-12-801009-9.00003-3.
 41. Albericio, F., Isidro-Ilobet, A. & Mercedes, A. Amino Acid-Protecting Groups. 2455–2504 (2009).
 42. Cleland, W. W. Dithiothreitol, a New Protective Reagent for SH Groups. *Biochemistry* **3**, 480–482 (1964).

■ APPENDICE

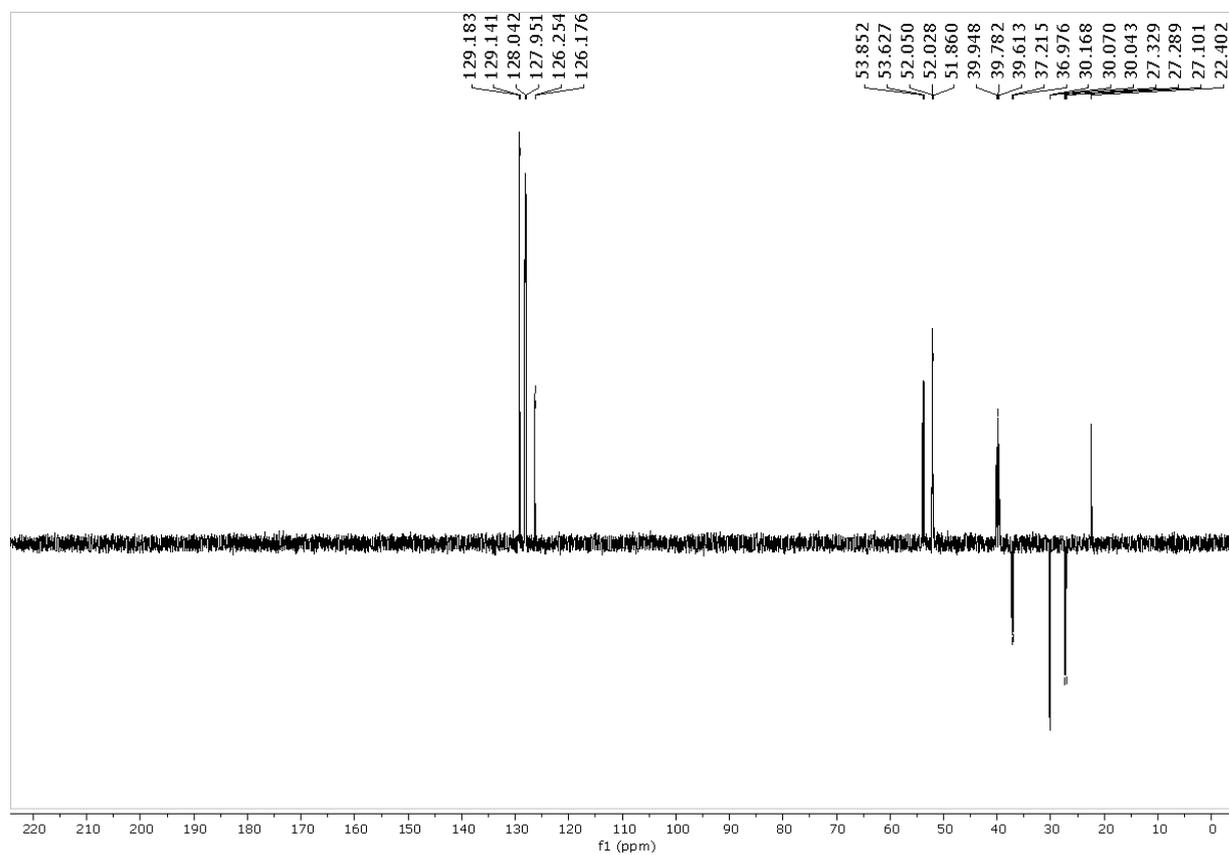
EFEFE: 1H-NMR (500 Hz; DMSO-d₆)



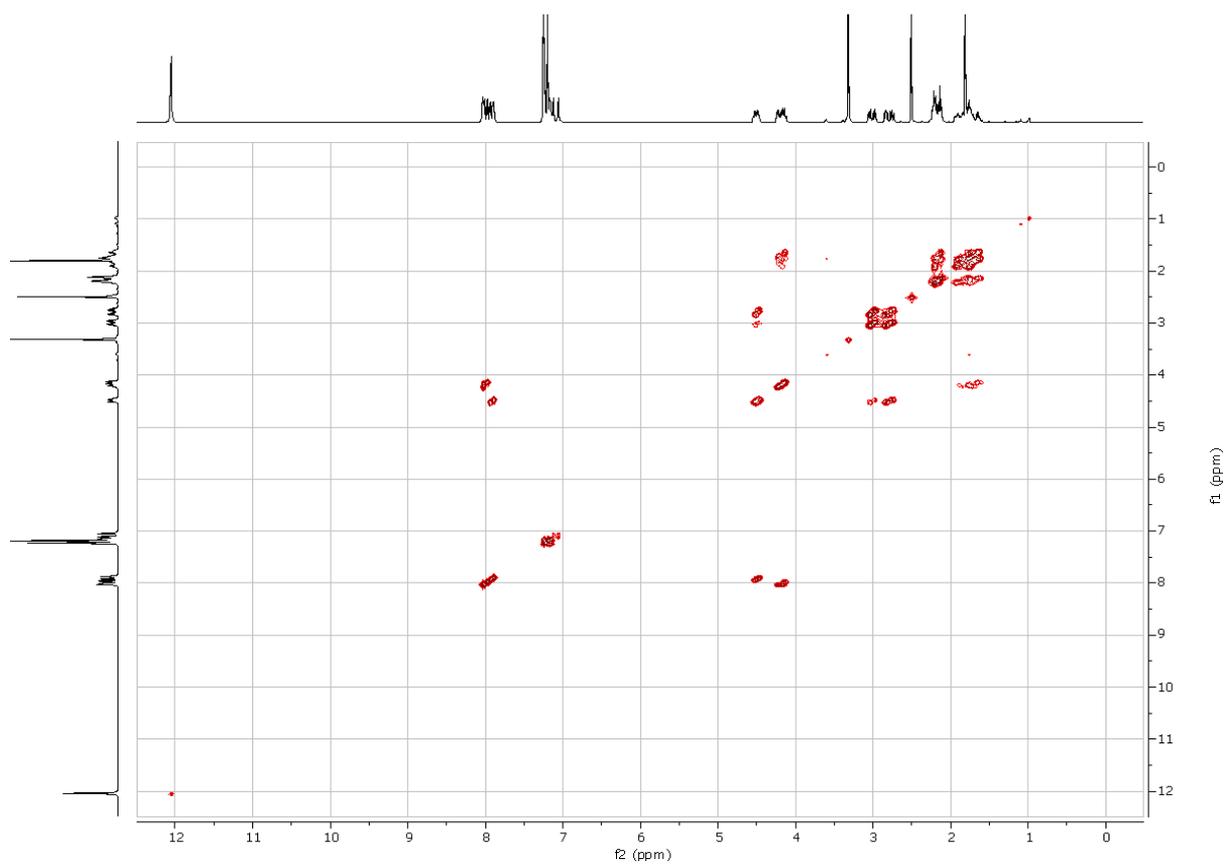
EFEFE: 13C-NMR (125 MHz; DMSO- d₆)



