



**Politecnico
di Torino**

Politecnico di Torino

Corso di Laurea Magistrale in Ingegneria Biomedica

A.A. 2024/2025

Sessione di Laurea Ottobre 2025

Sviluppo di particelle core-shell piezoelettriche e bioattive tramite metodo sol-gel

Relatrice:
Prof.ssa Marta Miola

Candidato:
Angelo Leo s281928

Correlatrice:
Prof.ssa Enrica Verne'

Ringraziamenti

Un ringraziamento alla relatrice, Prof.ssa Marta Miola,
alla correlatrice, Prof.ssa Enrica Verne', al dottorando e collega di sintesi Kevin Pontillo
e a tutte le persone conosciute all'interno del Gruppo Glance per la disponibilità e il supporto
durante questo lavoro di tesi.

Un ringraziamento particolare alla mia famiglia, agli amici torinesi e calabresi
che sono stati al mio fianco in questi anni.

Un ringraziamento anche a tutte le persone di buon animo e cuore, per avermi fatto capire
chi voglio essere, oltre ad un uomo di scienza.

Infine, una dedica a tutti quei bambini privati dei loro sogni
a causa delle guerre in corso.

Sommario

Figure	iv
Tabelle	ix
Abbreviazioni	x
Abstract (versione italiana)	xi
Abstract (english version).....	xii
1. Introduzione	1
1.1 Il tessuto osseo.....	3
1.2 Ingegneria del tessuto osseo	6
1.2.1 Biomateriali	8
1.3 Biomateriali bioattivi.....	12
1.3.1 Idrossiapatite.....	13
1.3.2 Vetri bioattivi.....	14
1.3.3 Vetroceramici bioattivi	18
1.3.4 Compositi bioattivi	19
1.4 Metodi di sintesi di vetri e vetroceramici bioattivi.....	21
1.4.1 Metodo melt-quencing	22
1.4.2 Metodo sol-gel.....	22
1.5 Sintesi di micro- e nano- particelle di vetro bioattivo	28
1.5.1 Processo Stober.....	28
1.5.2 Processo Stober modificato.....	33
1.6 Coating di silice o vetro bioattivo su particelle di natura diversa.....	35
1.7 Piezoelettricità	36
1.7.1 Materiali dielettrici, piezoelettrici, piroelettrici e ferroelettrici	36
1.7.2 Teoria e basi del fenomeno della piezoelettricità	39
1.7.3 Tipologie di biomateriali piezoelettrici.....	43
1.7.4 Bio-piezoelettricità nel tessuto osseo	45
1.8 Titanato di bario.....	48
1.9 Ossido di zinco.....	53
1.9.1 Proprietà piezoelettriche delle nanostrutture di ossido di zinco	57
1.9.2 Piezoelettricità dell'ossido di zinco per l'ingegneria del tessuto osseo	60
1.10 Materiali bioattivi e piezoelettrici: stato dell'arte.....	64
1.10.1 Titanato di bario.....	65
1.10.2 Ossido di zinco.....	80

2. Materiali e metodi.....	89
2.1 Titanato di bario.....	89
2.1.1 Sintesi delle particelle core-shell di BTO-BG	89
2.2 Ossido di zinco.....	98
2.2.1 Sintesi delle particelle core-shell di ZnO-BG	98
2.3 Caratterizzazioni.....	100
2.3.1 Morfologia e composizione: FE-SEM/EDS.....	100
2.3.2 Chimica superficiale: FTIR-ATR	102
2.3.3 Bioattività: test di immersione in SBF	107
3. Risultati e discussione.....	109
3.1 Titanato di bario.....	109
3.1.1 Morfologia e composizione: FE-SEM/EDS.....	109
3.1.2 Chimica superficiale: FTIR-ATR	125
3.1.3 Bioattività: test di immersione in SBF	129
3.2 Ossido di zinco.....	135
3.2.1 Morfologia e composizione: FE-SEM/EDS.....	135
3.2.2 Chimica superficiale: FTIR-ATR	140
4. Conclusioni.....	142
Bibliografia	145

Figure

Figura 1. Elementi chiave nell'ingegneria del tessuto osseo [18].	8
Figura 2. Confronto tra una struttura di silice cristallina (a) e vetrosa (b) (sono rappresentati solo tre atomi di ossigeno per tetraedro SiO_4 , con il quarto che giace al di sopra o al di sotto del piano dell'immagine) [30].	14
Figura 3. Grafico che mostra come la bioattività di un vetro e vetroceramico bioattivo dipenda dalla sua composizione (wt%), a seconda della regione si ha un comportamento diverso [20].	16
Figura 4. Sequenza di reazioni interfacciali alla base del legame tra tessuto osseo e vetro bioattivo impiantato [20].	17
Figura 5. Principali tipi di compositi basati su vetri bioattivi, con la loro morfologia, composizione e proprietà finali [35].	20
Figura 6. Schema riassuntivo dei due principali metodi di sintesi di un vetro bioattivo, mettendo in evidenza i vari passaggi [36].	21
Figura 7. Schema illustrativo del metodo sol-gel: viene messa in evidenza l'organizzazione delle unità strutturali di silice in soluzione e le reazioni di idrolisi e condensazione [40].	25
Figura 8. Grafico che mostra l'effetto del pH sulla crescita e formazione del gel durante la sintesi sol-gel [38].	27
Figura 9. Influenza del pH e del tipo di catalisi sulla morfologia di un vetro sol-gel a base silice [40].	27
Figura 10. Immagine SEM di particelle colloidali di silice ottenute tramite processo Stober [37].	29
Figura 11. Illustrazione dei diversi modelli teorici sviluppati per spiegare la nucleazione e crescita delle particelle colloidali di silice: A) monomer-addition model, B) aggregation-only model, C) in situ seeded growth model [50], [51].	30
Figura 12. Effetto della concentrazione di TEOS sulla dimensione delle particelle di silice sintetizzate [50].	31
Figura 13. Dimensione delle particelle di silice colloidali sintetizzate in funzione delle concentrazioni di acqua e ammoniaca, considerando una concentrazione fissa di TEOS pari a 0.28 M [48].	32
Figura 14. Esempio di nanoparticelle di vetro bioattivo a sistema ternario $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$ sintetizzate tramite processo Stober modificato [53].	34
Figura 15. Rappresentazione del processo di poling su un materiale ferroelettrico ed effetto sui domini elettrici: a) stato iniziale, b) stato di polarizzazione di saturazione, c) stato di polarizzazione residua [60].	38
Figura 16. Rappresentazione insiemistica dei diversi materiali dielettrici e classi cristallografiche.	39
Figura 17. Illustrazione raffigurante l'effetto piezoelettrico diretto (a) e inverso (b), nel caso bidimensionale [60].	41
Figura 18. Effetto della compressione meccanica sull'organizzazione strutturale di un materiale cristallino: sono rappresentati in 2D il reticolo cristallino e la cella unitaria, mettendo in evidenza gli ioni e i centri di carica positiva e negativa [56].	42
Figura 19. Strutture cristalline di tipo perovskite nel BTO (A) e di tipo wurtzite nel ZnO (B) [61],[68].	45
Figura 20. Impiego di uno scaffold piezoelettrico nell'ingegneria tissutale per la riparazione e rigenerazione di tessuto osseo o cartilagineo danneggiati [73].	47
Figura 21. Cella unitaria del BTO e transizioni di fase con la temperatura: la fase cubica è paraelettrica mentre le fasi tetragonale, ortorombica e romboedrica sono ferroelettriche [74].	49

Figura 22. Struttura cristallina esagonale dello ZnO: in grigio sono indicati gli anioni ossigeno mentre in blu i cationi zinco, c ed a invece sono i parametri reticolari [90].	54
Figura 23. Immagini SEM e TEM che mostrano le seguenti morfologie nanostrutturali 0D: a) quantum dots, b&c) nanosfere [90].	55
Figura 24. Immagini SEM e TEM che mostrano le seguenti morfologie nanostrutturali 1D: a) nanorods, b) nanobelts, c) nanoring, d) nanocombs, e) nanohelices e f) nanotube [90].	56
Figura 25. Immagini SEM e TEM che mostrano le seguenti morfologie nanostrutturali 2D: a) nanodisks, b) nanowhiskers, c) nanoplates esagonali, d) nanosheets porosi, e) nanosheets ultrafini e f) nanowalls [90].	56
Figura 26. Immagini SEM e TEM che mostrano le seguenti morfologie nanostrutturali 3D: a&b) morfologia a fiore a base di nanosheets, c&d) microsfele mesoporose, e) morfologia a fiore a base di nanorods e f) nanostruttura 3D a base di nanosheets e nanorods [90].	56
Figura 27. Andamento del coefficiente piezoelettrico d_{33} del PENG composito in funzione dell'aspect ratio delle nanostrutture di ZnO utilizzate come riempitivo piezoelettrico. Si considera una concentrazione di ZnO pari a 50 wt% [96].	60
Figura 28. Principali risultati del lavoro di Zhou et al. (2025) [100]: effetto del contenuto di ZnO (wt%) su a&b) performance piezoelettrica della membrana composita PLLA-ZnO, c) sulla vitalità cellulare nel tempo.	63
Figura 29. Processo di fabbricazione utilizzato da C.Polley et al. [101] per la realizzazione dello scaffold composito piezoelettrico e bioattivo a base di microparticelle di BTO e BG 45S5, miscelate allo stato solido.	66
Figura 30. Alcuni dei risultati principali del lavoro di C.Polley et al. [101], confrontando le due diverse composizioni BTO5BG e BTO15BG: A) proprietà meccaniche e in particolare resistenza a compressione, B) coefficiente piezoelettrico d_{33} e C) analisi SEM dei campioni in seguito a test di bioattività in SBF per 28 giorni.	66
Figura 31. Rappresentazione grafica dell'effetto della temperatura di sinterizzazione sul coefficiente piezoelettrico d_{33} . Il confronto avviene tra i tre campioni: BTO puro, BTO2.5BG e BTO5BG [102].	67
Figura 32. Schema illustrativo del processo di rivestimento di NPs di BTO tramite processo Stober modificato. Sono evidenziati i parametri di sintesi e la loro influenza sulla morfologia delle particelle core-shell, sul grado di aggregazione dei core e sullo spessore dello shell [85].	69
Figura 33. Immagine TEM raffigurante le NPs core-shell di BTO-SiO ₂ sintetizzate da Y. Zhang et al. [105]. Nel caso specifico il contenuto di SiO ₂ è pari a 8 wt% e lo shell ha uno spessore di circa 12 nm.	71
Figura 34. Protocollo di sintesi utilizzato da B. Hoomehr et al. [107] per sintetizzare NPs core-shell BG-ZrO ₂ , tramite metodo sol-gel e trattamento ad ultrasuoni. Si ottiene un design core-shell invertito, in cui la fase bioattiva rappresenta il core.	73
Figura 35. Immagini TEM raffiguranti le NPs core-shell BTO-BG (SiO ₂ -CaO) ottenute. Si può notare che all'aumentare del contenuto di BG aumenta lo spessore dello shell: A2) BG 5 wt%, B2) BG 10 wt%, C2) BG 15 wt%.	75
Figura 36. Immagini SEM effettuate sui rivestimenti a base di micropolveri composite BG 45S5-ZnO, in seguito a test di immersione in SBF a 28 giorni: a) substrato in acciaio inox 316L, b) substrato rivestito con polveri di composizione BG-10ZnO e c) substrato rivestito con polveri di composizione BG-20ZnO [109].	80
Figura 37. Protocollo di sintesi utilizzato da L. Qomariyah et al. [110] per sintetizzare NPs core-shell di ZnO-SiO ₂ .	81
Figura 38. Immagini TEM raffiguranti le NPs core-shell ZnO-SiO ₂ preparate variando il rapporto molare SiO ₂ :ZnO [110].	82
Figura 39. Protocollo di sintesi adottato da M. Ramasamy et al. [111] per sintetizzare NPs core-shell di ZnO-SiO ₂ , utilizzando un metodo sol-gel assistito da ultrasuoni.	83
Figura 40. Immagini SEM raffiguranti: a) NPs di ZnO e b) NPs core-shell ZnO-BG [113].	84

Figura 41. Spettro FTIR di riferimento relativo a NPs di pura silice (immagine adattata dal lavoro di K. Panwar et al. [114]).	103
Figura 42. Analisi FTIR condotta su micro- e nano-particelle di BG 45S5 per valutare modifiche della chimica superficiale al variare del tempo di immersione in SBF [116] (immagine adattata).	104
Figura 43. Immagini FESEM delle micropolveri di BTO di partenza, ad ingrandimenti crescenti (2000x, 10000x, 50000x).	110
Figura 44. Spettro EDS delle micropolveri di BTO di partenza.	110
Figura 45. Immagini FESEM del campione BTO TEOS Tamb (sintesi n.1), ad ingrandimenti crescenti (2000x, 10000x, 50000x).	111
Figura 46. Spettro EDS a sinistra e analisi composizionale a destra del campione BTO TEOS Tamb (sintesi n.1).	111
Figura 47. Immagini FESEM del campione BTO TEOS 40 (sintesi n.1), ad ingrandimenti crescenti (2000x, 10000x, 50000x).	112
Figura 48. Spettro EDS a sinistra e analisi composizionale a destra del campione BTO TEOS 40 (sintesi n.1).	112
Figura 49. Immagini FESEM del campione BTO AA TEOS Tamb (sintesi n.2), ad ingrandimenti crescenti (2000x, 10000x, 50000x).	113
Figura 50. Spettro EDS a sinistra e analisi composizionale a destra del campione BTO AA TEOS Tamb (sintesi n.2).	114
Figura 51. Immagini FESEM del campione BTO AA TEOS 40 (sintesi n.2), ad ingrandimenti crescenti (2000x, 10000x, 50000x).	114
Figura 52. Spettro EDS a sinistra e analisi composizionale a destra del campione BTO AA TEOS 40 (sintesi n.2).	115
Figura 53. Immagini FESEM del campione BTO AA TEOS TEP CN Tamb NTT (sintesi n.3), ad ingrandimenti crescenti (2000x, 10000x, 50000x).	116
Figura 54. Spettro EDS a sinistra e analisi composizionale a destra del campione BTO AA TEOS TEP CN Tamb NTT (sintesi n.3).	116
Figura 55. Immagini FESEM del campione BTO AA TEOS TEP CN Tamb TT (sintesi n.3), ad ingrandimenti crescenti (2000x, 10000x, 50000x).	117
Figura 56. Immagini FESEM del campione BTO AA TEOS TEP CN 40 NTT (sintesi n.4), ad ingrandimenti crescenti (2000x, 10000x, 50000x).	118
Figura 57. Spettro EDS a sinistra e analisi composizionale a destra del campione BTO AA TEOS TEP CN 40 NTT (sintesi n.4).	119
Figura 58. Immagini FESEM del campione BTO AA TEOS TEP CN 40 TT (sintesi n.4), ad ingrandimenti crescenti (2000x, 10000x, 50000x).	119
Figura 59. Spettro EDS a sinistra e analisi composizionale a destra del campione BTO AA TEOS TEP CN 40 TT (sintesi n.4).	120
Figura 60. Spettro EDS a sinistra e analisi composizionale a destra del campione BTO AA TEOS Tamb 0.5g (sintesi n.5).	121
Figura 61. Spettro EDS a sinistra e analisi composizionale a destra del campione BTO AA TEOS 40 0.5g (sintesi n.5).	121

Figura 62. Spettro EDS a sinistra e analisi composizionale a destra del campione BTO AA TEOS Tamb 1g (sintesi n.6).	121
Figura 63. Spettro EDS a sinistra e analisi composizionale a destra del campione BTO AA TEOS 40 1g (sintesi n.6).	122
Figura 64. Spettro EDS a sinistra e analisi composizionale a destra del campione BTO AA TEOS Tamb 1g 100-30 (sintesi n.7).	122
Figura 65. Spettro EDS a sinistra e analisi composizionale a destra del campione BTO AA TEOS 40 1g 100-30 (sintesi n.7).	123
Figura 66. Spettro EDS a sinistra e analisi composizionale a destra del campione BTO AA TEOS TEP CN 40 NTT 750 mg (sintesi n.8).	124
Figura 67. Spettro EDS a sinistra e analisi composizionale a destra del campione BTO AA TEOS TEP CN 40 NTT 200 mg (sintesi n.9).	124
Figura 68. Spettro EDS a sinistra e analisi composizionale a destra del campione BTO AA TEOS ammonia 2h 40 (sintesi n.10).	125
Figura 69. Spettri FTIR delle polveri di BTO di partenza, dei campioni BTO AA TEOS TEP CN Tamb NTT e BTO AA TEOS TEP CN Tamb TT (sintesi n.3) e dei campioni BTO AA TEOS TEP CN 40 NTT e BTO AA TEOS TEP CN 40 TT (sintesi n.4).	126
Figura 70. Spettro FTIR del campione BTO AA TEOS TEP CN 40 NTT (sintesi n.4), con indicati i picchi di assorbimento principali e indicativi della corretta formazione di uno shell di BG.	128
Figura 71. Immagini FESEM del campione BTO AA TEOS TEP CN 40 NTT (sintesi n.4) dopo 7 giorni in SBF, ad ingrandimenti crescenti: a e c) 20000x, b e d) 50000x.	130
Figura 72. Spettro EDS a sinistra e analisi composizionale a destra del campione BTO AA TEOS TEP CN 40 NTT (sintesi n.4) dopo 7 giorni in SBF. Le percentuali in peso e atomiche sono state ottenute facendo una media su tre aree.	131
Figura 73. Immagini FESEM del campione BTO AA TEOS TEP CN 40 NTT (sintesi n.4) dopo 14 giorni in SBF, ad ingrandimenti crescenti: a) 15000x, b) 20000x, c) 50000x e d) 100000x.	132
Figura 74. Spettro EDS a sinistra e analisi composizionale a destra del campione BTO AA TEOS TEP CN 40 NTT (sintesi n.4) dopo 14 giorni in SBF. Le percentuali in peso e atomiche sono state ottenute facendo una media su nove aree...	132
Figura 75. Spettri FTIR relativi alle particelle core-shell di BTO sintetizzate, a 0, 7 e 14 giorni di immersione in SBF.	133
Figura 76. Immagini FESEM delle nanopolveri di ZnO di partenza, ad ingrandimenti crescenti (2000x, 10000x, 20000x, 20000x). Nelle ultime due foto sono indicate le dimensioni delle nanopolveri.	136
Figura 77. Spettro EDS delle nanopolveri di ZnO di partenza.	136
Figura 78. Immagini FESEM del campione ZnO TEOS (sintesi n.1), ad ingrandimenti crescenti (2000x, 10000x, 50000x).	137
Figura 79. Spettro EDS a sinistra e analisi composizionale a destra del campione ZnO TEOS (sintesi n.1).	137
Figura 80. Immagini FESEM del campione ZnO AA TEOS 1h (sintesi n.2), ad ingrandimenti crescenti (2000x, 10000x, 50000x).	138
Figura 81. Spettro EDS a sinistra e analisi composizionale a destra del campione ZnO AA TEOS 1h (sintesi n.2).	138
Figura 82. Spettro EDS a sinistra e analisi composizionale a destra del campione ZnO TEOS 24h (sintesi n.3).	139

Figura 83. Spettro EDS a sinistra e analisi composizionale a destra del campione ZnO acetone TEOS 24h (sintesi n.4).	139
Figura 84. Spettri FTIR delle polveri di ZnO di partenza, del campione ZnO AA TEOS 1h (sintesi n.2) e del campione ZnO TEOS 24h (sintesi n.3).	140

Tabelle

Tabella 1. Alcune tra le composizioni (wt%) di vetro bioattivo più studiate [31].	18
Tabella 2. Tipologie di materiali e biomateriali piezoelettrici e loro coefficiente piezoelettrico [65], [67].	44
Tabella 3. Coefficiente piezoelettrico d_{33} relativo a diverse morfologie nanostrutturali di ZnO. In alcuni casi viene effettuato un dopaggio. In questa tabella non sono riportati gli specifici metodi di sintesi [90].	58
Tabella 4. Coefficiente piezoelettrico d_{33} relativo a diverse morfologie nanostrutturali di ZnO. In alcuni casi viene effettuato un dopaggio. In questa tabella non sono riportati gli specifici metodi di sintesi [91].	58
Tabella 5. Confronto in termini di proprietà fisiche, meccaniche e piezoelettriche tra l'osso (compatto e trabecolare) e gli scaffolds a base di BTO e nanopolveri di BG realizzati tramite freeze casting, da parte di Seidi et al. [103].	68
Tabella 6. Tabella riassuntiva dei principali lavori di ricerca in cui la fase piezoelettrica di BTO viene unita con una fase bioattiva, tramite miscelazione allo stato solido o approccio core-shell. Sono considerati anche lavori in cui lo shell è a base di silice.	76
Tabella 7. Tabella riassuntiva dei principali lavori di ricerca in cui la fase piezoelettrica di ZnO viene unita con una fase bioattiva, tramite miscelazione allo stato solido o approccio core-shell. Sono considerati anche lavori in cui lo shell è a base di silice.	86
Tabella 8. Diverse prove di sintesi effettuate per ottenere particelle core-shell di BTO. Sono ricapitolati i diversi parametri di processo utilizzati nelle diverse prove di sintesi.	96
Tabella 9. Diverse prove di sintesi effettuate per ottenere particelle core-shell di ZnO. Sono ricapitolati i diversi parametri di processo utilizzati nelle diverse prove di sintesi.	99
Tabella 10. Bande di assorbimento dello spettro FTIR e riferimenti, per la valutazione della formazione dello shell di vetro bioattivo, sia nel caso di BTO che ZnO.	105
Tabella 11. Bande di assorbimento dello spettro FTIR utilizzate per valutare la formazione di HAp sulle particelle core-shell di BTO sintetizzate. Il riferimento utilizzato è il lavoro di M. Mačković et al. [117].	106
Tabella 12. Elenco dei reagenti utilizzati nel protocollo Kokubo-Takadama per realizzare 11 di SBF.	108
Tabella 13. Percentuali in peso e atomiche ottenute tramite analisi EDS, ricalcolate considerando come elementi solo Si, Ca e P, per il campione BTO AA TEOS TEP CN Tamb NTT (sintesi n.3).	116
Tabella 14. Percentuali in peso e atomiche ottenute tramite analisi EDS, ricalcolate considerando come elementi solo Si, Ca e P, per il campione BTO AA TEOS TEP CN 40 NTT (sintesi n.4).	119
Tabella 15. Percentuali in peso e atomiche ottenute tramite analisi EDS ricalcolate considerando come elementi solo Si, Ca e P, per il campione BTO AA TEOS TEP CN 40 TT (sintesi n.4).	120
Tabella 16. Valori di pH della soluzione di SBF in cui è stato immerso il campione BTO AA TEOS TEP CN 40 NTT (sintesi n.4) per 3, 7 e 14 giorni.	129
Tabella 17. Percentuali in peso e atomiche ottenute tramite analisi EDS, ricalcolate considerando come elementi solo Si, Ca e P, per il campione BTO AA TEOS TEP CN 40 NTT (sintesi n.4) dopo 7 giorni in SBF. Le percentuali in peso e atomiche sono state ottenute facendo una media su tre aree.	131
Tabella 18. Percentuali in peso e atomiche ottenute tramite analisi EDS, ricalcolate considerando come elementi solo Si, Ca e P, per il campione BTO AA TEOS TEP CN 40 NTT (sintesi n.4) dopo 14 giorni in SBF. Le percentuali in peso e atomiche sono state ottenute facendo una media su tre aree.	133

Abbreviazioni

BTO – titanato di bario

ZnO – ossido di zinco

PZT – zirconato titanato di piombo

TEOS – tetraetil ortosilicato

TEP – trietil fosfato

CN – nitrato di calcio tetraidrato

ECM – matrice extracellulare

HAp – idrossiapatite

MSCs – cellule staminali mesenchimali

BMMSCs – cellule staminali mesenchimali del midollo osseo

TCP – fosfato tricalcico

SBF – fluido corporeo simulato

HCA – idrossicarbonatoapatite

T_g – temperatura di transizione vetrosa

BG – vetro bioattivo

T_c – temperatura di Curie

PENG – nanogeneratori piezoelettrici

AR – rapporto d'aspetto

NPs – nanoparticelle

PBS – soluzione tampone fosfato salina

EPD – deposizione elettroforetica

T_{amb} – temperatura ambiente

Abstract (versione italiana)

In qualità di alternativa ai convenzionali innesti ossei, l'ingegneria del tessuto osseo è un approccio innovativo per il trattamento di patologie e difetti ossei, mediante l'uso di biomateriali e stimoli. In questo senso, bioattività e piezoelettricità sono due importanti aspetti che influiscono sulla crescita e rigenerazione ossea, sfruttando rispettivamente il rilascio ionico e la stimolazione elettrica. In letteratura sono presenti diversi esempi relativi alla combinazione tra una fase piezoelettrica e una fase bioattiva, per esempio tramite la produzione di due particelle distinte che poi vengono miscelate allo stato solido o anche tramite l'incorporazione di una fase piezoelettrica come fase secondaria all'interno di una matrice, in modo da ottenere scaffolds o dischi compositi. L'obiettivo principale di questo lavoro di tesi è la sintesi di particelle, composte da un core piezoelettrico e da uno shell bioattivo, in un'unica formulazione e come unico materiale di partenza. Il processo di sintesi considerato è il processo Stober, un metodo sol-gel.

La parte sperimentale di questa tesi, condotta al Dipartimento di Scienza Applicata e Tecnologia del Politecnico di Torino, è stata incentrata su due materiali piezoelettrici (Titanato di bario e Ossido di zinco) in forma di polveri come core e su un vetro bioattivo ternario come shell basato sui precursori tetraetil ortosilicato (TEOS), trietil fosfato (TEP) e nitrato di calcio (CN). Per investigare la morfologia e la composizione di questi materiali, in particolare l'effettiva sintesi dello shell bioattivo, è stata effettuata un'analisi al microscopio elettrico a scansione a emissione di campo (FE-SEM) equipaggiato con spettroscopia a dispersione di energia (EDS), per investigare la composizione chimica e i gruppi funzionali delle particelle ottenute è stata effettuata un'analisi spettroscopica a infrarossi in trasformata di Fourier (FTIR); infine, è stato condotto un test di bioattività in vitro in fluido corporeo simulato (SBF) in modo da valutare la bioattività dei materiali sviluppati e perciò la loro abilità di legarsi in vivo al tessuto osseo.

Abstract (english version)

As an alternative to conventional bone grafts, bone tissue engineering is an innovative approach to treat bone diseases and defects, making use of biomaterials and stimuli. In this sense, bioactivity and piezoelectricity are two important aspects which have influence on bone growth and regeneration, exploiting ions release and electrical stimulation respectively. In literature there are examples regarding the combination of a piezoelectric phase and a bioactive phase, for example through the production of two distinct particles that then are solid state mixed and blended or through the incorporation of the piezoelectric phase as a secondary phase in a matrix, in order to obtain composite scaffolds or disks. The main purpose of this thesis work is the synthesis of particles, composed by a piezoelectric core and a bioactive shell, in a single formulation and as unique starting material. The synthesis process considered is the Stober process, a sol-gel method.

The experimental part of this thesis, conducted at the Department of Applied Science and Technology of the Politecnico di Torino, focused on two piezoelectric materials (Barium Titanate and Zinc Oxide) in form of powders as core and on a ternary bioactive glass shell based on tetraethyl orthosilicate (TEOS), triethyl phosphate (TEP) and calcium nitrate (tetrahydrate) (CN) as precursors. To investigate the morphology and composition of these materials, in particular the effective synthesis of the bioactive shell, a Field Emission Scanning Electron Microscope (FE-SEM) equipped with Energy Dispersive Spectroscopy (EDS) analysis was performed, to investigate the chemical composition and the functional groups of the obtained particles a Fourier Transform Infrared (FTIR) spectroscopic analysis was performed; at the end, the in vitro bioactivity test was carried out in simulated body fluid (SBF) to evaluate the bioactivity of the developed materials and thus their ability to bond in vivo with bone tissue.

1. Introduzione

Un promettente campo di ricerca biomedica, in costante sviluppo e con numerose applicazioni, è quello dell'Ingegneria Tissutale e Medicina Rigenerativa, in inglese TERM (Tissue Engineering and Regenerative Medicine), punto d'incontro di più discipline come scienza dei materiali, chimica e medicina.

L'obiettivo finale di questo progetto di tesi è quello di rivestire particelle piezoelettriche con un coating di vetro bioattivo. L'idea centrale è combinare due aspetti fondamentali per la stimolazione e crescita dell'osso: la piezoelettricità, quindi la stimolazione delle cellule ossee tramite segnali bioelettrici, e la bioattività, per la rapida osteointegrazione dell'impianto sfruttando il rilascio di ioni.

Il materiale del core da rivestire, sottoforma di polvere, può essere sintetizzato da zero in laboratorio utilizzando tecniche e precursori opportuni oppure si possono utilizzare particelle commerciali, modificandole dal punto di vista chimico e composizionale. Una volta che le particelle core-shell sono state sintetizzate, gli utilizzi applicativi sono diversi: filler inorganici dispersi all'interno di matrici o fibre polimeriche, rivestimenti su substrati o anche scaffold. La realizzazione di scaffold piezoelettrici e bioattivi, partendo da particelle core-shell piezoelettriche e bioattive, è forse l'applicazione più interessante. Una volta ottenute queste polveri multifunzionali, vengono utilizzate tecniche di fabbricazione per la realizzazione dello scaffold, per esempio utilizzando un legante polimerico e realizzando uno slurry. A questo punto lo scaffold può essere sinterizzato e polarizzato per migliorarne e incrementarne le proprietà piezoelettriche.

La prima fase di studio è coincisa con un'approfondita ricerca bibliografica sui metodi utilizzati in letteratura per unire le due diverse fasi, in particolare in un'unica formulazione core-shell. Nella successiva fase sperimentale l'obiettivo è stato quello di sintetizzare particelle costituite da un core interno in materiale piezoelettrico e da uno shell esterno in materiale bioattivo. È stato utilizzato il metodo sol-gel, nello specifico il metodo Stober modificato.

Per quanto riguarda la fase piezoelettrica, l'attenzione è stata posta sul titanato di bario (BTO) e sull'ossido di zinco (ZnO). La scelta di questi due materiali è stata giustificata da una serie di motivi quali il basso costo commerciale dei precursori o delle particelle stesse, il semplice metodo di sintesi e soprattutto il fatto di essere dei piezo-ceramici senza piombo (LFPCs, lead-free piezoceramics). I piezo-ceramici a base piombo (LBPCs, lead-based piezoceramics) come lo zirconato-titanato di piombo (PZT), infatti, sono problematici per quanto riguarda l'ambiente, la salute e risultano citotossici non solo ad alte ma anche a basse dosi di ioni metallici rilasciati. In aggiunta il BTO,

rispetto ad altri LFPCs come niobato di sodio-potassio (KNN), titanato di bismuto-sodio (BNT) e ferrite di bismuto (BFO), presenta un più alto coefficiente piezoelettrico. Lo ZnO, anch'esso con un'ottima biocompatibilità come il BTO, è stato scelto in quanto mostra un interessante incremento delle proprietà piezoelettriche alla nanoscala e nelle sue diverse morfologie nanostrutturali, aspetto approfondito nell'ambito di questa tesi. In aggiunta, sia BTO che ZnO sono materiali multifunzionali già molto utilizzati nell'ambito dell'ingegneria tissutale.

Per quanto riguarda, invece, la fase bioattiva si è considerata una composizione ternaria a base di silice, ossido di calcio e ossido di fosforo, che possiede capacità osteoinduttive e quindi di osteointegrazione.

Come menzionato precedentemente, l'obiettivo è unire le due diverse fasi durante il processo iniziale di sintesi, in modo da ottenere alla fine un materiale multifunzionale in cui le due fasi non saranno distinte in forma di matrice e fase dispersa. La fase di sintesi e i successivi trattamenti termici (calcinazione e sinterizzazione) potrebbero influire sulla dimensione del core piezoelettrico, dello shell bioattivo e sulle rispettive proprietà. La difficoltà principale consisterà nel garantire la formazione di uno shell senza intaccare le proprietà del core e nel bilanciare i due diversi aspetti nel costruito finale.

1.1 Il tessuto osseo

L'osso è un tessuto connettivo metabolicamente attivo, dinamico e mineralizzato. Svolge importanti funzioni come il garantire la locomozione, il supporto e la protezione dei tessuti molli e degli organi vitali, funge da riserva di calcio e fosforo e garantisce l'ematopoiesi per mezzo del midollo osseo.

Dal punto di vista biologico è costituito dalla matrice extracellulare (ECM) e da una componente cellulare.

L'ECM ossea rappresenta il 90% del volume osseo totale e comprende una parte organica (30%) e una parte inorganica (60%), oltre che acqua (10%) [1]. La componente organica, secreta dagli osteoblasti, consiste principalmente di collagene di tipo I oltre che di proteoglicani (es. decorina, asporina), glicoproteine (es. osteonectina) e altri fattori di crescita. Essa conferisce forma, resistenza a trazione e flessibilità al tessuto osseo. Relativamente alla parte inorganica, che conferisce resistenza meccanica, durezza e rigidità al tessuto osseo, troviamo principalmente idrossiapatite (HAp, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), un sale doppio di fosfato tricalcico e idrossido di sodio, e altri sali minerali. La deposizione dei nanocristalli di HAp avviene sull'impalcatura costituita dal collagene e dalle altre proteine non collageniche. Il collagene di tipo I presenta un'organizzazione multilivello: in ordine crescente di scala dimensionale troviamo una tripla elica polipeptidica, fibrille di collagene, fasci di fibrille fino ad arrivare a fibre di collagene. Queste ultime si orientano preferenzialmente a formare strutture dette lamelle [2], [3]. L'ECM ossea è un esempio perfetto di scaffold nanocomposito, a base principalmente di collagene e HAp.

La componente cellulare, invece, rappresenta il 10% del volume osseo totale. Tra le diverse tipologie cellulari troviamo [3], [4]:

- *Osteoblasti*: sono cellule grandi e cuboidali localizzate sulla superficie ossea e derivanti da cellule staminali mesenchimali (MSCs) che differenziano nella linea osteoprogenitrice. Sono deputate alla sintesi di nuova matrice ossea, processo che avviene in due fasi. Nella prima fase viene depositata matrice organica non mineralizzata detta osteoide, tramite la secrezione di proteine come collagene di tipo I, proteoglicani e altre proteine non collageniche come osteocalcina e osteopontina. Queste ultime due proteine sono in grado di legarsi agli ioni calcio e fosfato, regolando in questo modo la nucleazione e crescita di nanocristalli di HAp. Successivamente si ha la mineralizzazione, regolata da proteine come la proteina della matrice dentale-1 (DMP-1) e sialoproteine ossee che fungono da siti di nucleazione. Gli osteoblasti maturi possono andare incontro ad apoptosi oppure diventare osteociti o cellule di rivestimento osseo.

- *Osteoclasti*: sono cellule giganti multinucleate, derivanti da cellule mononucleari della linea ematopoietica. Tra i principali fattori coinvolti nell'osteoclastogenesi troviamo il ligando del recettore RANK (RANKL), l'osteoprotigerina e la citochina MCS-F. Nello specifico, RANKL e osteoprotigerina si legano allo stesso recettore RANK presente sulla membrana dei preosteoclasti, con il legame RANKL-RANK che stimola l'osteoclastogenesi e il legame osteoprotigerina-RANK che inibisce l'osteoclastogenesi. Durante la fase di riassorbimento osseo gli osteoclasti sigillano la zona di interesse, che prende il nome di lacuna di riassorbimento, e secernono ioni idrogeno, gli enzimi TRAP (fosfatasi acida resistente al tartrato) e catepsina K. Gli ioni idrogeno dissolvono la componente minerale della matrice ossea mentre gli enzimi TRAP e catepsina K si occupano di digerire la componente proteica della matrice, quindi principalmente collagene di tipo I.
- *Osteociti*: rappresentano il 90-95% delle cellule ossee totali. Sono localizzate all'interno delle lacune ossee lamellari, circondate da matrice ossea mineralizzata, e presentano una morfologia dendritica con processi citoplasmatici che attraversano i canalicoli ossei. Sono il risultato dell'intrappolamento degli osteoblasti nella matrice ossea alla fine del ciclo di rimodellamento e rispetto ad essi presentano un'attività di sintesi e di secrezione proteica ridotte. Attraverso il sistema costituito da lacune e canalicoli gli osteociti entrano in contatto con altri osteociti, con osteoblasti e cellule di rivestimento osseo. Questa rete è fondamentale per la loro funzione di meccanosensori, che si traduce nella conversione di segnali meccanici in segnali biochimici. Per questo motivo svolgono un ruolo importante nel processo di rimodellamento osseo.
- *Cellule di rivestimento osseo (bone-lining cells)*: sono osteoblasti che si trovano in uno stato quiescente sulla superficie ossea, ma sono in grado di riacquistare la loro attività secretoria in seguito a stimoli. Per quanto riguarda la loro funzione è stato dimostrato che partecipano al differenziamento degli osteoclasti ed evitano il contatto diretto tra osteoclasti e matrice ossea quando il riassorbimento osseo non deve avvenire.

Dal punto di vista anatomico e macroscopico distinguiamo tra osso corticale (80%) e osso spongioso (20%), con posizionamento, organizzazione strutturale, proprietà e attività metaboliche diverse. Nell'osso corticale le lamelle si dispongono perpendicolarmente le une alle altre attorno ad un canale centrale, detto canale haversiano, formando unità strutturali fondamentali dette osteoni. Nell'osso spongioso invece le lamelle si organizzano parallelamente a formare strutture dette trabecole [5]. Le trabecole possiedono la caratteristica di seguire le linee di distribuzione di carico all'interno dell'osso: questo è una prova del fatto che il tessuto osseo è vivo, in continuo rimodellamento e

sensibile agli stimoli esterni. Considerando ad esempio le ossa lunghe, l'osso compatto costituirà il rivestimento esterno mentre l'osso spongioso va a riempire le estremità dette epifisi.

Come detto, il tessuto osseo non è inerte e statico ma in rimodellamento continuo, questo significa che si rinnova nel tempo in risposta a stimoli esterni come sollecitazioni meccaniche, traumi e fratture: questo ha come conseguenza il fatto che un osso non correttamente sollecitato tende a riassorbirsi. Il processo di rimodellamento osseo è complesso e si basa su due azioni, quella di deposizione ossea degli osteoblasti e quella di riassorbimento osseo degli osteoclasti. È fondamentale una corretta comunicazione tra queste due diverse tipologie cellulari e un equilibrio del processo, per evitare patologie come l'osteoporosi, in cui prevale il riassorbimento osseo, o l'osteopetrosi, in cui invece l'attività osteoclastica è ridotta.