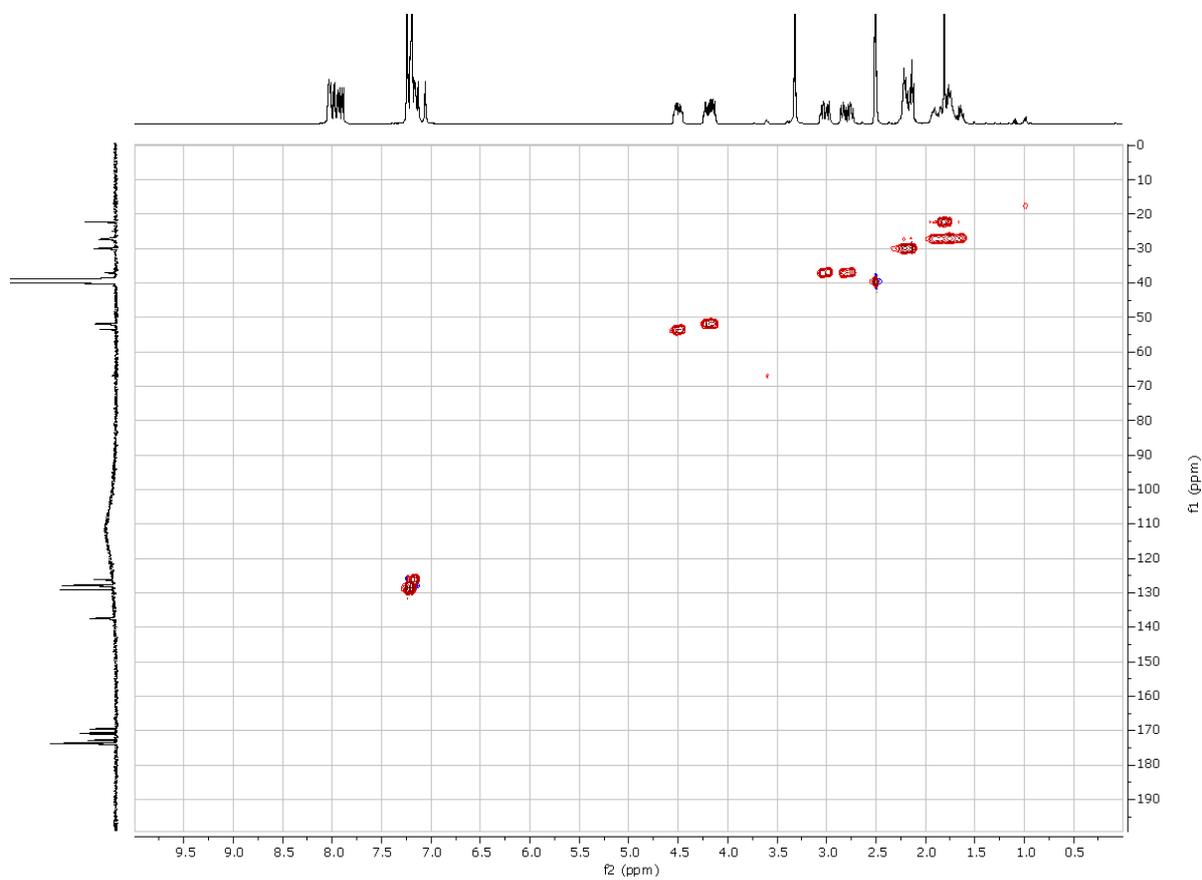
EFEFE: DEPT 135 (500 Hz; DMSO-d₆)



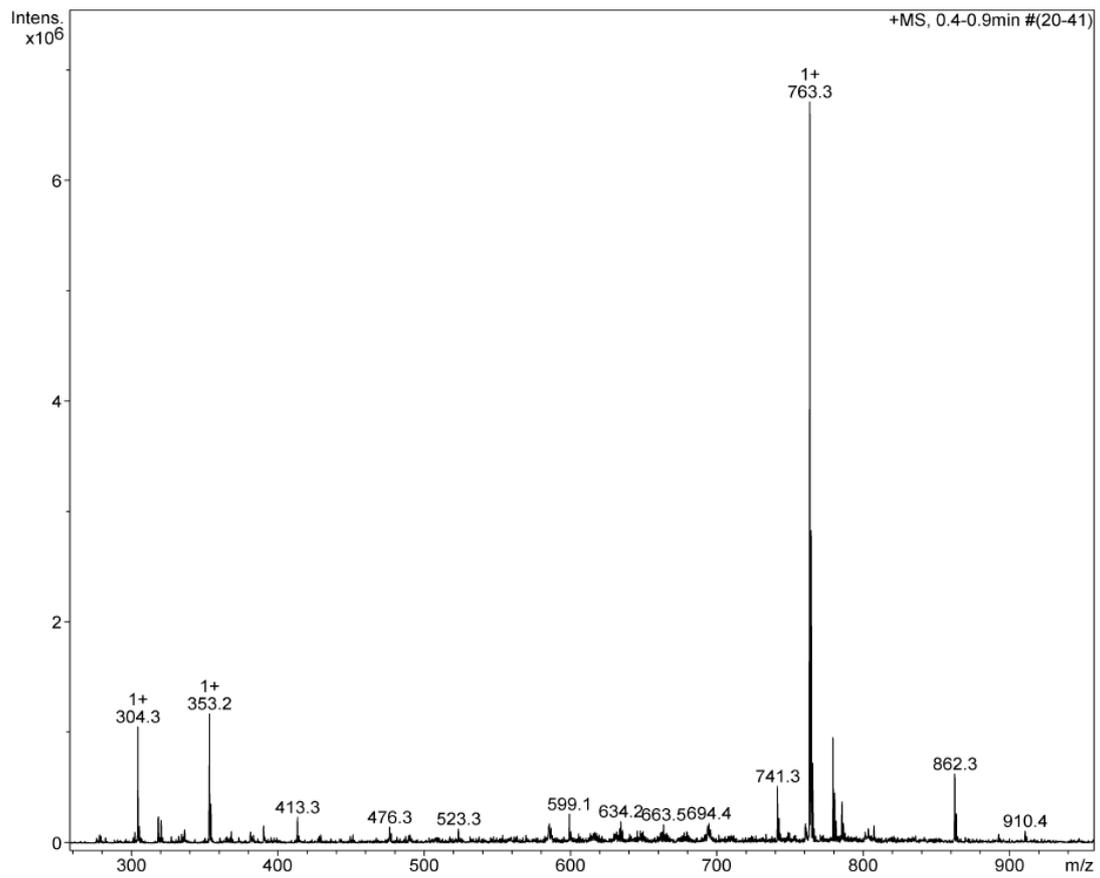
EFEFE: COSY (500 Hz; DMSO- d₆)