1.2 Ingegneria del tessuto osseo

La presenza nel tessuto osseo di difetti o danneggiamenti, associati a traumi, tumori, infezioni o patologie come l'osteoporosi, può influire negativamente sulla qualità di vita dei pazienti colpiti e rendere necessario un intervento riparativo. Questo è richiesto nel caso in cui l'area interessata sia estesa, in quanto la limitata capacità auto-riparativa del tessuto osseo risulta insufficiente. Approcci convenzionali sono l'autografting e l'allografting, nei quali una porzione di tessuto sano viene prelevata e impiantata nel sito danneggiato: nel primo caso il soggetto donatore e ricevente coincidono, mentre nel secondo caso sono diversi ma appartenenti alla stessa specie. Sebbene gli autografts, o innesti autologhi, diano ottimi risultati terapeutici e siano considerati il gold standard, presentano limitazioni quali la scarsa disponibilità di siti donatori, la necessità di un intervento chirurgico addizionale e il dolore localizzato nel sito di prelievo. Gli svantaggi degli allografts, o innesti allogenici, sono invece il rischio di rigetto immunitario e la possibile trasmissione di infezioni e patologie. Pertanto, l'ingegneria del tessuto osseo si propone come valida e innovativa alternativa [6].

Il termine "tissue engineering" fu utilizzato per la prima volta nel 1987. È un approccio multidisciplinare che si pone come obiettivo quello di ripristinare, sostituire o riparare un tessuto biologico, per mezzo di uno scaffold, cioè un costrutto in grado di mimare l'ECM dal punto di vista delle funzioni e della struttura. Fornisce un ambiente tridimensionale in grado di supportare funzioni cellulari come l'adesione, la migrazione, la proliferazione e il differenziamento e possiede proprietà fisiche importanti per la riparazione del tessuto osseo. Oltre al biomateriale, altri due elementi chiave sono la componente cellulare e i segnali, agenti in maniera sinergica. In figura 1 sono ricapitolate le componenti chiave dell'approccio di ingegneria del tessuto osseo.

Uno scaffold per l'ingegneria del tessuto osseo dovrebbe presentare [7], [8]:

- Dimensione dei pori tale da garantire una buona osteogenesi, mineralizzazione e buona vascolarizzazione del tessuto osseo ma anche una buona infiltrazione e proliferazione cellulare;
- Pori aperti e interconnessi;
- Resistenza meccanica e cinetica di degradazione controllata così da permettere un trasferimento del carico al tessuto circostante;

- Buona resistenza meccanica iniziale in modo da permetterne la manipolazione durante le fasi di sterilizzazione, impacchettamento, trasporto nella sala operatoria e in modo da resistere alle forze in vivo;
- Sterilità in modo da permettere una corretta semina e colonizzazione cellulare;

La componente cellulare è importante in quanto partecipa attivamente al processo di rigenerazione del tessuto tramite la secrezione di molecole segnale e di ECM. Per mimare correttamente il tessuto da rigenerare sarà importante inserire nello scaffold le diverse componenti cellulari, ciascuna delle quali potrà essere prelevata da una fonte diversa. Si possono sfruttare cellule differenziate o indifferenziate, con queste ultime che possono essere fatte differenziare in vitro o in vivo. Nel caso del tessuto osseo, per esempio, si può pensare di partire da MSCs per ottenere gli osteoblasti prima e gli osteociti dopo, mentre per gli osteoclasti si può partire da cellule mononucleate del midollo osseo (BMMCs). Nell'ottica di ottenere un costrutto vascolarizzato e funzionale è importante includere cellule endoteliali, migliorando in questo modo la rigenerazione del tessuto osseo.

Per quanto riguarda i segnali, questi modulano le funzioni cellulari come il differenziamento, ma anche l'angiogenesi e l'osteogenesi. Per esempio, alcuni studi hanno mostrato che stimoli di natura elettrica possono avere un effetto sulla proliferazione e differenziamento delle MSCs: si ha un aumento dell'espressione delle proteine morfogeniche dell'osso e la conseguente attivazione di vie segnaletiche e citochine coinvolte nella formazione e nel rimodellamento osseo [6]. Per favorire la vascolarizzazione del costrutto impiantato è importante incorporare dei fattori di crescita, direttamente nello scaffold con tecniche diverse oppure facendo una modifica genetica delle cellule seminate: esempi di fattori di crescita che favoriscono l'angiogenesi sono il fattore di crescita dell'endotelio vascolare (VEGF, vascular endothelial growth factor) e il fattore di crescita derivato dalle piastrine (PDGF, platelet-derived growth factor). La vascolarizzazione è importante per garantire che il costrutto sia vitale e funzionale, per favorire il corretto apporto di nutrienti e la corretta rimozione di sottoprodotti metabolici in tutto il volume [9]. È stato dimostrato che biomateriali non in grado di promuovere l'angiogenesi hanno una probabilità superiore di fallire, in particolare quando utilizzati per il trattamento di difetti con un volume superiore a 60 cm³. Questo perché angiogenesi e osteogenesi sono processi interconnessi, importanti per la guarigione ossea e per un corretto rimodellamento. Per garantire entrambi i processi è importante considerare attentamente la porosità dello scaffold: una porosità tra 80-200 µm garantisce una crescita interna di tessuto osseo, mentre una porosità tra 300-500 µm permette la formazione di una rete vascolare [10].

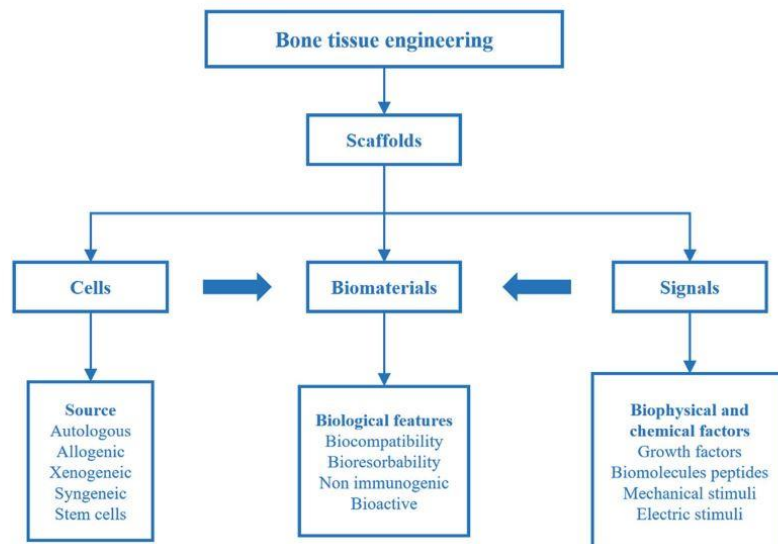


Figura 1. Elementi chiave nell'ingegneria del tessuto osseo [18].

1.2.1 Biomateriali

Lo scaffold ideale per l'ingegneria del tessuto osseo dovrebbe essere biocompatibile, biodegradabile e bioattivo. Relativamente alla bioattività, si distingue fra osteoinduttività e osteoconduttività.

La biocompatibilità è una proprietà che riguarda non soltanto il biomateriale in sé quanto il modo in cui interagisce con l'ambiente circostante, biologico, in particolare a livello superficiale e interfacciale. In termini rigorosi, la biocompatibilità è definita come la capacità di un biomateriale di svolgere la funzione prevista, senza provocare alcuna risposta locale o sistemica avversa nel soggetto, ma inducendo un'appropriata risposta benefica a livello cellulare e tissutale, garantendo così un buon esito della terapia. Fattori che influiscono sulla biocompatibilità sono la posizione di impianto, il tempo di permanenza dell'impianto nel corpo e le sollecitazioni a cui il biomateriale è sottoposto. La valutazione della biocompatibilità di un biomateriale è la prima azione da fare se lo si vuole utilizzare come materiale da impianto. La valutazione può avvenire tramite test in vitro, su cellule o sfruttando modelli in vitro, e tramite valutazioni in vivo su animali [11].

La biodegradabilità si riferisce alla scissione e decomposizione del biomateriale in sottoprodotti più semplici, per via di reazioni chimiche che possono essere promosse dall'ambiente biologico che circonda l'impianto. Per esempio, biomateriali polimerici possono andare incontro a degradazione idrolitica o enzimatica, a livello superficiale o dell'intero volume (bulk). Concetto simile è quello della bioriassorbibilità in cui però i frammenti di degradazione del materiale vengono completamente riassorbiti in vivo o eliminati per via naturale quale può essere quella metabolica [12]. È importante

che i prodotti di degradazione siano biocompatibili e non tossici. In quest'ottica, è importante che la velocità di biodegradabilità o biorisorbibilità sia confrontabile con la velocità di rigenerazione e di ricrescita del tessuto, in modo da evitare una guarigione incompleta o un supporto meccanico insufficiente al tessuto in crescita.

La bioattività può essere considerata come un'estensione del concetto di biocompatibilità. Si riferisce a materiali in grado di indurre attivamente una risposta specifica da parte dell'organismo, in modo che si instauri un legame chimico tra il materiale e il tessuto. È importante che sulla superficie del materiale si formi tessuto normale e che l'interfaccia materiale-tessuto sia in grado di sopportare le normali sollecitazioni che agiscono localmente nel sito di impianto [13]. Il concetto di bioattività e i materiali bioattivi verranno approfonditi nelle prossime sezioni.

L'osteconduttività si riferisce alla capacità di un materiale di stimolare l'adesione, la proliferazione e la formazione di ECM da parte degli osteoblasti, supportando in questo modo la crescita di tessuto osseo, con riferimento alla superficie dell'impianto e alle sue caratteristiche. L'osteoaduttività invece si riferisce all'abilità di reclutare MSCs e di indurre il loro differenziamento in cellule osteoprogenitrici, prima, e osteoblasti, dopo. Si può anche definire come il processo attraverso cui l'osteogenesi viene indotta ed è un meccanismo che entra in gioco durante la guarigione o il rimodellamento osseo [14], [15], [16]. Tra i materiali osteoaduttivi troviamo la maggior parte dei biovetri, tra i materiali osteoconduttivi invece abbiamo per esempio l'HAp sintetica [13].

Tra i principali materiali utilizzati per l'ingegneria del tessuto osseo troviamo [6], [9]:

- *Ceramici*: HAp, fosfato tricalcico (TCP), fosfato bicalcico (BCP), vetri e vetroceramici bioattivi, aventi basse proprietà meccaniche, fragilità e degradabilità variabile. Possono essere utilizzati per realizzare rivestimenti oppure come fasi disperse;
- *Polimeri*: polimeri naturali (chitosano, alginato, acido ialuronico, collagene, gelatina e fibroina della seta) e polimeri sintetici (PLA, PGA, PLGA, PCL). I primi presentano una buona biocompatibilità, biodegradabilità, somiglianza all'ECM del tessuto nativo, buona capacità di interagire con il tessuto ma allo stesso tempo insufficienti proprietà meccaniche, variabilità tra lotti di produzione, elevata velocità di degradazione e problemi di immunogenicità. I polimeri sintetici invece presentano caratteristiche e proprietà più facilmente controllabili ma mancano di bioattività;
- *Metalli*: per esempio titanio, magnesio, cobalto in genere sottoforma di leghe. Sono facilmente fabbricabili e processabili, presentano eccellenti proprietà meccaniche, ma molti materiali metallici sono problematici dal punto di vista della biodegradabilità, scarsa, e si portano dietro

il rischio di produrre detriti metallici e ioni che possono dare problemi di infiammazione e tossicità;

- *Compositi*: l'obiettivo è combinare i vantaggi di materiali diversi in modo da mimare meglio la struttura, le proprietà meccaniche e l'attività biologica del tessuto osseo. Per esempio, compositi ceramici-metalli sono stati proposti per migliorare il comportamento a corrosione dei metalli, per avere superiori proprietà meccaniche e una migliore bioattività come nel caso di spugne in lega di magnesio rinforzate con nano-HAp. Molto utilizzati sono i compositi polimeri-ceramici con l'esempio di uno scaffold poroso in PLLA/HAp che rispetto ad uno scaffold a base di solo PLLA mostra un'aumentata e accelerata crescita del tessuto osseo. Questo tipo di compositi si possono definire biomimetici dal punto di vista compositivo dal momento che l'osso stesso è un materiale composito;

I biomateriali possono essere raggruppati in tre diverse classi [17], [18], [19]:

- *Biomateriali di I generazione*: sono materiali presi in prestito da altre discipline piuttosto che specificatamente progettati per applicazioni biomedicali. Le caratteristiche distintive sono l'abilità di mimare le prestazioni meccaniche del tessuto da sostituire, l'assenza di tossicità e l'inerzia nei confronti dell'organismo. Esempi sono metalli come il titanio e le sue leghe, polimeri sintetici come PMMA e PEEK e ceramici come allumina e zirconia. Le prestazioni di questi materiali sono limitate dalla risposta dell'organismo ospitante nei confronti dell'impianto, consistente in infiammazione, formazione di capsula fibrotica intorno all'impianto e scarsa integrazione con il tessuto circostante;
- *Biomateriali di II generazione*: questa classe contiene biomateriali biomimetici, bioresponsivi e bioattivi. Sono in grado di controllare i processi di adsorbimento proteico, le interazioni con l'ambiente biologico circostante inducendo una risposta controllata e la rigenerazione del tessuto attorno all'impianto. Lo sviluppo di questa seconda classe di biomateriali ha preso ispirazione dalla natura, non soltanto per quanto riguarda il cercare di mimare le caratteristiche biochimiche e strutturali di un tessuto naturale ma anche focalizzandosi sulla sua capacità di riassorbimento durante il processo di rimodellamento tissutale. Alcuni possono essere biodegradabili e bioriassorbibili in vivo. Esempi sono l'HAp, i vetri e vetroceramici bioattivi ma anche idrogeli a base di collagene e acido ialuronico, chitosano e alginato, copolimeri PLGA e metalli porosi;
- *Biomateriali di III generazione*: mentre i biomateriali di II generazione erano pensati per essere bioriassorbibili o bioattivi, in questo caso si ha l'unione di queste due proprietà, con

l'obiettivo di sviluppare materiali che, una volta impiantati, aiutino l'organismo a guarire da solo. L'attenzione è posta più sulla rigenerazione del tessuto che sulla sostituzione. Sono materiali in grado di modulare processi fondamentali per la rigenerazione del tessuto come l'adesione, la proliferazione e il differenziamento cellulare tramite l'attivazione di particolari geni e sono pensati per stimolare le specifiche risposte cellulari a livello molecolare. Esempi sono polimeri modificati in modo da incorporare peptidi e sequenze specifiche riconosciute dalle cellule oppure un gel riassorbibile a base di vetro bioattivo;

Questo lavoro di tesi si concentra sui materiali bioceramici. Considerando il diverso meccanismo di adesione al tessuto, la diversa reattività chimica e biologica e anche il diverso spessore dell'interfaccia impianto-tessuto, possiamo distinguere [20]:

- *Bioceramici quasi-inerti*: sono densi e non porosi, con un'interfaccia materiale-tessuto meccanicamente debole e con movimenti relativi che portano allo sviluppo di una capsula fibrotica. Si parla di ancoraggio morfologico all'osso tramite cemento oppure per compressione (press-fit) ed esempi sono l'allumina e la zirconia;
- *Bioceramici microporosi per crescita interna di tessuto osseo (bone ingrowth)*: il tessuto osseo cresce nei pori superficiali e si salda meccanicamente. Si parla di ancoraggio biologico, in grado di sopportare sollecitazioni maggiori e più complesse rispetto ad un ancoraggio morfologico. Esempio è l'HAp porosa, che può essere depositata tramite plasma spraying sulla superficie metallica di una protesi;
- *Bioceramici bioattivi*: si parla di ancoraggio bioattivo in cui si ha un legame chimico e biologico con il tessuto, in questa categoria rientrano i vetri e vetro-ceramici bioattivi, i compositi bioattivi come HAp-polietilene e l'HAp densa sintetica;
- *Bioceramici riassorbibili*: in forma massiva (bulk) o sottoforma di polvere, sono progettati per essere gradualmente riassorbiti e sostituiti da tessuto naturale. Esempio è il TCP;

1.3 Biomateriali bioattivi

Nel 1969, L. Hench fornì la definizione di materiale bioattivo: “un materiale in grado di indurre una specifica risposta all’interfaccia con il tessuto, risultante nella formazione di un legame saldo con esso”. Questa definizione si allinea a quella fornita nel 1987 dall’European Society for Biomaterials in base alla quale un materiale bioattivo è un materiale progettato in modo da indurre una specifica attività e risposta biologica. Quindi, quando un materiale bioattivo è impiantato nel corpo si verificano una serie di reazioni fisico-chimiche che risultano in un legame interfacciale con il tessuto. Relativamente alla rigenerazione ossea, si creano condizioni favorevoli per l’osteogenesi e per la mineralizzazione all’interfaccia impianto-tessuto [21], [22]. La scoperta dei materiali bioattivi viene attribuita a L. Hench grazie ai suoi studi circa l’abilità di speciali vetri di legarsi al tessuto osseo in seguito a reazioni chimiche [23].

Si possono distinguere due classi di materiali bioattivi [24], [25]:

- *Classe A*: sono materiali osteoproduttivi e osteoconduttivi, che si legano in maniera rapida all’osso e che sono in grado di legarsi anche a tessuti molli come la membrana timpanica. All’interfaccia con il materiale bioattivo vengono indotte risposte sia extracellulari che intracellulari. Un esempio è il Bioglass 45S5;
- *Classe B*: sono materiali soltanto osteoconduttivi che si legano lentamente all’osso ma che non sono in grado di legarsi a tessuti molli. All’interfaccia con il vetro vengono indotte soltanto risposte extracellulari. Un esempio è l’HAp sintetica;

L’appartenenza alla classe A o alla classe B dipende dalla cinetica delle reazioni superficiali, che si verificano in vivo a contatto con i fluidi biologici o in vitro a contatto con una soluzione corporea simulata, a sua volta influenzata dalla composizione e dalla microstruttura del materiale bioattivo.

La bioattività di un materiale può essere misurata tramite l’indice di bioattività I_B che è in relazione con $t_{0.5bb}$, cioè il tempo necessario a far sì che il legame impianto-osso interessi il 50% dell’interfaccia:

$$I_B = 100/t_{0.5bb}$$

Come per la biocompatibilità, la valutazione della bioattività di un materiale può essere condotta in vitro o in vivo. In vitro si possono sfruttare il test di immersione nel fluido corporeo simulato (SBF, simulated body fluid) oppure test cellulari per valutare risposte come adesione, proliferazione e differenziamento. In vivo invece si sfrutta un modello animale in cui il materiale viene impiantato e si osserva la risposta biologica e quindi l’eventuale formazione di neo-tessuto osseo.

Materiali con $I_B > 8$, come il Bioglass 45S5, sono in grado di legarsi sia a tessuti duri che molli e quindi appartengono alla classe A, mentre materiali con $0 < I_B < 8$ sono in grado di legarsi solo a tessuti duri e quindi appartengono alla classe B [26].

Per migliorare la bioattività e per indurre stimoli specifici si possono incorporare ioni metallici come Ag^+ , B^{3+} , Cu^+ , Cu^{2+} , Co^{2+} , Ce^{3+} , Zn^{2+} , Ga^{3+} e Sr^{2+} all'interno del materiale bioattivo. Ciascuno di questi ioni induce una risposta biologica specifica e in questo modo si ottengono vetri e vetroceramici bioattivi multifunzionali. Tuttavia, è importante prestare attenzione ai livelli degli ioni metallici per evitare problemi di tossicità. Lo stronzio è un elemento traccia all'interno dello scheletro umano: quando si dopa con esso un vetro bioattivo si osserva un'accelerata formazione superficiale di idrossicarbonatoapatite (HCA) ed è in grado di sostituire gli ioni calcio grazie alla somiglianza in termini di carica e raggio ionico. Come il calcio e il fosforo, anche lo zinco è un elemento traccia necessario per la crescita e il mantenimento di osso sano, in quanto è coinvolto nel metabolismo osseo. Anche l'aggiunta di ioni ferro determina un miglioramento della bioattività. L'aggiunta di ioni argento invece conferisce al materiale bioattivo proprietà antibatteriche, con la capacità di inibire batteri Gram positivi e batteri Gram negativi. La preparazione di vetri e vetroceramici bioattivi contenenti ioni terapeutici in genere avviene tramite sintesi sol-gel piuttosto che metodo melt-quenching [27].

1.3.1 Idrossiapatite

L'HAp sintetica è uno dei bioceramici fosfoalcalici più utilizzati in ambito biomedico, per via della sua somiglianza con l'apatite biologica del tessuto osseo. Trova impiego soprattutto in ambito ortopedico e dentale, in forma densa o porosa. Come detto nei paragrafi precedenti, si tratta di un sale doppio di fosfato tricalcico e idrossido di sodio con formula $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ e con proprietà osteoconduttive. Presenta scarse proprietà meccaniche, bassa solubilità e degradabilità per via dell'elevato rapporto stechiometrico Ca/P (circa 1.67) e per questo motivo si preferisce utilizzarla in compositi, piccoli sostituti ossei oppure per realizzare rivestimenti, non in zone molto sollecitate dal punto di vista meccanico [6], [23]. Può essere sintetizzata in laboratorio utilizzando diversi metodi come precipitazione per via umida, metodo sol-gel o sintesi idrotermale/solvotermale, ottenendo morfologie diverse (es. nano- e micro- particelle, nanorods, nanowires, plate, flake, flower, sheet) e proprietà diverse come la cristallinità. Presenta una struttura cristallina esagonale con una cella unitaria costituita da due reticoli cristallini interpenetrati: un reticolo a base di ioni Ca^{2+} e PO_4^{3-} ed un reticolo a base di ioni OH^- [28]. Per quanto riguarda il suo meccanismo di bioattività, a contatto con

il pH acido dei fluidi biologici si ha una sua parziale dissoluzione con rilascio di ioni Ca^{2+} e PO_4^{3-} , che poi si ricombinano con altri ioni presenti nei fluidi biologici, come gli ioni CO_3^{2-} , portando in questo modo alla precipitazione superficiale di HCA [29].

1.3.2 Vetri bioattivi

I vetri sono materiali amorfi con assenza di un ordine a lungo raggio e con un comportamento dipendente dalla temperatura, in funzione di una temperatura caratteristica che è la temperatura di transizione vetrosa (T_g): al di sotto di essa si ha un solido vetroso rigido e fragile mentre al di sopra si ha un liquido sottoraffreddato, gommoso e con una certa mobilità molecolare. Quando un vetro viene riscaldato, si ha una blanda diminuzione della sua viscosità, permettendo una sua lavorazione in forme diverse. In figura 2 è riportato un confronto grafico tra una struttura di silice cristallina e amorfa relativamente al diverso ordine e disposizione atomica.

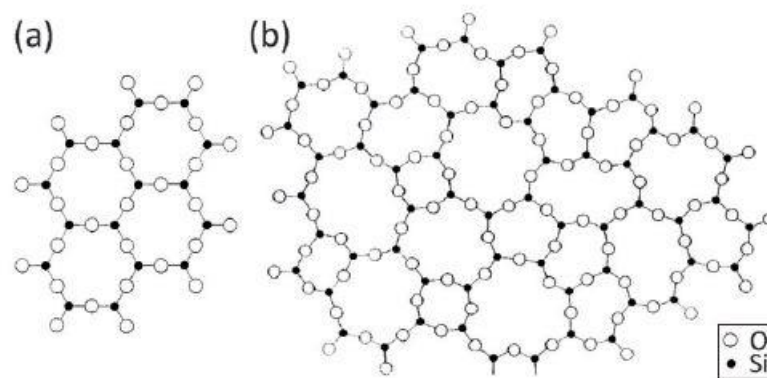


Figura 2. Confronto tra una struttura di silice cristallina (a) e vetrosa (b) (sono rappresentati solo tre atomi di ossigeno per tetraedro SiO_4 , con il quarto che giace al di sopra o al di sotto del piano dell'immagine) [30].

All'interno della struttura di un vetro troviamo tre componenti principali: ossidi formatori della rete vetrosa, ossidi modificatori e ossidi intermedi.

Gli *ossidi formatori* sono in grado di formare un vetro senza bisogno di altri componenti aggiuntivi: tra essi troviamo l'ossido di silicio (SiO_2), pentossido di fosforo (P_2O_5) e il triossido di boro (B_2O_3). Nel caso di vetri silicati l'unità strutturale base è un tetraedro SiO_4 , che può connettersi ad altri tetraedri vicini attraverso legami Si-O-Si, noti come legami ad ossigeno pontante. Questi tetraedri sono comunemente denominati unità Q^n dove n indica il numero di atomi di ossigeno pontanti connessi al tetraedro. Nel caso dei vetri silicati si hanno quattro atomi di ossigeno pontanti per tetraedro (Q^4), in quanto ogni tetraedro è legato ad un altro in corrispondenza dei suoi quattro spigoli.

Gli *ossidi modificatori* modificano la struttura del vetro convertendo atomi di ossigeno pontanti, con legami chimici di natura covalente, in atomi di ossigeno non pontanti, generando legami $\text{Si-O}^-\text{M}^+$, con M^+ che rappresenta il catione modificatore e con un legame che diventa di natura ionica. Esempi di ossidi modificatori sono gli ossidi a base di metalli alcalini o alcalino-terrosi, come sodio (Na), calcio (Ca) e stronzio (Sr).

Gli *ossidi intermedi* possono comportarsi da ossidi modificatori oppure entrare nella catena principale della struttura vetrosa comportandosi più da ossidi formatori [30]. Esempi di ossidi intermedi sono l'ossido di zirconio (ZrO_2) e l'ossido di stagno (SnO_2).

Il primo vetro bioattivo scoperto e studiato fu il *Bioglass® (45S5)* di composizione 45% SiO_2 -24.5% Na_2O -24.5% CaO -6% P_2O_5 (wt%, percentuale in peso). Si tratta di un vetro che può essere facilmente processato per fusione e colata ad alte temperature (1300-1500°C), in modo da ottenere piccoli impianti di forma rettangolare, scaffold, polveri o rivestimenti.

Il meccanismo di bioattività è stato dimostrato per un certo range composizionale di vetri bioattivi (BGs, bioactive glasses) contenenti SiO_2 , Na_2O , CaO e P_2O_5 in specifiche proporzioni. Questi vetri si distinguono dai comuni vetri sodico-calcici (soda-lime) per alcune caratteristiche: <60 mol% di SiO_2 , alto contenuto di Na_2O e CaO e alto rapporto $\text{CaO}:\text{P}_2\text{O}_5$. Queste caratteristiche rendono la superficie di questi vetri altamente reattiva quando esposta a fluidi biologici. Vetri con un grande contenuto di P_2O_5 non sono in grado di formare un legame chimico con l'osso. La figura 3 mostra come la capacità del vetro bioattivo di legarsi a tessuti duri come l'osso ma anche a tessuti molli sia funzione della sua composizione. Le composizioni nella regione A sono bioattive e in grado di legarsi all'osso, quelle nella regione B sono bioinerti e portano alla formazione di una capsula fibrotica non aderente, quelle nella regione C sono bioriassorbibili, nella regione E viene garantito il legame con tessuti molli e infine le composizioni nella regione D non sono state testate per impianti. Piccole aggiunte di Al_2O_3 , Ta_2O_5 , TiO_2 , Sb_2O_3 , o ZrO_2 inibiscono il legame con l'osso.

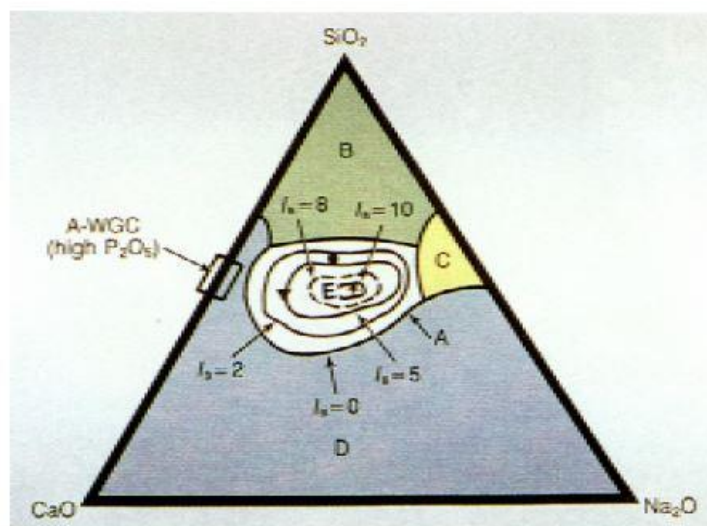


Figura 3. Grafico che mostra come la bioattività di un vetro e vetroceramico bioattivo dipenda dalla sua composizione (wt%), a seconda della regione si ha un comportamento diverso [20].

Composizioni a base di ossido di boro o ossido di fosforo mostrano una dissoluzione più rapida e una bioattività più adatta per l'ingegneria di tessuti molli [31].

Come riassunto in figura 4, la formazione del legame tra vetro bioattivo e tessuto osseo consiste in una serie di reazioni chimiche superficiali. Durante le prime cinque fasi si verificano:

- Rapido scambio ionico tra il biovetro e il fluido corporeo, con un aumento del pH della soluzione a contatto con la superficie del vetro bioattivo;
- Dissoluzione della struttura vetrosa con formazione di gruppi silanoli Si-OH superficiali;
- Condensazione e ri-polimerizzazione dei gruppi silanoli superficiali a formare un primo strato interno idratato e simil-gel ricco di silice SiO₂;
- Migrazione di ioni calcio Ca²⁺ e fosfato PO₄³⁻ attraverso lo strato di gel di silice in modo da formare un secondo strato più esterno e amorfo a base CaO-P₂O₅;
- Cristallizzazione di questo strato esterno per incorporazione di anioni OH⁻, CO₃²⁻ e F⁻ dal fluido biologico in modo da formare uno strato di HCA.

Successivamente si ha l'assorbimento di fattori di crescita e una serie di eventi cellulari che portano alla formazione di nuovo tessuto osseo: viene influenzato il ciclo cellulare delle cellule osteoprogenitrici che vanno incontro a mitosi e si ha la proliferazione e il differenziamento in osteoblasti, con questi che poi, tramite l'attivazione di particolari geni, vengono stimolati a produrre e mineralizzare nuova matrice ossea.

È stato dimostrato che lo step critico per il meccanismo di bioattività e per la rigenerazione ossea è il rilascio controllato di ioni in seguito alla dissoluzione del vetro.

Il meccanismo di bioattività e la rapidità delle reazioni dipendono dalla composizione del vetro bioattivo. Quando la concentrazione di SiO_2 all'interno della struttura vetrosa è superiore al 55 mol% la velocità delle reazioni è molto bassa, addirittura ad una concentrazione del 60 mol% le reazioni sono talmente lente che il materiale si può considerare biologicamente inerte. È importante sottolineare che questa considerazione vale per i vetri bioattivi ottenuti tramite metodo melt-quenching, come verrà spiegato nei prossimi paragrafi. I vetroceramici bioattivi possiedono una reattività e quindi una velocità delle reazioni intermedie [20], [25].

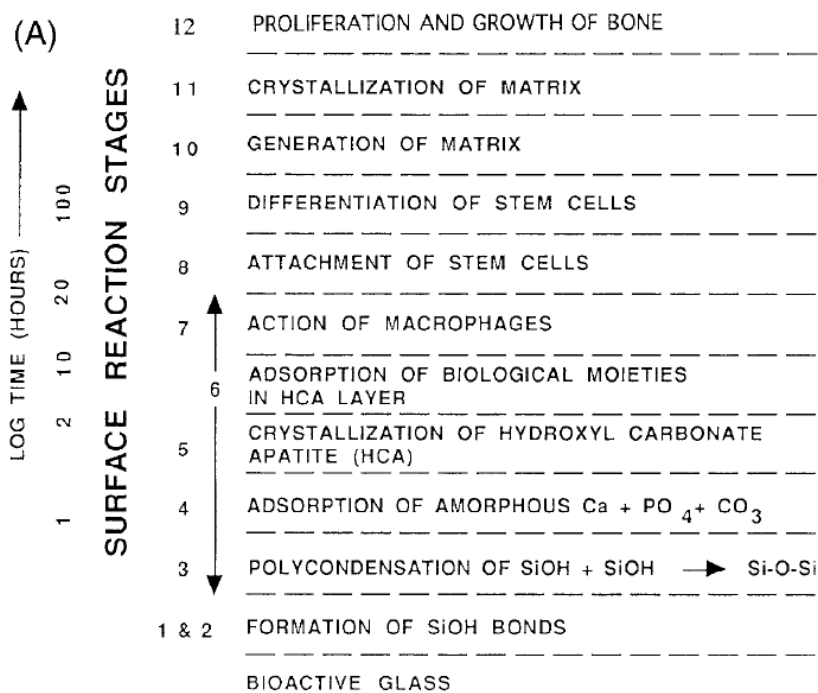


Figura 4. Sequenza di reazioni interfacciali alla base del legame tra tessuto osseo e vetro bioattivo impiantato [20].

I dispositivi a base di Bioglass® 45S5 oggi commercializzati si possono trovare in forma di particolato oppure come dispositivi monolitici, cioè prodotti finali macroscopici con diametro superiore a 1 cm. Tra i primi possiamo trovare *Perioglas*® utilizzato per trattare difetti e perdita di osso in ambito parodontale in caso di parodontite o in seguito ad estrazione dentale, *Novabone*® utilizzato come riempitivo osseo in ambito ortopedico in siti non portanti e il *Novamin*® utilizzato invece per il trattamento dell'ipersensibilità dentale. In forma monolitica invece abbiamo

l'*EPI* (impianto percutaneo extracocleare) utilizzato come impianto nella ricostruzione dell'orecchio medio e l'*ERMI* (impianto endosseo di mantenimento della cresta alveolare) utilizzato per favorire la ricostruzione dentale in seguito ad estrazione [25], [31], [32]. I vetri bioattivi trovano anche applicazione clinica nell'ambito della chirurgia maxillofacciale, nel trattamento di ferite e nella chirurgia spinale [32].

Nella tabella 1 seguente sono riportate alcune delle formulazioni di vetro bioattivo indagate, di composizione diversa e quindi anche con proprietà di reattività diverse.

Tabella 1. Alcune tra le composizioni (wt%) di vetro bioattivo più studiate [31].

45S5	45SiO ₂ -24.5Na ₂ O-24.5CaO-6P ₂ O ₅
13-93	53SiO ₂ -6Na ₂ O-12K ₂ O-5MgO-20CaO-4P ₂ O ₅
13-93B3	53B ₂ O ₃ -6Na ₂ O-12K ₂ O-5MgO-20CaO-4P ₂ O ₅
S53P4	53SiO ₂ -20CaO-23Na ₂ O-4P ₂ O ₅
70S30C	70SiO ₂ -30CaO
58S	58SiO ₂ -33CaO-9P ₂ O ₅
1-98	52.7SiO ₂ -1B ₂ O ₃ -6Na ₂ O-11K ₂ O-5MgO-22CaO-2P ₂ O ₅
P50C35N15	71P ₂ O ₅ -19.7CaO-9.3Na ₂ O

1.3.3 Vetrocereamici bioattivi

In base ad una definizione rivisitata e moderna, un vetroceramico bioattivo è “un materiale inorganico e non metallico che contiene almeno una fase cristallina all'interno di una matrice vetrosa e che è stato progettato in modo da indurre una specifica attività biologica”. Si possono ottenere vetroceramici bioattivi attraverso una cristallizzazione indesiderata di un vetro bioattivo dopo la fusione e colata per via del raffreddamento, durante la stabilizzazione del gel nel metodo sol-gel o durante la sinterizzazione. In generale però è consigliato procedere attraverso un controllato trattamento termico, in modo da poter controllare le caratteristiche delle fasi cristalline che si formano. Tra le principali fasi cristalline che mostrano biocompatibilità troviamo l'apatite, la wollastonite, la mica e la combeite [31]. La fase cristallina apatite fornisce bioattività mentre le altre fasi cristalline migliorano le proprietà meccaniche, che per un vetroceramico bioattivo sono superiori rispetto a quelle di un vetro bioattivo [33].

La formazione di fasi cristalline durante la sinterizzazione di polveri per ottenere uno scaffold a base di vetro bioattivo è considerata problematica perché ostacola il flusso viscoso di materiale, impattando negativamente sulle proprietà meccaniche finali dello scaffold. Per questo motivo, per

facilitare la sinterizzazione di scaffold porosi a base di vetro bioattivo senza la formazione di fasi cristalline si ricorre a composizioni con una scarsa tendenza a cristallizzare come la 1393 (vedi tabella 1). In generale, SiO_2 aumenta la stabilità del vetro verso la cristallizzazione mentre P_2O_5 favorisce la cristallizzazione ma può anche ridurre la velocità di nucleazione oltre una certa concentrazione [33].

Tra i vetroceramici bioattivi più noti troviamo *Cerabone® A/W*, *Ceravital®*, *Ilmaplant® L1* e *Bioverit®*. Il Cerabone A/W, quello più noto e importante, contiene cristalli di ossifluoroapatite e wollastonite (CaSiO_3) all'interno di una matrice vetrosa a base CaO-SiO_2 , presenta ottime proprietà meccaniche e un'elevata resistenza interfacciale del legame con l'osso. Il Bioverit è un vetroceramico bioattivo silicato-fosfato contenente cristalli di apatite e mica, con quest'ultima che conferisce buona lavorabilità [20].

Per quanto riguarda l'effetto della cristallizzazione di un vetro bioattivo sulla bioattività, alcuni sostengono che l'effetto sia negativo e sia quindi da evitare, mentre altri sostengono che non sia influente o che addirittura migliori la bioattività. Il tipo e la composizione delle fasi cristalline presenti ma anche la composizione e la microstruttura della matrice vetrosa residua influiscono sulla velocità di dissoluzione e quindi di scambio ionico, sulla rapidità e formazione dello strato di HCA. Quello che si è osservato è che la formazione di fasi cristalline silicate ritarda ma non inibisce la formazione dello strato di HCA. Inoltre, cristalli interni di apatite e di whitlockite fungono da siti di precipitazione superficiale [33].

1.3.4 Compositi bioattivi

Una scelta progettuale frequente è quella di incorporare una seconda fase dispersa bioattiva all'interno di una matrice polimerica, adottando un approccio che risulta essere di per sé biomimetico dal momento che anche l'osso è un composito apatite-collagene. Come materiali polimerici si possono utilizzare il polietilene (PE), il PEEK e il polisolfone (PSU). Nel caso in cui è necessario che il materiale finale sia biodegradabile, si possono utilizzare polimeri come PLA, PGA, PCL e PHB. Realizzare dei compositi a base di bioceramici bioattivi permette di risolvere il problema legato alla fragilità della loro forma massiva, che ne limita le applicazioni, e di modulare proprietà come la porosità, il modulo elastico e la velocità di degradazione [32], [34]. Questa tipologia di materiali multifunzionali viene sviluppata per cercare di avvicinarsi alla tenacità a frattura, alla duttilità e al modulo elastico del tessuto osseo. Uno dei primi compositi bioattivi a matrice polimerica studiati è stato il composito HAp/HDPE, commercialmente conosciuto come HAPLEX, a cui hanno fatto seguito

compositi costituiti da PE come matrice e vetro o vetroceramico bioattivo come fase dispersa. La matrice polimerica fornisce duttilità e una bassa deformazione a rottura, mentre la fase dispersa bioattiva determina un aumento del modulo elastico e quindi un irrigidimento [20].

La seconda fase dispersa deve avere una morfologia e delle caratteristiche superficiali tali da garantire una buona interazione meccanica o chimica con la matrice, evitando problemi come il distacco (de-bonding) durante l'applicazione di sollecitazioni. Si deve evitare la formazione di aggregati, cercando invece di garantire una dispersione fine e omogenea. Questi parametri saranno influenzati dal processo di sintesi delle due fasi. Ai fini della bioattività del composito finale, è importante la frazione volumetrica di fase bioattiva dispersa: per esempio nel caso dei compositi a matrice polimerica, si assume come valore minimo una frazione in volume pari al 20% [34].