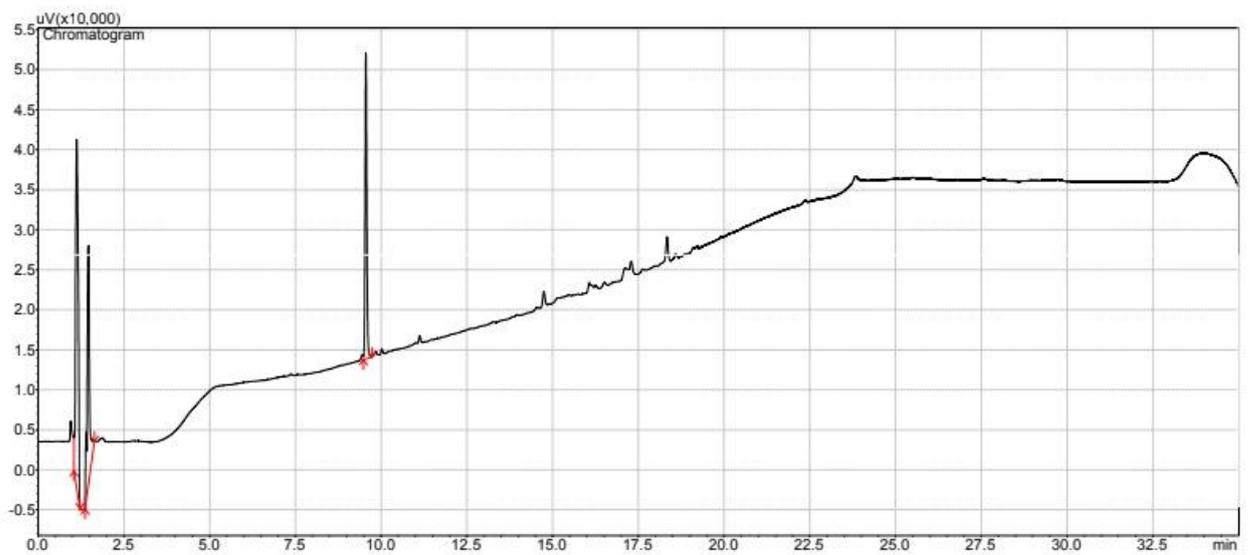
EFEFE: HSQC



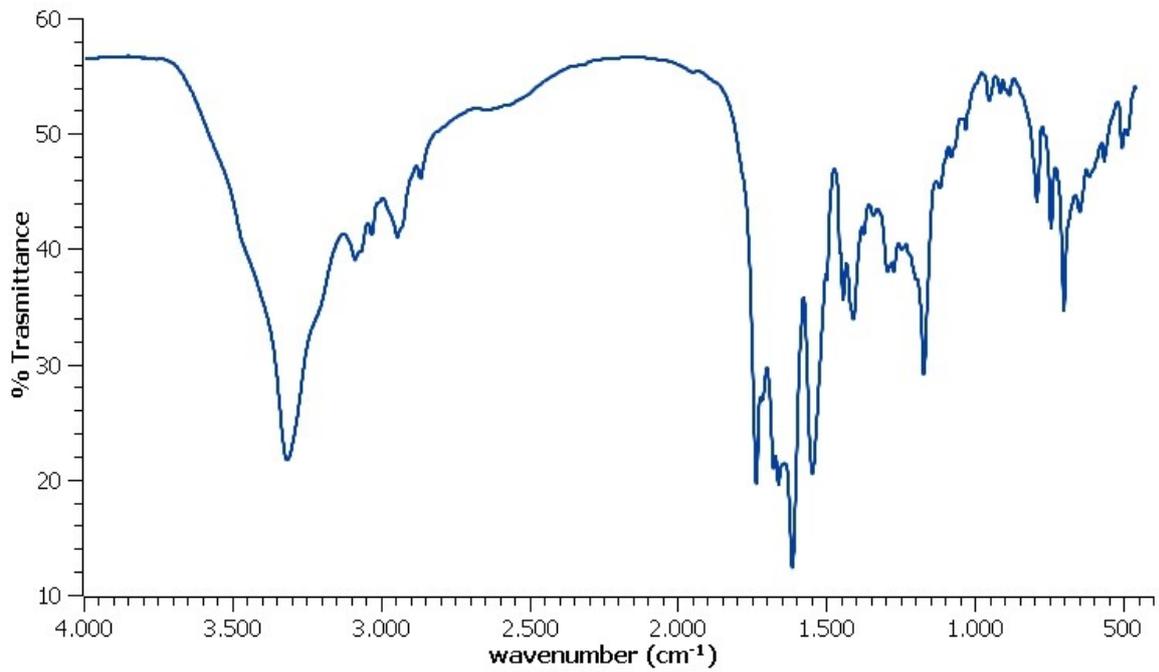
EFEFE: ESI-MS



EFEFE: HPLC



EFEFE: FT-IR (Pastiglia KBr)

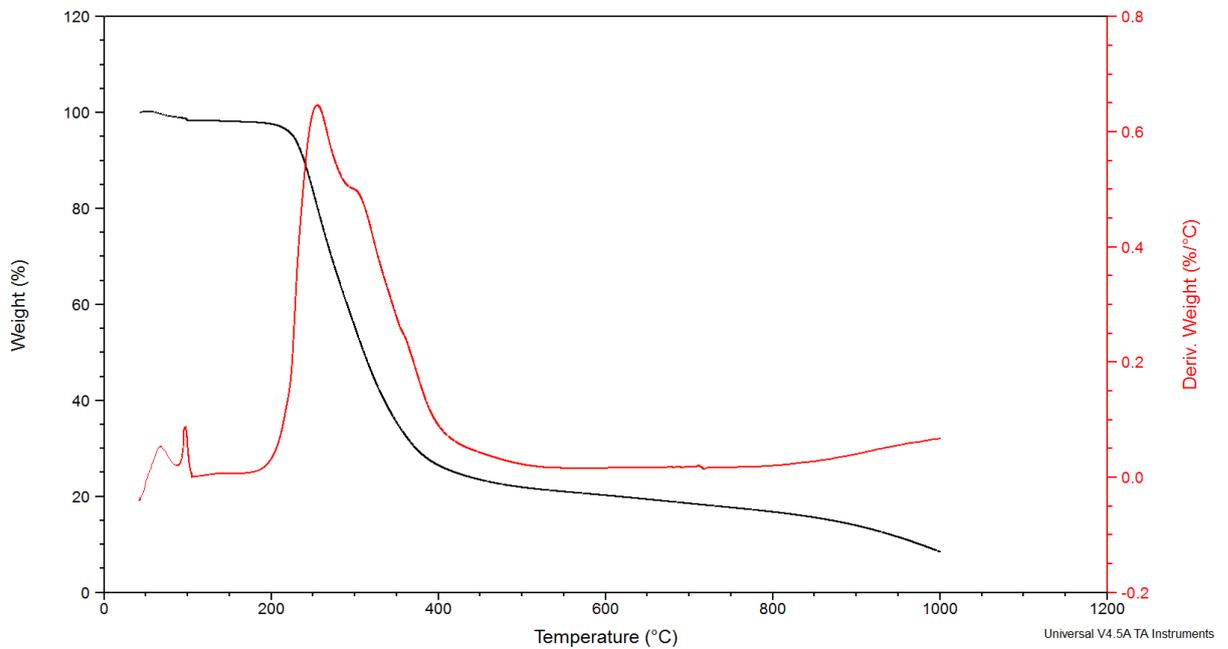


EFEFE: TGA

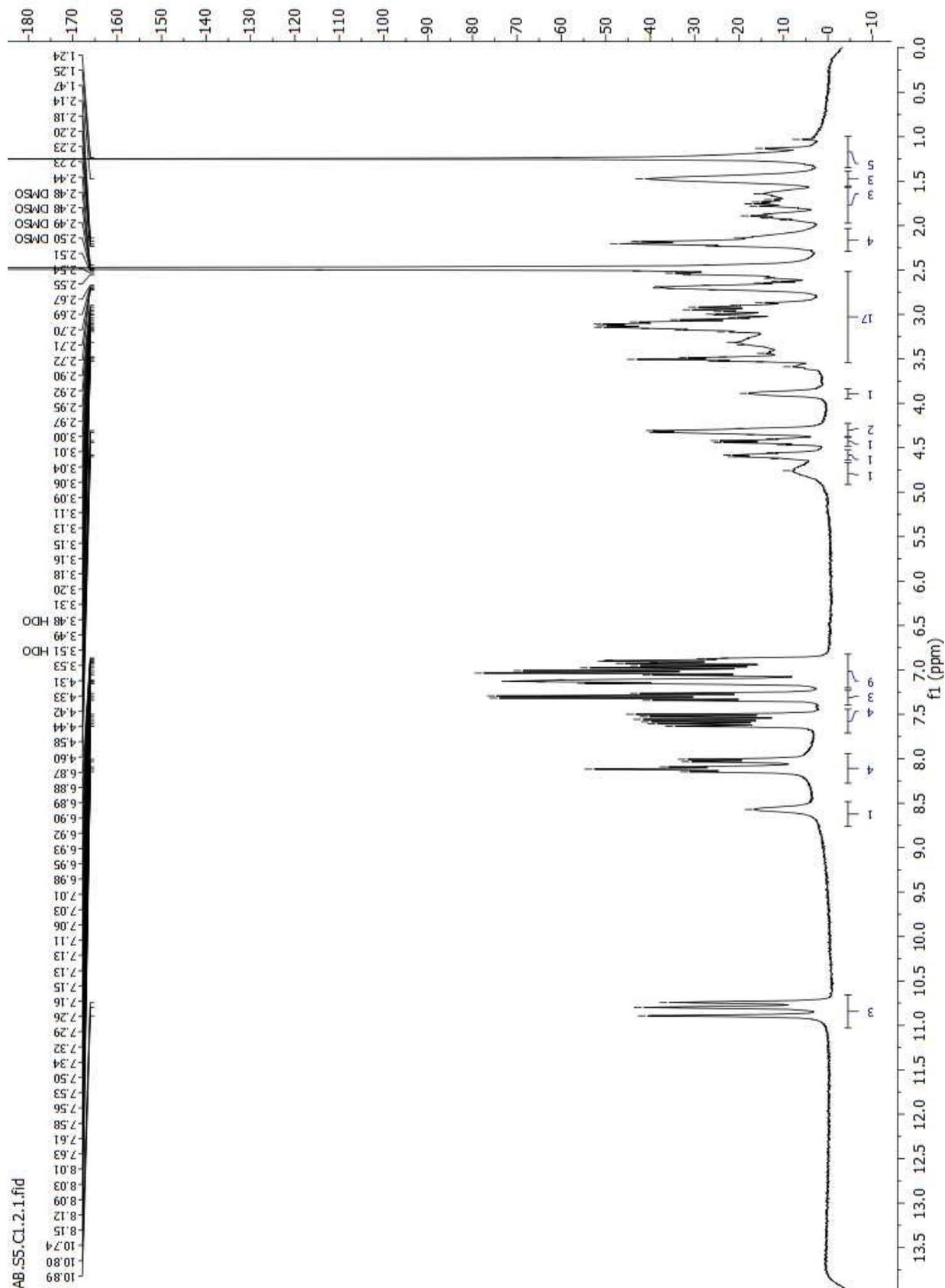
Sample: AB-EFEFE
Size: 4.7080 mg
Method: Miriam generale HT
Comment: AB-EFEFE