Generalmente la fase bioattiva dispersa è sottoforma di particelle o di fibre. Oltre ad una matrice polimerica biodegradabile, un'altra possibilità è utilizzare un hydrogel in modo da ottenere un prodotto finale bioattivo e iniettabile. La fase dispersa può anche essere ceramica o metallica bioinerte, sottoforma di microparticelle o nanoparticelle, all'interno di una matrice di vetro bioattivo, in modo da migliorare la tenacità a frattura dello scaffold a base di vetro bioattivo. In figura 5 sono riportati alcuni esempi di compositi bioattivi, con caratteristiche finali diverse a seconda dei componenti di partenza [35].

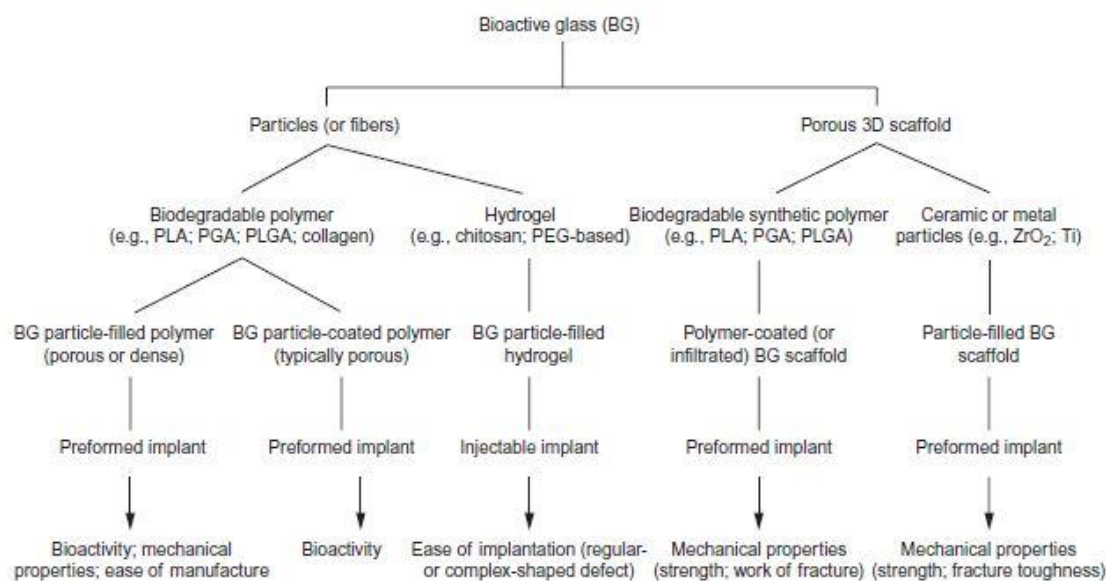


Figura 5. Principali tipi di compositi basati su vetri bioattivi, con la loro morfologia, composizione e proprietà finali [35].

1.4 Metodi di sintesi di vetri e vetroceramici bioattivi

I due principali metodi di produzione dei vetri bioattivi sono il metodo di fusione e colata, anche noto in letteratura come metodo melt-quenching, e il metodo sol-gel per via umida. Come verrà descritto di seguito, i due metodi permettono di ottenere materiali bioattivi con morfologie e caratteristiche diverse. Come già detto precedentemente nella sezione 1.3.3, i vetroceramici bioattivi si ottengono per cristallizzazione indesiderata di un vetro bioattivo dopo la fusione e colata per via del raffreddamento, durante la stabilizzazione del gel nel metodo sol-gel o sottoponendo le polveri di vetro bioattivo ottenute ad un trattamento termico controllato. Nella seguente figura 6 sono schematizzati, sottoforma di diagramma di flusso, i diversi passaggi dei due metodi di sintesi citati.

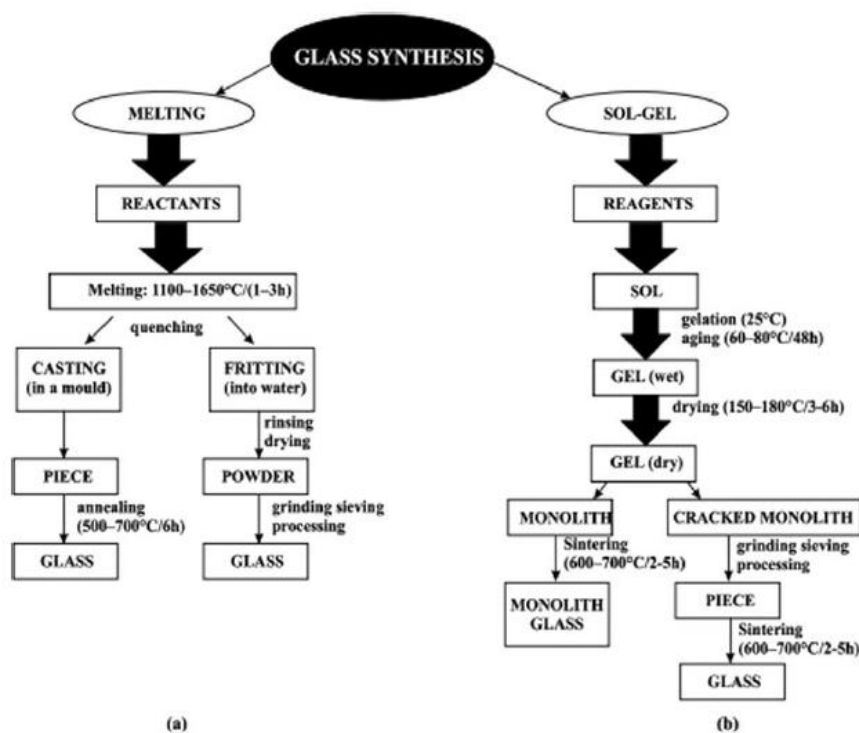


Figura 6. Schema riassuntivo dei due principali metodi di sintesi di un vetro bioattivo, mettendo in evidenza i vari passaggi [36].

1.4.1 Metodo melt-quencing

È il metodo più comune e tradizionale. I materiali precursori di partenza, generalmente a base di ossidi, carbonati e sali inorganici, sono in forma di polveri. Preliminarmente si ha una fase di macinazione, a secco o ad umido utilizzando acetone o etanolo, in modo da rompere eventuali agglomerati ed ottenere polveri di dimensione omogenea. Successivamente le polveri sono fatte essiccare in aria, trasferite in un crogiolo in allumina o platino e poi portate a fusione all'interno di un forno ad alta temperatura. Le temperature di fusione sono più alte per vetri alluminosilicati, anche fino a 1500°C, mentre sono più basse per vetri borati o fosfati, intorno a 1200-1300°C. Prima della fase di fusione vera e propria si effettua una calcinazione e un mantenimento di almeno un'ora alla temperatura di fusione in modo da garantire una fusione omogenea. A questo punto il fuso viene colato in uno stampo di grafite o metallico e raffreddato in aria, in modo da ottenere un dispositivo monolitico come una barretta o altre forme a seconda della geometria dello stampo. Questo quencing in aria permette di evitare fenomeni di cristallizzazione. Un'altra possibilità è quella di effettuare il quencing tramite raffreddamento rapido in acqua, ottenendo la cosiddetta fritta da cui poi si ottengono polveri di biovetro. Con questo metodo il biovetro è ottenibile anche sottoforma di scagliette (flakes). I vetri bioattivi ottenuti per melt-quencing presentano bioattività per un contenuto di silice < 60 mol%. Esempio di vetro bioattivo ottenuto con questo metodo è il Bioglass 45S5 [21], [36].

1.4.2 Metodo sol-gel

Si tratta di un metodo di sintesi per via umida, di tipo bottom-up, basato sulla manipolazione e miscelazione dei reagenti a livello atomico. Viene utilizzato per preparare polimeri inorganici o ceramici passando da uno stato di sol ad uno stato di gel.

Per sol si intende una dispersione di particelle solide colloidali (dimensione 1-100 nm) in un liquido, mentre per gel si intende una struttura tridimensionale reticolata e con porosità interconnesse. Nel passaggio tra i due stati si verifica un aumento di viscosità del sistema. Sulla base di come avviene la rimozione della fase liquida dalle porosità e quindi l'essiccamento, un gel può essere definito xerogel o aerogel: nel primo caso si sfrutta l'evaporazione termica e si ottiene una struttura monolitica, nel secondo caso il liquido è rimosso in forma gassosa in condizioni supercritiche. Nel caso in cui la fase liquida sia un alcol, lo xerogel prende il nome di alcogel [37]. In letteratura viene fornita anche una classificazione più rigorosa delle tipologie di gel, sulla base della struttura molecolare finale e dei legami intermolecolari: una tipologia è quella dei polimeri metal-ossanici,

polimeri inorganici interconnessi attraverso legami covalenti e intermolecolari, che si formano per esempio in seguito ad idrolisi e condensazione di alcossidi metallici come il TEOS [38].

La chimica che sta dietro questo metodo consiste in reazioni contemporanee di idrolisi e condensazione dei precursori di partenza in fase liquida, generalmente alcossidi metallici $M(OR)_x$, composti metallorganici in cui vari ligandi organici sono legati ad un elemento metallico o metalloide. Gli alcossidi metallici sono i precursori più utilizzati in quanto reagiscono facilmente con l'acqua e durante questa reazione di idrolisi i gruppi OR (gruppi alcossili, con R gruppo alchilico) sono sostituiti da gruppi OH (gruppi ossidrili). Nel caso di alcossido metallico a base di silicio questo porta alla formazione di gruppi silanoli Si-OH [39].

Ai fini della sintesi dei biovetri, l'attenzione è posta sugli alcossidi metallici a base di silicio, mentre per la sintesi sol-gel di altri materiali se ne considerano altri di diversa natura, per esempio a base di metalli di transizione come il titanio e lo zirconio [38].

In figura 7 è rappresentata la sintesi sol-gel partendo da un precursore alcossido a base di silicio in soluzione acquosa, in presenza di un catalizzatore. Sono evidenziate le reazioni di idrolisi e condensazione del precursore.

A seconda dell'ossido formatore del vetro o vetroceramico bioattivo che si vuole ottenere, si sceglierà di conseguenza il precursore di partenza: generalmente nel caso di vetro a base di SiO_2 si utilizza il TEOS con formula $Si(OC_2H_5)_4$, mentre per P_2O_5 si utilizza il TEP con formula $PO(OC_2H_5)_3$ e per il B_2O_3 si utilizza il trimetil borato (TMB) con formula $B(OCH_3)_3$. Per quanto riguarda gli ossidi modificatori in genere si utilizzano sali come i nitrati, un esempio è il CN. Generalmente i cationi modificatori non entrano nel network di silice finché non si effettua il trattamento termico di stabilizzazione del gel. Ad essere sintetizzati tramite questo metodo sono soprattutto i biovetri silicati [40].

Dal punto di vista storico, i primi importanti studi furono condotti da T. Graham: egli osservò che miscelando TEOS e acqua si verifica la formazione di un network di silice e quindi di un gel che poi, in seguito ad essiccamento, dà origine ad una struttura vetrosa di silice. Successivamente, è stato il professor L. Hench a proporre il metodo sol-gel per la fabbricazione di biovetri [41].

Per realizzare strutture sol-gel monolitiche si possono adottare tre approcci:

- *Metodo 1:* gelificazione partendo da particelle colloidali poste in soluzione, che interagiscono la loro portando alla formazione del network e del gel di silice;

- *Metodo 2*: idrolisi e policondensazione di precursori alcossidi in forma liquida o nitrati, seguite da una fase di essiccamento del gel in condizioni supercritiche (critical-point drying), con ottenimento di un aerogel;
- *Metodo 3*: idrolisi e policondensazione di precursori alcossidi in forma liquida, seguite da una fase di invecchiamento (ageing) ed essiccamento (drying) in condizioni atmosferiche, con ottenimento di uno xerogel;

In riferimento al metodo 3, possiamo riassumere di seguito i diversi passaggi:

- *Fase 1*: si ha la miscelazione in acqua dei precursori alcossidi in forma liquida, seguita da reazioni di idrolisi e parziale condensazione. Nel caso degli alcossidi metallici a base di silicio Si(OR)_4 l'idrolisi porta alla sostituzione dei gruppi -OR con gruppi -OH e formazione quindi di gruppi silanoli Si-OH. Successivamente con la reazione di condensazione si ha la formazione di gruppi silossanici Si-O-Si con eliminazione di una molecola d'acqua o di alcol, come illustrato in figura 7. I diversi legami silossanici si comportano come particelle colloidali con legami intramolecolari, formando in questo modo il sol;
- *Fase 2*: si ha la deposizione del sol in un opportuno stampo (casting), in modo da ottenere una specifica morfologia finale;
- *Fase 3*: si ha la gelificazione per policondensazione, cioè le particelle colloidali a base silice formatesi si legano le une alle altre formando una rete tridimensionale e quindi un gel (umido) di morfologia opportuna;
- *Fase 4*: si ha l'invecchiamento (aging) del gel durante il quale la policondensazione continua e si verifica una diminuzione della porosità del gel ed un aumento delle sue proprietà meccaniche come la resistenza;
- *Fase 5*: si ha l'essiccamento (drying) del gel, in modo da rimuovere il liquido intrappolato nelle porosità del network;
- *Fase 6*: si ha la stabilizzazione chimica del gel (secco), consistente nella rimozione di gruppi silanoli superficiali dalle porosità del network, per trattamento termico a 500-800°C;
- *Fase 7*: si ha la densificazione del gel e quindi la riduzione delle porosità, per trattamento ad alta temperatura in genere inferiore a 1000°C.

Questi passaggi permettono di ottenere strutture monolitiche [37].

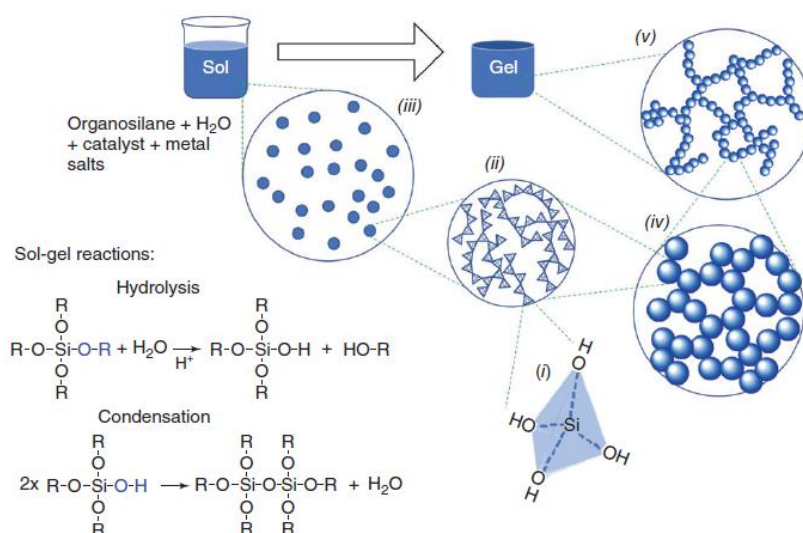


Figura 7. Schema illustrativo del metodo sol-gel: viene messa in evidenza l'organizzazione delle unità strutturali di silice in soluzione e le reazioni di idrolisi e condensazione [40].

Gli aspetti vantaggiosi del metodo sol-gel rispetto al metodo melt-quenching, per quanto riguarda la sintesi di vetri e vetroceramici bioattivi, sono i seguenti [21], [37], [38], [40], [41], [42]:

- Range di composizioni più vasto;
- Apparecchiature e strumentario per la sintesi più semplice;
- Composizioni più semplici a parità di bioattività: ad esempio una composizione binaria SiO₂-CaO ottenuta tramite metodo sol-gel può presentare una bioattività paragonabile alla composizione quaternaria del Bioglass 45S5 ottenuto tramite metodo melt-quenching;
- Temperature di lavoro più basse, anche nell'intorno della temperatura ambiente;
- Miglior controllo sulla morfologia e sulla taglia delle particelle sintetizzate;
- Area superficiale specifica e rapporto superficie-volume maggiori, per via all'intrinseca natura mesoporosa (pori di dimensione 2-50 nm) dei biovetri ottenuti tramite metodo sol-gel: questo fa sì che la cinetica di rilascio e di scambio ionico, la velocità di degradazione e la bioattività siano maggiori a parità di composizione. Inoltre, il contenuto limite di SiO₂ entro cui è garantita la bioattività è pari al 90 mol% contro il 60 mol% del caso melt-quenching;
- Maggiore versatilità: il biovetro finale può essere ottenuto in forma di film, fibre, monoliti, polveri, rivestimenti;
- Elevata purezza e omogeneità dei prodotti finali;
- Possibilità di incapsulare nel materiale ioni dopanti o altre biomolecole con attività biologica specifica;
- Elevata presenza di gruppi silanoli superficiali, utili per successive funzionalizzazioni;

Tuttavia, i vetri sol-gel presentano una maggiore fragilità e più basse proprietà meccaniche rispetto ai biovetri melt-quenched con la stessa composizione: questa è un'altra conseguenza, in questo caso negativa, dell'intrinseca natura mesoporosa dei biovetri sol-gel [21].

La morfologia e struttura finale del gel variano in funzione di parametri di processo come il tipo di catalisi (acida o basica) e concentrazione di catalizzatore, tipo e concentrazione di precursore, temperatura, pressione, tipo di solvente, fattore R (numero di moli di acqua/numero di moli di precursore), tempo e temperatura delle fasi di invecchiamento, essiccamento e stabilizzazione del gel [37], [38], [40], [42]. Questi parametri influiscono sulla velocità relativa delle reazioni di idrolisi e condensazione e quindi sul rapporto tra le costanti di velocità delle reazioni k_H e k_C . È importante ricordare che queste due reazioni si verificano simultaneamente [37].

Alcuni studi hanno dimostrato che sol a basso contenuto di acqua portano alla formazione di strutture lineari, utili per ottenere strutture finali fibrose a base di vetro bioattivo. Sol a più alto contenuto di acqua invece formano strutture più ramificate e reticolate e sono adatti per ottenere strutture monolitiche [43].

Il parametro di processo più importante, insieme al contenuto di acqua, è il catalizzatore (tipo e concentrazione) e il conseguente pH della sospensione. In genere in condizioni neutre le reazioni di idrolisi e condensazioni sono lente e per questo le si accelera sfruttando un catalizzatore acido o basico, che cambierà il pH della sospensione. In condizioni acide è più veloce l'idrolisi e la sua velocità aumenta con la concentrazione del catalizzatore acido: prevale la nucleazione e la formazione di monomeri idrolizzati piuttosto che la loro aggregazione, di conseguenza il gel che si forma avrà una struttura reticolata basata su piccole particelle di silice, con una grande area superficiale e piccole porosità. In condizioni basiche invece ad essere più veloce è la reazione di condensazione e la sua velocità aumenta con la concentrazione del catalizzatore basico: in questo caso si formano pochi centri di nucleazione che tendono a condensare formando una struttura del gel a base di particelle di silice più grandi, con una minore area superficiale e porosità più grandi [40]. Quanto detto è mostrato in figura 8.

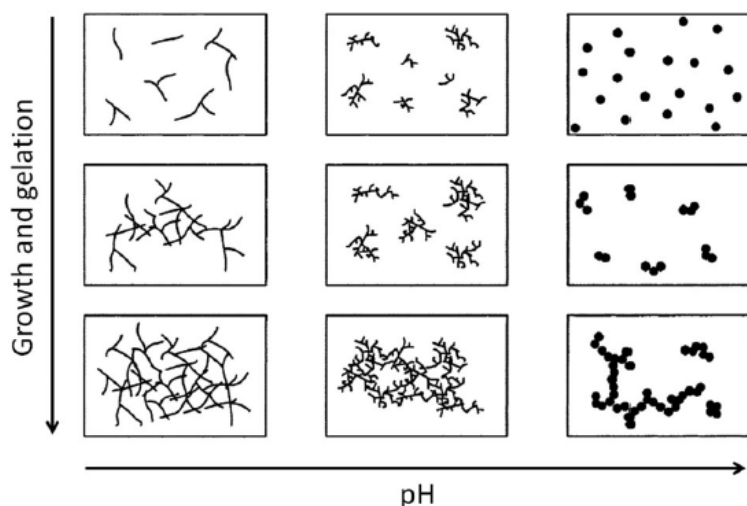


Figura 8. Grafico che mostra l'effetto del pH sulla crescita e formazione del gel durante la sintesi sol-gel [38].

In realtà la cinetica non dipende tanto dal tipo di catalizzatore acido/basico quanto dal valore di pH raggiunto dalla sospensione [42].

Considerando l'idrolisi e condensazione del TEOS, si possono ottenere strutture di silice sottoforma di particelle dense a pH elevato (>7) oppure polimeriche reticolate a pH basso (<2), come mostrato in figura 9 [40].

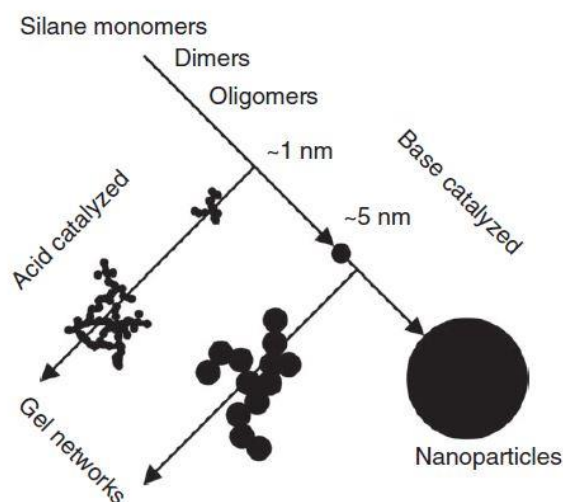


Figura 9. Influenza del pH e del tipo di catalisi sulla morfologia di un vetro sol-gel a base silice [40].

Il tipo di catalizzatore, la sua concentrazione e il pH della sospensione influiscono anche sul tempo di gelificazione del sistema, riducendolo a seconda del tipo di sintesi [21].

1.5 Sintesi di micro- e nano- particelle di vetro bioattivo

Questo paragrafo tratta la sintesi di micro- e nano- particelle di vetro bioattivo, introducendo metodi che si applicano in principio per particelle di silice amorfa. Questa trattazione risulta importante perché meccanismi analoghi sono alla base di rivestimenti (coating) di silice o vetro bioattivo su particelle di natura diversa, in modo da realizzare configurazioni core-shell.

Scendendo di scala dimensionale si ha che la bioattività aumenta: crescono l'area superficiale specifica, il rapporto superficie-volume, la rapidità di dissoluzione e quindi di scambio ionico. Di conseguenza gli effetti vengono amplificati passando da un dispositivo monolitico macroscopico a particelle micrometriche e ulteriormente con particelle nanometriche [44].

Per quanto riguarda i metodi utilizzabili per la realizzazione di nanoparticelle di vetro bioattivo troviamo il metodo sol-gel, pirolisi spray, irradiazione con microonde, sintesi alla fiamma e il metodo delle microemulsioni (con o senza surfattante) [45].

Di seguito si tratterà del metodo sol-gel conosciuto come processo Stober.

1.5.1 Processo Stober

Introdotta nel 1968, il processo Stober è un metodo sol-gel per sintetizzare micro- e nano- particelle di silice amorfa con morfologia, composizione, dispersione e proprietà chimico-fisiche controllate, in condizioni basiche ($\text{pH} > 7$).

Tra le possibili applicazioni abbiamo lo sviluppo di vetri nanostrutturati con caratteristiche di super-idrofobicità, di dispositivi nanometrici non tossici e biocompatibili per rilascio di farmaco, di sensori alla nanoscala, applicazioni nell'ambito della catalisi e dell'adsorbimento di molecole [46]. Queste morfologie sono particolarmente adatte per realizzare nanocompositi, per esempio tramite inserimento in una matrice polimerica fotoreticolabile. A tal proposito è importante garantire una buona monodispersità delle particelle, le quali possono anche essere modificate in superficie con organosilani per favorire il legame con la matrice [47].

Si riescono ad ottenere particelle di diametro 0.05-2 μm , agendo sui parametri di processo.

In figura 10 è riportata un'immagine SEM raffigurante particelle colloidali di silice ottenute tramite processo Stober.

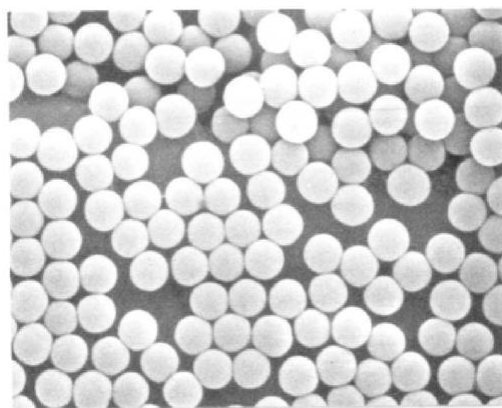


Figura 10. Immagine SEM di particelle colloidali di silice ottenute tramite processo Stober [37].

Considerando il più utilizzato sistema TEOS-etanolo-acqua, il protocollo di sintesi è semplice: si miscelano insieme etanolo, acqua (H_2O) e ammoniaca ($NH_{3(aq)}$), successivamente si aggiunge il TEOS e si mantiene tutto in agitazione (tramite stirring magnetico, shaker oppure trattamento ad ultrasuoni) per un certo tempo. Nelle fasi finali si fa una centrifugazione e lavaggio delle polveri ottenute che poi vengono essiccate e infine macinate. Con il sistema TEOS-etanolo-acqua però non è possibile ottenere particelle di dimensione superiore a $1\ \mu m$, a meno di non utilizzare un precursore e un solvente alcolico diversi [48].

Con il processo Stober è anche difficile ottenere nanoparticelle monodisperse con taglia inferiore a 50 nm. Un'alternativa può essere sfruttare un processo Stober modificato utilizzando un amminoacido basico come L-lisina oppure ricorrere al metodo delle microemulsioni [49].

J. Smith et al. [49] nel loro lavoro sono riusciti ad ottenere particelle colloidali di silice con una taglia $<20\ nm$, monodisperse e con bassa aggregazione, in concentrazione elevata nel sol, agendo sui rapporti molari TEOS:etanolo:acqua e senza utilizzare surfattanti o agenti disperdenti. Sono partiti da rapporti molari 1:126:9 ed hanno osservato che la concentrazione di silice nel sol aumenta all'aumentare del contenuto di TEOS e acqua e al diminuire del contenuto di etanolo. Per quanto riguarda la taglia delle particelle hanno osservato che questa aumenta all'aumentare del contenuto di acqua e al diminuire del contenuto di etanolo. Aspetto interessante di questo lavoro è che la rimozione del solvente in condizioni di pressione ridotta, utilizzando un evaporatore rotante a $55^\circ C$, ha permesso di ottenere particelle di silice con una concentrazione nel sol che passa dal 4 wt% al 15 wt%, utilizzando rapporti molari 5:79:9.

Numerosi studi sono stati condotti sui meccanismi di formazione, nucleazione e crescita delle particelle di silice, proponendo alcuni modelli teorici come [50], [51] (figura 11):

- *Monomer-addition model*: si ha la formazione di nuclei di silice per condensazione di due monomeri silanoli generati per idrolisi del TEOS. Successivamente si ha la crescita di questi nuclei per addizione di monomeri sulla loro superficie. Questo modello prevede che le fasi di nucleazione e crescita sia separate e si sfrutta per spiegare la formazione di grandi particelle monodisperse nel caso di una concentrazione elevata di ammoniaca (>0.95M);
- *Aggregation-only model*: in questo caso la nucleazione avviene dopo la condensazione dei monomeri silanoli a formare una struttura polimerica che poi diventa instabile e si divide in piccole particelle (nuclei) che tendono via via ad aggregarsi formando prima particelle di silice primarie e poi crescendo per attacco superficiale di monomeri e oligomeri. A differenza del monomer-addition model in questo caso si assume che la nucleazione continui durante l'intero processo e non solo nella prima fase. Si sfrutta per spiegare la formazione di piccole particelle di silice polidisperse nel caso di una concentrazione bassa di ammoniaca (<0.95 M);
- *In situ seeded growth model*: si tratta di un modello unificato e complesso, coerente con dati sperimentali, che postula l'esistenza di due fasi temporalmente distinte che sono pathway I (nucleazione e crescita iniziali) e pathway II (crescita e allargamento);

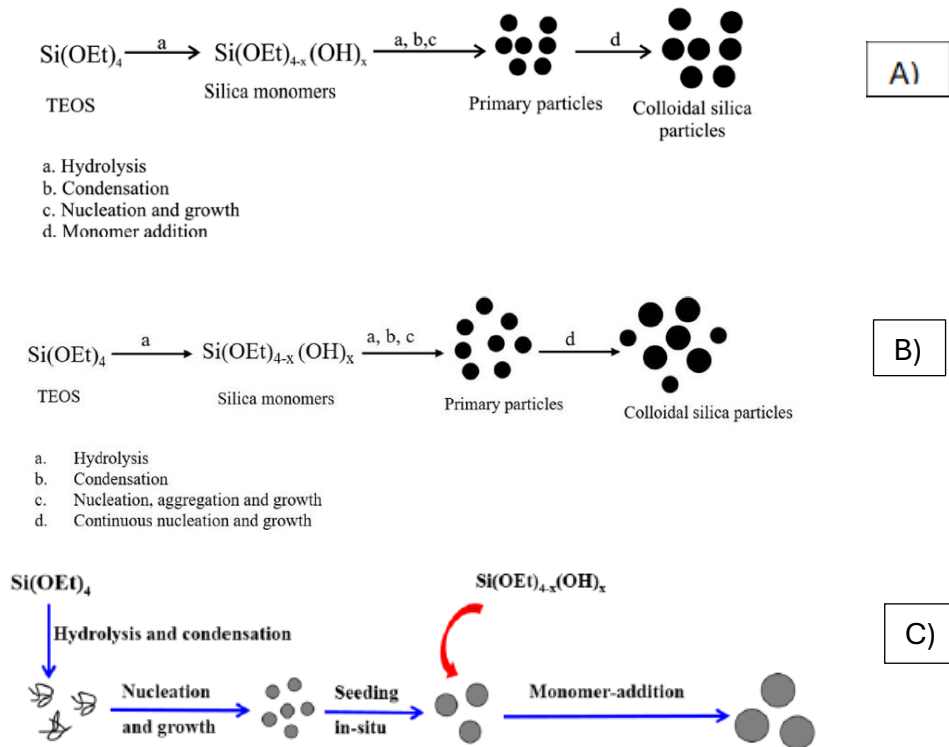


Figura 11. Illustrazione dei diversi modelli teorici sviluppati per spiegare la nucleazione e crescita delle particelle colloidali di silice: A) monomer-addition model, B) aggregation-only model, C) in situ seeded growth model [50], [51].

Di seguito verranno analizzati gli effetti dei diversi parametri di processo. A tal proposito vale la pena citare il lavoro [46], una review in cui si effettua un'analisi sistematica dei diversi protocolli e risultati ottenuti da differenti gruppi di ricerca. I parametri di processo principali sono [48]:

- Tipo di solvente alcolico (metanolo, etanolo, n-propanolo, n-butanolo) e sua concentrazione;
- Tipo di tetra-alchil silicato (metil, etil, n-propil, n-butil) e sua concentrazione;
- Concentrazioni di acqua;
- Concentrazione di ammoniaca;
- Temperatura di sintesi.

Questi parametri influiscono sulla cinetica delle reazioni di idrolisi e condensazione, sulla taglia delle particelle sintetizzate, sulla loro dispersità e quindi distribuzione di taglia. Solventi alcolici e tetra-alchil silicati diversi si distinguono soprattutto per la lunghezza delle loro catene e quindi per il loro peso molecolare: all'aumentare di questi aumenta la dimensione delle particelle di silice sintetizzate.

Effetto del TEOS

All'aumentare del contenuto di TEOS aumenta la taglia delle nanoparticelle di silice (figura 12). La monodispersità è garantita fino ad una concentrazione ottimale di TEOS, dopodiché prevale la polidispersità. Aggiungendo TEOS in più passaggi oppure in maniera dilazionata nel tempo si possono ottenere particelle di silice di dimensioni maggiori, 1-4.5 μm [50]. Aumentando troppo la concentrazione di TEOS, l'acqua per l'idrolisi del TEOS può risultare insufficiente e quindi nel sol può rimanere del TEOS non idrolizzato e non reagito [49].

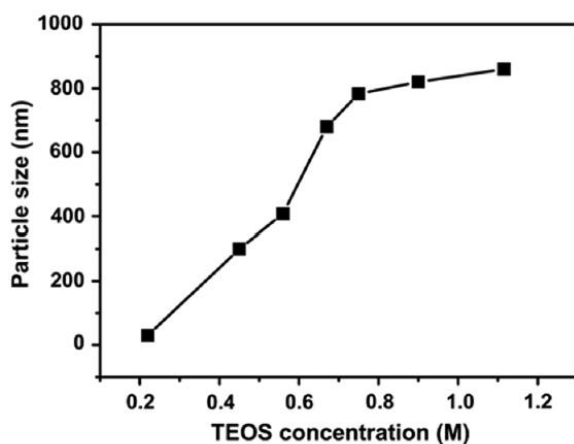


Figura 12. Effetto della concentrazione di TEOS sulla dimensione delle particelle di silice sintetizzate [50].

Effetto dell'ammoniaca

L'ammoniaca influisce sulla morfologia permettendo di ottenere particelle sferiche [48]. All'aumentare della concentrazione di ammoniaca si genera un numero maggiore di oligomeri silanoli in soluzione, aumenta il grado di condensazione e si ottengono quindi particelle di silice più grandi. La sua azione è quella di accelerare le reazioni di idrolisi e condensazione del TEOS. La polidispersità segue invece un andamento opposto, cioè diminuisce all'aumentare della concentrazione di ammoniaca. Controlla il grado di aggregazione delle particelle: produce ioni OH^- in soluzione che conferiscono una carica superficiale negativa alle particelle e la conseguente repulsione elettrostatica va ad inibire l'aggregazione [50], [52].

Effetto dell'acqua

In alcuni studi si è osservato che la dimensione delle particelle aumenta con la concentrazione dell'acqua fino ad un contenuto limite, dopodiché si ha una diminuzione dimensionale. Essa promuove le reazioni di idrolisi e condensazione, ma se in quantità elevata finisce per diluire gli oligomeri silanoli in soluzione e portare ad ottenere particelle più piccole. Entro un certo range di concentrazione la dimensione aumenta (aggregazione > nucleazione) mentre oltre questo range diminuisce (aggregazione < nucleazione), come mostrato in figura 13. Si è visto che aggiungendo del sale, la dimensione aumenta anche per alte concentrazioni di acqua [46], [52].

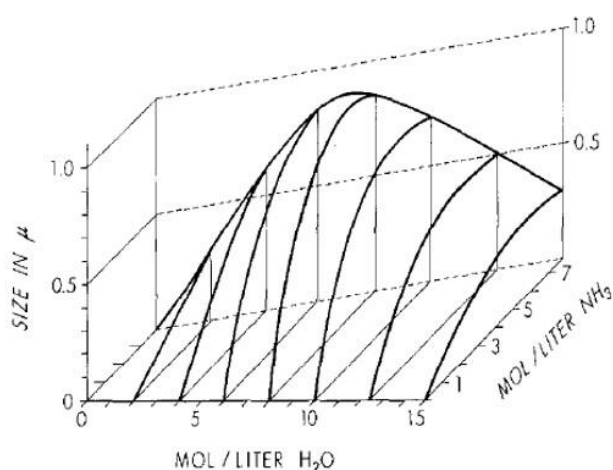


Figura 13. Dimensione delle particelle di silice colloidali sintetizzate in funzione delle concentrazioni di acqua e ammoniaca, considerando una concentrazione fissa di TEOS pari a 0.28 M [48].

Effetto della temperatura

La reazione di idrolisi è endotermica, mentre la reazione di condensazione è esotermica. Di conseguenza all'aumentare della temperatura la reazione di idrolisi è accelerata mentre quella di condensazione è rallentata. Pertanto, come spiegato nel paragrafo 1.4.2 relativamente all'effetto del pH nel metodo sol-gel, prevale la nucleazione e la formazione di monomeri idrolizzati piuttosto che la loro aggregazione, di conseguenza si formano piccole particelle di silice. Inoltre, diminuisce anche l'indice di polidispersità, ciò significa che ad alta temperatura le particelle di silice sintetizzate tendono ad essere più monodisperse e quindi con una distribuzione di taglia più stretta. Inoltre, una temperatura di lavoro elevata può portare ad un'evaporazione dell'ammoniaca e al conseguente rallentamento della reazione di condensazione [46], [52].

Effetto del solvente alcolico

Si è osservato che al diminuire del contenuto di etanolo aumentano la concentrazione di silice nel sol e la dimensione delle nanoparticelle sintetizzate [49].

1.5.2 Processo Stober modificato

Per produrre nanoparticelle di vetro bioattivo il processo Stober viene modificato introducendo altri precursori come il TEP per l'ossido formatore di fosforo e il CN per l'ossido modificatore di calcio, in modo da modificare la struttura interna delle nanoparticelle sintetizzate e impartire proprietà bioattive.

L'aggiunta di questi precursori avrà un effetto sulla taglia, forma e dispersità delle particelle, anche a basse concentrazioni. Un aspetto problematico è il fatto che la composizione effettivamente ottenuta si discosta da quella nominale, con le concentrazioni di Ca e P inferiori rispetto a quelle auspiccate. Gli ioni calcio, in seguito all'idrolisi e condensazione delle particelle di silice, tendono a legarsi ai gruppi silanoli superficiali carichi negativamente e poi a diffondere all'interno del network vetroso per calcinazione a 400°C. Affinchè la concentrazione di calcio sia elevata è fondamentale un'elevata presenza di gruppi silanoli superficiali sulle particelle sintetizzate e anche un'elevata forza di questi legami, in modo da resistere ad eventuali lavaggi pre-calcinazione. Per quanto riguarda invece gli ioni fosforo, la loro incorporazione nel network di silice avviene per idrolisi del TEP prima della nucleazione delle nanoparticelle [53].

Scelte importanti in questo tipo di sintesi sono l'istante temporale di aggiunta dei precursori modificati, l'ordine con cui vengono aggiunti e anche i relativi tempi di miscelazione e reazione [53], [54]. Una rappresentazione grafica del processo Stober modificato, per ottenere nanoparticelle di vetro bioattivo, è riportata in figura 14.