TGA

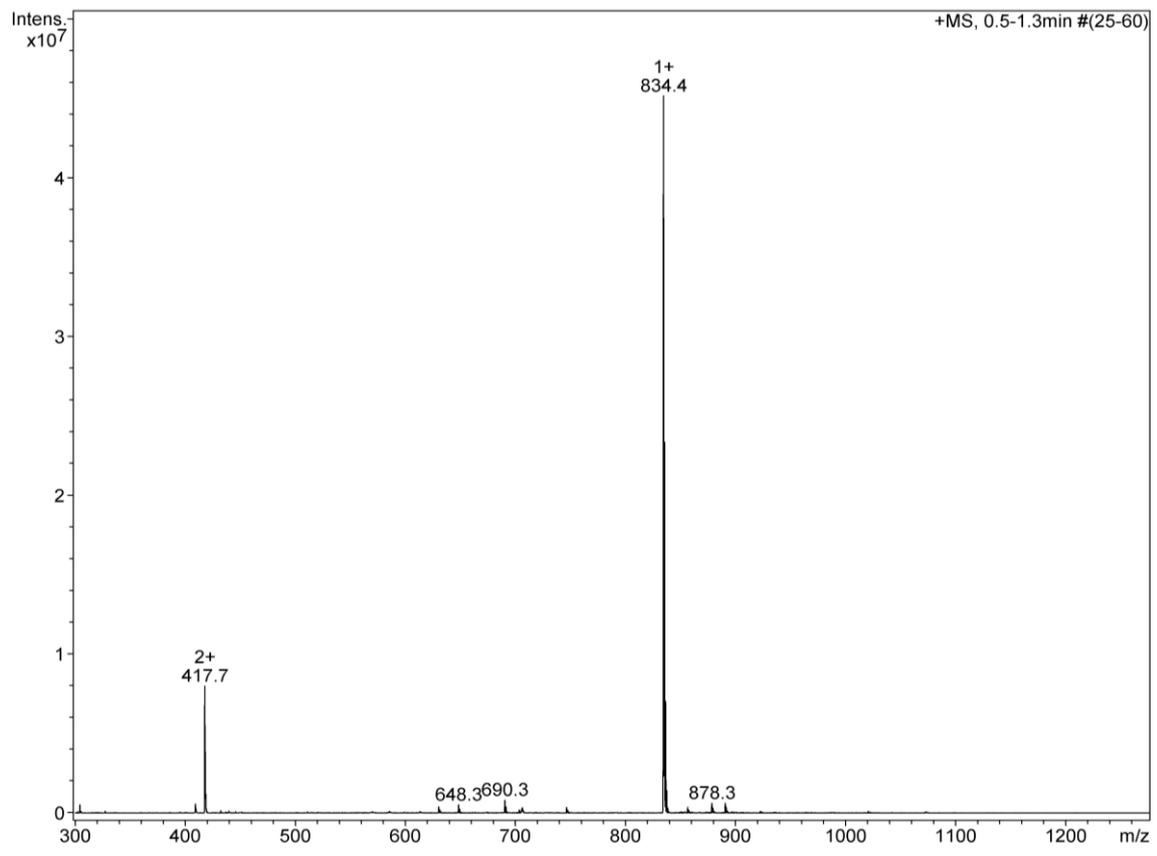
File: C:\...Anna Fortunato\AB-EFEFE.001
Operator: Miriam Mba
Run Date: 27-Jan-2022 14:16
Instrument: TGA Q5000 V3.17 Build 265