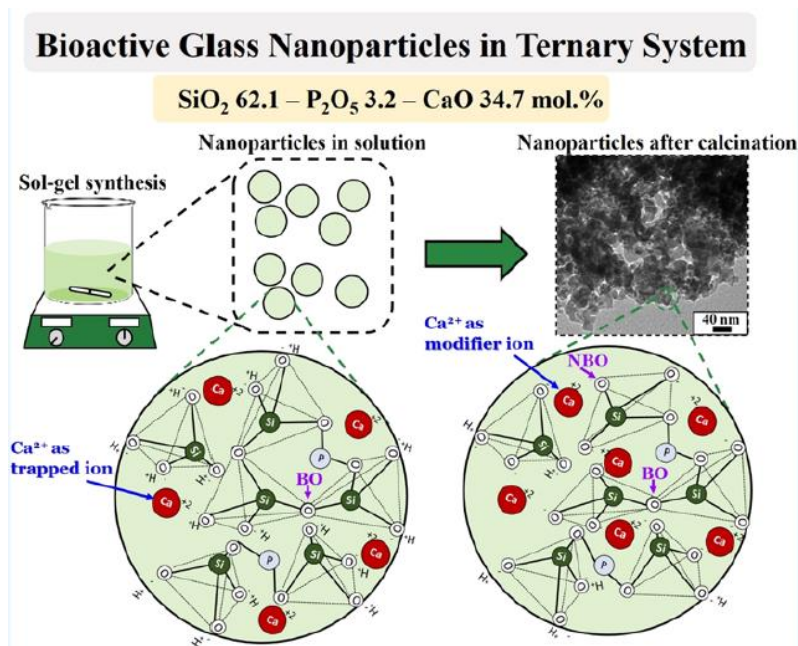


Figura 14. Esempio di nanoparticelle di vetro bioattivo a sistema ternario SiO_2 - CaO - P_2O_5 sintetizzate tramite processo Stober modificato [53].

1.6 Coating di silice o vetro bioattivo su particelle di natura diversa

Alcuni studi presenti in letteratura, come quelli che verranno descritti nel paragrafo 1.10, mettono in luce gli effetti che un rivestimento a base di silice amorfa o di vetro bioattivo possono avere su particelle di natura diversa, inorganica nel contesto di questa tesi.

Per quanto riguarda un rivestimento a base di silice amorfa, tra gli effetti troviamo:

- Modifica della chimica superficiale (es. reattività, energia libera) e della topografia superficiale (es. rugosità);
- Riduzione della tendenza all'aggregazione;
- Miglioramento della dispersibilità in soluzione acquosa e in matrici polimeriche;
- Miglioramento della biocompatibilità, riduzione del rilascio ionico e della citotossicità, come nel caso di NPs di BTO;
- Miglioramento della stabilità termica, come nel caso di NPs di ZrO_2 ;
- Modulazione delle proprietà ottiche, come nel caso di NPs di ZnO (es. fotoluminescenza, foto-stabilità e assorbimento di raggi UV);
- Modulazione delle proprietà dielettriche (es. rigidità dielettrica, polarizzazione residua) e ferroelettriche, di accumulo di energia e microstrutturali (es. inibizione della crescita dei grani), come nel caso di particelle di BTO e del ceramico massivo ottenuto per sinterizzazione;

Un rivestimento a base di vetro bioattivo conferisce invece al core capacità di osteoinduttività oltre a influire su proprietà del materiale ceramico sinterizzato quali porosità, densità e resistenza meccanica a compressione.

1.7 Piezoelettricità

1.7.1 Materiali dielettrici, piezoelettrici, piroelettrici e ferroelettrici

I materiali piezoelettrici biocompatibili sono una tipologia molto interessante di materiali smart, in grado di rispondere ad uno stimolo esterno inducendo una risposta specifica. Tra i materiali smart troviamo, oltre ai materiali piezoelettrici, anche quelli piroelettrici e ferroelettrici, in grado di convertire forme di energia primaria (es. meccanica, termica) in forme di energia secondaria (es. elettrica, chimica). Si tratta di forme diverse di un materiale dielettrico, accomunate dal fatto che la cella cristallina elementare è non-centrosimmetrica. A livello biomedico, questi materiali trovano applicazione, oltre che nell'ingegneria tissutale, anche per lo sviluppo di nuove terapie, di biosensori, di tecniche di imaging, nell'ambito della catalisi [55], [56].

Un materiale dielettrico è un materiale isolante che può essere polarizzato in seguito all'applicazione di un campo elettrico. Ponendo un dielettrico tra due piastre metalliche e applicando un campo elettrico E (V/m), si genera una densità di carica superficiale sulle piastre, anche chiamata spostamento elettrico D (C/m²). Per polarizzazione P (C/m²) invece si intende l'eccesso di densità di carica superficiale rispetto al caso in cui tra le piastre metalliche ci sia il vuoto. In formule si può scrivere:

$$D = \varepsilon E = \varepsilon_0 \varepsilon_r E = \varepsilon_0 E + P$$

dove ε_0 indica la permittività dielettrica nel vuoto, ε_r indica la permittività dielettrica relativa (o costante dielettrica) del materiale dielettrico e ε è semplicemente la permittività dielettrica del materiale dielettrico. Nel caso in cui il campo elettrico applicato sia alternato, ε_r sarà complessa e comprensiva di una parte reale ε_r' ed una parte immaginaria ε_r'' . La permittività è una grandezza dipendente dalla frequenza.

La performance di un materiale dielettrico dipende da parametri quali la permittività dielettrica, la perdita dielettrica e la rigidità dielettrica. La perdita dielettrica, definita come $\tan(\delta) = \frac{\varepsilon_r''}{\varepsilon_r'}$, trova origine nel fatto che la polarizzazione non è sempre in fase con il campo elettrico alternato applicato e si ha una dissipazione sottoforma di calore dell'energia elettrica accumulata. La rigidità dielettrica invece viene definita come l'intensità massima del campo elettrico che un materiale dielettrico può sopportare prima che si verifichi una scarica, una sua rottura irreversibile. I materiali dielettrici trovano applicazione come condensatori, cioè accumulatori di energia. La densità di energia

immagazzinata (J/m^3) in un materiale dielettrico in seguito ad applicazione di un campo elettrico viene definita come $U_e = \int \vec{E} \cdot d\vec{D}$ e dipende quindi dalla relazione tra E e D [57], [58].

I materiali dielettrici sono caratterizzati dalla presenza di dipoli elettrici all'interno del materiale, e di conseguenza da momenti di dipolo, intrinseci oppure indotti indirettamente dall'applicazione di un campo elettrico esterno, diretto o alternato. In presenza di un campo elettrico esterno si ha l'allineamento dei momenti di dipolo interni e di conseguenza si ha una polarizzazione del materiale: questa si può verificare per esempio perché ioni positivi o negativi oppure centri di carica positiva o negativa, all'interno di molecole e atomi, si separano e assumono la direzione del campo elettrico. Quindi sono i dipoli all'interno di un materiale dielettrico ad essere responsabili della polarizzazione. La polarizzazione macroscopica del materiale può essere definita come la somma vettoriale dei momenti di dipolo per unità di volume del materiale solido. La polarizzazione totale P è il risultato della sovrapposizione di tre diversi meccanismi di polarizzazione quali:

- *Polarizzazione elettronica (P_e):* l'applicazione di un campo elettrico esterno determina la separazione tra la nuvola elettronica e il nucleo positivo all'interno di un atomo. Si tratta di un effetto indotto, infatti la polarizzazione svanisce in seguito alla rimozione del campo elettrico;
- *Polarizzazione ionica (P_i):* tipica dei materiali ionici, l'applicazione di un campo elettrico esterno deforma i legami tra cationi e anioni, generando dei momenti di dipolo indotti;
- *Polarizzazione orientazionale (P_o):* riguarda molecole che presentano al loro interno dei momenti di dipolo permanenti. L'applicazione di un campo elettrico fa sì che questi dipoli molecolari si orientino, in quanto si genera un momento torcente su ciascun dipolo elettrico [58];

Si distingue tra materiali dielettrici non polari e polari: nel primo caso ciascuna molecola non presenta un momento di dipolo permanente in quanto le cariche al suo interno sono equamente distribuite, nel secondo caso invece ciascuna molecola presenta un momento di dipolo permanente [57].

In alcuni materiali dielettrici polari, i dipoli permanenti interni interagiscono gli uni con gli altri e si allineano lungo certe direzioni, determinando una polarizzazione spontanea anche in assenza di campo elettrico esterno applicato: questi materiali sono i *materiali piroelettrici*. La loro peculiarità è che questa polarizzazione spontanea cambia al variare della temperatura, in quanto si modificano leggermente le posizioni atomiche all'interno della struttura cristallina. Se si considera un cristallo piroelettrico, questo cambiamento di polarizzazione generano un voltaggio attraverso esso. In questo modo si ha la conversione di energia termica in energia elettrica [57], [59].

Se un materiale piroelettrico sottoposto ad un campo elettrico esterno mostra un'inversione della polarizzazione spontanea, e una modifica della sua direzione e intensità, si parla di *materiale ferroelettrico*. I materiali ferroelettrici presentano una temperatura critica T_c (temperatura di Curie): il comportamento è ferroelettrico per $T < T_c$ mentre per $T > T_c$ diventa paraelettrico, cioè perde la polarizzazione spontanea e si comporta da normale dielettrico. La polarizzazione di un materiale ferroelettrico viene ricondotta a strutture chiamate domini elettrici, all'interno dei quali i dipoli elettrici sono allineati e la direzione della polarizzazione è uniforme. Si ha che un dominio elettrico ha il vettore polarizzazione orientato in maniera diversa rispetto ad un dominio adiacente. In un ferroelettrico policristallino, i domini elettrici arbitrariamente orientati possono essere allineati mediante l'applicazione di un forte campo elettrico esterno [55], [57], [58]. Una volta rimosso questo campo elettrico esterno, alcuni domini elettrici mantengono la direzione acquisita e questo garantisce una polarizzazione rimanente nel materiale ferroelettrico. Si tratta di una condizione necessaria per permettere al materiale ferroelettrico di avere un comportamento piezoelettrico, altrimenti i domini elettrici sono orientati casualmente in direzioni diverse e non si ha una polarizzazione residua macroscopica. Si parla di processing di poling ed è applicabile soltanto a materiali piezoelettrici che sono anche ferroelettrici, mentre non è applicabile a quelli non-ferroelettrici. Durante il processo di poling si verifica, per effetto piezoelettrico inverso, una deformazione del materiale, come illustrato in figura 15. La valutazione della ferroelettricità di un materiale può essere fatta anche osservando il grafico P-E: deve presentarsi un'isteresi, per via della risposta dei domini elettrici al campo elettrico applicato [60].

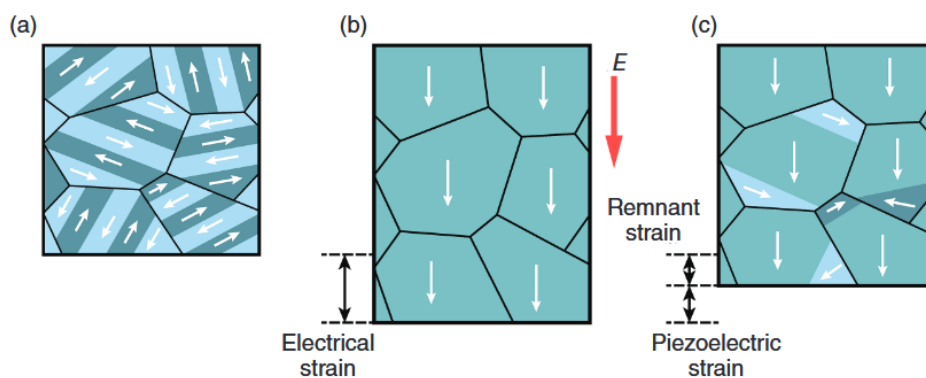


Figura 15. Raffigurazione del processo di poling su un materiale ferroelettrico ed effetto sui domini elettrici: a) stato iniziale, b) stato di polarizzazione di saturazione, c) stato di polarizzazione residua [60].

Un materiale piezoelettrico è un materiale la cui struttura cristallina si modifica quando viene applicata una sollecitazione meccanica esterna, generando momenti di dipolo non nulli all'interno del reticolo cristallino e quindi una polarizzazione netta. La sollecitazione meccanica determina un aumento o una diminuzione della lunghezza dei dipoli, alterando in questo modo la polarizzazione e quindi la densità di carica superficiale sul cristallo. Questo riguarda l'effetto piezoelettrico diretto, mentre nel caso dell'effetto piezoelettrico inverso un campo elettrico esterno applicato determina una deformazione per trazione o compressione del cristallo in quanto viene alterato lo spazio occupato dai dipoli. Pertanto, i materiali piezoelettrici sono una categoria di materiali dielettrici polarizzabili per effetto di un campo elettrico o di una sollecitazione meccanica [56], [58], [59].

Relativamente ad un materiale cristallino, si hanno 32 classi cristallografiche: tra queste abbiamo 21 classi non-centrosimmetriche, 20 classi piezoelettriche e 10 classi piroelettriche [55], [59]. L'analisi delle proprietà e caratteristiche di questi materiali è condotta a livello della cella unitaria, cioè la minima unità ripetitiva del reticolo cristallino. La relazione tra materiali dielettrici, piezoelettrici, piroelettrici e ferroelettrici è mostrata in figura 16.

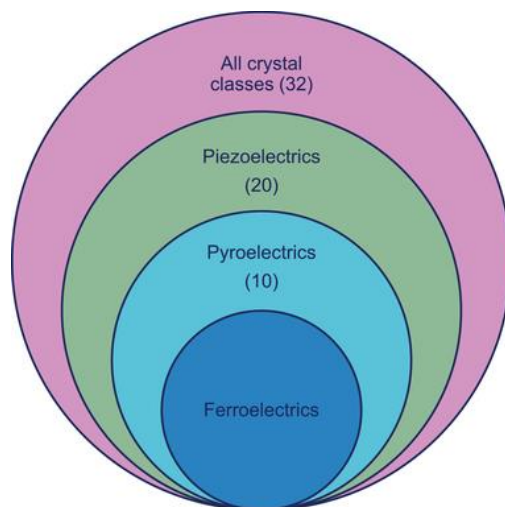


Figura 16. Rappresentazione insiemistica dei diversi materiali dielettrici e classi cristallografiche.

1.7.2 Teoria e basi del fenomeno della piezoelettricità

Come introdotto nel paragrafo precedente, la piezoelettricità è la proprietà di alcuni materiali dielettrici di rispondere a stimoli meccanici generando una carica elettrica, tramite il cosiddetto effetto piezoelettrico diretto. Allo stesso tempo esiste anche l'effetto piezoelettrico inverso per cui sul materiale può essere indotta una deformazione meccanica per applicazione di un campo elettrico

esterno. Si tratta quindi di un fenomeno reversibile, come mostrato in figura 17. L'effetto piezoelettrico diretto è stato scoperto nel 1880 dai fratelli Jacques e Pierre Curie, tramite studi su materiali come il quarzo, mentre l'effetto piezoelettrico inverso è stato scoperto da G. Lippman nel 1881 [56]. L'effetto piezoelettrico diretto permette ai materiali piezoelettrici di funzionare da sensori, mentre l'effetto piezoelettrico inverso permette un funzionamento da attuatori [61]. Condizione necessaria per la piezoelettricità, nel caso dei materiali cristallini, è l'anisotropia e l'assenza di un centro di inversione, cioè si deve avere una struttura cristallina non-centrosimmetrica [62].

La piezoelettricità può essere vista come un'interazione lineare tra lo stato meccanico e lo stato elettrico del materiale. La costante alla base di questa relazione lineare è il coefficiente piezoelettrico d , un tensore di terzo rango che accoppia un tensore di primo rango (spostamento elettrico D o campo elettrico E) e un tensore di secondo rango (tensione σ o deformazione ε). Le equazioni piezoelettriche, nel caso diretto (a) e inverso (b) possono essere scritte nelle seguenti forme:

$$(a) D_k = d_{kij} \sigma_{ij}$$

$$(b) \varepsilon_{ij} = d_{kij}^T E_k$$

D è lo spostamento elettrico (C/m²), E è il campo elettrico (V/m), ε è la deformazione, σ è la tensione (N/m²), d_{kij} è il coefficiente piezoelettrico di carica (pC/N) and d_{kij}^T è il coefficiente piezoelettrico di deformazione (pm/V) [61]. Considerando questa descrizione matematica, gli indici i, j, k variano tra 1 e 3 e le componenti vettoriali e tensoriali sono espresse relativamente ad un sistema di riferimento cartesiano, corrispondente ad un sistema di coordinate fisiche del cristallo (e_1, e_2, e_3): per esempio, nel caso di fenomeno piezoelettrico diretto, d_{kij} descrive lo spostamento elettrico lungo l'asse cartesiano e_k per via della sollecitazione meccanica applicata lungo l'asse e_i e normale ad e_j . Il primo indice è quindi elettrico mentre il secondo e terzo sono indici meccanici. Essendo un tensore di terzo rango, d ha un massimo di $3^3 = 27$ componenti indipendenti ma considerando le simmetrie fisiche e cristallografiche si riducono a 18. Questo permette di passare ad una indicizzazione diversa utilizzando la notazione di Voigt: gli indici ij sono sostituiti da un singolo indice m variabile tra 1 e 6 e di conseguenza d viene scritto in forma matriciale 3×6 . La forma e il contenuto di questa matrice variano in funzione del tipo di simmetria della struttura cristallina e quindi in funzione della classe cristallografica. Nel caso di struttura cristallina centrosimmetrica, la matrice è nulla e quindi sono nulli tutti i coefficienti piezoelettrici. Essendo proprietà fisiche, i coefficienti piezoelettrici dipendono quindi dal sistema di coordinate scelto [62]. Quando si valuta la performance di un materiale piezoelettrico l'attenzione viene posta sul coefficiente piezoelettrico d_{km} che rappresenta la carica

generata per unità di forza meccanica applicata o anche la deformazione generata per unità di voltaggio applicato. Come precedentemente detto, si tratta di una scrittura in forma ridotta in cui k (1,2,3) ed m (1,...,6) indicano rispettivamente la direzione della grandezza elettrica e della grandezza meccanica. In letteratura in genere si riporta e si fa riferimento al coefficiente piezoelettrico longitudinale d_{33} , al coefficiente piezoelettrico trasversale d_{31} e al coefficiente piezoelettrico tangenziale o di taglio d_{15} . Nel caso di d_{33} si ha che la forza agisce nella direzione 3, parallelamente all'asse di polarizzazione ed è impressa sulla stessa superficie su cui la carica si genera, pertanto la direzione di polarizzazione e la direzione della sollecitazione meccanica sono lungo lo stesso asse. Inoltre, vale la relazione empirica $d_{33} \approx -2.5d_{31}$. Maggiore è il valore del coefficiente piezoelettrico d_{33} , più la risposta piezoelettrica del materiale sarà intensa e l'effetto marcato. Un altro parametro di valutazione è il coefficiente di accoppiamento elettromeccanico k , il cui quadrato corrisponde al rapporto tra l'energia in output e l'energia in input della trasformazione, di tipo meccanico ed elettrico a seconda che l'effetto sia diretto o inverso [56], [60].

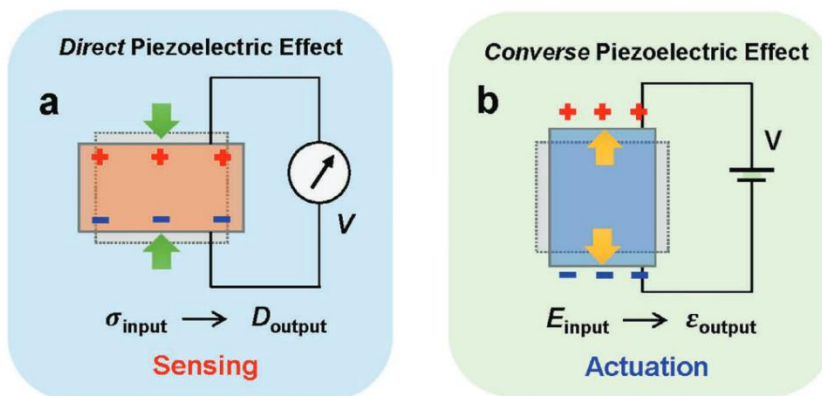


Figura 17. Illustrazione raffigurante l'effetto piezoelettrico diretto (a) e inverso (b), nel caso bidimensionale [60].

Consideriamo un materiale cristallino, con gli atomi e gli ioni disposti nel reticolo cristallino e nella cella elementare. In assenza di una sollecitazione meccanica esterna, all'interno dell'unità strutturale si ha che i centri di carica positiva e negativa coincidono e per questo si ha un dipolo netto nullo. In seguito all'applicazione di una sollecitazione meccanica esterna, invece, si ha una deformazione strutturale con i centri di carica che tendono a separarsi e si genera un dipolo elettrico netto non nullo: il materiale si polarizza e sulle superfici del cristallo si generano cariche opposte. Quanto detto è illustrato in figura 18 [56].

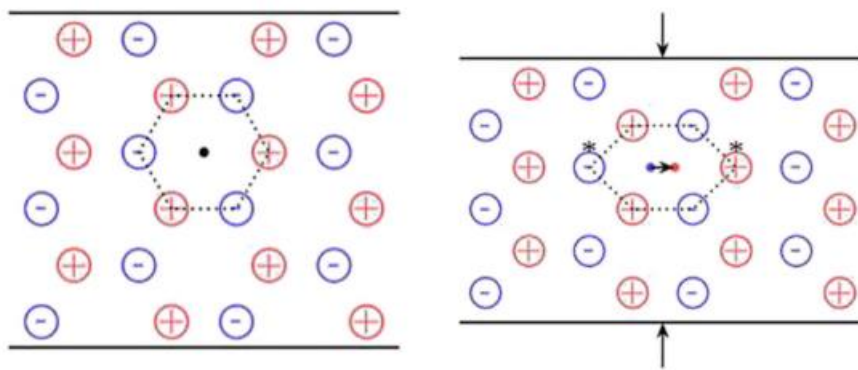


Figura 18. Effetto della compressione meccanica sull'organizzazione strutturale di un materiale cristallino: sono rappresentati in 2D il reticolo cristallino e la cella unitaria, mettendo in evidenza gli ioni e i centri di carica positiva e negativa [56].

Un materiale piezoelettrico policristallino è costituito da grani cristallini (o cristalliti) al cui interno si trovano i domini elettrici, come detto nel paragrafo 1.7.1. Per migliorare la performance piezoelettrica del materiale (piezoelettrico e ferroelettrico) e quindi incrementare il coefficiente d_{33} , si ricorre al processo di *poling*: si applica un intenso campo elettrico esterno in modo che i domini elettrici e i dipoli elettrici interni si allineino nella direzione di poling, determinando così uno stato di polarizzazione macroscopica permanente. In seguito al processo di poling:

- Nel caso di effetto piezoelettrico diretto, se la sollecitazione meccanica applicata lungo la direzione di poling è di compressione, sulle facce del cristallo si genererà un voltaggio con polarità concorde a quella utilizzata nel processo di poling, mentre se la sollecitazione è di trazione la polarità sarà discorde;
- Nel caso di effetto piezoelettrico inverso, se il voltaggio applicato lungo la direzione di poling ha polarità concorde a quella utilizzata nel processo di poling allora la deformazione indotta sarà di trazione, mentre se il voltaggio ha polarità discorde allora la deformazione indotta sarà di compressione.

Tra le principali tecniche di poling troviamo quella in voltaggio continuo (DC) o in voltaggio alternato (AC), con la seconda che risulta essere più efficiente. Tra i fattori che influiscono maggiormente sul processo di poling e sulle caratteristiche piezoelettriche del materiale troviamo: a) intensità del campo elettrico applicato, elevata e superiore all'intensità del campo elettrico coercitivo del materiale; b) temperatura di lavoro, in genere elevata ma inferiore a T_c ; c) durata del processo di poling. Il processo di poling è molto importante per i ceramici piezoelettrici con struttura cristallina di tipo perovskite [63].

1.7.3 Tipologie di biomateriali piezoelettrici

Si distingue tra piezo-ceramici di natura inorganica e piezo-polimeri di natura organica. Si differenziano per caratteristiche chimiche, meccaniche e piezoelettriche, oltre che per la diversa origine del comportamento piezoelettrico. Mentre nei ceramici piezoelettrici, monocristallini o policristallini, la piezoelettricità è dovuta al particolare arrangiamento degli ioni all'interno della struttura cristallina, nei polimeri piezoelettrici l'origine risiede nella struttura molecolare del polimero contenente dipoli molecolari che si riorientano in seguito allo stimolo meccanico o elettrico fornito [64].

Tra i piezo-polimeri troviamo per esempio PVDF (poli(vinilidene fluoride), il copolimero P(VDF-TrFE), PHBV (poli-3-idrossibutirrato-3-idrossivalerato), PLLA (acido poli-L-lattico). Esempi di polimeri naturali piezoelettrici sono polisaccaridi come la cellulosa e il chitosano e proteine come il collagene e la cheratina. Rispetto ai piezo-ceramici presentano un coefficiente piezoelettrico più basso, una migliore flessibilità e duttilità, una più facile processabilità, migliore biocompatibilità e quindi assenza del problema di citotossicità e in alcuni casi anche biodegradabilità. Il PVDF, nella conformazione cristallina β , è quello più utilizzato con un buon coefficiente piezoelettrico, anche se risulta essere non biodegradabile come invece risultano essere il PHBV e il PLLA [65], [66].

Tra i piezo-ceramici troviamo zirconato-titanato di piombo (PZT), titanato di bario (BTO), ossido di zinco (ZnO), niobato di potassio-sodio (KNN) e niobato di litio-sodio-potassio (LNKN). Presentano un coefficiente piezoelettrico molto elevato, superiore rispetto a quello dei piezo-polimeri, ma anche il problema della citotossicità, associata alla dissoluzione ionica a contatto con i fluidi biologici. Questo problema riguarda soprattutto i piezo-ceramici a base piombo (lead-based piezo-ceramics, LBPC) come PZT, in quanto il piombo anche a basse dosi può causare problemi a livello neuronale, problemi metabolici e può essere pericoloso in caso di gravidanza. Invece, i piezo-ceramici senza piombo (lead-free piezo-ceramics, LFPC), come BTO, ZnO, KNN e LNKN, a basse dosi risultano sicuri mentre la citotossicità si presenta per alte dosi e concentrazioni. Per questo motivo a livello biomedico, come biomateriali per l'ingegneria tissutale, trovano maggiormente applicazione i LFPC rispetto ai LBPC. I piezo-ceramici inoltre presentano fragilità e richiedono processi di lavorazione a temperature molto elevate. Per migliorare le proprietà meccaniche, la flessibilità e le proprietà piezoelettriche, ha preso piede la fabbricazione in forma di nanostrutture. Tra i piezo-ceramici di origine naturale troviamo per esempio il quarzo (SiO_2), il sale di Rochelle e il topazio [67], [61], [59].

La tabella 2 contiene un riepilogo delle tipologie principali di materiali e biomateriali piezoelettrici con associato il loro coefficiente piezoelettrico.

I piezo-ceramici possono essere suddivisi in due famiglie a seconda della struttura cristallina [61] (figura 19):

- *Famiglia perovskite*: la formula chimica è ABO_3 , con A indicante un elemento alcalino-terroso e B indicante un metallo di transizione. Entrambi O ed A hanno un più grande raggio ionico e sono arrangiati in una struttura cubica chiusa compatta, mentre B ha un raggio ionico più piccolo e occupa i vuoti centrali ottaedrici. Esempi di materiali con questa struttura cristallina sono PZT e BTO.
- *Famiglia wurtzite*: si tratta di un sistema cristallino esagonale con coordinazione tetraedrica e composizione di tipo AB. In questa struttura non-centrosimmetrica, gli atomi A presentano un arrangiamento esagonale compatto con gli atomi B che occupano i vuoti tetraedrici. Dal momento che la direzione di polarizzazione di questi materiali non può essere cambiata tramite un processo di poling, in genere sono utilizzati come singolo cristallo oppure in forme complesse organizzata lungo specifiche direzioni cristallografiche [68]. Esempi di materiali con questa struttura cristallina sono ZnO e il nitruro di gallio (GaN).

Tabella 2. Tipologie di materiali e biomateriali piezoelettrici e loro coefficiente piezoelettrico [65], [67].

Tipologia di materiali piezoelettrici		coefficiente piezoelettrico d_{33} (pC/N)
Ceramici sintetici	PZT	225-590
	BTO	190
	ZnO*	12.4
	KNN	93
	LNKN	98
Polimeri sintetici	PVDF**	-25
	PVDF-TrFE***	-25.2
	PHB	-(1-2) (d14)
	PLLA	-9.82 (d14)
Polimeri naturali	tessuto osseo (secco)	0.7-2.3
	collagene	0.2-2 (d14)

* per un film sottile di ZnO

** calcolato teoricamente

*** PVDF:TrFE (80:20)



Figura 19. Strutture cristalline di tipo perovskite nel BTO (A) e di tipo wurtzite nel ZnO (B) [61],[68].

La realizzazione di compositi polimero-ceramici piezoelettrici può essere utile per combinare la durezza, rigidità e ottima piezoelettricità dei ceramici con l'elasticità, la duttilità, la biocompatibilità e l'eventuale biodegradabilità dei polimeri. È un'ottima strategia per incrementare il coefficiente piezoelettrico di un polimero o per risolvere il problema della citotossicità dei piezo-ceramici.

1.7.4 Bio-piezoelettricità nel tessuto osseo

Le caratteristiche di piezoelettricità sono presenti in tessuti umani sia duri (dentina, osso) che molli (pelle, cartilagine, tendini e legamenti) e l'origine risiede nella componente proteica fibrosa le cui molecole si organizzano in maniera ordinata a formare cristalliti [69]. Nel caso del tessuto osseo, la cui piezoelettricità venne dimostrata con gli studi di I. Yasuda del 1954, la fonte della piezoelettricità è rappresentata dal collagene e non dalla componente cellulare o dalla fase minerale di HAp: infatti si è osservato che le caratteristiche piezoelettriche scompaiono in seguito alla rimozione del collagene mentre permangono in seguito a demineralizzazione o decellularizzazione del tessuto [65], [67], [70]. Alcuni studi però supportano l'idea che la struttura cristallina esagonale dell'HAp possa supportare la piezoelettricità e che un ruolo possa averlo anche l'interfaccia tra essa e le fibrille di collagene [67].

Il comportamento piezoelettrico del collagene ha origine alla nanoscala. Sono stati infatti condotti studi su singole fibrille di collagene di tipo I che hanno mostrato una risposta piezoelettrica principalmente a taglio ($d_{15} \sim 1$ pC/N) e una polarizzazione assiale unipolare lungo la loro intera lunghezza. Il collagene risulta essere piezoelettrico per via della sua struttura e organizzazione

molecolare: le molecole di collagene (o tropocollagene) sono organizzate in fibrille tramite legami intermolecolari di tipo covalente, creando in questo modo una struttura a network che permette una trasmissione delle sollecitazioni meccaniche tra le molecole vicine [71]. Inoltre, contribuiscono anche i legami ad idrogeno tra i terminali carbossilici (-COOH) e amminici (-NH₂) delle catene polipeptidiche, orientati nel senso di lunghezza delle molecole di collagene e quindi della fibrilla di collagene [69]. Alla nanoscala, le molecole di collagene si organizzano a formare strutture molecolari ordinate e orientate, dette cristalliti, con una simmetria strutturale di tipo esagonale [72], [69].

La piezoelettricità del tessuto osseo rappresenta un tassello aggiuntivo alla legge di Wolff: il tessuto osseo si rimodella in funzione dello stress meccanico applicato proprio tramite l'effetto piezoelettrico e quindi gli stimoli bioelettrici che si generano [67].

Considerando queste proprietà del tessuto osseo, uno scaffold piezoelettrico può essere considerato biomimetico e può incentivare la riparazione e rigenerazione tissutale (figura 20) tramite l'attivazione di specifiche vie di segnalazione [73]. Impiantandolo in zone sollecitate meccanicamente, si generano stimoli elettrici che poi si trasferiscono alle cellule ossee, questo provoca l'apertura dei canali del calcio voltaggio-dipendenti e il conseguente aumento della concentrazione intracellulare di Ca²⁺, le successive attivazioni delle proteine segnaletiche calmodulina e calcineurina, con il segnale che arriva fino al nucleo cellulare e regola l'espressione di specifici geni. Per esempio, viene indotta la traduzione di specifici fattori di crescita come TGF- β e BMP. Quindi, in sintesi, un ruolo cruciale è svolto dalla via segnaletica calcio/calmodulina e dalla conseguente sintesi di fattori di crescita e altre biomolecole che accelerano l'osteogenesi [66], [73]. In generale i segnali bioelettrici generati influiscono sulla proliferazione e sul differenziamento cellulare tramite complessi meccanismi che coinvolgono anche cambiamenti a livello extracellulare, come l'aggregazione e il cambiamento conformazionale di ioni e proteine e anche un cambiamento del potenziale cellulare transmembrana [65], [67]. Tutto questo può essere indotto sfruttando uno scaffold piezoelettrico, senza necessità di una sorgente elettrica esterna.

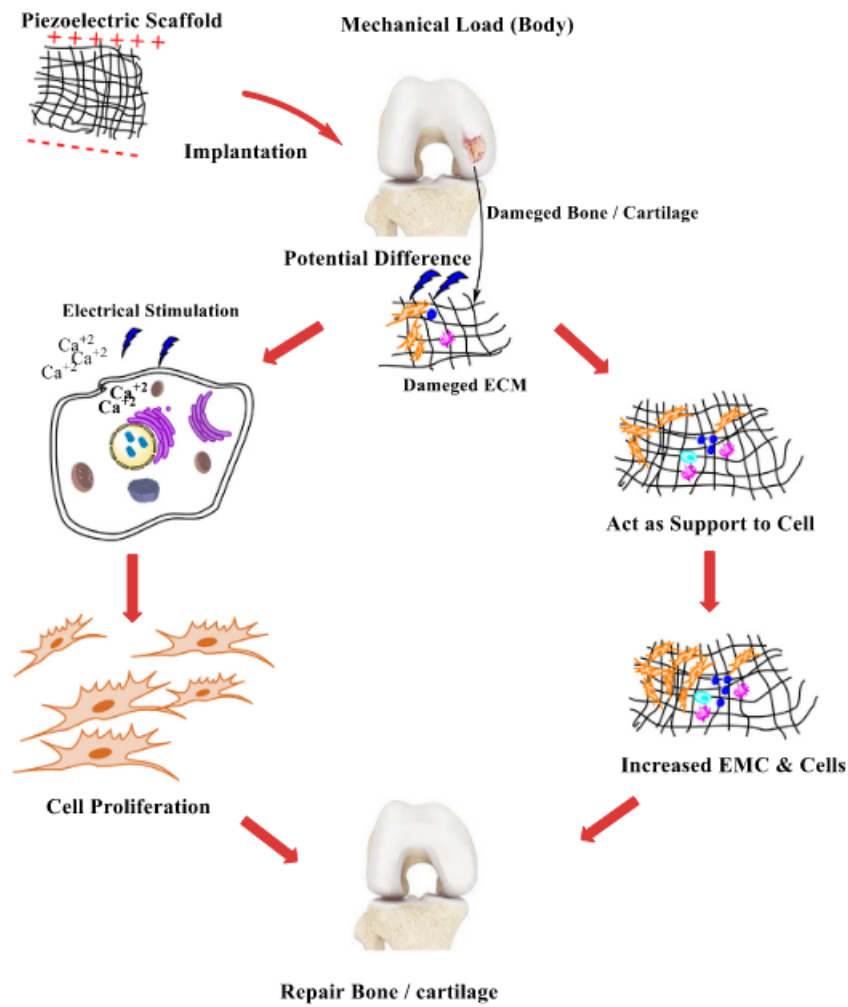


Figura 20. Impiego di uno scaffold piezoelettrico nell'ingegneria tissutale per la riparazione e rigenerazione di tessuto osseo o cartilagineo danneggiati [73].

1.8 Titanato di bario

Il BTO è stato il primo materiale ceramico policristallino con proprietà di ferroelettricità ad essere stato scoperto. Intorno al 1950 era considerato il principale candidato per la realizzazione di trasduttori piezoelettrici ma la successiva scoperta del PZT, con superiori proprietà piezoelettriche e una più alta T_c , ne hanno ridotto l'interesse applicativo. Cominciarono comunque ad essere disponibili i primi prodotti commerciali a base di BTO come fonografi, pickups, accelerometri, capacitori [74].

Il BTO è un piezo-ceramico che in base alla sua struttura cristallina appartiene alla famiglia perovskite: considerando la cella cubica unitaria, gli ioni Ba^{2+} sono posizionati ai vertici (siti A), lo ione Ti^{4+} si trova al centro (sito B) e gli anioni O^{2-} sono localizzati ai centri delle facce e definiscono un ottaedro BO_6 . Come illustrato in figura 21, la struttura cristallina del BTO va incontro ad una serie di transizioni di fase con la temperatura. Si hanno [75]:

- Struttura cristallina *cubica*: per $T > T_c$, con $T_c = 120^\circ C$;
- Struttura cristallina *tetragonale*: per $5 < T < T_c$;
- Struttura cristallina *ortorombica*: per $-90^\circ C < T < 5^\circ C$;
- Struttura cristallina *romboedrica*: per $T < -90^\circ C$;

Mentre la prima fase è paraelettrica, le ultime tre sono ferroelettriche e quindi piezoelettriche. Le transizioni di fase inter-ferroelettriche a bassa temperatura (tetragonale-ortorombica e ortorombica-romboedrica) sono accompagnate da un cambiamento direzionale del vettore polarizzazione. Inoltre, per $T > 1460^\circ C$ la struttura cristallina si modifica passando da cubica, tipica della famiglia perovskite, ad esagonale. Dal punto di vista cristallografico, la polarizzazione spontanea è dovuta alla separazione tra i centri di carica positivo e negativo, con la transizione di fase in corrispondenza di T_c . Il BTO presenta un'elevata costante dielettrica relativa, proprietà ottiche non lineari, un d_{33} di riferimento pari a 190 pC/N, una T_f pari a $1654^\circ C$ e una temperatura di sinterizzazione nel range $1200-1300^\circ C$ [74], [76]. È un materiale scarsamente solubile e disperdibile in acqua, con una banda proibita (bandgap) pari a 3.2 eV a temperatura ambiente [77].

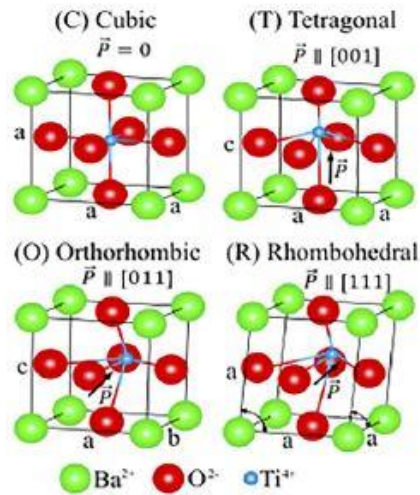


Figura 21. Cella unitaria del BTO e transizioni di fase con la temperatura: la fase cubica è paraelettrica mentre le fasi tetragonale, ortorombica e romboedrica sono ferroelettriche [74].

Le proprietà elettriche dei piezo-ceramici a base BTO possono essere modulate tramite strategie diverse. Una delle più comuni modifiche è la sostituzione chimica o doping, tramite cui si modulano la distorsione del reticolo, la configurazione dei domini e le transizioni di fase. Si riesce ad imprimere un'elevata capacità piezoelettrica determinando uno spostamento della temperatura di transizione di fase, in particolare la T_c . La sostituzione, in genere isovalente, riguarda i cationi nei siti A e B: ioni a bassa valenza normalmente si vanno a collocare nei siti A al posto degli ioni Ba^{2+} (es. ioni Ca^{2+} e Sr^{2+}), mentre ioni ad alta valenza tipicamente rimpiazzano gli ioni Ti^{4+} nei siti B (es. ioni Zr^{4+} , Hf^{4+} e Sn^{4+}). Il doping con ioni Zr^{4+} , Hf^{4+} e Sn^{4+} permette di diminuire la T_c . Tra questi il dopante più efficace è lo ione stagno. Tramite doping si ha che le proprietà piezoelettriche, quindi il coefficiente d_{33} , aumentano e si avvicinano a quelle dei materiali a base piombo, soprattutto quando si effettua una co-sostituzione sia nei siti A che B [78].

Per realizzare uno scaffold o anche un disco a base di BTO il primo step è la sintesi delle particelle, questo nel caso in cui il materiale di partenza non sia commerciale. Metodi di sintesi diversi permettono di ottenere taglie e morfologie diverse, influenzando in questo modo sulle proprietà meccaniche, ferroelettriche e piezoelettriche. Per esempio, quando la taglia diminuisce nel range micrometrico si ha che la costante dielettrica aumenta, mentre quando si va al di sotto del range micrometrico invece diminuisce. Inoltre, il metodo di sintesi e la temperatura di sintesi influiscono anche sulla struttura cristallina. Per quanto riguarda la morfologia, si è osservato che la risposta piezoelettrica di nanowires è molto superiore a quella di nanoparticelle di BTO. Il metodo di sintesi tradizionale è la reazione allo stato solido condotta ad alta temperatura tra BaCO_3 e TiO_2 . Altri metodi

di sintesi più controllati sono il metodo della co-precipitazione, il metodo solvotermale/idrotermale o il metodo sol-gel [65]. Partendo da polveri nel range nanometrico o da soluzioni colloidali, si possono realizzare film a base di BTO sfruttando tecniche come lo sputtering, lo slip-casting, la sintesi idrotermale o la tecnica sol-gel. Nella realizzazione di un componente ceramico piezoelettrico si ha che la costante dielettrica e il coefficiente piezoelettrico d_{33} dipendono dalla temperatura di sinterizzazione, dalla densità del sinterizzato e dalla dimensione dei grani cristallini [79]. In generale c'è una dipendenza dalla microstruttura, dalla dimensione dei domini elettrici e dalla mobilità delle pareti dei domini. La relazione tra il coefficiente piezoelettrico d_{33} e la dimensione del grano cristallino cambia in funzione del metodo di sinterizzazione utilizzato. All'aumentare della temperatura di sinterizzazione si vede che aumentano la densità del ceramico e la dimensione del grano, mentre l'andamento del coefficiente piezoelettrico d_{33} in funzione della dimensione del grano cristallino mostra prima una crescita fino ad un massimo e poi una decrescita [80], [81].

Il BTO è uno dei ceramici piezoelettrici più utilizzati nell'ingegneria tissutale ossea per la preparazione di scaffold, mostrando ottime capacità osteogeniche. Generalmente è utilizzato in combinazione con altri materiali, come idrogeli, matrici polimeriche o HAp in modo da migliorarne biocompatibilità, citocompatibilità e per bilanciare la sua elevata resistenza meccanica e rigidità. Per questo tipo di applicazione, un aumento della temperatura di sinterizzazione dello scaffold ceramico fabbricato determina un incremento della resistenza a compressione, del coefficiente piezoelettrico e della capacità di creare un'interfaccia salda con il tessuto osseo circostante. Si è anche osservato che un rivestimento a base di BTO su uno scaffold conferisce proprietà antibatteriche e una migliore capacità osteogenica [82]. In uno studio del 2002 viene posta attenzione sul ruolo della carica superficiale del BTO ferroelettrico. Partendo da microparticelle, si è prima ottenuto un dischetto a base di BTO, per pressatura isostatica a freddo e seguente sinterizzazione, e poi lo si è polarizzato. Effettuando il processo di poling al di sopra di T_c ed eseguendo un test di immersione nel MEM (minimal essential medium), un terreno di coltura cellulare, si è osservata la formazione di cristalli di fosfato di calcio sulla superficie polarizzata negativamente (N-BTO) e quindi una sorta di comportamento bioattivo, in particolare dopo 30 giorni. Questo è dovuto all'adsorbimento di ioni Ca^{2+} dal MEM sulla superficie carica negativamente e alla successiva nucleazione di cristalli Ca-P [83]. Pur non essendo uno studio condotto in SBF e quindi non un test standard di bioattività, risulta comunque interessante perché sottolinea l'importanza della carica superficiale del materiale, fornita tramite il processo di poling.

Il BTO in forma nanoparticellare è un ottimo riempitivo per la realizzazione di nanocompositi piezoelettrici. In letteratura si trovano esempi di compositi a matrice polimerica come PVDF/BTO o

anche PLLA/BTO, con quest'ultimo che presenta minori proprietà piezoelettriche ma biodegradabilità. Per esempio, in un recente lavoro del 2024 da parte di R. Schonlein et al. [84] nanoparticelle di BTO (~50 nm) sono state incorporate in microfibre a base di PLLA, per la realizzazione di uno scaffold nanocomposito tramite elettrospinning. Il BTO permette di aumentare la risposta piezoelettrica del costrutto a base PLLA, mantenendo una buona citocompatibilità. Prima di essere incorporate nelle microfibre di PLLA, le nanoparticelle vengono rivestite con uno strato di polidopamina, in modo da rafforzare il legame interfacciale con la matrice, la trasmissione degli stimoli meccanici nel costrutto e di conseguenza anche l'output piezoelettrico. Aggiungendo 5 wt% di nanoparticelle di BTO rivestite, si ha un aumento del 120% delle proprietà piezoelettriche rispetto ad uno scaffold a base di solo PLLA. Lavori precedenti hanno mostrato che BMMSCs (bone marrow mesenchymal stem cells, cellule staminali mesenchimali del midollo osseo) seminate su fibre elettrospinnate di PLLA/BTO vanno incontro ad un maggior differenziamento osteogenico. Questo tipo di costrutto può essere utilizzato nell'ambito dell'ingegneria del tessuto osseo, dal momento che le particelle di BTO nella matrice di PLLA promuovono anche l'osteogenesi e l'osteointegrazione.

Continuando a parlare di BTO in forma di nanoparticelle, oltre a presentare elevate proprietà dielettriche e ferroelettriche, presentano sia un effetto battericida che batteriostatico, inoltre mostrano nei confronti di cellule tumorali una citotossicità basata su stress ossidativo, possono essere utilizzate come agenti di contrasto per imaging. Diversi metodi di modifica superficiale sono utilizzati per migliorarne la dispersibilità, la stabilità e la biocompatibilità, come [75]:

- *Idrossilazione*: quindi esposizione di gruppi idrossili -OH. È in genere il primo step di modifica, importante per ridurre la tendenza all'aggregazione dovuta alle elevate energia e area superficiali;
- *Funzionalizzazione con modificatori di natura organica*: per esempio facendo un doppio aggraffaggio silano-PEG, con il silano che permette un ancoraggio covalente della molecola di PEG sulla superficie della nanoparticella, oppure realizzando un rivestimento superficiale a base di polidopamina;
- *Approcci core-shell*: un esempio è BTO-core SiO₂-shell [85];

Quando si realizzano sospensioni acquose a base di BTO, quest'ultimo presenta instabilità e tendenza a rilasciare ioni Ba²⁺ per idrolisi: dal punto di vista biologico questo può avere un effetto citotossico, per esempio a livello nervoso può bloccare i canali ionici del potassio. Per questo motivo sono

importanti le strategie di modifica superficiale [85], [86] ed è anche importante regolare il contenuto (wt%) di BTO all'interno di uno scaffold.

Significativi e interessanti esempi di compositi a base BTO per l'ingegneria tissutale sono quelli con proprietà di bioattività, come verrà approfondito nel paragrafo 1.10.1. Un esempio molto frequente in letteratura è il composito BTO/HAp, ottenuto mescolando le due diverse polveri solide e poi effettuando una sinterizzazione. Per esempio, C. Polley et al. [87] nel 2020 hanno realizzato uno scaffold composito utilizzando la tecnica binder jetting, di 3D printing, ottenendo un costrutto con macro- e micro- porosità (100-200 μm), con queste ultime importanti per l'osteogenesi. Sono partiti da polveri di BTO (dimensione media $<3\mu\text{m}$), di HAp (dimensione media $\sim 40\mu\text{m}$) e hanno utilizzato il PEMA (polietilenmetacrilato) come legante, ottenendo una composizione 68 wt% BaTiO₃, 18 wt% HA and 14 wt% PEMA. In seguito alle fasi di stampa, di sinterizzazione e di poling, il costrutto ha mostrato un coefficiente piezoelettrico d_{33} pari a circa 3 pC/N, simile al valore del coefficiente piezoelettrico dell'osso e quindi sufficiente per applicazioni di ingegneria del tessuto osseo in cui si vuole adottare un approccio biomimetico. I test cellulari in vitro hanno mostrato una buona adesione, crescita e vitalità cellulari e in generale la composizione del materiale è risultata essere citocompatibile ma con basse proprietà meccaniche da migliorare. Questo tipo di studio è il punto di partenza per la realizzazione di scaffold compositi piezoelettrici e bioattivi più complessi e innovativi, nei quali la fase bioattiva di HAp viene sostituita da una fase a base di vetro o vetroceramico bioattivo.

In conclusione, in campo biomedico il BTO trova applicazione, oltre che nell'ambito dell'ingegneria tissutale, anche nello sviluppo di sensori indossabili, di sistemi per rilascio di farmaco, nel bioimaging, per finalità antibatteriche, terapia antitumorale e stimolazione nervosa [65], [85]. Per esempio nanoparticelle di BTO, ad alto dosaggio (0.6 g/mL), hanno mostrato un effetto terapeutico antitumorale nei confronti di cellule di carcinoma mammario [77].

1.9 Ossido di zinco

In questo paragrafo il focus è posto sulle proprietà piezoelettriche dello ZnO, soprattutto in riferimento alle diverse morfologie nanostrutturali. Prima di entrare nel merito del discorso è importante definire il concetto di nanostruttura: si tratta di una struttura molecolare con almeno una dimensione nel range 1-100 nm. Una nanostruttura è caratterizzata dalla dimensionalità, in base alla quale si distingue tra nanostrutture 0-dimensionali (0D) come le nanoparticelle con tutte le dimensioni nel range appena definito, nanostrutture 1-dimensionali (1D) come nanowires o nanorods con lunghezza molto maggiore del diametro e nanostrutture 2-dimensionali (2D) come nanosheets con una dimensione nel range nanometrico e le altre due dimensioni molto più grandi. Esistono anche altre morfologie nanostrutturali più complesse come quelle 3-dimensionali (3D) o 4-dimensionali (4D). Tutte queste nanostrutture sono accomunate dal fatto di avere un elevato rapporto area superficiale su volume. Quando lo ZnO è ridotto alla nanoscala, le sue proprietà diventano dipendenti dalla forma e dalla struttura e la piezoelettricità è tra queste. L'interesse per le proprietà piezoelettriche alla nanoscala è qualcosa di piuttosto recente. Mentre alla nanoscala le proprietà di ferroelettricità e ferromagnetismo spariscono, le proprietà di piezoelettricità sono conservate: si ha risposta piezoelettrica di un materiale aumenta nel passare dalla macroscale alla nanoscale [88], [89], [90].

Le nanostrutture di ZnO presentano importanti proprietà quali non tossicità, biocompatibilità, elevata banda proibita (bandgap) in qualità di materiale semiconduttore, buona capacità di sensing di tipo chimico, presentano elevato assorbimento nel range UV, trasparenza nel range visibile, ottime proprietà elastiche e soprattutto proprietà di piezoelettricità e piroelettricità. Sulla base di queste proprietà, possibili applicazioni sono per esempio lo sviluppo di sensori chimici e biochimici, di attuatori meccanici o sistemi di raccolta e conversione di energia (energy harvesting) di tipo meccanico, ma anche applicazioni elettroniche ed ottiche [90]. In generale lo ZnO non presenta ferroelettricità e quindi non necessita di un processo di poling. Effetti tossici dal punto di vista biologico non si sono verificati per dimensioni micrometriche o maggiori, mentre invece è stata osservato un certo livello di tossicità nel range nanometrico per via della produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS), per esempio utilizzando nanoparticelle. Tuttavia, la citotossicità di nanoparticelle può essere ridotta sfruttando una modifica di tipo chimico o fisico [66].

La più comune struttura cristallina dello ZnO è quella esagonale della famiglia wurtzite, in cui il catione Zn^{2+} è circondato da quattro anioni O^{2-} e viceversa. Si tratta di una struttura cristallina non-centrosimmetrica con un arrangiamento tetraedrico, in cui la lunghezza del legame lungo l'asse c è maggiore rispetto agli altri tre legami, determinando in questo modo una polarità lungo l'asse c.

La polarizzazione netta, quindi il comportamento piezoelettrico, deriva dalla separazione dei centri di carica positivo e negativo quando una pressione esterna agisce sugli spigoli del tetraedro. La struttura dello ZnO può anche essere vista come un impilamento, lungo l'asse c, di piani alternati a base di ioni Zn^{2+} e O^{2-} , quindi si individuano delle superfici polari. Tutto ciò fa sì che la direzione preferenziale di crescita di cristalli di ZnO sia lungo l'asse c e questo, per esempio, è fondamentale per formazione di ZnO nanowires. Per ottenere altre morfologie nanostrutturali quello che si fa è bloccare la crescita lungo l'asse c e modificare la crescita cristallografica [91]. Quanto detto è illustrato in figura 22.

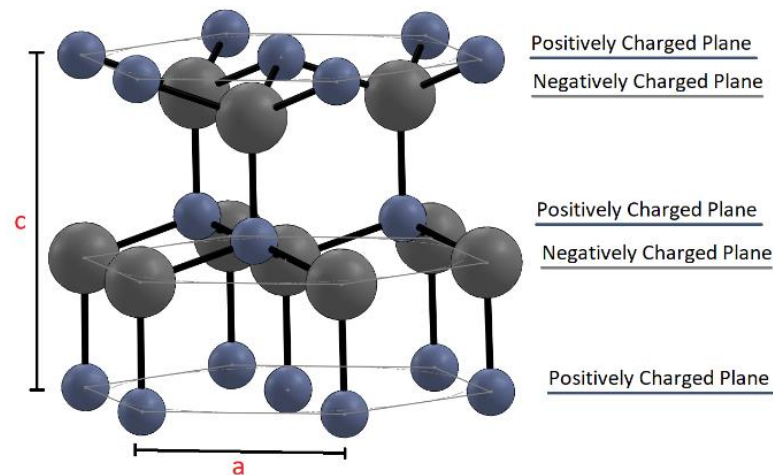


Figura 22. Struttura cristallina esagonale dello ZnO: in grigio sono indicati gli anioni ossigeno mentre in blu i cationi zinco, c ed a invece sono i parametri reticolari [90].

Una delle tecniche di sintesi principali per ottenere nanostrutture con taglia, morfologia e proprietà diverse è il metodo di sintesi idrotermale, una tecnica bottom-up di tipo chimico. Cambiando i parametri di processo di questo metodo (es. substrato, pH o temperatura della soluzione), si riescono ad ottenere nanostrutture diverse. Si tratta di una tecnica semplice, a basso costo ed efficiente. Sono disponibili inoltre formulazioni commerciali, sottoforma di polvere secca o in sospensione. Ad esempio, sul sito di *Alfa Chemistry Nanomaterials* si trovano nanopolveri di ZnO, eventualmente dopate e in dimensioni diverse [92], sul sito di *SigmaAldrich* si possono trovare ZnO nanowires e nanopolveri [93] e anche sul sito di *ACS Material* sono acquistabili ZnO nanowires [94]. Sul sito dell'azienda *HW Nanoscale Materials* sono acquistabili ZnO nanorods [95].

Le diverse nanostrutture di ZnO presentano proprietà e applicazioni diverse [90]:

- *Nanostrutture ZnO 0D*: come quantum dots, core-shell quantum dots, nanosfere solide o porose (figura 23). Sono impiegate per lo sviluppo di celle solari e per applicazioni antibatteriche e fotocatalitiche;
- *Nanostrutture ZnO 1D*: come nanorods, nanobelts, nanotubes e nanowires (figura 24). Sono considerate le nanostrutture ideali per la fabbricazione di dispositivi opto-elettronici alla nanoscala. Gli ZnO nanobelts, con la loro polarità superficiale, sono considerati il sistema piezoelettrico ideale alla nanoscala;
- *Nanostrutture ZnO 2D*: come nanosheets, nanodisks, nanowhiskers, nanoplates e nanoflowers (figura 25). Trovano applicazione nello sviluppo di nanoreattori, sensori, fotocatalizzatori, celle fotovoltaiche e PENGs. Risultano essere più efficienti rispetto alle nanostrutture 1D, per esempio relativamente al gas sensing o alla conversione di energia solare;
- *Nanostrutture ZnO 3D*: sono nanostrutture gerarchiche ottenute per assemblaggio di nanostrutture 1D e/o 2D, come unità base. Esempi sono assemblaggi a base di soli 1D-nanorods, 1D-nanowires, 2D-nanosheets o a base di 2D-nanosheets e 1D-nanorods (figura 26). Una morfologia tipica è quella simil-fiore. Presentano un maggiore rapporto area superficiale su volume e superiori proprietà rispetto alla forma massiva in bulk. Per questo motivo possono essere sfruttate per sviluppare nanodispositivi più complessi per la fotocatalisi, per sensori, sistemi di rilascio di farmaco o come sistemi per energy harvesting.

Di seguito sono riportate alcune immagini morfologiche delle diverse nanostrutture di ZnO, ottenute tramite sintesi da parte di diversi gruppi di ricerca.

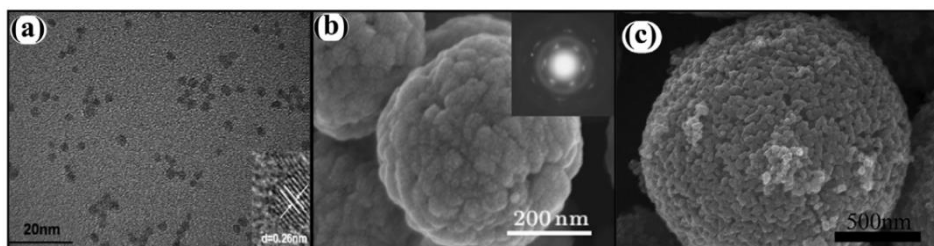


Figura 23. Immagini SEM e TEM che mostrano le seguenti morfologie nanostrutturali 0D: a) quantum dots, b&c) nanosfere [90].

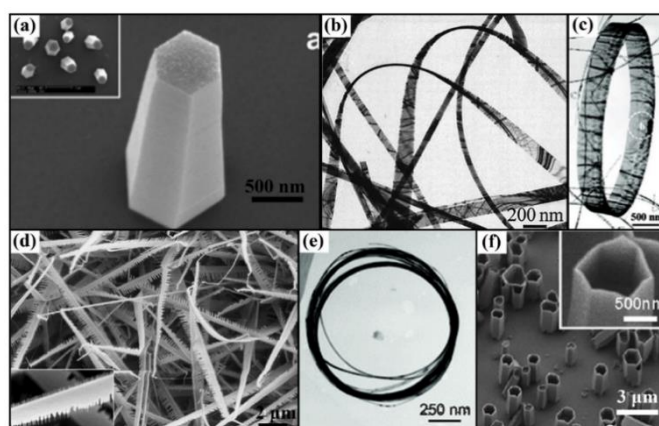


Figura 24. Immagini SEM e TEM che mostrano le seguenti morfologie nanostrutturali 1D: a) nanorods, b) nanobelts, c) nanoring, d) nanocombs, e) nanohelices e f) nanotube [90].

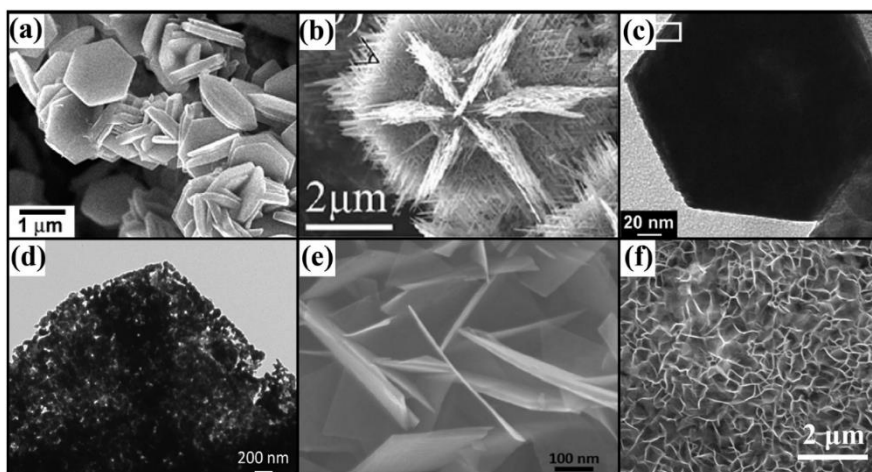


Figura 25. Immagini SEM e TEM che mostrano le seguenti morfologie nanostrutturali 2D: a) nanodisks, b) nanowhiskers, c) nanoplates esagonali, d) nanosheets porosi, e) nanosheets ultrafini e f) nanowalls [90].

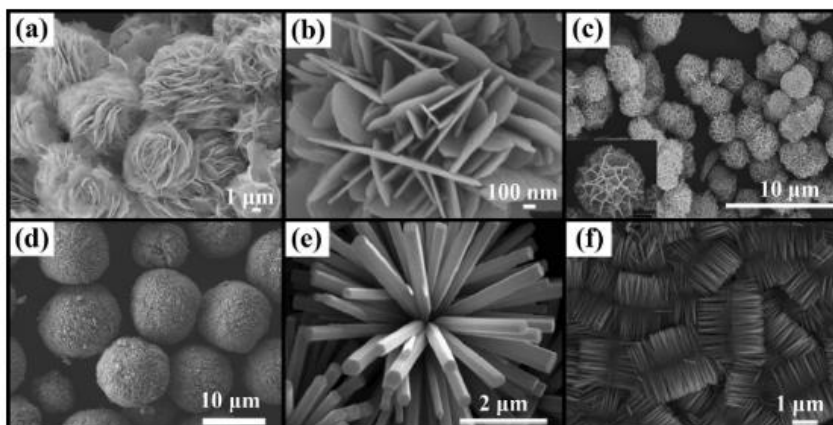


Figura 26. Immagini SEM e TEM che mostrano le seguenti morfologie nanostrutturali 3D: a&b) morfologia a fiore a base di nanosheets, c&d) microsfele mesoporose, e) morfologia a fiore a base di nanorods e f) nanostruttura 3D a base di nanosheets e nanorods [90].

1.9.1 Proprietà piezoelettriche delle nanostrutture di ossido di zinco

L'analisi di letteratura ha mostrato che il campo di studio e sviluppo principale è quello inerente all'energy harvesting e allo sviluppo di nanogeneratori piezoelettrici (PENGs, piezoelectric nanogenerators), in grado di convertire uno stimolo meccanico esterno, per esempio vibrazionale proveniente dall'ambiente o dal corpo umano, in energia elettrica, utile per alimentare sistemi autonomi senza la necessità di una batteria. Questo può essere sfruttato in dispositivi medici impiantabili. Questi PENGs sono basati appunto su nanostrutture piezoelettriche, in genere poste su un substrato flessibile.

Come riportato in tabella 4, lo ZnO in forma massiva presenta un coefficiente piezoelettrico d_{33} pari a 12.4 pC/N.

Il lavoro di S. Goel e B. Kumar [90] è una review interessante in cui vengono analizzate nel dettaglio la piezoelettricità e la ferroelettricità di diverse nanostrutture di ZnO. Viene riportato il valore del coefficiente piezoelettrico d_{33} per diverse morfologie, distinguendo tra il caso in cui si utilizzano e non si utilizzano ioni dopanti. Nella tabella 3 riportata di seguito, sono elencate alcune delle casistiche a mio parere più interessanti. Per una descrizione più dettagliata delle nanostrutture e dei loro metodi di sintesi rimando ad una consultazione specifica degli articoli primari riportati nella suddetta review. Alcuni importanti informazioni estrapolate da questo lavoro sono le seguenti:

- Relativamente ai nanowires, si è osservato che l'output piezoelettrico aumenta con l'aspect ratio (AR, rapporto d'aspetto, lunghezza/diametro) del nanowire, cioè al diminuire del diametro mantenendo invece una lunghezza costante, fino ad un certo AR limite oltre il quale invece si ha una diminuzione;
- Nanorods, nanobelts e nanosheets sono le nanostrutture principalmente studiate e utilizzate relativamente ad applicazioni piezoelettriche;
- Per i sistemi a base di ZnO puro non dopato, il coefficiente piezoelettrico d_{33} assume valori nel range 2-50 pC/N, in accordo con quanto riportato nella tabella 3;
- Particolarmente efficace risulta il dopaggio con metalli delle terre rare (es. cerio, lantanio, gadolinio, ittrio), che vanno a sostituire gli ioni Zn^{2+} . Si ha un incremento della risposta piezoelettrica se il rapporto carica ionica/raggio ionico dello ione dopante è maggiore rispetto a quello dello ione zinco (i.e 2.70 e/Å);

Tabella 3. Coefficiente piezoelettrico d_{33} relativo a diverse morfologie nanostrutturali di ZnO. In alcuni casi viene effettuato un dopaggio. In questa tabella non sono riportati gli specifici metodi di sintesi [90].

Campione	d_{33} (pC/N)
ZnO nanorods	49,7
ZnO nanobelt	26,7
ZnO nanorods allineati verticalmente	11,8
film sottile di ZnO	8,7
ZnO pillars esagonali ordinati e separati	7,5
ZnO film dopato con V^{5+} ($Zn_{0.975}V_{0.025}O$)	110
ZnO film dopato con Cr^{3+} ($Zn_{0.94}Cr_{0.06}O$)	120
ZnO film dopato con Fe^{3+} ($Zn_{0.988}Fe_{0.012}O$)	127
ZnO film dopato con Mn^{3+}/Mn^{4+} ($Zn_{0.913}Mn_{0.087}O$)	86
ZnO nanorods dopati con Ce^{3+} (1 mol%)	30
ZnO nanorods dopati con La^{3+} (5 mol%)	101
ZnO nanosheets dopati con Y^{3+} (5 mol%)	420
ZnO nanorods dopati con Nd^{3+} (5 mol%)	512

Un'altra review interessante è quella redatta da N. Bhadwal et al. [91], in cui vengono riportati PENGs composti a base di nanostrutture di ZnO. In questo lavoro vengono anche riassunte le proprietà piezoelettriche di diverse morfologie nanostrutturali di ZnO, distinguendo tra caso con dopaggio e senza dopaggio, in linea con quanto fatto da S. Goel e B. Kumar [90]. Nella tabella 4 riportata nella pagina seguente, è elencato il coefficiente piezoelettrico d_{33} per nanostrutture di ZnO relativamente a diversi lavori e studi. Per una descrizione più dettagliata delle nanostrutture e dei loro metodi di sintesi rimando ad una consultazione specifica degli articoli primari riportati nella suddetta review.

Tabella 4. Coefficiente piezoelettrico d_{33} relativo a diverse morfologie nanostrutturali di ZnO. In alcuni casi viene effettuato un dopaggio. In questa tabella non sono riportati gli specifici metodi di sintesi [91].

Campione	dopaggio	d_{33} (pC/N)	dimensioni
ZnO massivo		12,4	
ZnO nanorods		0,4-9,5	D=150-500 nm, L=400-600 nm
		~9,2	D=150±55 nm, L=2300±120 nm
		7,5±0,6	D=300 nm, L=2 μ m
		11,8	D=150 nm, L=1,5 μ m
		49,7	D=20 nm, L=500 nm
	Eu ³⁺	43,38	D=78,92 nm, L=302,33 nm
	Gd ³⁺	45,49	D=59,85 nm, L=245,13 nm
	La ³⁺	100,3	D=123,49 nm, L=704,38 nm
	Ce ³⁺	30	D=16-20 nm, L=80-120 nm
	Nd	512	D=101 nm, L=412 nm
ZnO nanobelts	Ba ²⁺	41,28	D=73,25 nm, L=476,51 nm
		14,3-26,7	spessore= 65 nm, larghezza= 360 nm, lunghezza= decine di μ m
ZnO nanosheets		6,48-18,9	spessore=1,5-4,5 nm, lunghezza laterale= ~ 8 μ m
		80±0,8	spessore= 1,1 nm, lunghezza laterale= diversi mm
	Y ³⁺	420	~34 nm

ZnO film		5-5,3	spessore=285-710 nm
	V	85	spessore=285 nm

Alcuni importanti informazioni estrapolate da questo lavoro sono le seguenti:

- Per i sistemi a base di ZnO puro non dopato, il coefficiente piezoelettrico d_{33} assume valori nel range 0.4-80.8 pC/N, in accordo anche con la tabella 4;
- In ordine di coefficiente piezoelettrico d_{33} crescente troviamo ZnO nanobelts, nanorods e nanosheets;
- Nd³⁺-ZnO nanorods mostrano una piezoelettricità confrontabile con quella del PZT massivo ($d_{33} \sim 500$ pC/N);
- Un PENG composito con elevato output piezoelettrico si ottiene incorporando ZnO nanowires o anche ZnO nanosheets, allineati verticalmente, all'interno di una matrice di PVDF;

Gli ZnO nanowires presentano una maggiore flessibilità rispetto al materiale massivo, per via dell'elevato AR. Questo permette di sopportare una maggiore tensione meccanica e di conseguenza una quantità maggiore di energia meccanica può essere convertita in energia elettrica. Pertanto risultano essere nanostrutture ideali per la realizzazione di PENGs [89].

Nel lavoro di J. Kaur et al. [88], diversi PENGs basati su nanostrutture diverse di ZnO (0D-nanoparticelle, 1D-nanorods e 2D-nanosheets) vengono confrontati in termini di output piezoelettrico (i.e corrente, voltaggio e potenza). I PENGs sono stati realizzati ponendo le nanostrutture piezoelettriche a base di ZnO, sintetizzate tramite metodo idrotermale, tra due elettrodi ed applicando in maniera periodica delle forze pressorie su questi nanodispositivi. I risultati sperimentali hanno mostrato che, a parità di stress in input, gli output piezoelettrici aumentano in quest'ordine: PENGs basati su nanoparticelle, basati su nanorods e basati su nanosheets. In particolare, un ruolo chiave è giocato dal fatto che i nanosheets formano una rete interconnessa che amplifica la deformazione, l'accumulo di carica e quindi l'output piezoelettrico.

Un altro lavoro interessante è quello di M. Kang et al. [96] in cui viene valutata la relazione, sia dal punto di vista sperimentale che modellistico, tra l'aspect ratio AR di nanostrutture di ZnO utilizzate come riempitivo piezoelettrico in un PENG composito a matrice polimerica e le proprietà piezoelettriche di quest'ultimo. I risultati mostrano che all'aumentare dell'AR aumenta la performance piezoelettrica del PENG, come dimostrato dall'aumento del coefficiente piezoelettrico d_{33} . Sfruttando il metodo di sintesi idrotermale, l'AR è stato regolato agendo su temperatura e tempo di crescita. Quanto detto è riportato in figura 27 dove si può considerare AR=3.3 indicativo di una

morfologia nanoparticellare, AR=6.1 di una morfologia a nanorod e infine AR=24.3 indicativo di una morfologia a nanowire. Si ha che il maggior AR garantisce una maggiore deformazione del riempitivo piezoelettrico, una maggiore trasmissione interna del carico e di conseguenza un maggior output piezoelettrico.

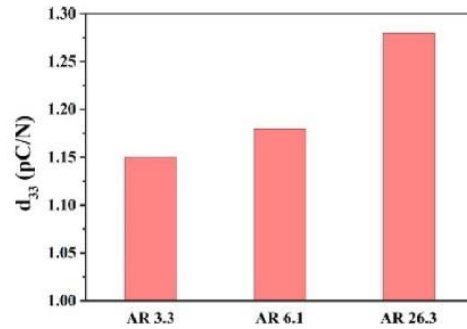


Figura 27. Andamento del coefficiente piezoelettrico d_{33} del PENG composito in funzione dell'aspect ratio delle nanostrutture di ZnO utilizzate come riempitivo piezoelettrico. Si considera una concentrazione di ZnO pari a 50 wt% [96].

Studi computazionali condotti su ZnO nanotubes a singola parete hanno mostrato che le proprietà piezoelettriche della nanostruttura sono dipendenti dal suo diametro e nello specifico si ha che il coefficiente piezoelettrico d_{33} aumenta all'aumentare del diametro [97].

1.9.2 Piezoelettricità dell'ossido di zinco per l'ingegneria del tessuto osseo

In questa sezione vengono riportati alcuni lavori scientifici in cui lo ZnO è utilizzato nell'ambito dell'ingegneria del tessuto osseo per via delle sue proprietà piezoelettriche.

Chen et al. (2023) [98] hanno sfruttato NPs di ZnO (50 ± 10 nm) come riempitivo all'interno di nanofibre elettrospinnate di PHB, con l'obiettivo di incrementarne proprietà meccaniche e piezoelettriche. Nello specifico hanno realizzato uno scaffold a base di nanofibre PHB-ZnO integrate in un aerogel di chitosano (rapporto di massa 6:4), nel complesso biocompatibile, biodegradabile, macroporoso e con proprietà piezoelettriche. Le nanofibre di PHB-ZnO formano lo scheletro del costruito, mentre il chitosano funge da agente reticolante. Per ottenere una stimolazione elettrica, per via delle proprietà piezoelettriche del costruito, si è sfruttata una stimolazione ad ultrasuoni. La risposta piezoelettrica aumenta all'aumentare della potenza degli ultrasuoni, entro i limiti stabiliti dalla FDA per applicazioni biomediche. Hanno osservato che all'aumentare della concentrazione di ZnO, fino al 2 wt%, il voltaggio piezoelettrico in output aumenta, mentre per alte concentrazioni di

ZnO (es. 4 wt%) si riduce la formabilità e si introduce distorsione nel costrutto. I risultati cellulari in vitro hanno mostrato che la stimolazione elettrica, ottenuta grazie agli ultrasuoni e sfruttando la piezoelettricità del costrutto, migliora la crescita, adesione e migrazione di BMMSCs, il loro differenziamento osteogenico e mineralizzazione. Sullo scaffold ottenuto sono state condotte anche analisi inerenti il rilascio di ioni Zn^{2+} , per via della dissoluzione del riempitivo inorganico: a 5 giorni il livello cumulativo totale ($<0.5 \mu\text{g/ml}$) è risultato essere inferiore rispetto al limite di citotossicità ($\sim 10 \mu\text{g/ml}$). Infine, i risultati in vivo, inserendo lo scaffold in un difetto osseo creato in tibia di ratto, hanno mostrato una guarigione accelerata e completa con formazione di nuovo tessuto osseo dopo 8 settimane dall'impianto, grazie alla stimolazione ad ultrasuoni e alla piezoelettricità.

Un altro lavoro interessante è quello di H. Ghaedsharafi et al. (2024) [99]. Sfruttando la tecnica dell'elettrospinning coassiale, hanno realizzato uno scaffold nanocomposito, biodegradabile e bioattivo, a base di fibre core-shell, con core a base di PVDF e ZnO NPs (10-30 nm) incorporate e shell esterno a base di PCL. Lo ZnO si comporta da agente nucleante andando ad incrementare la fase piezoelettrica β del PVDF, aumenta la piezoelettricità complessiva del costrutto ed influisce su diverse proprietà biologiche. L'interazione tra le NPs ceramiche e la matrice polimerica si basa su legami ad idrogeno. Nello specifico all'aumentare del contenuto (wt%) di ZnO, aggiunto nella soluzione di PVDF, si hanno i seguenti effetti sulle proprietà del costrutto:

- Aumenta l'agglomerazione delle ZnO NPs e quindi la formazione di agglomerati all'interno delle fibre elettrospinnate, determinando in questo modo anche una dispersione non uniforme nel core polimerico;
- Fino ad un contenuto pari a 0.5 wt% la fase piezoelettrica β del PVDF aumenta, mentre oltre 0.5 wt% diminuisce;
- Per un contenuto superiore a 0.5 wt% si ha una diminuzione delle proprietà meccaniche del costrutto;
- Diminuisce la velocità di degradazione;
- Aumenta la probabilità di formazione di HAp. Il test di bioattività in SBF, per 28 giorni, ha dimostrato la bioattività del costrutto e la deposizione di CaP. Il rapporto atomico percentuale Ca/P aumenta all'aumentare del contenuto di ZnO, avvicinandosi al valore di 1.67 tipico dell'HAp.

Per un contenuto pari a 0.5 wt% di ZnO si ha un incremento dell'output piezoelettrico ($d_{33} \sim 6.5 \text{ pc/N}$), dovuto sia alla piezoelettricità propria delle NPs di ZnO sia all'indiretto incremento della fase

β del PVDF. Infine, lo ZnO risulta importante anche per la mineralizzazione e la deposizione di fosfato di calcio, migliora la proliferazione e la crescita cellulare. La concentrazione ottimale di ZnO è risultata essere 0.5 wt%, senza effetti citotossici.

Zhou et al. (2025) [100] nel loro lavoro si sono occupati di sviluppare una membrana composita, da applicare su un difetto osseo, a doppio strato: uno strato a base di microfibre di PLLA con all'interno NPs di ZnO (~20 nm) e un secondo strato a base di microfibre di collagene, entrambi ottenuti tramite elettrospinning. La dispersione uniforme delle NPs di ZnO all'interno della matrice polimerica migliora la piezoelettricità del costrutto, quest'ultima attivata tramite stimolazione LIPUS (low-intensity pulsed ultrasound, 20 mW/cm²). Le NPs di ZnO sono state inserite nella soluzione di PLLA, con concentrazione pari a 0,1,2 e 4 wt%, prima della fase di fabbricazione tramite elettrospinning. La valutazione delle proprietà piezoelettriche della membrana a base di solo PLLA-ZnO ha mostrato una correlazione positiva tra la performance elettrica del costrutto e la concentrazione delle NPs di ZnO: all'aumentare della concentrazione di NPs di ZnO si ha un aumento del coefficiente piezoelettrico d_{33} della membrana, pari a 3.5 pC/N per una concentrazione di 1 wt%. L'aggiunta di ZnO ha come altri effetti un aumento della rugosità superficiale delle microfibre, una diminuzione dell'idrofilicità e un aumento della resistenza a trazione del costrutto. Considerando i risultati dei test cellulari in vitro su citocompatibilità e vitalità osteoblastica, la concentrazione ottimale di ZnO si è vista essere pari a 1 wt%, dal momento che per una concentrazione maggiore si ha una diminuzione della vitalità cellulare in particolare a 7 giorni e un aumento del numero di cellule morte. Il successivo inserimento del secondo strato a base di collagene fornisce alla membrana caratteristiche di bioattività, migliora la biocompatibilità, la performance piezoelettrica, la capacità osteogenica e osteoinduttiva e quindi la risposta cellulare. I test di rilascio in vitro hanno mostrato che il livello di ioni Zn^{2+} , rilasciati dalla membrana PLLA-ZnO@COL, risulta essere inferiore alla concentrazione limite di citotossicità (5 μ g/mL). In conclusione, i migliori risultati cellulari in vitro e in vivo sono stati ottenuti nel seguente ordine: PLLA-ZnO@COL, PLLA-ZnO e PLLA, con un miglioramento in caso di stimolazione LIPUS. L'incorporazione dello ZnO migliora la capacità della membrana di indurre rigenerazione ossea. I principali risultati di questo lavoro sono riportati nella figura 28 sottostante.