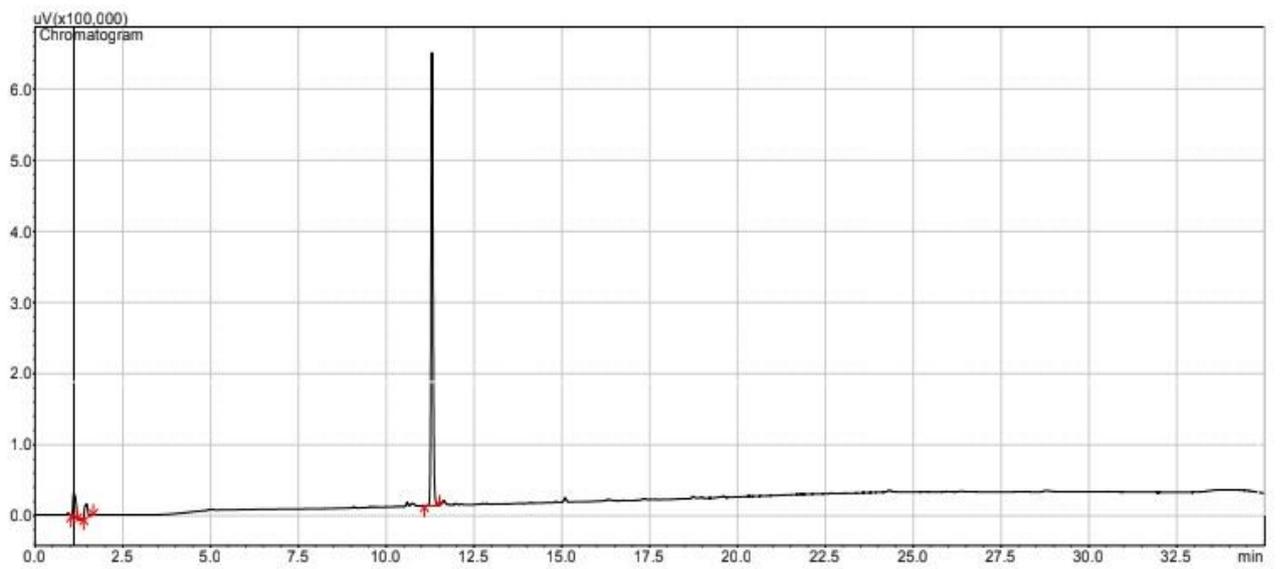
WKWEW: NMR (300Hz; DMSO-d₆)