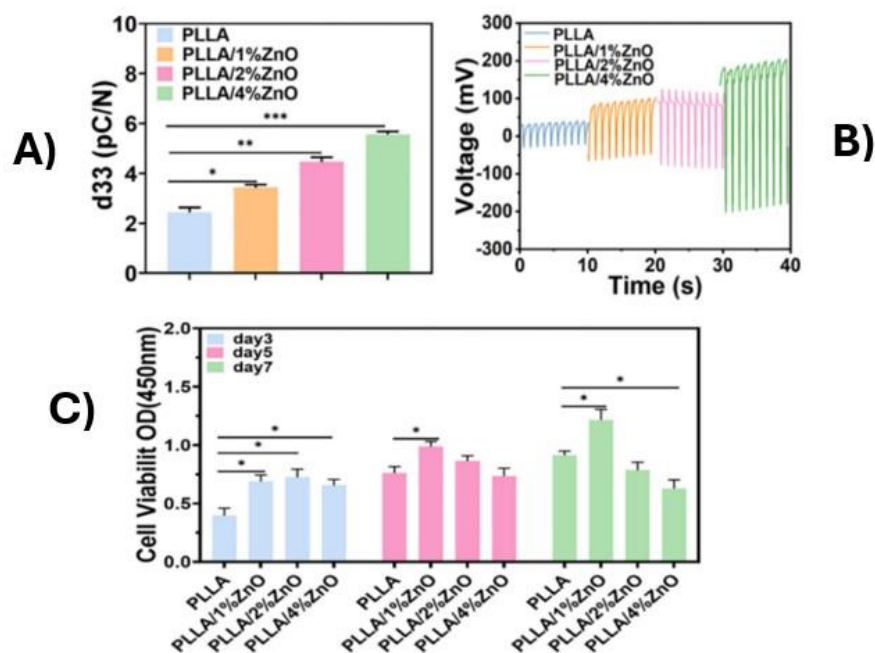


Figura 28. Principali risultati del lavoro di Zhou et al. (2025) [100]: effetto del contenuto di ZnO (wt%) su a&b) performance piezoelettrica della membrana composita PLLA-ZnO, c) sulla vitalità cellulare nel tempo.

In chiusura di questo paragrafo sulla piezoelettricità dello ZnO, in riferimento alle diverse morfologie nanostrutturali e nell'ambito dell'ingegneria del tessuto osseo, possiamo dire che trovano elevata applicazione le NPs di ZnO soprattutto all'interno di una matrice polimerica: dimensioni tipiche sono intorno alle decine di nm, con un coefficiente piezoelettrico d_{33} del costruito intorno a 5 pC/N. Si ottengono quindi bassi valori del coefficiente piezoelettrico d_{33} , comunque sufficienti nel contesto di un approccio biomimetico e quindi per mimare il microambiente del tessuto osseo dal punto di vista elettrico. Se si vogliono invece ottenere valori più elevati, utili per fornire più elevati stimoli elettrici o anche per lo sviluppo di PENGs, nanostrutture più efficienti risultano essere nanowires, nanosheets, nanorods e nanobelts. In generale è importante garantire biocompatibilità ed evitare citotossicità: a tal proposito il livello di ioni Zn^{2+} rilasciati deve essere inferiore alla concentrazione limite di citotossicità (5-10 $\mu\text{g/mL}$) e per fare questo è importante un rivestimento o incapsulamento con materiale biocompatibile che limiti questo rilascio.

1.10 Materiali bioattivi e piezoelettrici: stato dell'arte

In questo paragrafo, che rappresenta il cuore di questa tesi e il punto di partenza per studi futuri nel settore, verranno elencati e descritti alcuni studi di ricerca in cui sono stati sviluppati materiali contemporaneamente bioattivi e piezoelettrici. La fase piezoelettrica analizzata è a base di BTO o ZnO, mentre la fase bioattiva sarà a base di BG. L'analisi di letteratura ha mostrato che nei primi tentativi, di unire fase piezoelettrica e fase bioattiva in un'unica formulazione, come componente bioattiva è stata considerata l'HAp. In alcuni lavori come metodo si utilizza la semplice miscelazione delle polveri solide mentre in altri, quelli di interesse, si utilizzano metodi di sintesi di tipo chimico e il processo Stober modificato per realizzare uno shell bioattivo attorno ad un core piezoelettrico. Oltre al metodo di unione delle due fasi, alla tipologia di fasi, sono importanti anche la dimensione e la concentrazione delle due fasi e la compatibilità tra esse. Questa fase di ricerca bibliografica è stata preliminare per l'ultimo step di lavoro, ovvero la parte sperimentale di laboratorio.

Alcuni lavori citati non contengono la fase piezoelettrica di interesse (es. casi in cui si considera ZrO_2) o presentano uno shell a base di sola silice senza ioni modificatori. Ho ritenuto importanti e utile citarli in quanto il metodo di sintesi utilizzato e le considerazioni teoriche degli autori possono essere punto di partenza per il nostro scopo.

La combinazione tra materiali ceramici piezoelettrici e BGs presenta delle difficoltà. Generalmente, il processo di produzione dei ceramici piezoelettrici richiede elevate temperature di sinterizzazione (es. nel caso del BTO intorno a 1320°C), in modo da ottenere una struttura coesa e resistente meccanicamente. Queste alte temperature sono però critiche per molti BGs, in quanto possono determinare la formazione di fasi cristalline e influire sulla bioattività. Come detto nel paragrafo 1.3.3, la formazione di fasi cristalline silicate non inibisce ma ritarda la formazione dello strato di HCA. Pertanto, un passaggio chiave nella fabbricazione di un materiale piezoelettrico e bioattivo è la progettazione della fase di sinterizzazione con i suoi parametri. Dal punto di vista della composizione del materiale finale e della concentrazione delle due diverse fasi, generalmente il contenuto di fase piezoelettrica è superiore rispetto a quello della fase bioattiva (indicativamente 75-80 wt% e 20-25 wt%) e il rapporto relativo influisce sull'equilibrio tra proprietà di piezoelettricità e proprietà di bioattività.

1.10.1 Titanato di bario

Un lavoro che può essere considerato un punto di partenza è quello di *C. Polley et al.* [87], già presentato nel paragrafo 1.8 relativo al BTO. In questo lavoro particelle micrometriche di BTO e HAp sono state utilizzate per realizzare uno scaffold tramite tecnica di additive manufacturing, dopo essere state mescolate e legate utilizzando un legante polimerico. Non è stata valutata la bioattività del costruito ma soltanto il comportamento piezoelettrico: nello specifico si è osservato che il coefficiente piezoelettrico d_{33} cresce all'aumentare dell'intensità del campo elettrico applicato durante il processo di poling, mentre il tempo di poling è risultato essere poco influente. I test cellulari in vitro sono stati soddisfacenti ma mancano test in vivo.

Lo stesso gruppo di ricerca [101] ha poi fatto un passo in avanti sostituendo le particelle micrometriche di HAp con particelle micrometriche di BG di composizione 45S5 (dimensione media $\sim 4\mu\text{m}$). Utilizzando anche in questo caso la tecnica di fabbricazione binder jetting, si è ottenuto uno scaffold ceramico piezoelettrico-vetroceramico bioattivo. In figura 29 è schematizzato il processo di fabbricazione adottato per la realizzazione dello scaffold multifunzionale. Sono state valutate due composizioni diverse, una ad alto contenuto di BG (15 wt%) e una a basso contenuto di BG (5 wt%). Questo lavoro è importante poichè evidenzia l'effetto del post-trattamento termico di sinterizzazione sulla componente vetrosa: dal momento che la temperatura massima di sinterizzazione è oltre le T_g della componente vetrosa, entra in gioco il flusso viscoso del biovetro che facilita la densificazione e compattazione del materiale, in particolare nel caso 15 wt% BG questo permette una sinterizzazione ad una temperatura massima più bassa (1150°C) rispetto al caso 5 wt% BG (1320°C). Durante la sinterizzazione si formano seconde fasi per via della reazione tra BTO e BG (fasi $\text{Ba}_2\text{TiSi}_2\text{O}_8$ e CaTiO_3) e per via della cristallizzazione del BG (fase $\text{Na}_6\text{Ca}_3\text{Si}_6\text{O}_{18}$), fenomeno più marcato nella composizione ad alto contenuto di BG. Rispetto al lavoro precedente, in questo caso l'aggiunta di BG al posto dell'HAp determina un aumento delle proprietà meccaniche, vicine a quelle dell'osso trabecolare e adatte per applicazioni in zone non troppo sollecitate dal punto di vista meccanico. Confrontando le due composizioni si osserva che in quella ad alto contenuto di BG si hanno superiori proprietà meccaniche come la resistenza a compressione, un minore coefficiente piezoelettrico d_{33} , una maggiore bioattività valutata tramite test in SBF a 28 giorni con l'HCA precipitata che presenta morfologia a cavolfiore, ma anche un effetto citotossico superiore come mostrato dai test cellulari in vitro. In figura 30 sono riportati i risultati più rilevanti relativamente alle proprietà meccaniche, piezoelettriche e di bioattività delle due composizioni valutate. La composizione migliore è risultata essere pertanto la BTO5BG in quanto meno citotossica, con una buona risposta cellulare e con coefficiente piezoelettrico $d_{33} \sim 21\text{pC/N}$. Mancano però test in vivo su un modello animale.

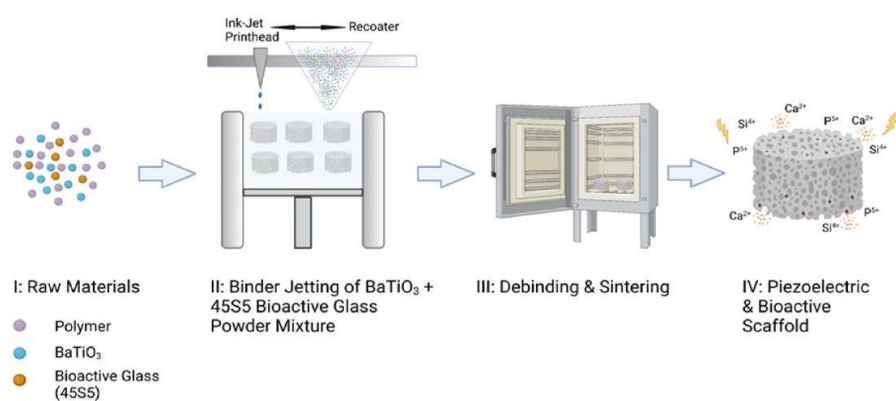


Figura 29. Processo di fabbricazione utilizzato da C.Polley et al. [101] per la realizzazione dello scaffold composito piezoelettrico e bioattivo a base di microparticelle di BTO e BG 45S5, miscelate allo stato solido.

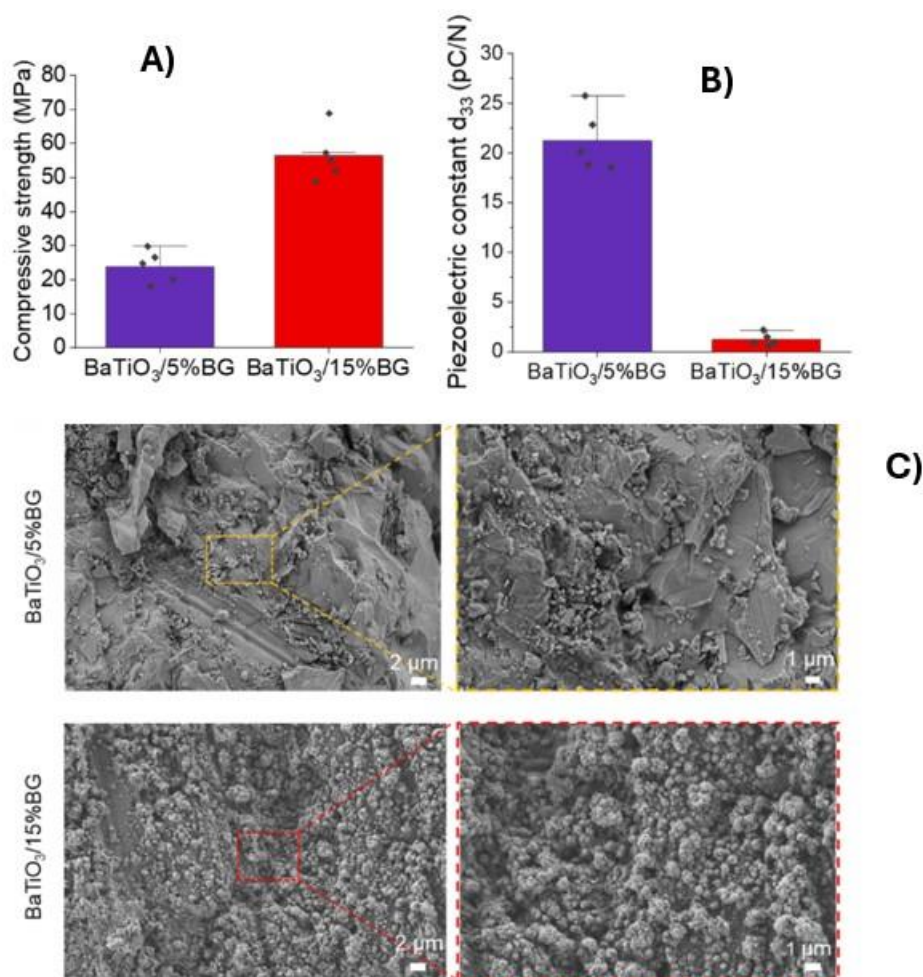


Figura 30. Alcuni dei risultati principali del lavoro di C.Polley et al. [101], confrontando le due diverse composizioni BTO5BG e BTO15BG: A) proprietà meccaniche e in particolare resistenza a compressione, B) coefficiente piezoelettrico d_{33} e C) analisi SEM dei campioni in seguito a test di bioattività in SBF per 28 giorni.

Successivamente nel 2024, lo stesso gruppo di ricerca di C. Polley et al. [102] si è occupato di realizzare un materiale piezoelettrico e bioattivo, nuovamente a base di particelle micrometriche commerciali di BTO e BG 45S5, miscelate allo stato solido. La novità di questo lavoro però è rappresentata dall'utilizzo della tecnica FAST (field-assisted sintering technique), con l'obiettivo di ottenere un campione con un'elevata densità e un basso grado di cristallizzazione della componente vetrosa. Nel lavoro viene indagato nel dettaglio l'effetto della temperatura massima di sinterizzazione su proprietà del campione finale quali la densità, il coefficiente piezoelettrico d_{33} e la percentuale di fase cristallina tetragonale del BTO. È stata osservata l'importanza di un post-trattamento a 1320 °C in modo da impartire una riconfigurazione microstrutturale del materiale, così da indurre un incremento della taglia dei grani e quindi migliori proprietà piezoelettriche. Le composizioni indagate sono state BTO2.5BG (2.5 wt%) e BTO5BG (5 wt%) ed anche in questo caso si è osservato che all'aumentare del contenuto di BG le proprietà piezoelettriche diminuiscono, questo poichè la componente vetrosa è non piezoelettrica e interferisce con l'allineamento dei dipoli durante il processo di poling. Inoltre, alle alte temperature di lavoro, per via di reazioni chimiche di scambio ionico tra BTO e BG, si forma la seconda fase $\text{Ba}_2\text{TiSi}_2\text{O}_8$ (Frensoite) piezoelettrica ma non ferroelettrica. Per le combinazioni indagate, il coefficiente piezoelettrico d_{33} varia nel range 0.78-3.39 pC/N, risultando dello stesso ordine rispetto a quello del tessuto osseo. La figura 31 riporta il coefficiente piezoelettrico d_{33} al variare della temperatura di sinterizzazione, per un materiale finale a base di BTO, BTO2.5BG e BTO5BG. In sostanza, rispetto al lavoro precedente cambia soltanto la tecnica di sinterizzazione, con effetti sul grado di compattazione del materiale finale e sulle proprietà piezoelettriche. Mancano però test di bioattività, cellulari in vitro e test in vivo.

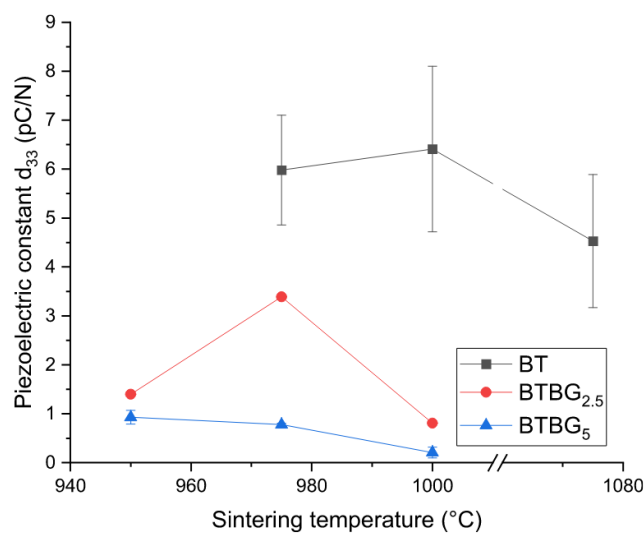


Figura 31. Rappresentazione grafica dell'effetto della temperatura di sinterizzazione sul coefficiente piezoelettrico d_{33} . Il confronto avviene tra i tre campioni: BTO puro, BTO2.5BG e BTO5BG [102].

Nel 2020, *B. Saeidi et al.* [103] hanno realizzato uno scaffold poroso e composito a base di micropolveri di BTO e nanopolveri di BG a composizione ternaria silicio-calcio-fosforo (<50 nm), sfruttando la tecnica freeze casting. Hanno confrontato le due diverse composizioni BTO90nBG10 e BTO75nBG25, rispettivamente con contenuto di BG pari a 10 vol% e 25 vol%. Entrambe le composizioni sono risultate essere soddisfacenti dal punto di vista delle proprietà meccaniche, piezoelettriche e biologiche, non mostrando citotossicità nei test cellulari in vitro. La composizione a maggior contenuto di BG ha mostrato una maggiore densità e minore porosità per via del flusso viscoso della componente vetrosa durante la sinterizzazione (1320°C, 2h), una maggiore resistenza a compressione per via dell'azione rinforzante della fase vetrosa e anche una migliore risposta cellulare da parte di MSCs. Il coefficiente piezoelettrico d_{33} misurato per le due diverse composizioni BTO90nBG10 e BTO75nBG25 vale rispettivamente 36 pC/N e 24 pC/N, superiore rispetto a quello del tessuto osseo e quindi i costrutti sono in grado di facilitare la rigenerazione ossea. Durante la sinterizzazione è stata inoltre osservata la parziale ricristallizzazione della fase vetrosa con formazione di seconde fasi minori. Non sono stati effettuati test di bioattività o test in vivo in modello animale. La tabella 5 riportata di seguito mette a confronto le due composizioni fabbricate e il tessuto osseo, compatto e trabecolare, dal punto di vista delle proprietà fisiche, meccaniche e piezoelettriche.

Tabella 5. Confronto in termini di proprietà fisiche, meccaniche e piezoelettriche tra l'osso (compatto e trabecolare) e gli scaffolds a base di BTO e nanopolveri di BG realizzati tramite freeze casting, da parte di Seidi et al. [103].

Property	BT90/nBG10	BT75/nBG25	Compact bone	Cancellous bone
Density, g/cm ³	0.99 ± 0.1	1.18 ± 0.1	1.4-1.9	0.8-1.1
Porosity, %	82 ± 1	77 ± 1	5-30	75-95
Compressive strength, MPa	8.1 ± 0.3	16.9 ± 1.1	50-150	1.3-13
d_{33} , pC/N	36	24	0.7	0.7
Statistical analysis was conducted using ANOVA; $P \leq 0.001$ (Differences were considered significant for $P \leq 0.05$)				

Per quanto riguarda studi in cui si utilizza invece un approccio core-shell, nel 2020 *H. Huang et al.* [85] hanno modificato superficialmente NPs di BTO (diametro medio~8 nm) con un rivestimento di silice amorfa in modo da migliorarne la dispersibilità in acqua, la stabilità e la biocompatibilità. Sono stati proposti e confrontati due interessanti metodi: il metodo Stober modificato, che permette di ottenere un design core-shell di tipo aggregato (100-200 nm), e il metodo della microemulsione inversa, che permette di ottenere invece un design core-shell singolo (~29 nm). Il primo metodo risulta nell'incapsulamento di aggregati di NPs di BTO con uno strato di SiO₂ spesso (20-100 nm), è più efficiente dal punto di vista del tempo di sintesi e del costo ma può essere difficile da utilizzare con particelle di piccola taglia, idrofobiche e con un'elevata concentrazione in sospensione colloidale.

Il secondo approccio invece risulta nell'incapsulamento di singole NPs di BTO con un rivestimento di SiO₂ sottile (~10 nm), è migliore per rivestire NPs con taglia inferiore a 10 nm ma è più complicato, meno scalabile e richiede un tempo di sintesi più lungo. Inoltre, il metodo della microemulsione inversa richiede l'utilizzo del surfattante Igepal CO-520 e si basa su un meccanismo di scambio di un ligando. I ricercatori in questo studio hanno mostrato che lo shell di silice è in grado di confinare gli ioni Ba²⁺ all'interno del core, minimizzandone il rilascio in ambiente acquoso e quindi la tossicità: il test di rilascio, effettuato in soluzione tampone fosfato salina (PBS, phosphate-buffered saline) a pH=7.4 per 48h, ha mostrato un quantitativo di ioni Ba²⁺ rilasciati inferiore al 3% in peso del quantitativo totale di bario nelle NPs di BTO. Di questo lavoro, ai fini della tesi e della successiva parte sperimentale, interessa il metodo Stober modificato. Il protocollo di sintesi proposto dagli autori è il seguente:

- 1) Dispersione delle NPs di BTO in etanolo, ad una concentrazione di 9 mg/mL;
- 2) Miscelazione sotto stirring, per 20 min, di 9 mL di questa sospensione, 1 mL di acqua e 100 µL di TEOS;
- 3) Aggiunta di 0.2 mL di ammoniaca (28%);
- 4) Stirring per 2h;
- 5) Centrifugazione e raccolta delle NPs di BTO modificate in superficie con SiO₂;

Con questo protocollo di sintesi si ottengono aggregati di forma sferica, mentre utilizzando nello step 2) 2 mL di acqua e 50 µL di TEOS si ottiene una forma allungata. Parametri importanti sono il quantitativo di TEOS, di acqua e il rapporto molare etanolo/acqua. Come catalizzatore basico è utilizzata l'ammoniaca. Nello specifico, aumentando il contenuto di TEOS si ottiene uno shell di silice con uno spessore maggiore e una superficie più liscia, mentre aumentando la concentrazione di acqua (i.e diminuendo il rapporto molare etanolo/acqua) aumenta la dimensione del core, si ottiene uno shell di silice con una superficie più rugosa e irregolare e aumenta il grado di aggregazione delle NPs di BTO. Quanto detto è illustrato in figura 32.

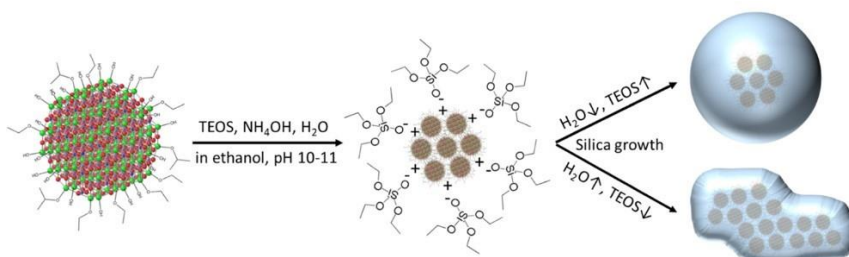


Figura 32. Schema illustrativo del processo di rivestimento di NPs di BTO tramite processo Stober modificato. Sono evidenziati i parametri di sintesi e la loro influenza sulla morfologia delle particelle core-shell, sul grado di aggregazione dei core e sullo spessore dello shell [85].

Il lavoro appena illustrato si basa, soprattutto dal punto di vista teorico, sulle precedenti considerazioni di *L. Ding et al.* [104], relative alla sintesi di NPs core-shell di $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2$ sfruttando il metodo della microemulsione inversa. In questo articolo l'obiettivo è quello di realizzare NPs con design core-shell singolo, evitando la formazione di particelle di sola silice. I parametri su cui viene maggiormente posta l'attenzione sono il contenuto di NPs da rivestire, di TEOS e di ammoniaca. Alcuni dei risultati più importanti sono i seguenti:

- Aumentando il contenuto di TEOS aumenta lo spessore dello shell di silice, ma oltre un certo valore si vengono a formare anche particelle di pura silice. Una migliore strategia è quindi quella di frazionare l'aggiunta del maggior contenuto di TEOS (es. decine di $\mu\text{L/h}$, per una decina di ore). Il contenuto di TEOS è in relazione con la concentrazione di monomeri idrolizzati in soluzione, da cui dipende il verificarsi di una nucleazione omogenea (i.e formazione di particelle di pura silice) o una nucleazione eterogenea (i.e formazione di uno shell di silice su una particella di natura diversa);
- Anche il contenuto di ammoniaca influisce sullo spessore dello shell di silice. Aumentare solo esso però ha un basso effetto incrementale ma è necessario anche diminuire il contenuto di TEOS, da aggiungere questa volta tutto in una volta. Dall'altro lato, un basso contenuto di ammoniaca determina la formazione di uno shell di silice sottile, in quanto si formano meno monomeri idrolizzati di TEOS in soluzione.

Quindi questo lavoro è importante per capire come regolare il rivestimento a base silice di particelle di diversa natura, agendo su due parametri importanti quali il contenuto di TEOS e il contenuto di ammoniaca.

Nel 2015, *Y. Zhang et al.* [105] hanno proposto un diverso protocollo di sintesi, nuovamente basato sul processo Stober, per ottenere NPs core-shell di BTO-SiO_2 , partendo da NPs commerciali di BTO (dimensione media ~ 300 nm). Facendo variare la percentuale in peso di silice da 1 a 8 %wt sono riusciti ad ottenere uno shell di silice con spessore fino a 12 nm, dipendente pertanto dal quantitativo di precursore TEOS utilizzato. Nello specifico il protocollo di sintesi utilizzato dagli autori è il seguente:

- 1) Sospensione di 20 g di NPs di BTO in 50 ml di etanolo e 3 ml di acido acetico;
- 2) Stirring magnetico per 40 min a 40°C in bagno termostatico ad acqua, poi trattamento ad ultrasuoni per 30 min;
- 3) Aggiunta lenta di TEOS (volume non specificato, variabile in modo da ottenere un contenuto di SiO_2 di 0, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 4.0, 6.0 e 8 wt%);

- 4) Stirring magnetico per 40 min a 40°C in bagno termostatico ad acqua, poi trattamento ad ultrasuoni per 30 min;
- 5) Aggiunta goccia a goccia di ammoniaca (25-28%);
- 6) Centrifugazione e lavaggio con acqua deionizzata delle polveri ottenute;
- 7) Essiccamento in aria a 100°C per 12h;

Il primo step di sintesi consiste nel pre-attivare le NPs di BTO in acido acetico ed etanolo, in modo da ripulire la superficie e indurre l'esposizione di gruppi ossidrilici -OH utili per la formazione dello shell di silice. Come descritto nel paragrafo 1.5.1, l'effetto della temperatura, testato in questo protocollo, potrebbe essere quello di accelerare la reazione di idrolisi e rallentare la reazione di condensazione del TEOS, in modo da favorire la nucleazione e formazione di monomeri idrolizzati piuttosto che la loro aggregazione. Di conseguenza verrebbe favorita la deposizione sul core di BTO. Il catalizzatore basico è l'ammoniaca (25-28%), anche se nel lavoro citato non viene riportato il valore di pH a cui la sospensione viene portata. In figura 33 è riportata un'immagine TEM raffigurante le NPs core-shell sintetizzate. Le polveri ottenute sono state poi sottoposte a pressatura uniassiale, in seguito a miscelamento con legante PVA (5%), in modo da ottenere pellets di dimensione millimetrica (diametro 12 mm, spessore 0.5 mm). Dopo una fase di de-binding per allontanare il legante (600°C, 2h), i pellets sono stati sinterizzati in aria a 1250°C per 2h, con una velocità di riscaldamento pari a 2°C/min. Con la sinterizzazione è stata osservata la formazione della seconda fase cristallina $\text{Ba}_2\text{TiSi}_2\text{O}_8$, per via delle reazioni di inter-diffusione all'interfaccia tra core e shell. L'obiettivo ultimo degli autori è stato quello di valutare le differenti proprietà dielettriche e la microstruttura tra un ceramico ottenuto partendo da NPs di solo BTO e un ceramico a base di NPs core-shell di BTO-SiO₂.

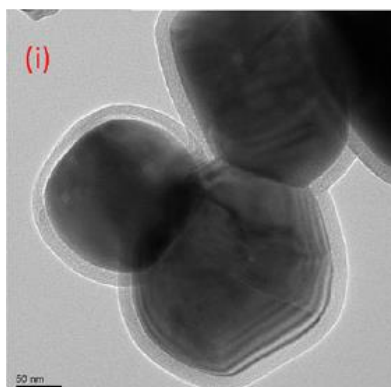


Figura 33. Immagine TEM raffigurante le NPs core-shell di BTO-SiO₂ sintetizzate da Y. Zhang et al. [105]. Nel caso specifico il contenuto di SiO₂ è pari a 8 wt% e lo shell ha uno spessore di circa 12 nm.

Un protocollo simile al precedente è stato adottato da *L. Xu et al.* [106] nel 2017, per sintetizzare NPs core-shell di BTO-SiO₂. Nello specifico, i passaggi di sintesi effettuati sono i seguenti:

- 1) Sospensione di 10 g di NPs di BTO in 25 ml di etanolo e 1 ml di acido acetico;
- 2) Stirring magnetico per 30 min, poi trattamento ad ultrasuoni per 30 min;
- 3) Aggiunta lenta di TEOS (volume non specificato, variabile in modo da ottenere un contenuto di SiO₂ di 2.5, 5, 7.5, 10, 15 e 20 wt%);
- 4) Stirring magnetico per 30 min, poi trattamento ad ultrasuoni per 30 min;
- 5) Aggiunta goccia a goccia di ammoniaca in modo da portare il pH a 9.5;
- 6) Stirring a 40°C per 5h;
- 7) Centrifugazione e lavaggio con etanolo delle polveri ottenute;
- 8) Essiccazione in forno a 120°C per 8h;

Le polveri sintetizzate sono state poi miscelate con il legante PVA (5%), pressate in pastiglie e infine sinterizzate a 1200°C. Rispetto al lavoro precedente di *Y. Zhang et al.* [105], in questo caso la dimensione media delle NPs di partenza di BTO è ~100 nm e cambiano anche le percentuali in peso di SiO₂ considerate, quindi il contenuto di TEOS. In questo caso il pH a cui viene portata la sospensione, grazie all'aggiunta dell'ammoniaca, è specificato e pari a 9.5. Cambia anche il punto del protocollo in cui viene introdotto l'effetto della temperatura (40°C), cioè dopo l'aggiunta dell'ammoniaca e non prima. Anche qui viene effettuato un pre-trattamento con acido acetico e si sfruttano nuovamente gli ultrasuoni, per favorire la dispersione delle NPs e fornire energia alle reazioni. Allo stesso modo, l'obiettivo finale degli autori è stato quello di valutare gli effetti del rivestimento a base di silice amorfa sulla microstruttura e proprietà dielettriche del ceramico composito finale. Il processo di sinterizzazione porta alla formazione di una seconda fase cristallina, identificata dagli autori come BaTiSiO₅, impattante sulle proprietà finali del materiale ceramico.

I due lavori appena descritti, di *Y. Zhang et al.* [105] e *L. Xu et al.* [106], forniscono protocolli di sintesi molto dettagliati per ottenere NPs core-shell di BTO-SiO₂. I materiali finali ottenuti, pellets nel primo lavoro e pastiglie nel secondo, possono essere sottoposti a polarizzazione e successiva valutazione delle proprietà piezoelettriche. In aggiunta, partendo da essi si può modificare il protocollo in modo da ottenere uno shell a base di BG, utilizzando i precursori TEP e CN. È importante valutare il rilascio di ioni Ba²⁺ tramite test in vitro, come fatto da *H. Huang et al.* [85].

Nel 2021, *B. Hoomehr et al.* [107] hanno progettato e sintetizzato NPs core-shell composte da un core a base di BG di composizione binaria (SiO₂-CaO) e uno shell a base di zirconia (ZrO₂), per ottenere quindi una formulazione core-shell a design invertito. Hanno sfruttato un metodo sol-gel combinato con trattamento ad ultrasuoni. Nello specifico, la sospensione in etanolo delle NPs di BG,

sintetizzate tramite metodo sol-gel utilizzando come precursori TEOS e CN, è stata aggiunta ad una sospensione di precursori della zirconia e poi trattata con ultrasuoni. La formazione dello shell di ZrO_2 è una conseguenza dell'adsorbimento dei cationi Zr^{4+} sulla superficie carica negativamente delle NPs di BG, tramite interazioni elettrostatiche, ed è promossa anche dalle successive fasi di essiccamento e calcinazione (600°C , 3h). Le NPs core-shell ottenute si presentano con una morfologia sferica (diametro medio ~ 150 nm, spessore shell ~ 15 nm) e una superficie rugosa. Sono state utilizzate per realizzare un rivestimento su un substrato metallico, tramite la tecnica della deposizione elettroforetica (EPD). Su questi rivestimenti sono stati condotti test in SBF a 7 giorni per valutarne la bioattività ed è stata osservata la formazione di depositi di CaP, anche se in numero inferiore rispetto ad un rivestimento a base di NPs di solo BG, questo perchè lo shell agisce da barriera limitando ma non impedendo il rilascio ionico dal core di BG. La rugosità dello shell risulta importante per non impedire il rilascio ionico e quindi preservare le proprietà bioattive del core. Questo lavoro può essere un punto di partenza, non tanto per quanto riguarda le quantità dei precursori e le dimensioni delle polveri da utilizzare, quanto per gli step di sintesi, i solventi e l'utilizzo degli ultrasuoni. Si può partire da questo lavoro per provare a realizzare uno shell piezoelettrico su un core bioattivo, ricordando che è importante che la superficie dello shell da ottenere sia rugosa affinché la bioattività del core venga preservata. La figura 34, tratta direttamente dall'articolo citato, illustra il metodo di sintesi seguito dagli autori.

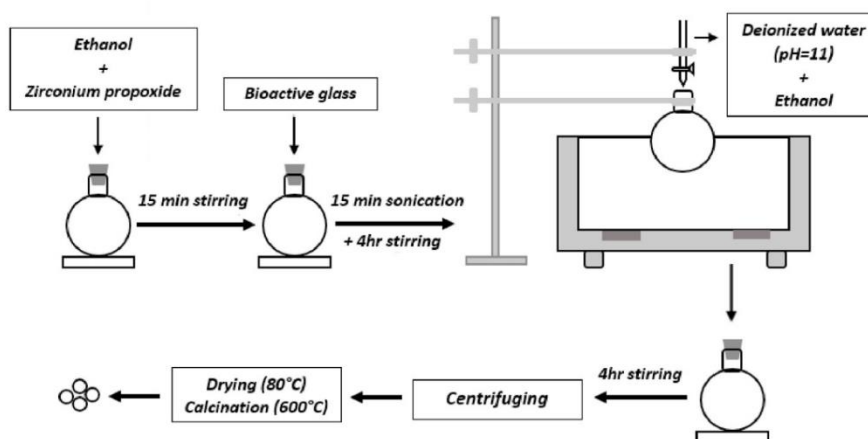


Figura 34. Protocollo di sintesi utilizzato da B. Hoomehr et al. [107] per sintetizzare NPs core-shell BG- ZrO_2 , tramite metodo sol-gel e trattamento ad ultrasuoni. Si ottiene un design core-shell invertito, in cui la fase bioattiva rappresenta il core.

Il lavoro più interessante individuato è quello di Z. Yang *et al.* [108]. Questi ricercatori sono riusciti a rivestire un core di BTO con uno shell uniforme e omogeneo a base di BG di composizione binaria ($\text{SiO}_2\text{-CaO}$), utilizzando il metodo sol-gel assistito da ultrasuoni. Il protocollo di sintesi utilizzato è il seguente:

- 1) Pre-attivazione delle NPs di BTO con acido acetico in etanolo, sotto stirring e trattamento ad ultrasuoni per 30 min;
- 2) Aggiunta goccia a goccia di un certo volume di TEOS liquido, in accordo con il rapporto in massa BTO:BG scelto e quindi con il contenuto di BG (5,10,15 wt%);
- 3) Secondo trattamento ad ultrasuoni;
- 4) Aggiunta dell'ammoniaca, all'interno della sospensione, in modo da portare il pH a 9.5;
- 5) Stirring a 40°C per 2h;
- 6) Aggiunta del precursore CN solido;
- 7) Stirring per 4h;
- 8) Centrifugazione, lavaggio ed essiccamento delle polveri core-shell ottenute;

Il pre-trattamento con acido acetico è importante per attivare la superficie delle NPs di BTO e per indurre l'esposizione superficiale dei gruppi ossidrilici -OH. Il trattamento con ultrasuoni facilita la dispersione delle NPs, cosa importante per ottenere un design core-shell singolo. L'ammoniaca, e in particolare il pH, sono importanti in quanto catalizzano le reazioni di idrolisi e condensazione del TEOS, permettendo la formazione di un'iniziale shell a base silice all'interno del quale poi dovranno entrare gli ioni modificatori Ca^{2+} . Altri parametri di sintesi importanti sono i tempi di stirring e la temperatura. Dopo la loro sintesi, le NPs core-shell sono state sospese in etanolo insieme al legante polimerico PVP, in modo da formare uno slurry. Utilizzando la tecnica gas extrusion, di 3D printing, è stato quindi fabbricato uno scaffold cilindrico millimetrico, poi sottoposto a trattamento termico di sinterizzazione e infine a polarizzazione (110°C, 3 kV, 15 min). Temperatura di sinterizzazione e contenuto di BG sono i due parametri che più influiscono sulla microstruttura, sulle proprietà meccaniche, piezoelettriche, di bioattività e sulla risposta cellulare. Nello specifico sono state valutate tre diverse temperature di sinterizzazione (1150°C, 1200°C, 1250°C) e tre diversi contenuti di BG (5, 10, 15 wt%). I risultati delle caratterizzazioni hanno mostrato che:

- Aumentando il contenuto di BG (5,10,15 wt%) aumenta lo spessore dello shell bioattivo (5,11,16 nm). Inoltre, dal momento che la fase bioattiva alle alte temperature di sinterizzazione fonde e funge da legante tra le particelle di BTO, si verifica anche un aumento della densità e diminuzione della porosità, con conseguente aumento della resistenza meccanica a compressione. Il coefficiente piezoelettrico d_{33} invece diminuisce all'aumentare della fase non piezoelettrica;

- Per quanto riguarda la temperatura di sinterizzazione, a 1150°C e 1200°C non si ha una densificazione completa. All'aumentare di essa, dal momento che le particelle diventano più grosse, si ha un aumento della densità, una riduzione della porosità e conseguentemente un aumento della resistenza meccanica a compressione. Il coefficiente piezoelettrico d_{33} invece aumenta;
- Come già osservato in lavori precedenti, durante la sinterizzazione si verifica la formazione di una seconda fase cristallina ($\text{Ba}_2\text{TiSi}_2\text{O}_8$), per via di reazioni interfacciali tra il core di BTO e l'ossido di silicio all'interno dello shell di BTO;
- All'aumentare del contenuto di BG si ha una migliore risposta cellulare in termini di adesione, proliferazione e differenziamento osteogenico di MSCs. Questa migliore risposta si verifica anche nel caso di scaffold polarizzato rispetto a quello non polarizzato;

I risultati migliori si sono ottenuti nel caso di temperatura di sinterizzazione pari a 1250°C e contenuto di BG pari a 15 wt%. In questo caso il costrutto finale presenta una resistenza meccanica a compressione pari a 66 MPa e un coefficiente piezoelettrico d_{33} pari a circa 1.1 pC/N, entrambi valori vicini alle rispettive proprietà dell'osso (vedi tabella 5). In questo lavoro mancano, però, test di bioattività a lungo termine, test in vivo e test relativi al rilascio di ioni Ba^{2+} . Nella seguente figura 35 sono riportate le immagini TEM relative alle NPs core-shell sintetizzate, per diversi contenuti di fase bioattiva.

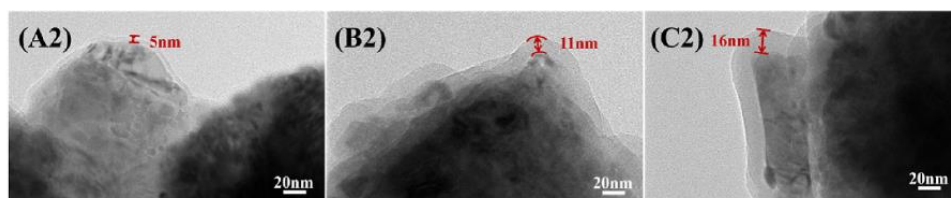


Figura 35. Immagini TEM raffiguranti le NPs core-shell BTO-BG (SiO_2 -CaO) ottenute. Si può notare che all'aumentare del contenuto di BG aumenta lo spessore dello shell: A2) BG 5 wt%, B2) BG 10 wt%, C2) BG 15 wt%.

Nella tabella 6 riportata di seguito sono riassunti in maniera concisa i lavori precedentemente analizzati, relativi all'unione di una fase piezoelettrica rappresentata dal BTO e di una fase bioattiva o anche consistente in un rivestimento di silice. Sono riportate le informazioni più rilevanti quali le principali caratteristiche del core e dello shell, il metodo di unione delle due fasi, il campione finale ottenuto nel lavoro, i risultati principali ottenuti e in particolare le proprietà piezoelettriche e bioattive eventualmente valutate, le applicazioni e gli sviluppi futuri.

Tabella 6. Tabella riassuntiva dei principali lavori di ricerca in cui la fase piezoelettrica di BTO viene unita con una fase bioattiva, tramite miscelazione allo stato solido o approccio core-shell. Sono considerati anche lavori in cui lo shell è a base di silice.

Fase piezoelettrica	Fase bioattiva	Metodo di unione delle due fasi	Campione finale	Valutazioni e applicazioni	Proprietà piezoelettriche	Bioattività	Aspetti da migliorare	Rif.	Anno
BTO (polveri commerciali, dimensione media <3µm, 68 wt%).	HAp (polveri commerciali, dimensione media ~40µm, 18 wt%).	Miscelazione allo stato solido.	Polveri mescolate sfruttando un legante polimerico (PEMA) e scaffold realizzato tramite tecnica binder jetting, sinterizzato e polarizzato (120°C, 1.25 kV/mm, 15-30 min).	I test cellulari in vitro hanno mostrato una buona adesione, crescita e vitalità cellulari e in generale la composizione del materiale è risultata essere citocompatibile.	d33~3pC/N	Non valutata.	Scarse proprietà meccaniche migliorabili modificando il trattamento di sinterizzazione o la composizione. È necessario effettuare test in vivo.	[87]	2020
BTO (polveri commerciali, dimensione media <3µm).	BG 45S5 (polveri commerciali, dimensione media ~4µm, 5 wt%/15 wt%).	Miscelazione allo stato solido.	Polveri mescolate sfruttando un legante polimerico (PEMA) e un agente di flusso a base silice e scaffold realizzato tramite tecnica binder jetting, sinterizzato e polarizzato (120°C, 1.25 kV/mm, 30 min).	La composizione migliore è risultata essere la BTO5BG (BG 5 wt%) in quanto meno citotossica, con buone risposte cellulari, con un maggiore coefficiente piezoelettrico e con buone proprietà meccaniche e di bioattività.	d33~21pC/N per BTO5BG, d33~1.2 pC/N per BTO15BG	Nel caso della composizione BTO15BG il test di bioattività in SBF a 28 giorni mostra la formazione di uno strato di HCA con la tipica morfologia a cavolfiore mentre nel caso della composizione BTO5BG la precipitazione di HCA è meno pronunciata, sottoforma di particelle più isolate e pertanto con una bioattività inferiore.	È necessario effettuare test in vivo, valutare il rilascio di ioni Ba ²⁺ tramite test in vitro.	[101]	2023
BTO (polveri commerciali).	BG 45S5 (polveri commerciali, 2.5 wt%/5 wt%).	Miscelazione allo stato solido.	Materiale ottenuto tramite FAST (field-assisted sintering technique), sottoposto a post-trattamento a 1320°C e polarizzato (12 kV, 15 min).	È stato valutato l'effetto della temperatura massima di sinterizzazione sulla densità del campione, sulla frazione di fase cristallina tetragonale, sulla microstruttura e sulle proprietà piezoelettriche. È stato valutato anche l'effetto di un post-trattamento a 1320°C.	d33 nel range 0.78-3.39 pC/N.	Non valutata.	È necessario effettuare test di bioattività, test cellulari in vitro e test in vivo, in particolare valutare il rilascio di ioni Ba ²⁺ .	[102]	2024

BTO (polveri micrometriche sintetizzate).	BG (nanopolveri sintetizzate tramite metodo sol-gel, con composizione ternaria a base silicio-calcio-fosforo, <50 nm).	Miscelazione allo stato solido.	Polveri mescolate fino ad ottenere uno slurry, sottoposto a freeze casting e poi sinterizzato (1250°C, 2h). Infine, il campione cilindrico millimetrico è stato sottoposto a processo di poling (14 kV, 110°C, 30 min).	Entrambe le composizioni valutate, BTO90nBG10 (10 %vol) e BTO75nBG25 (25 %vol), sono risultate soddisfacenti dal punto di vista delle proprietà fisiche, meccaniche, piezoelettriche e biologiche, nello specifico la composizione a maggior contenuto di BG presenta una maggiore densità e minore porosità, maggiore resistenza a compressione, minori proprietà piezoelettriche e una migliore risposta cellulare in vitro	d33~36pC/N per la composizione BTO90nBG10, d33~24 pC/N per BTO75nBG25	Non valutata.	È necessario effettuare test di bioattività e test di impianto in vivo.	[103]	2020
BTO (NPs sintetizzate tramite metodo sol-gel modificato, diametro medio ~8 nm).	Rivestimento a base di silice amorfa (fase non bioattiva) partendo dal precursore TEOS. Ammoniaca (28%) utilizzata come catalizzatore basico.	Approccio core-shell tramite metodo Stober modificato.	NPs core-shell BTO-SiO ₂ disperdibili in etanolo o acqua (in quest'ultimo caso la dispersibilità è garantita fino ad una concentrazione di 5 mg/mL).	Il test di rilascio degli ioni Ba ²⁺ , tramite test in PBS a pH=7.4 per 48h, ha mostrato un livello di ioni rilasciati <3% in peso rispetto al quantitativo totale di bario nelle NPs di BTO. I parametri di processo principali sono il contenuto di TEOS e il contenuto di acqua (i.e rapporto molare etanolo/acqua).	Non valutate.	Non valutata.	Inserimento di ioni modificatori in modo da ottenere uno shell bioattivo, realizzazione di campioni millimetrici per sinterizzazione in modo da valutare proprietà piezoelettriche. È importante effettuare test cellulari in vitro.	[85]	2020

BTO (NPs commerciali, dimensione media ~300 nm).	Rivestimento a base di silice amorfa (fase non bioattiva) partendo dal precursore TEOS.	Approccio core-shell tramite metodo Stober modificato, sfruttando ultrasuoni e una temperatura di 40°C. Come catalizzatore basico è stata utilizzata l'ammoniaca (25-28%). È stato effettuato un pre-trattamento con acido acetico.	NPs core-shell con spessore dello shell variabile tra 0.5-12 nm per un contenuto di SiO ₂ variabile tra 1 e 8 wt%. Utilizzate per realizzare pellets millimetrici (diametro 12 mm, spessore 0.5 mm), sfruttando il legante PVA e tramite pressatura uniassiale. Successivamente i pellets sono stati sottoposti a fase di de-binding (600°C, 2h) e sinterizzazione in aria (1250°C, 2h, velocità di riscaldamento 2°C/min).	È stato osservato che all'aumentare della percentuale in peso di SiO ₂ , quindi del contenuto di TEOS, lo spessore dello shell di silice aumenta. Durante la sinterizzazione si forma la seconda fase cristallina Ba ₂ TiSi ₂ O ₈ .	Non sono state valutate le proprietà piezoelettriche ma l'effetto sulle proprietà dielettriche (es. rigidità dielettrica) e microstruttura.		Inserimento di ioni modificatori in modo da ottenere uno shell di BG. Polarizzazione dei pellets realizzati e valutazione delle proprietà piezoelettriche. Può essere utile effettuare test cellulari in vitro. È importante effettuare anche test di rilascio di ioni Ba ²⁺ .	[105]	2015
BTO (NPs commerciali, dimensione media ~100 nm).	Rivestimento a base di silice amorfa (fase non bioattiva) partendo dal precursore TEOS.	Approccio core-shell tramite metodo Stober modificato, sfruttando ultrasuoni e una temperatura di 40°C. Come catalizzatore basico è stata utilizzata l'ammoniaca, portando il pH a 9.5. È stato effettuato un pre-trattamento con acido acetico.	NPs core-shell con spessore dello shell variabile per un contenuto di SiO ₂ variabile tra 2.5 e 20 wt%. Utilizzate per realizzare pastiglie, sfruttando il legante PVA e tramite pressatura. Successivamente le pastiglie sono state sinterizzate a 1200 °C.	È stato osservato che all'aumentare della percentuale in peso di SiO ₂ , quindi del contenuto di TEOS, lo spessore dello shell di silice aumenta. Durante la sinterizzazione si forma la seconda fase cristallina BaTiSiO ₅ .	Non sono state valutate le proprietà piezoelettriche ma l'effetto sulle proprietà dielettriche (es. rigidità dielettrica) e microstruttura.		Inserimento di ioni modificatori in modo da ottenere uno shell di BG. Polarizzazione delle pastiglie realizzate e valutazione delle proprietà piezoelettriche. Può essere utile effettuare test cellulari in vitro. È importante effettuare test di rilascio di ioni Ba ²⁺ .	[106]	2017

Nessuna (shell non piezoelettrico, a base di ZrO_2).	Core a base di BG a composizione binaria (SiO_2 -CaO).	Approccio core-shell a design invertito (i.e fase bioattiva utilizzata come core), in cui vengono utilizzati gli ultrasuoni.	NPs core-shell con diametro medio ~150 nm e spessore dello shell ~15 nm. Fase di calcinazione condotta a 600°C per 3h. Particelle utilizzate per realizzare un rivestimento su substrato metallico sfruttando la tecnica EPD.	Le NPs core-shell presentano morfologia sferica e superficie rugosa, importante per preservare la bioattività del core.		I test di bioattività a breve termine condotti sul rivestimento a base di NPs BG- ZrO_2 hanno mostrato la formazione di depositi di CaP anche se in numero inferiore rispetto ad un rivestimento a base di NPs di solo BG, la bioattività è quindi preservata.	È necessario effettuare test di bioattività a lungo termine. Provare a sostituire lo shell di zirconia con uno shell a base di materiale piezoelettrico come BTO o ZnO.	[107]	2021
BTO in forma di NPs (dimensioni non specificate).	BG a composizione binaria (SiO_2 -CaO), 5,10,15 wt%.	Approccio core-shell tramite metodo Stober modificato, sfruttando ultrasuoni. Come catalizzatore basico è stata utilizzata l'ammoniaca, portando il pH a 9.5. È stato effettuato un pre-trattamento con acido acetico.	NPs core-shell con spessore dello shell variabile tra 5-16 nm. Utilizzate per realizzare uno scaffold piezoelettrico e bioattivo tramite tecnica gas extrusion. Successivamente si hanno le fasi di sinterizzazione in aria e polarizzazione (110°C, 3 kV, 15 min).	I risultati migliori si hanno per temperatura di sinterizzazione pari a 1250°C e contenuto di BG pari a 15 wt%. Si ottengono una resistenza meccanica a compressione pari a 66 MPa e un coefficiente piezoelettrico d_{33} ~1.1 pC/N. Ottime risposte cellulari tramite test in vitro. Inoltre, il costruito polarizzato risulta più performante di quello non polarizzato.	Considerando come temperatura di sinterizzazione pari a 1250°C, il coefficiente piezoelettrico vale ~1.1 pC/N nel caso di BG 15 wt%, ~2.5 pC/N nel caso di BG 10 wt%, ~7.2pC/N nel caso di BG 5 wt%.	Il test di bioattività in SBF a 7 giorni ha mostrato formazione superficiale di apatite, tanto più marcata quanto maggiore è il contenuto di BG.	È necessario effettuare test di bioattività a lungo termine, valutare il rilascio di ioni Ba^{2+} ed effettuare test in vivo in modello animale.	[108]	2024

1.10.2 Ossido di zinco

Nel 2024, *H. Laybidi et al.* [109] hanno sintetizzato micropolveri di natura composita, consistenti in una matrice di BG 45S5 con all'interno disperse NPs di ZnO. Il metodo utilizzato è quello della miscelazione in quanto le NPs di ZnO vengono aggiunte nel gel a base di BG, ottenuto tramite metodo sol-gel partendo dai precursori TEOS, TEP e CN. Successivamente, tramite tecnica EPD, si è realizzato un rivestimento composito con proprietà bioattive e antibatteriche su un substrato di acciaio inox 316L. Gli autori in questo lavoro si sono focalizzati principalmente sulle proprietà antibatteriche e bioattive, testando due diverse composizioni delle micropolveri composite: una con un contenuto di ZnO pari a 10 wt% e una con un contenuto pari a 20 wt%. Tramite caratterizzazioni condotte sul rivestimento depositato, e quindi non sulle singole polveri, si è osservato che all'aumentare del contenuto di ZnO aumenta l'effetto antibatterico e diminuisce la capacità osteoinduttiva, dal momento che diminuisce il contenuto di fase bioattiva. Nello specifico i test di bioattività in SBF a 28 giorni hanno mostrato la formazione di precipitati di CaP più fini e più densamente distribuiti nel caso della composizione BG-10ZnO. In figura 36 sono riportate le immagini al SEM condotte sui campioni in seguito a test di immersione in SBF a 28 giorni, così da visualizzare la precipitazione di CaP e quindi la bioattività del rivestimento composito. In questo lavoro però non vengono valutate le proprietà piezoelettriche delle micropolveri composite o del rivestimento realizzato, che sarebbero comunque molto basse dal momento che la fase predominante è quella bioattiva.

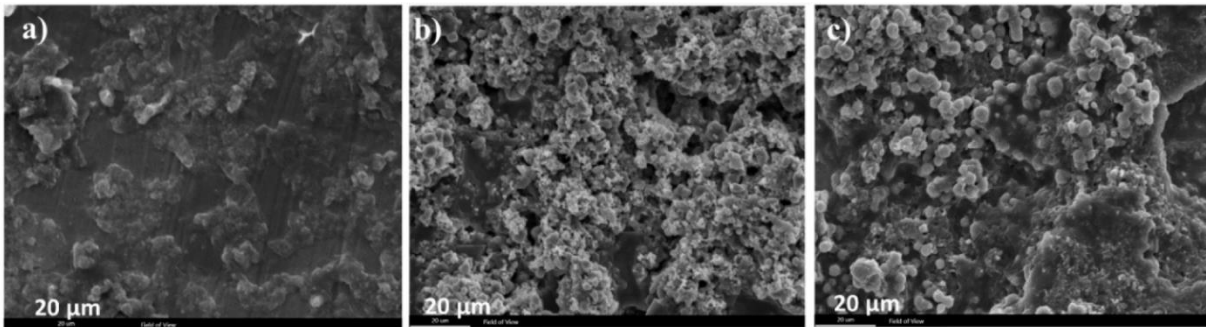


Figura 36. Immagini SEM effettuate sui rivestimenti a base di micropolveri composite BG 45S5-ZnO, in seguito a test di immersione in SBF a 28 giorni: a) substrato in acciaio inox 316L, b) substrato rivestito con polveri di composizione BG-10ZnO e c) substrato rivestito con polveri di composizione BG-20ZnO [109].

Nel 2024, *L. Qomariyah et al.* [110] hanno sintetizzato NPs core-shell di ZnO-SiO₂, utilizzando un metodo diverso dal classico processo Stober modificato: la nucleazione eterogenea dello shell amorfo di silice attorno al core di ZnO è stata indotta contemporaneamente alla sintesi e crescita di quest'ultimo, non dopo come in altri metodi descritti in cui invece si parte da particelle commerciali.

Per via delle elevate energia e area superficiale di particelle nanometriche di ZnO, per facilitarne il rivestimento con silice alcuni autori utilizzano agenti surfattanti come il CTAB (bromuro di cetil-trimetilammonio) mentre questo metodo non ne prevede l'utilizzo, evitando problemi di contaminazione e attenti lavaggi. Inoltre, un aspetto importante riguarda l'utilizzo degli ultrasuoni in quanto permettono di accelerare le reazioni di idrolisi e condensazione del TEOS, rendendo più rapido l'intero processo, e garantiscono una minore aggregazione e una migliore dispersione dei core di ZnO. Il protocollo di sintesi utilizzato è riportato in figura 37. Come catalizzatore basico è stato utilizzato l'idrossido di sodio (NaOH, 0.1 M) e non l'ammoniaca, con il pH portato a 11. Anche il metanolo, solvente per la sintesi dei core di ZnO, accelera l'idrolisi del TEOS e la formazione di monomeri idrolizzati. Come valutato dagli autori, variare il rapporto molare $\text{SiO}_2:\text{ZnO}$ (0.25, 0.50, 0.75, 1.00) ha effetti sulla morfologia e anche sulle proprietà ottiche delle NPs core-shell: hanno osservato che all'aumentare della concentrazione di TEOS aumenta lo spessore dello shell (3-11 nm) e la dimensione complessiva delle NPs core-shell sintetizzate (dimensione media ~60-70 nm), aumenta la dispersibilità e diminuisce l'aggregazione. In figura 38 sono riportate le immagini TEM delle NPs core-shell per diversi rapporti molar $\text{SiO}_2:\text{ZnO}$. Inoltre, le analisi relative alla granulometria hanno mostrato che le particelle sintetizzate hanno dimensioni omogenee e quindi presentano una distribuzione di taglia stretta.

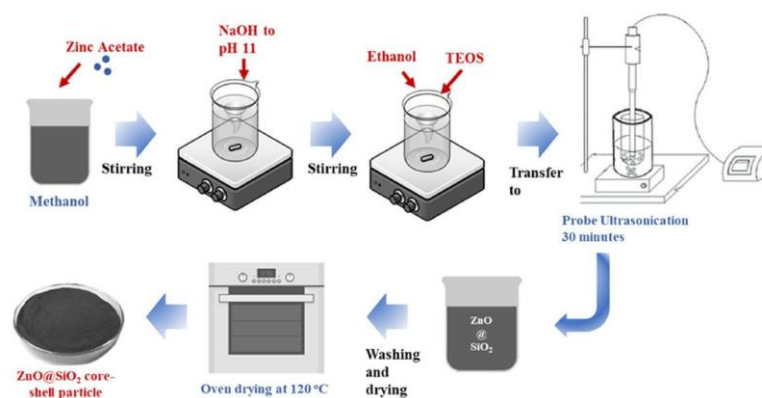


Figura 37. Protocollo di sintesi utilizzato da L. Qomariyah et al. [110] per sintetizzare NPs core-shell di ZnO-SiO₂.

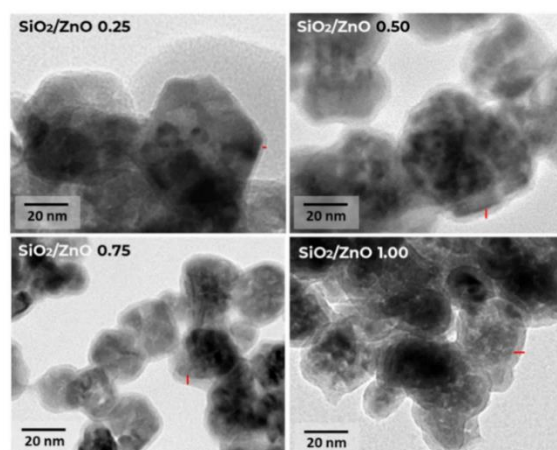


Figura 38. Immagini TEM raffiguranti le NPs core-shell ZnO-SiO₂ preparate variando il rapporto molare SiO₂:ZnO [110].

NPs di ZnO rivestite con uno shell amorfo di silice trovano applicazione come riempitivi all'interno di matrici polimeriche. È quanto proposto da *M. Ramasamy et al.* [111], che hanno sintetizzato NPs core-shell di ZnO-SiO₂ utilizzando un metodo sol-gel assistito da ultrasuoni. Il protocollo di sintesi da essi adottato è schematizzato in figura 39. Come catalizzatore basico è stata utilizzata l'ammoniaca (25-28 %), in modo da portare il pH della sospensione a 12 e accelerare l'idrolisi e condensazione del TEOS. Fondamentale per la formazione dello shell di silice è la fase di stirring overnight (4). Sono state valutate due diverse composizioni, una con un contenuto di TEOS pari a 30 wt% e una con un contenuto pari a 80 wt%, rispetto al contenuto di ZnO. Le analisi morfologiche al TEM e quelle composizionali con EDX hanno rilevato: a) uno shell con spessore pari a 2 nm, irregolare e non uniforme, e una percentuale atomica di Si pari a 0.02 at%, per contenuto di TEOS pari a 30 wt%, b) uno shell con spessore pari a 7 nm, uniforme e continuo, e una percentuale atomica di Si pari a 0.13 at%, per contenuto di TEOS pari a 80 wt%. Le polveri secche ottenute sono state poi miscelate con pellets di PEAA (poli(etilen-co-acido acrilico)), prima allo stato secco e poi estruse allo stato fuso, in modo da fabbricare un film a matrice polimerica e contenente una seconda fase dispersa. È stato osservato che le NPs di ZnO rivestite con silice si distribuiscono meglio all'interno della matrice polimerica e tendono meno a formare aggregati, oltre al fatto che presentano proprietà ottiche modulate dalla modifica superficiale. L'applicazione ultima di questo film composito, indagata dagli autori, non è di natura biomedica ma di tipo ottico, relativamente alla capacità di NPs a base di ZnO di assorbire radiazioni UV e migliorare la foto-stabilità.

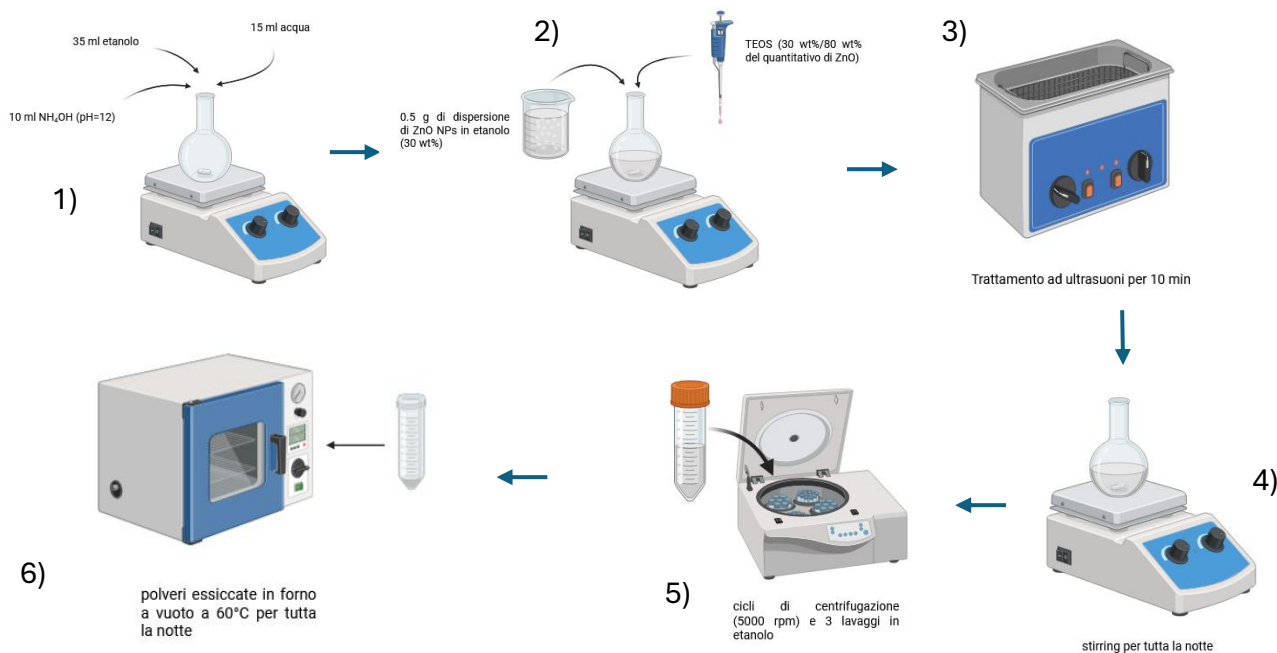


Figura 39. Protocollo di sintesi adottato da M. Ramasamy et al. [111] per sintetizzare NPs core-shell di ZnO-SiO₂, utilizzando un metodo sol-gel assistito da ultrasuoni.

Nel 2014, il gruppo di M. Ramasamy et al. [112], in buona parte simile al precedente, ha proseguito il lavoro. La novità non è rappresentata dal protocollo di sintesi utilizzato, identico al precedente, quanto dalle valutazioni effettuate: sono stati condotti test cellulari con fibroblasti dermali umani in modo da valutare la citotossicità delle NPs core-shell di ZnO-SiO₂. Il loro articolo contiene alcune informazioni assenti in quello precedente, ad esempio relativamente alla dimensione delle NPs sintetizzate: partendo dalle analisi TEM, il raggio idrodinamico è risultato essere ~46 nm per NPs di ZnO, ~50 nm per NPs ZnO-SiO₂ con shell sottile (30 wt% di TEOS) e ~75 nm per NPs ZnO-SiO₂ con shell spesso (80 wt% di TEOS). Le analisi composizionali con EDX hanno fornito valori leggermente diversi rispetto al lavoro precedente, dal momento che è stata rilevata una percentuale atomica di Si pari a 0.45 at%, per contenuto di TEOS pari a 30 wt% e una percentuale atomica di Si pari a 2.05 at%, per contenuto di TEOS pari a 80 wt%. Si tratta di valori più alti rispetto a quelli ottenuti con il lavoro precedente, ma che non vengono giustificati dagli autori stessi. I risultati cellulari hanno mostrato che all'aumentare dello spessore dello shell di silice, quindi del contenuto di TEOS, migliora la vitalità cellulare, si riducono gli effetti citotossici seppur presenti e diminuisce lo stress ossidativo. Mancano test specifici relativi al rilascio di ioni Zn²⁺. Come per il lavoro precedente, aggiungendo i precursori TEP e CN durante il processo sol-gel, regolando i tempi di stirring e

sfruttando trattamenti termici si può passare da un coating di silice amorfa ad un coating di BG a composizione ternaria ($\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$), riadattando in questo modo il protocollo proposto.

Il lavoro più interessante individuato è quello condotto, nel 2022, da *F. Aghili et al.* [113]. Sono state sintetizzate NPs core-shell con core a base di ZnO (dimensione media ~ 260 nm) e shell a base di BG a composizione binaria ($\text{SiO}_2\text{-CaO}$), utilizzando un metodo sol-gel supportato da ultrasuoni. Come precursori della fase vetrosa bioattiva sono stati utilizzati TEOS e CN, manca quindi il componente fosfato in quanto non è stato utilizzato il precursore TEP. I ricercatori hanno preso spunto dal precedente lavoro di B. Hoomehr et al. [107], analizzato nel precedente paragrafo 1.10.1, in cui sono state sintetizzate NPs core-shell di BG-ZrO₂ a design invertito, utilizzando allo stesso modo un metodo sol-gel supportato da ultrasuoni. Come in questo precedente lavoro di riferimento, anche F. Aghili et al. hanno utilizzato le NPs core-shell sintetizzate per realizzare un rivestimento tramite EPD. Le analisi morfologiche con SEM e TEM hanno evidenziato la formazione di precipitati di BG attorno alle polveri nanometriche esagonali di ZnO, in modo da costituire uno shell rugoso e non uniforme. Sul rivestimento depositato tramite EPD è stato condotto un test di bioattività in SBF, a 7 giorni, per valutarne la capacità osteoinduttiva: le analisi morfologie al SEM e le analisi EDS hanno evidenziato la precipitazione di nano-depositi di CaP. Mancano analisi relative al rilascio di ioni Zn^{2+} e valutazioni delle proprietà piezoelettriche delle NPs. In figura 40 sono riportate le immagini SEM, estrapolate dall'articolo di riferimento, raffiguranti le NPs di ZnO di partenza (a) e le NPs di ZnO rivestite con uno shell di BG (b).

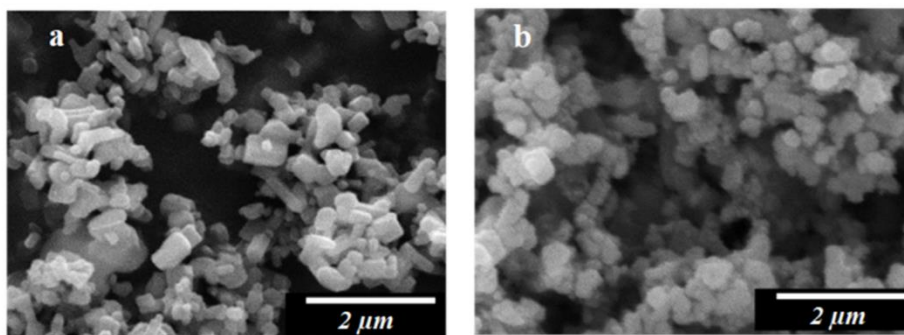


Figura 40. Immagini SEM raffiguranti: a) NPs di ZnO e b) NPs core-shell ZnO-BG [113].

Il protocollo di sintesi da essi utilizzato per ottenere le NPs core-shell è il seguente:

- 1) Miscelazione di 0.1 mL di TEOS e 100 mL di etanolo, all'interno di un bagno ad ultrasuoni per 15 min;
- 2) Dispersione di 0.1 g di ZnO, tramite trattamento ad ultrasuoni per 15 min;
- 3) Stirring per 1h;

- 4) Aggiunta goccia a goccia di una soluzione costituita da 6 mL di acqua deionizzata (titolata a pH=11 tramite aggiunta di ammoniaca al 25%) e 33 mL di etanolo, all'interno del bagno ad ultrasuoni;
- 5) Aggiunta di 0.03 g di CN;
- 6) Trattamento in bagno ad ultrasuoni per 5 min e poi stirring per 24 h;
- 7) Primo ciclo di centrifugazione, un lavaggio in etanolo e secondo ciclo di centrifugazione sulle particelle sintetizzate;
- 8) Essiccamento delle polveri a 80°C;
- 9) Calcinazione a 600°C per 3h, con una velocità di riscaldamento e di successivo raffreddamento pari rispettivamente a 5°C/min e 10°C/min;

Quindi per prima cosa si prepara una soluzione di TEOS in etanolo (1), nella quale poi vengono disperse le NPs di ZnO, con queste ultime che fungeranno da siti di nucleazione eterogenea per i depositi di BG (2). Gli ultrasuoni vengono utilizzati per favorire la dispersione alla nanoscala. L'ammoniaca (25%) e il pH basico sono importanti per l'idrolisi del TEOS e la sua condensazione sulla superficie delle NPs di ZnO, per reazione con i gruppi nucleofili -OH (4). L'ultima fase di stirring è importante per permettere agli ioni Ca^{2+} , derivanti dal CN, di penetrare nello shell di silice precedentemente formato (5 e 6).

Nella tabella 7 riportata nella pagina seguente sono riassunti in maniera concisa i lavori precedentemente analizzati, relativi all'unione di una fase piezoelettrica rappresentata dallo ZnO e di una fase bioattiva o anche consistente in un rivestimento di silice. L'organizzazione della tabella 7 e le informazioni contenute seguono lo schema dell'analogia tabella 6.

Tabella 7. Tabella riassuntiva dei principali lavori di ricerca in cui la fase piezoelettrica di ZnO viene unita con una fase bioattiva, tramite miscelazione allo stato solido o approccio core-shell. Sono considerati anche lavori in cui lo shell è a base di silice.

Fase piezoelettrica	Fase bioattiva	Metodo di unione delle due fasi	Campione finale	Valutazioni e applicazioni	Proprietà piezoelettriche	Bioattività	Aspetti da migliorare	Rif.	Anno
ZnO (nanoparticelle, fase dispersa).	BG 45S5 (matrice ottenuta tramite metodo sol-gel partendo dai precursori TEOS, TEP e CN)	Miscelazione, la fase dispersa viene aggiunta alla matrice di BG in forma di gel.	Si ottengono micropolveri composite BG-ZnO poi utilizzate per realizzare un rivestimento su un substrato di acciaio inox 316L tramite EPD.	Sono state testate due diverse composizioni (10 wt% ZnO e 20 wt% ZnO): all'aumentare del contenuto di ZnO aumenta l'antibattericità e diminuisce la bioattività. Test condotti sul rivestimento depositato e non sulle singole micropolveri composite.	Non valutate.	I test di bioattività per immersione in SBF a 28 giorni hanno mostrato la deposizione di CaP sui rivestimenti. Nel caso della composizione BG-10ZnO i depositi sono più fini e più densamente distribuiti.	Mancano test in vivo e analisi relativi al rilascio di ioni Zn^{2+} . In futuro potrebbero essere valutate le proprietà piezoelettriche dopo aver sinterizzato le micropolveri composite in una forma monolitica, sfruttando un legante come PVA e pressatura.	[109]	2024
ZnO (particelle nanometriche, sintetizzate a partire da acetato di zinco diidrato come precursore).	SiO ₂ (partendo dal precursore TEOS).	Approccio core-shell, utilizzando metodo sol-gel assistito da ultrasuoni; la formazione dello shell di silice avviene contemporaneamente alla crescita dei core di ZnO. Come catalizzatore basico si è utilizzato NaOH e non ammoniaca (pH=11). Non vengono specificate le quantità di reagenti utilizzati.	NPs core-shell con una struttura ben definita e una distribuzione granulometrica stretta.	Sono stati valutati gli effetti morfologici di un rapporto molare SiO ₂ :ZnO variabile (0.25, 0.50, 0.75, 1.00): si è osservato che all'aumentare del contenuto di TEOS aumenta lo spessore dello shell (~3-11 nm) e la dimensione complessiva della particella (~60-70 nm), aumenta la dispersibilità e diminuisce l'aggregazione.	Non valutate.		Ottenere un rivestimento a base di BG utilizzando anche i precursori CN e TEP nel metodo sol-gel supportato da ultrasuoni. Mancano studi relativi alla risposta cellulare e al rilascio ionico.	[110]	2024

ZnO (NPs disperse in etanolo, formulazione commerciale non specificata).	SiO ₂ (partendo dal precursore TEOS).	Approccio core-shell, utilizzando un metodo sol-gel assistito da ultrasuoni. Come catalizzatore basico si è utilizzata ammoniaca (25-28%, pH=12). Sono specificate le quantità di reagenti utilizzati.	NPs core-shell con shell di spessore < 10 nm. Particelle in seguito mescolate con pellets di PEAA allo stato secco, fuse ed estruse in modo da ottenere un film composito a base di matrice polimerica con seconda fase dispersa.	All'aumentare del contenuto di TEOS aumenta lo spessore dello shell, migliora la dispersibilità all'interno della matrice polimerica e vengono modulate le proprietà ottiche. Per un contenuto di TEOS pari a 30 wt% si hanno uno shell con spessore 2 nm, irregolare e non uniforme, e un contenuto di Si pari a 0.02 at%. Per un contenuto di TEOS pari a 80 wt% si hanno uno shell con spessore 7 nm, continuo e uniforme, e un contenuto di Si pari a 0.13 at%.	Non valutate.		Ottenere un rivestimento a base di BG utilizzando anche i precursori CN e TEP, nel metodo sol-gel supportato da ultrasuoni. Mancano studi relativi alla risposta cellulare e al rilascio ionico.	[111]	2013
ZnO (NPs disperse in etanolo, formulazione commerciale non specificata).	SiO ₂ (partendo dal precursore TEOS).	Approccio core-shell, utilizzando un metodo sol-gel assistito da ultrasuoni. Come catalizzatore basico si è utilizzata ammoniaca (25-28%, pH=12). Sono specificate le quantità di reagenti utilizzati.	NPs core-shell	All'aumentare del contenuto di TEOS aumenta lo spessore dello shell, migliorano la fotostabilità, la citocompatibilità e si riducono citotossicità e stress ossidativo sulle cellule. Per un contenuto di TEOS pari a 30 wt% si hanno uno shell con spessore 2 nm, irregolare e non uniforme, e un contenuto di Si pari a 0.45 at%. Per un contenuto di TEOS pari a 80 wt% si hanno uno shell con spessore 7 nm, continuo e uniforme, e un contenuto di Si pari a 2.05 at%. Raggio idrodinamico ~46 nm per NPs di ZnO, ~50 nm per per contenuto di TEOS pari a 30 wt% e ~75 nm per un contenuto di TEOS pari a 80 wt%.	Non valutate.		Come per il lavoro precedente, uno sviluppo futuro può essere l'inserimento dei precursori TEP e CN durante il processo sol-gel, regolando i tempi di stirring e sfruttando trattamenti termici. Si può quindi riadattare il protocollo di sintesi in modo da passare da uno shell di silice ad uno shell di BG. Mancano test specifici relativi al rilascio di ioni Zn ²⁺ .	[112]	2014

ZnO (polveri nanometriche commerciali, con forma esagonale e dimensione media ~260 nm).	BG (composizione binaria SiO ₂ -CaO, partendo dai precursori TEOS e CN).	Approccio core-shell, utilizzando metodo sol-gel assistito da ultrasuoni. Come catalizzatore basico si è utilizzata ammoniaca (25%), pH=11.	NPs core-shell con core di dimensione media ~260 nm e shell di spessore medio ~26 nm. La superficie delle NPs core-shell si presenta come rugosa e quindi lo shell non è uniforme. Successivamente tramite EPD si è realizzato un rivestimento su lega di Mg.	La superficie delle NPs di ZnO funge da sito di nucleazione eterogenea per i nano-depositi di BG. Parametri di sintesi importanti sono il contenuto di TEOS, il contenuto di ammoniaca e pH della sospensione, la T della sospensione.	Non valutate.	I test di bioattività, per immersione in SBF a 7 giorni, hanno mostrato la deposizione di CaP sui rivestimenti, ottenuti tramite EPD partendo dalle NPs core-shell.	Effettuare test di rilascio di ioni Zn ²⁺ , introdurre l'ossido formatore di fosforo all'interno del network vetroso dello shell di BG utilizzando anche il precursore TEP.	[113]	2022
---	---	---	---	--	---------------	---	--	-------	------

2. Materiali e metodi

Questa seconda parte della tesi è dedicata alla descrizione dell'attività sperimentale condotta nei laboratori di Biomateriali e Compositi del Dipartimento di Scienza Applicata e Tecnologia (DISAT), all'interno del gruppo Glance. L'obiettivo è stato realizzare uno shell a base di BG, di composizione ternaria ($\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$) definita, attorno ad un core piezoelettrico. Relativamente a quest'ultimo, si è lavorato parallelamente su due diversi materiali quali BTO e ZnO. Il metodo di sintesi utilizzato è stato il processo Stober modificato, quindi un metodo sol-gel.