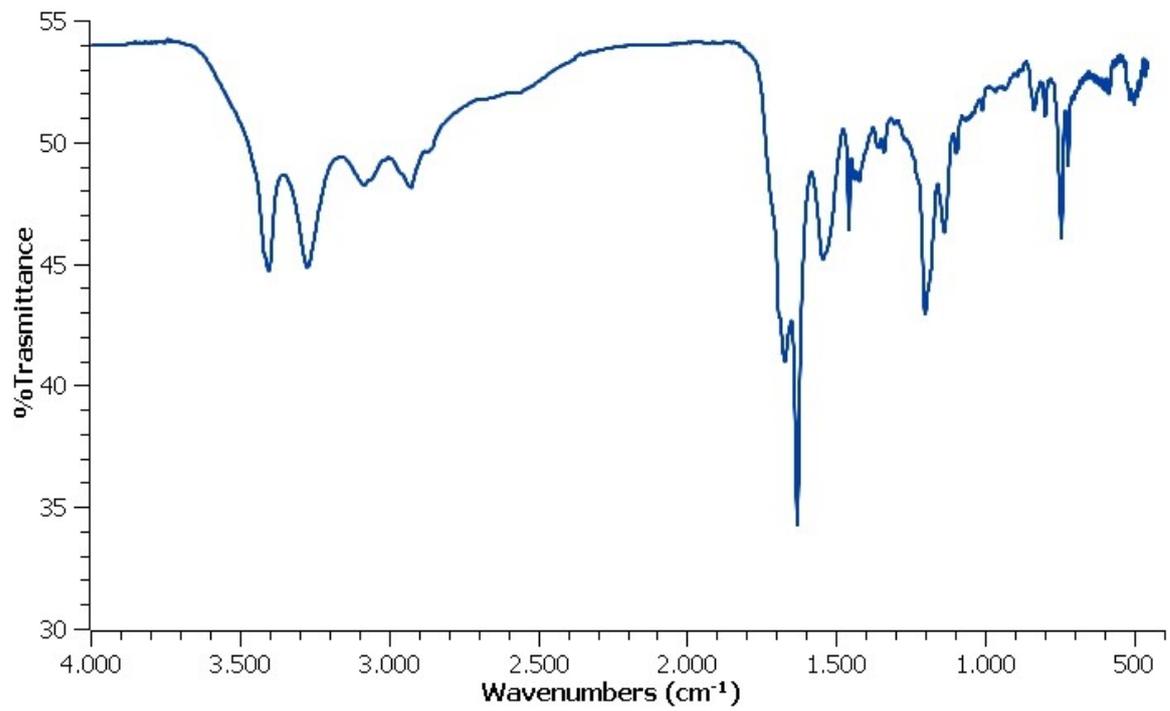
WKWEW: ESI-MS



WKWEW: HPLC



WKWEW: FT-IR

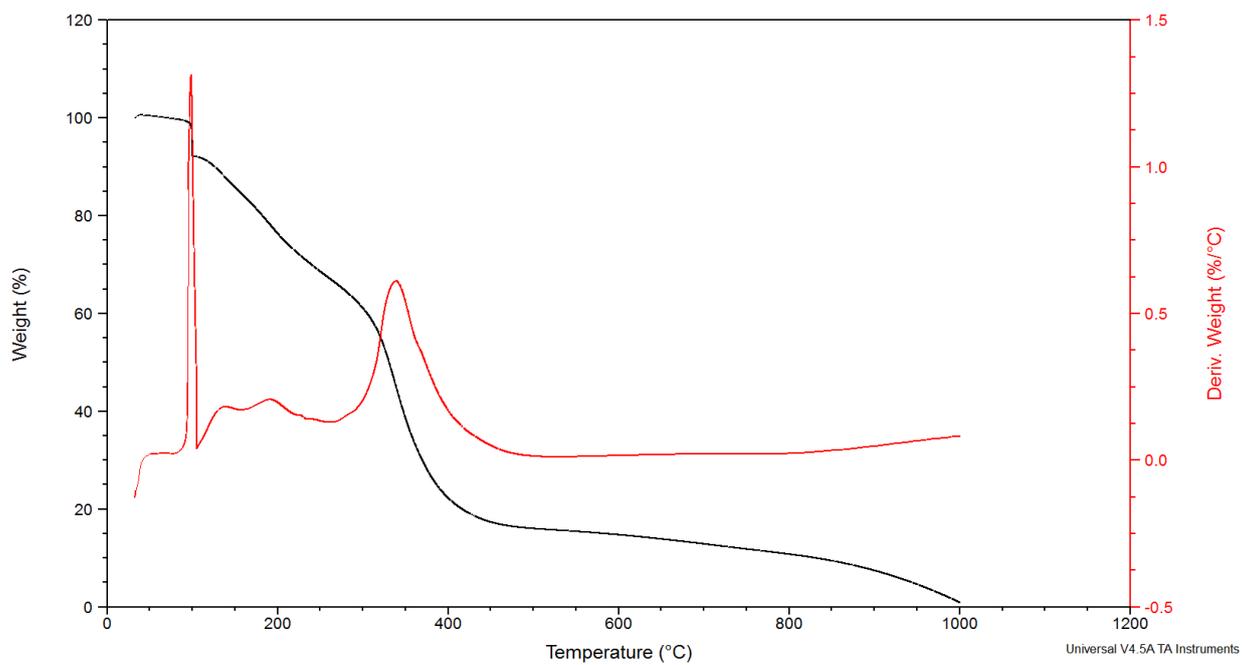


WKWEW: TGA

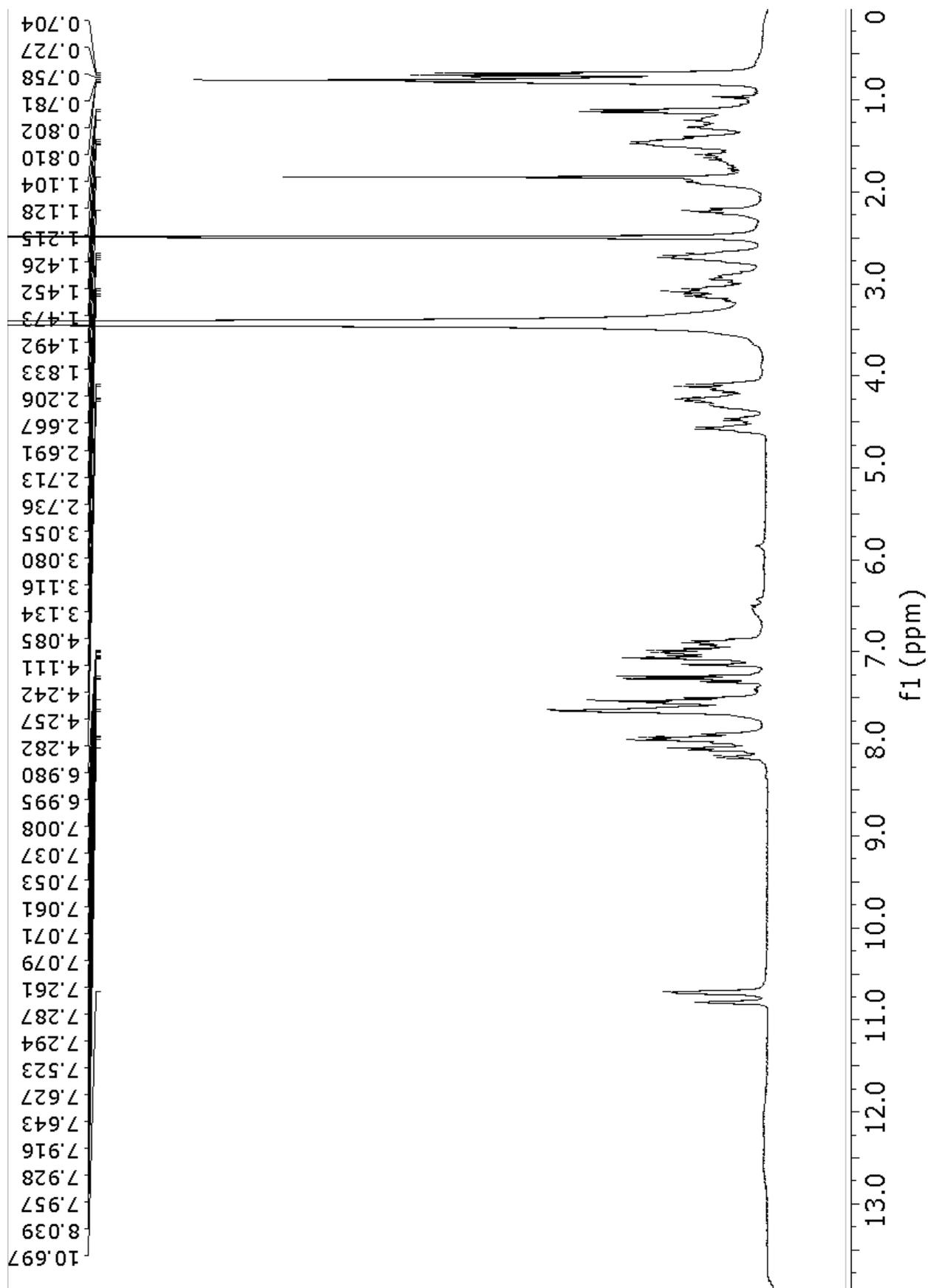
Sample: AB-WKWEW
Size: 2.9560 mg
Method: Miriam generale HT
Comment: AB-WKWEW

TGA

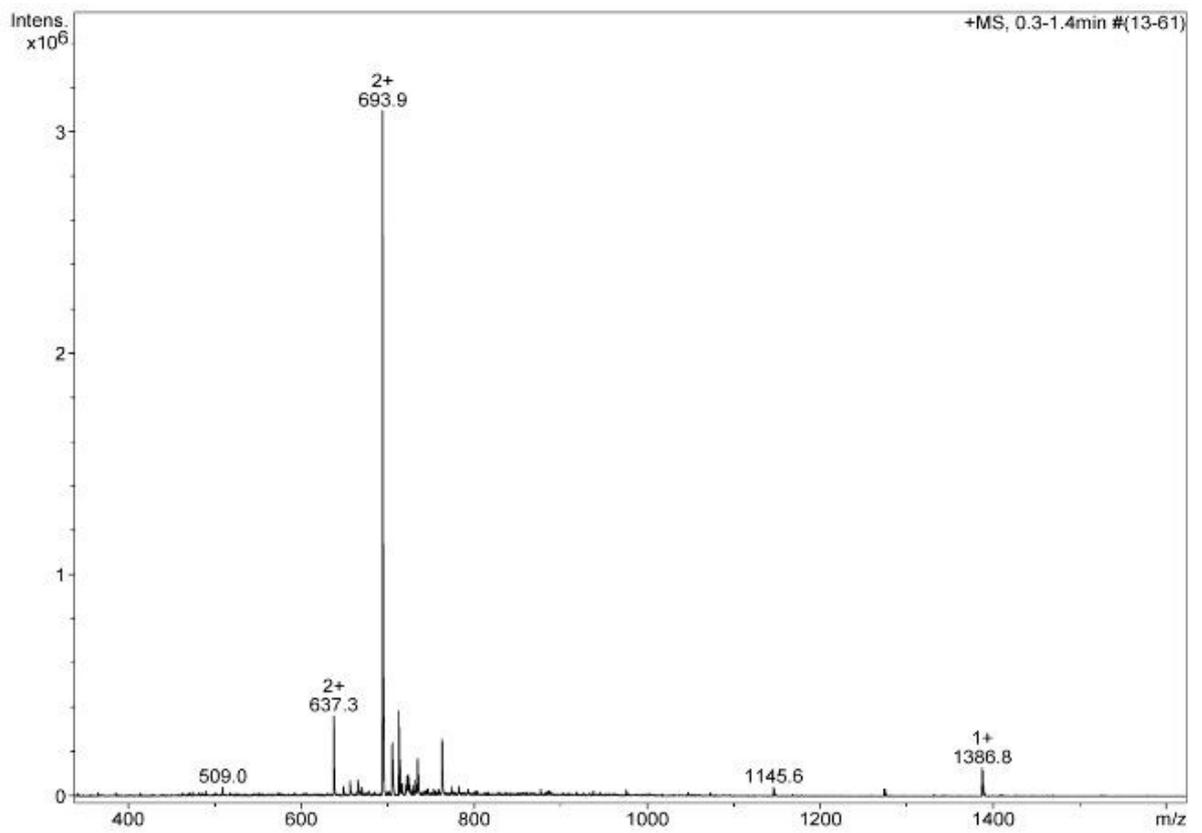
File: C:\...Anna Fortunato\AB-WKWEW.001
Operator: Miriam Mba
Run Date: 27-Jan-2022 11:59
Instrument: TGA Q5000 V3.17 Build 265



IKVAVWKWEW: NMR (300Hz; DMSO-d₆)



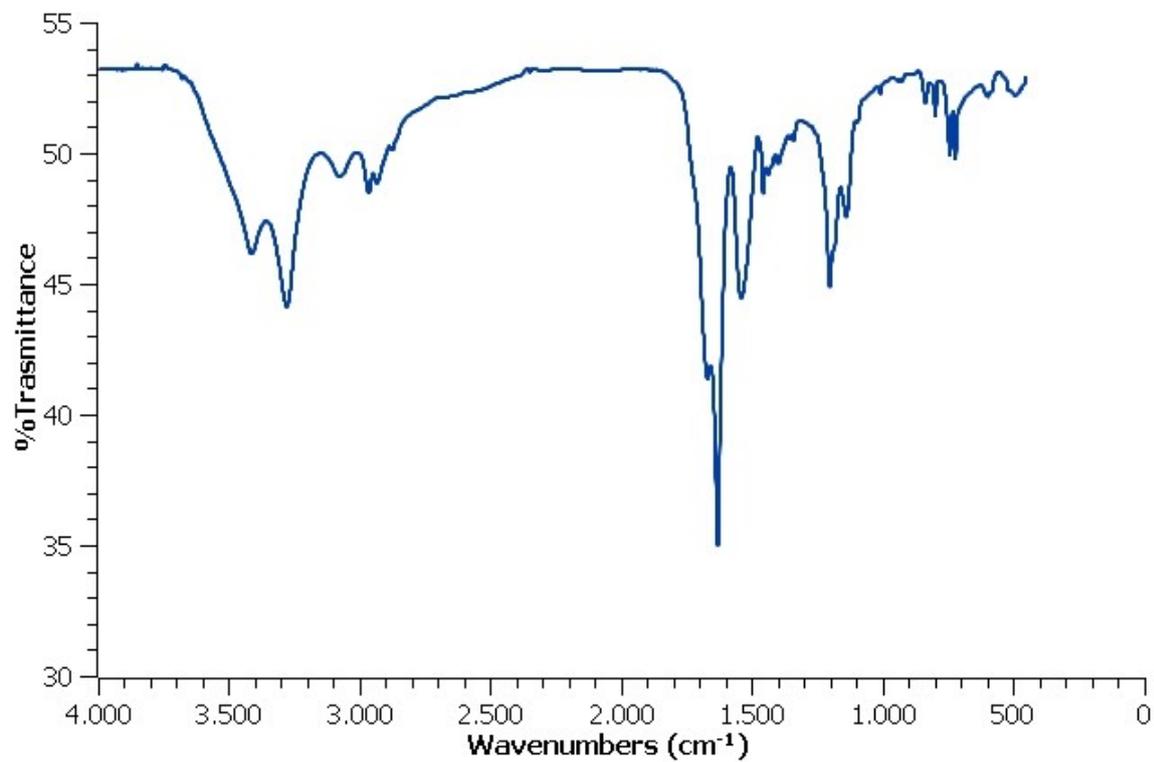
IKVAVWKWEW: ESI-MS



IKVAVWKWEW: HPLC



IKVAVWKWEW: FT-IR



IKVAVWKWEW: TGA

Sample: AB-IKVAV
Size: 1.4540 mg
Method: Miriam generale HT
Comment: AB-IKVAV

TGA

File: C:\...Anna Fortunato\AB-IKVAV.001
Operator: Miriam Mba
Run Date: 27-Jan-2022 17:17
Instrument: TGA Q5000 V3.17 Build 265