Saranno descritti i materiali di partenza per il core, la composizione dello shell a base di BG, i protocolli di sintesi utilizzati e individuati grazie alla precedente fase di ricerca bibliografica e le tecniche di caratterizzazione utilizzate. I risultati finali ottenuti saranno presentati e discussi nel paragrafo 3.

I reagenti utilizzati nei protocolli di sintesi sono stati TEOS, TEP, CN, etanolo ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$), acido acetico (CH_3COOH), idrossido di ammonio (NH_4OH , 33%). I materiali di partenza per il core sono descritti nelle sottosezioni seguenti.

Tutte le sintesi che verranno citate di seguito sono state condotte all'interno di una cappa chimica aspirante per solventi. L'acqua utilizzata nelle sintesi è acqua bidistillata ottenuta tramite bidistillatore. Il raggiungimento, da parte delle sospensioni di particelle realizzate, del pH desiderato è stato verificato tramite pHmetro.

Come verrà illustrato di seguito, per quanto riguarda le particelle di ZnO la sintesi si è fermata al rivestimento con sola silice, pertanto non sono stati utilizzati i precursori TEP e CN ma solo il TEOS.

2.1 Titanato di bario

Come materiale di partenza per il core sono state utilizzate polveri sub-micrometriche di BTO (dimensione media delle particelle $\leq 3\mu\text{m}$) (CAS 12047-27-7).

2.1.1 Sintesi delle particelle core-shell di BTO-BG

I riferimenti seguiti sono stati i lavori di Z. Yang et al. [108] e di H. Huang et al. [85], con la differenza che nell'ambito di questa tesi sono state utilizzate particelle di BTO sub-micrometriche e non nanometriche. Per il protocollo di sintesi si è preso spunto principalmente dal lavoro di H. Huang et

al. [85], riadattando le quantità dei materiali di partenza, mentre il lavoro di Z. Yang et al. [108] ha fornito ispirazione per quanto riguarda il pre-trattamento con acido acetico e il pH della sospensione.

È stato seguito anche il protocollo di sintesi sol-gel di vetri bioattivi sviluppato dal gruppo Glance in lavori precedenti. Il processo sol gel effettuato porta alla formazione di un vetro bioattivo di composizione $77\text{SiO}_2\text{-}14\text{CaO-}9\text{P}_2\text{O}_5$ (wt%).

Complessivamente sono stati effettuati 10 tentativi di sintesi nel caso del BTO.

Nel lavoro di H. Huang et al. [85], come illustrato nel paragrafo 1.10.1, il primo passaggio è la dispersione delle particelle di BTO nell'etanolo, utilizzato come solvente. I quantitativi di acqua ed etanolo sono stati riscalati in funzione del volume di TEOS stabilito dal protocollo del gruppo Glance.

Per quanto riguarda il volume di H_2O da utilizzare:

$$\begin{array}{ccccccc} 0.1 \text{ ml} & : & 9 \text{ ml} & = & 11.2 \text{ ml} & : & X \text{ ml} \\ (\text{TEOS}) & & (\text{H}_2\text{O}) & & (\text{TEOS}) & & (\text{H}_2\text{O}) \end{array}$$

$$x = 112 \text{ ml H}_2\text{O}$$

dividendo per 10, in modo da lavorare con quantità minori di reagenti, abbiamo:

$$1.12 \text{ ml TEOS, } 56 \text{ ml H}_2\text{O}$$

dividendo per 2, dal momento che si tratta di un primo tentativo di sintesi, abbiamo:

$$0.56 \text{ ml TEOS, } \sim 5.5 \text{ ml H}_2\text{O}$$

Per quanto riguarda il volume di etanolo da utilizzare:

$$\begin{array}{ccccccc} 0.1 \text{ ml} & : & 9 \text{ ml} & = & 11.2 \text{ ml} & : & X \text{ ml} \\ (\text{TEOS}) & & (\text{etanolo}) & & (\text{TEOS}) & & (\text{etanolo}) \end{array}$$

$$x = 1008 \text{ ml etanolo}$$

dividendo per 10 abbiamo:

$$1.12 \text{ ml TEOS, } 100 \text{ ml etanolo}$$

dividendo per 2 abbiamo:

$$0.56 \text{ ml TEOS, } 50 \text{ ml etanolo}$$

Quindi, nella *sintesi n.1*, sono stati utilizzati 0.56 ml di TEOS, 5.5 ml di acqua e 50 ml di etanolo. Per mantenere la stessa concentrazione dell'articolo di riferimento (1 mg/ml), il quantitativo di polveri di BTO utilizzato è stato 50 mg. In breve, 50 mg di polveri di BTO sono stati solubilizzati in 50 ml di etanolo, ad una concentrazione di 1 mg/ml. Successivamente 5.5 ml di acqua e 0.56 ml di TEOS sono stati aggiunti alla sospensione, mantenendo il tutto sotto stirring magnetico per 20 min. A questo punto è stata aggiunta soluzione di ammoniaca goccia a goccia in modo da portare il pH a 9.5 e la nuova sospensione è stata sottoposta a stirring magnetico per 20 min. Lo step successivo è stata la divisione della sospensione in due batches (ossia lotti sperimentali): il primo sottoposto a stirring a temperatura ambiente (T_{amb}) per 30 min, il secondo posto in bagno termostatico ad acqua

a 40°C per 2 h. Dopo questa fase, le due diverse sospensioni sono state sottoposte ad un primo ciclo di centrifugazione (5000 rpm, 2 min), ad un lavaggio con acqua e ad un secondo ciclo di centrifugazione (5000 rpm, 2 min). Infine, le polveri raccolte sono state lasciate essiccare in incubatore a 37°C. I campioni ottenuti con questa prova di sintesi sono stati denominati BTO TEOS Tamb e BTO TEOS 40.

A partire dalla *sintesi n.2* è stato introdotto il pre-trattamento con acido acetico, come fatto anche in altri lavori individuati in letteratura. Oltre all'azione di pulizia superficiale effettuata sulle particelle di BTO, in uno studio è stato osservato che l'effetto superficiale dell'acido acetico è anche quello di indurre una leggera dissoluzione superficiale di ioni Ba^{2+} , determinando in questo modo la formazione in superficie di un sottile layer esterno di TiO_2 e quindi un arricchimento di Ti. Così facendo si generano delle vacanze superficiali che possono essere colmate da protoni H^+ provenienti dalla soluzione (leaching solution) che, collocandosi vicino agli atomi di ossigeno, portano alla formazione ed esposizione superficiale di gruppi Ti-OH, senza alterare in maniera significativa la struttura e composizione superficiale delle particelle [114]. Questi gruppi ossidrili -OH esposti saranno poi sfruttati per la condensazione con i monomeri idrolizzati di TEOS. Si tratta comunque di un pre-trattamento blando in condizioni diluite. In breve, 50 mg di polveri di BTO sono stati attivati in una soluzione composta da 5 ml di acido acetico e 5 ml di etanolo (rapporto in volume 1:1), sotto stirring per 30 min. La sospensione è stata poi sottoposta ad un ciclo di centrifugazione (5000 rpm, 2 min). A questo punto si è proseguito come nella sintesi n.1, con l'unica differenza riguardante il modo in cui sono stati ottenuti i due batches sperimentali, in seguito all'aggiunta dell'ammoniaca: il primo è stato nuovamente sottoposto a stirring Tamb per 30 min, il secondo invece è stato posto in orbital shaker (agitatore orbitale) a 40°C per 2 h. I campioni ottenuti con questa prova di sintesi sono stati denominati BTO AA TEOS Tamb e BTO AA TEOS 40.

Nella *sintesi n.3* il quantitativo iniziale di polvere è stato raddoppiato e di conseguenza anche quello degli altri reagenti. Un'altra modifica riguarda l'utilizzo del trattamento ad ultrasuoni in seguito all'aggiunta del TEOS. Pertanto, 100 mg di polvere di BTO sono stati attivati in una soluzione composta da 10 ml di acido acetico e 10 ml di etanolo (rapporto in volume 1:1), sotto stirring per 30 min. La sospensione è stata poi sottoposta ad un ciclo di centrifugazione (5000 rpm, 2 min). Le polveri attivate sono state solubilizzate in 100 ml di etanolo, sono stati aggiunti 10 ml di acqua e 1.12 ml di TEOS, mantenendo tutto sotto stirring magnetico, e la nuova sospensione è stata sottoposta a trattamento con ultrasuoni per 20 min. A questo punto è stata aggiunta soluzione di ammoniaca goccia a goccia in modo da portare il pH a 9.5 e la sospensione risultante è stata posta in stirring a Tamb per 30 min. La sospensione è stata poi sottoposta ad un ciclo di centrifugazione (5000 rpm, 2 min) e le

polveri raccolte sono state risospese in un piccolo volume di etanolo (2-3 ml). Sono stati utilizzati i precursori TEP e CN per cercare di passare da uno shell di silice ad uno shell di BG a composizione ternaria ($\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$). Pertanto, alle polveri risospese, sono stati aggiunti 28 μl di TEP e si è lasciato in stirring per 2h. Sono stati poi aggiunti 77 mg di CN e di nuovo in stirring per 1.5 h. In seguito ad un ciclo di centrifugazione (5000 rpm, 2 min), le polveri raccolte sono state divise in due batches: il primo è stato lasciato essiccare in incubatore a 37°C , il secondo è stato sottoposto a trattamento termico. Il trattamento termico è stato articolato in una prima fase in forno a 60°C per 48 h, seguita da un trattamento in rampa di temperatura (700°C 2h, $5^\circ\text{C}/\text{min}$), dopo aver posto le polveri in un crogiolo di silice. I campioni ottenuti con questa prova di sintesi sono stati denominati BTO AA TEOS TEP CN Tamb NTT e BTO AA TEOS TEP CN Tamb TT.

La *sintesi n.4* è simile alla sintesi n.3 con la differenza che, dopo l'aggiunta dell'ammoniaca, la sospensione è stata posta in orbital shaker a 40°C per 2h. Anche in questa sintesi, come nella sintesi n.3, sono stati utilizzati i precursori TEP e CN e sono stati ottenuti due batches a seconda che le polveri siano state trattate termicamente o meno. I campioni ottenuti con questa prova di sintesi sono stati denominati BTO AA TEOS TEP CN 40 NTT e BTO AA TEOS TEP CN 40 TT.

Nelle successive prove di *sintesi n.5* e *n.6* si è cercato di aumentare il quantitativo di polvere iniziale, non variando però il quantitativo di etanolo, in modo da ottenere alla fine di un quantitativo di polveri rivestite sufficiente ad eseguire un successivo test di bioattività in SBF. Ovviamente per prima cosa è stato necessario valutare la deposizione della silice, per poi eventualmente utilizzare anche TEP e CN. Il fatto di non aumentare il volume di etanolo, non utilizzando più una concentrazione di riferimento pari a 1 mg/ml, è stato fatto per evitare un consumo eccessivo di solvente nell'ottica di uno sviluppo commerciale.

Nelle *sintesi n.5* e *n.6* sono stati utilizzati 0.5 g di polveri di BTO e 5.6 ml di TEOS nel primo caso e 1 g di polveri di BTO e 11.2 ml di TEOS nel secondo caso. Il quantitativo di acqua non è stato cambiato rispetto alla sintesi n.3, cioè sono stati utilizzati 10 ml.

Nello specifico, nella *sintesi n.5*, 0.5 g di polveri di BTO sono stati attivati in una soluzione composta da 10 ml di acido acetico e 10 ml di etanolo (rapporto in volume 1:1), sotto stirring per 30 min. La sospensione è stata poi sottoposta ad un ciclo di centrifugazione (5000 rpm, 2 min) e lavaggio con etanolo. Le polveri attivate sono state solubilizzate in 100 ml di etanolo, sono stati aggiunti 10 ml di acqua e 5.6 ml di TEOS, mantenendo tutto sotto stirring magnetico, e la nuova sospensione è stata sottoposta a trattamento con ultrasuoni per 20 min. A questo punto è stata aggiunta soluzione di ammoniaca goccia a goccia in modo da portare il pH a 9.5 e la sospensione risultante è stata posta in

stirring a Tamb per 20 min. Lo step successivo è stata la divisione della sospensione in due batches: il primo sottoposto a stirring a Tamb per 10 min, il secondo posto in orbital shaker a 40°C per 2 h. Dopo questa fase, le due diverse sospensioni sono state sottoposte ad un primo ciclo di centrifugazione (5000 rpm, 2 min), ad un lavaggio con acqua e ad un secondo ciclo di centrifugazione (5000 rpm, 2 min). Infine, Le polveri raccolte sono state lasciate a essiccare in incubatore a 37°C. I campioni ottenuti con questa prova di sintesi sono stati denominati BTO AA TEOS Tamb 0.5g e BTO AA TEOS 40 0.5g.

Nella *sintesi n.6* sono stati utilizzati invece 1 g di polveri di BTO e 11.2 ml di TEOS. Per il resto il procedimento e il quantitativo di etanolo ed acqua sono identici a quelli della sintesi n.5. I campioni ottenuti con questa prova di sintesi sono stati denominati BTO AA TEOS Tamb 1g e BTO AA TEOS 40 1g.

Nella *sintesi n.7* si è aumentato il rapporto etanolo/acqua, utilizzando 100 ml di etanolo e 30 ml di acqua per 1 g di polveri di BTO. In breve, 1 g di polveri di BTO sono stati attivati in una soluzione composta da 10 ml di acido acetico e 10 ml di etanolo (rapporto in volume 1:1), sotto stirring per 30 min. La sospensione è stata poi sottoposta ad un ciclo di centrifugazione (5000 rpm, 2 min) e lavaggio con etanolo. Le polveri attivate sono state solubilizzate in 100 ml di etanolo, sono stati aggiunti 30 ml di acqua e 11.2 ml di TEOS, mantenendo tutto sotto stirring magnetico, e la nuova sospensione è stata sottoposta a trattamento con ultrasuoni per 20 min. A questo punto è stata aggiunta soluzione di ammoniaca goccia a goccia in modo da portare il pH a 9.5 e la sospensione risultante è stata posta in stirring a Tamb per 1h. Successivamente una porzione di sospensione è stata prelevata e posta su orbital shaker a 40°C per 2h: in questo modo sono stati ottenuti due batches, uno sottoposto a stirring a Tamb per 1h e l'altro a stirring a Tamb per 1h + orbital shaker a 40°C per 2h, complessivamente. Le due diverse sospensioni, in tempi diversi, sono state sottoposte ad un primo ciclo di centrifugazione (5000 rpm, 2 min), ad un lavaggio con etanolo e ad un secondo ciclo di centrifugazione (5000 rpm, 2 min). Infine, Le polveri raccolte sono state lasciate a essiccare in incubatore a 37°C. I campioni ottenuti con questa prova di sintesi sono stati denominati BTO AA TEOS Tamb 1g 100-30 e BTO AA TEOS 40 1g 100-30.

Nella *sintesi n.8* si è lavorato con un quantitativo complessivo di polveri di BTO pari a 750 mg, ma lavorando separatamente in triplicato con 250 mg di polveri. In breve, 250 mg di polveri di BTO sono stati attivati in una soluzione composta da 10 ml di acido acetico e 10 ml di etanolo (rapporto in volume 1:1), sotto stirring per 30 min. La sospensione è stata poi sottoposta ad un ciclo di centrifugazione (5000 rpm, 2 min) e lavaggio con etanolo. Le polveri attivate sono state solubilizzate in 250 ml di etanolo (concentrazione 1 mg/ml), sono stati aggiunti 25 ml di acqua e 2.8 ml di TEOS,

mantenendo tutto sotto stirring magnetico, e la nuova sospensione è stata poi trattata con ultrasuoni per 20 min. A questo punto è stata aggiunta soluzione di ammoniaca goccia a goccia in modo da portare il pH a 9.5 e la sospensione risultante è stata posta in stirring per 20 min. Successivamente è stata posta in orbital shaker a 40°C per 2h. Arrivati a questo punto, le polveri ottenute in triplicato nei 3 diversi batches (250 mg x3) sono state riunite in un'unica cuvette e risospese in 6 ml di etanolo. Pertanto, alle polveri risospese sono stati aggiunti 210 µl di TEP e si è lasciato in stirring per 2h. Sono stati poi aggiunti 577.6 mg di CN e di nuovo in stirring per 1.5 h. In seguito ad un ciclo di centrifugazione (5000 rpm, 2 min), le polveri raccolte sono state lasciate essiccare in incubatore a 37°C. Non è stato quindi effettuato alcun trattamento termico finale. Il campione ottenuto con questa prova di sintesi è stato denominato BTO AA TEOS TEP CN 40 NTT 750 mg.

Nella *sintesi n.9* è stato aumentato il volume di acido acetico utilizzato nel pre-trattamento, in modo da avere un rapporto quantità di polveri/volume di acido acetico pari a 10. In breve, 200 mg di polveri di BTO sono stati attivati in una soluzione composta da 20 ml di acido acetico e 20 ml di etanolo (rapporto in volume 1:1), sotto stirring per 30 min. La sospensione è stata poi sottoposta ad un ciclo di centrifugazione (5000 rpm, 2 min) e lavaggio con etanolo. Le polveri attivate sono state solubilizzate in 200 ml di etanolo (concentrazione 1 mg/ml), sono stati aggiunti 20 ml di acqua e 2.24 ml di TEOS, mantenendo tutto sotto stirring magnetico, e la nuova sospensione è stata poi trattata con ultrasuoni per 20 min. A questo punto è stata aggiunta soluzione di ammoniaca goccia a goccia in modo da portare il pH a 9.5 e successivamente è stata posta in orbital shaker a 40°C per 2h. La sospensione è stata poi sottoposta ad un ciclo di centrifugazione (5000 rpm, 2 min) e le polveri raccolte sono state risospese in un piccolo volume di etanolo (2-3 ml). Alle polveri risospese sono stati aggiunti 56 µl di TEP e si è lasciato in stirring per 3h. Sono stati poi aggiunti 154 mg di CN e di nuovo in stirring per 1.5 h. In seguito ad un ciclo di centrifugazione (5000 rpm, 2 min), le polveri raccolte sono state lasciate essiccare in incubatore a 37°C. Non è stato quindi effettuato alcun trattamento termico finale. Il campione ottenuto con questa prova di sintesi è stato denominato BTO AA TEOS TEP CN 40 NTT 200 mg.

Nell'ultima *sintesi n.10* la modifica principale è stata utilizzare un volume definito di ammoniaca, piuttosto che far riferimento al pH raggiunto dalla sospensione (9.5). Considerando il lavoro di H. Huang et al. [85], gli autori utilizzano 0.2 ml di ammoniaca (28%) per 100 µL di TEOS, di conseguenza in questa prova di sintesi per 1.12 ml di TEOS sono stati utilizzati 2.2 ml di ammoniaca (28%), unendo 1.9 ml di ammoniaca (33%) e 0.3 ml di acqua, in modo da diluire e rispettare il volume totale. In breve, 100 mg di polveri di BTO sono stati attivati in una soluzione composta da 10 ml di acido acetico e 10 ml di etanolo (rapporto in volume 1:1), sotto stirring per 30 min. La sospensione è

stata poi sottoposta ad un ciclo di centrifugazione (5000 rpm, 2 min). Le polveri attivate sono state solubilizzate in 100 ml di etanolo, sono stati aggiunti 11 ml di acqua e 1.12 ml di TEOS, mantenendo tutto sotto stirring magnetico, e la nuova sospensione è stata posta in stirring per 20 min. La sospensione è stata poi posta in orbital shaker a 40°C per 2 h. Dopo questa fase, la sospensione è stata sottoposta ad un primo ciclo di centrifugazione (5000 rpm, 2 min), ad un lavaggio con acqua e ad un secondo ciclo di centrifugazione (5000 rpm, 2 min). Infine, le polveri raccolte sono state lasciate essiccare in incubatore a 37°C. Il campione ottenuto con questa prova di sintesi è stato denominato BTO AA TEOS ammonia 2h 40.

Nella tabella 8, riportata di seguito, sono ricapitolate le diverse prove di sintesi svolte sul BTO, con i diversi parametri di processo utilizzati.

Tabella 8. Diverse prove di sintesi effettuate per ottenere particelle core-shell di BTO. Sono ricapitolati i diversi parametri di processo utilizzati nelle diverse prove di sintesi.

Sintesi	acido acetico (ml)	lavaggio post-trattamento con acido acetico	BTO (mg)	etanolo (ml)	acqua (ml)	TEOS (ml)	ammoniaca	miscelazione post-aggiunta TEOS	step post-aggiunta ammoniaca	TEP (µl)	CN (mg)	lavaggio finale	campioni
n.1	no	no	50	50	5,5	0,56	pH 9.5	stirring magnetico 20 min	stirring Tamb 30 min, bagno termostatico ad acqua 40 °C 2h ¹			acqua	BTO TEOS Tamb, BTO TEOS 40
n.2	5	no	50	50	5,5	0,56	pH 9.5	stirring magnetico 20 min	stirring Tamb 30 min, orbital shaker ad acqua 40 °C 2h ¹			acqua	BTO AA TEOS Tamb, BTO AA TEOS 40
n.3	10	no	100	100	10	1,12	pH 9.5	ultrasuoni 20 min	stirring Tamb 30 min	28	77	no	BTO AA TEOS TEP CN Tamb NTT, BTO AA TEOS TEP CN Tamb TT
n.4	10	no	100	100	10	1,12	pH 9.5	ultrasuoni 20 min	orbital shaker 40°C 2h	28	77	no	BTO AA TEOS TEP CN 40 NTT, BTO AA TEOS TEP CN 40 TT
n.5	10	lavaggio con etanolo	500	100	10	5,6	pH 9.5	ultrasuoni 20 min	stirring Tamb 10 min, orbital shaker 40°C 2h ¹			acqua	BTO AA TEOS Tamb 0.5g, BTO AA TEOS 40 0.5g
n.6	10	lavaggio con etanolo	1000	100	10	11,2	pH 9.5	ultrasuoni 20 min	stirring Tamb 10 min, orbital shaker 40°C 2h ¹			acqua	BTO AA TEOS Tamb 1g, BTO AA TEOS 40 1g
n.7	10	lavaggio con etanolo	1000	100	30	11,2	pH 9.5	ultrasuoni 20 min	stirring Tamb 1h min, stirring Tamb 1h min + orbital shaker 40°C 2h ²			etanolo	BTO AA TEOS Tamb 1g 100-30, BTO AA TEOS 40 1g 100-30
n.8	10	lavaggio con etanolo	250 ³	250 ³	25 ³	2,8 ³	pH 9.5	ultrasuoni 20 min	orbital shaker 40°C 2h ¹	210	577,6	no	BTO AA TEOS TEP CN 40 NTT 750 mg
n.9	20	lavaggio con etanolo	200	200	20	2,24	pH 9.5	ultrasuoni 20 min	orbital shaker 40°C 2h	56 ⁴	154	no	BTO AA TEOS TEP CN 40 NTT 200 mg

n.10	10	no	100	100	11	1.12	2.2 (ml) ⁵	stirring magnetico 20 min	stirring Tamb 2h, orbital shaker 40°C 2h			acqua	BTO AA TEOS ammonia 2h 40
------	----	----	-----	-----	----	------	-----------------------	---------------------------------	--	--	--	-------	------------------------------

¹tra l'aggiunta dell'ammoniaca e lo step successivo menzionato c'è una fase di stirring per 20 min

²come specificato nella descrizione del protocollo della sintesi n.7, dopo l'aggiunta dell'ammoniaca si ha una fase di stirring per 1h, poi una porzione di questa sospensione è posta in orbital shaker a 40°C per 2h, quindi complessivamente si ottengono i 2 diversi batches definiti

³si è lavorato in triplicato, quindi in totale con la sintesi n.8 sono stati ottenuti 750 mg di micropolveri di BTO rivestite

⁴in questo caso il tempo di stirring è 3h anziché 2h come per le altre prove di sintesi

⁵volume di ammoniaca (28%)

2.2 Ossido di zinco

Come materiale di partenza per il core di ZnO sono state utilizzate polveri sub-micrometriche (100-600 nm, $\leq 1\mu\text{m}$) (CAS 1314-13-2).

2.2.1 Sintesi delle particelle core-shell di ZnO-BG

Come riferimento è stato preso il lavoro di F. Aghili et al. [113].

Complessivamente sono stati effettuati 4 tentativi di sintesi nel caso dello ZnO.

In breve, la *sintesi n.1* è iniziata con il miscelamento tramite stirring magnetico di 100 ml di etanolo e 0.1 mL di TEOS. In seguito, sono stati aggiunti 0.1 g di polveri di ZnO e si è proceduto ad un trattamento in bagno ad ultrasuoni per 15 min. Una soluzione costituita da 33 ml di etanolo e da 6 ml di acqua, quest'ultima titolata a pH=11 tramite aggiunta di soluzione di ammoniaca, è stata poi aggiunta goccia a goccia alla sospensione di polveri mantenendo il tutto sotto stirring magnetico per 1h. Dopo questa fase, la sospensione è stata sottoposta ad un primo ciclo di centrifugazione (5000 rpm, 2 min), ad un lavaggio con etanolo e ad un secondo ciclo di centrifugazione (5000 rpm, 2 min). Infine, le polveri raccolte sono state lasciate essiccare in incubatore a 37°C. Il campione ottenuto con questa prova di sintesi è stato denominato ZnO TEOS.

Nella *sintesi n.2* è stato effettuato un pre-trattamento delle polveri di ZnO con acido acetico, prendendo spunto da quanto fatto con le polveri di BTO, per cercare di favorire la formazione dello shell di silice. Inoltre, il quantitativo di polveri di ZnO e il volume di TEOS di partenza sono stati aumentati di un fattore pari a 5. In breve, 0.5 g di polveri di ZnO sono stati attivati in una soluzione composta da 10 ml di acido acetico e 10 ml di etanolo (rapporto in volume 1:1), sotto stirring per 30 min. La sospensione è stata poi sottoposta ad un ciclo di centrifugazione (5000 rpm, 2 min) e lavaggio con etanolo, in modo da rimuovere l'eccesso di acido acetico. A questo punto si è proseguito come nella sintesi n.1, con la differenza che sono stati utilizzati 0.5 g di polveri di ZnO pretrattate e 0.5 ml di TEOS. Il campione ottenuto con questa prova di sintesi è stato denominato ZnO AA TEOS 1h.

La *sintesi n.3* è risultata essere simile alla sintesi n.2, ma senza il pre-trattamento con acido acetico e aumentando a 24 h il tempo della fase di stirring successiva all'aggiunta della soluzione con acqua titolata a pH=11. Inoltre, come fatto nella sintesi n.1, l'iniziale miscelazione di etanolo e TEOS è stata condotta tramite stirring magnetico e non per trattamento ad ultrasuoni. Pertanto, sono stati utilizzati nuovamente 0.5 g di polveri di ZnO e 0.5 ml di TEOS. Il campione ottenuto con questa prova di sintesi è stato denominato ZnO TEOS 24h.

Nell'ultima *sintesi n.4*, è stato provato un pre-trattamento iniziale delle polveri di ZnO utilizzando acetone. In breve, 0.1 g di polveri di ZnO sono stati pretrattati in una soluzione composta da 10 ml di acetone e 10 ml di etanolo (rapporto in volume 1:1), sotto stirring per 30 min. La sospensione è stata poi sottoposta ad un ciclo di centrifugazione (5000 rpm, 2 min) e lavaggio con etanolo. Parallelamente, 100 ml di etanolo e 0.1 ml di TEOS sono stati miscelati tramite trattamento ad ultrasuoni per 15 min. In seguito, sono state aggiunte le polveri di ZnO pretrattate e si è proceduto ad un trattamento in bagno ad ultrasuoni per 15 min. Una soluzione costituita da 33 ml di etanolo e da 6 ml di acqua, quest'ultima titolata a pH=11 tramite aggiunta di soluzione di ammoniaca, è stata poi aggiunta goccia a goccia alla sospensione di polveri mantenendo il tutto sotto stirring magnetico per 24h. Dopo questa fase, la sospensione è stata sottoposta ad un primo ciclo di centrifugazione (5000 rpm, 2 min), ad un lavaggio con etanolo e ad un secondo ciclo di centrifugazione (5000 rpm, 2 min). Infine, le polveri raccolte sono state lasciate essiccare in incubatore a 37°C. Il campione ottenuto con questa prova di sintesi è stato denominato ZnO acetone TEOS 24h.

Nella tabella 9, riportata di seguito, sono ricapitolate le diverse prove di sintesi svolte sullo ZnO, con i diversi parametri di processo utilizzati.

Tabella 9. Diverse prove di sintesi effettuate per ottenere particelle core-shell di ZnO. Sono ricapitolati i diversi parametri di processo utilizzati nelle diverse prove di sintesi.

Sintesi	pre-trattamento	lavaggio in seguito a pre-trattamento	ZnO (mg)	etanolo (ml)	TEOS (ml)	miscelazione iniziale di etanolo e TEOS	step post-aggiunta della soluzione contenente acqua titolata a pH=11	lavaggio finale	campioni
n.1	no	no	100	100	0,1	stirring magnetico	stirring magnetico 1h	con etanolo	ZnO TEOS
n.2	10 ml acido acetico	con etanolo	500	100	0,5	ultrasuoni 15 min	stirring magnetico 1h	con etanolo	ZnO AA TEOS 1h
n.3	no	no	500	100	0,5	stirring magnetico	stirring magnetico 24h	con etanolo	ZnO TEOS 24h
n.5	10 ml acetone	con etanolo	100	100	0,1	ultrasuoni 15 min	stirring magnetico 24h	con etanolo	ZnO acetone TEOS 24h

2.3 Caratterizzazioni

Le polveri di interesse, dopo essere state modificate dal punto di vista chimico in superficie tramite il processo Stober modificato e successivamente essiccate, sono state caratterizzate con tecniche opportune in modo da valutare la morfologia, la composizione, la chimica superficiale e la bioattività in vitro. In dettaglio, per indagare la morfologia e la composizione sono state effettuate analisi al microscopio elettronico a scansione a effetto di campo (FE-SEM) munito di spettroscopia a dispersione di energia (EDS), per indagare la chimica e i gruppi funzionali sulle particelle sintetizzate sono state eseguite analisi spettroscopiche in trasformata di Fourier nell'infrarosso (FTIR), per fare una valutazione della bioattività dei materiali sviluppati sono stati effettuati test di immersione in SBF.

2.3.1 Morfologia e composizione: FE-SEM/EDS

La microscopia elettronica è una tecnica di analisi che permette di indagare e valutare la morfologia superficiale di un campione, sfruttando l'interazione tra questo ed un fascio primario di elettroni focalizzato e accelerato. Questo contatto produce tre diversi segnali, raccolti tramite rilevatori diversi, e in grado di fornire informazioni diverse. Si generano nello specifico:

- Elettroni secondari (SEs, secondary electrons): si tratta di elettroni a bassa energia, generati per via di un'interazione di tipo anelastico. Sono utili per ottenere informazioni topografiche limitate ad alcuni nanometri sulla superficie del campione.
- Elettroni retrodiffusi (BSEs, backscattered electrons): si tratta di elettroni a più alta energia, generati per via di un'interazione di tipo elastico che determina una deflessione, ad un angolo maggiore di 90°, degli elettroni primari in seguito al contatto con il nucleo atomico o con elettroni di simile energia. Sono utili per ricavare informazioni relative alla struttura superficiale del campione, in quanto il contrasto generato nell'immagine è determinato dal numero atomico degli elementi sulla superficie del campione.
- Raggi X caratteristici;

SEM e FESEM si distinguono per il modo in cui vengono emessi gli elettroni primari e per la risoluzione raggiungibile. Nel primo caso si sfrutta l'effetto termoionico riscaldando un filamento di tungsteno tramite corrente applicata, nel secondo caso si utilizza un cannone a effetto di campo. In quest'ultimo caso, nello specifico, viene applicato un gradiente di potenziale elettrico sulla punta di un filamento di tungsteno, dal quale gli elettroni vengono emessi per effetto tunnel. Nel FESEM,

il fascio elettronico emesso è più focalizzato si riduce il volume di interazione con il campione, e questo permette di ottenere una migliore risoluzione [115].

Come detto sopra, l'interazione tra il fascio di elettroni primari ad alta energia e il campione produce anche raggi X caratteristici. Questi vengono sfruttati nell'analisi composizionale EDS, integrata in uno strumento SEM/FESEM. L'interazione avviene con gli atomi del campione: un elettrone del guscio più interno viene scalzato lasciando una lacuna che viene colmata da un elettrone proveniente da un guscio più esterno e questa differenza di energia tra i due livelli si traduce nell'emissione di un fotone X caratteristico. Ogni elemento chimico emette fotoni X ad una specifica energia (keV). In uno spettro EDS, che è uno spettro di emissione, in ordinata viene riportata l'intensità del fascio emesso, proporzionale al numero di fotoni X emessi, e in ascissa l'energia corrispondente. Dal momento che ogni elemento chimico emette fotoni X ad una specifica energia, si riesce a determinare la composizione in termini di elementi. È una tecnica qualitativa e non quantitativa, che permette di fare confronti composizionali per esempio in seguito a trattamenti superficiali e di determinare la distribuzione degli elementi anche attraverso mappe.

Sia per l'analisi morfologica con FESEM che per l'analisi composizionale con EDS, si deve lavorare in condizioni di alto vuoto e i campioni devono essere resi conduttivi tramite metallizzazione.

Nel lavoro sperimentale di questa tesi, le analisi morfologiche sono state condotte utilizzando il microscopio FE-SEM Zeiss ULTRA 55 mentre quelle composizionali sono state condotte utilizzando una sonda EDS integrata in un SEM da banco. La dimensione delle particelle, laddove riportata in figura, è stata determinata utilizzando il programma Image J.

Le polveri essiccate sono state innanzitutto preparate per metallizzazione con platino (Pt) tramite sputtering, utilizzando un substrato di Pt posto all'interno di una camera a vuoto riempita con il gas inerte argon (Ar). Successivamente le polveri metallizzate, rese quindi conduttive e visibili al microscopio elettronico, sono state posizionate tramite un nastro adesivo in carbonio (carbon tape) su un supporto circolare (stub). Prima dell'inserimento dei supporti all'interno della camera dello strumento, su di essi è stato rivolto un getto di aria compressa in modo da rimuovere eventuali polveri non aderite. Gli ingrandimenti ai quali l'analisi morfologica è stata condotta sono stati 2000x, 10000x e 50000x. Per quanto riguarda l'analisi composizionale con EDS, come voltaggio è stato scelto 15 kV e sono state analizzate 3 diverse aree sulla superficie del campione. In questo modo le percentuali in peso e atomiche, tabellate e relative ai diversi elementi chimici individuati, sono state ottenute come medie. Le tabelle EDS finali sono state anche corrette escludendo eventuali tracce di C o Pt individuate dallo strumento.

Relativamente al BTO, per le sintesi dalla n.5 alla n.10 non è stata effettuata l'analisi morfologica al FESEM, ma soltanto l'analisi composizionale EDS. Questo perchè l'obiettivo perseguito in queste sintesi è stato quello di migliorare la scalabilità del processo di sintesi, ottenendo un quantitativo di polveri più elevato e adeguato per eventuali test di bioattività successivi, con una riduzione del volume di etanolo utilizzato, e anche nell'ottica di uno sviluppo commerciale. Contemporaneamente si è cercato di migliorare il rivestimento delle particelle, ottenendo delle percentuali atomiche di Si elevate.

Relativamente allo ZnO, per le sintesi n.3 e n.4 non è stata effettuata l'analisi morfologica al FESEM, ma soltanto l'analisi composizionale con EDS integrato nel SEM da banco. Questo perchè l'obiettivo perseguito in queste sintesi è stato quello di mettere a punto i parametri di sintesi in modo da depositare una quantità sufficiente di silice sottoforma di shell.

2.3.2 Chimica superficiale: FTIR-ATR

La spettroscopia infrarossa in trasformata di Fourier (FTIR) è una tecnica di analisi spettroscopica vibrazionale, basata sulla variazione dello stato energetico vibrazionale di una molecola o di un atomo in seguito all'assorbimento di una radiazione IR incidente. Ogni gruppo funzionale e ogni molecola presentano un modo di vibrare caratteristico e una banda di assorbimento IR caratteristica. Si tratta di una tecnica qualitativa o al più semi-quantitativa in quanto, sfruttando la legge di Lambert-Beer, si può mettere in relazione l'assorbanza con la concentrazione di cromoforo. Lo spettro IR in genere riporta sull'asse delle ordinate l'assorbanza A/trasmittanza T (u.a) e sull'asse delle ascisse il numero d'onda μ (cm^{-1}), inverso della lunghezza d'onda. L'assorbanza viene definita come:

$$A = \log\left(\frac{I_0}{I}\right)$$

dove I_0 indica l'intensità della radiazione incidente, mentre I l'intensità della radiazione emessa. La trasmittanza è definita invece come l'inverso dell'assorbanza. Lo spettrofotometro FTIR è composto da una sorgente IR e da un sistema ottico chiamato interferometro di Michelsen. I dati in uscita da quest'ultimo vengono elaborati a valle, in trasformata di Fourier in modo da fornire lo spettro FTIR. All'interno di uno spettro IR la regione di maggior interesse è generalmente quella nel range $1300\text{-}900\text{ cm}^{-1}$, definita impronta d'onda e caratteristica della specie molecolare indagata. Una variante molto utilizzata, di questo metodo di analisi, è la tecnica FTIR-ATR, nella quale il campione è posto a contatto con un cristallo ad alto indice di rifrazione. Si tratta di una tecnica di analisi versatile che non richiede una particolare preparazione del campione e che sfrutta le variazioni

di intensità di una radiazione infrarossa totalmente riflessa dal cristallo, associate alla propagazione di un'onda evanescente nei primi strati superficiali del campione (0.5-5 μm).

In questo lavoro di tesi, la valutazione degli spettri FTIR relativi ai campioni in esame, è stata effettuata sulla base di spettri sperimentali estrapolati da articoli di letteratura.

Per valutare qualitativamente l'avvenuta formazione dello shell a base silice è stato considerato, tra gli altri, lo spettro FTIR relativo a NPs di pura silice estrapolato dal lavoro di K. Panwar et al. [116] e riportato di seguito nella figura 41.

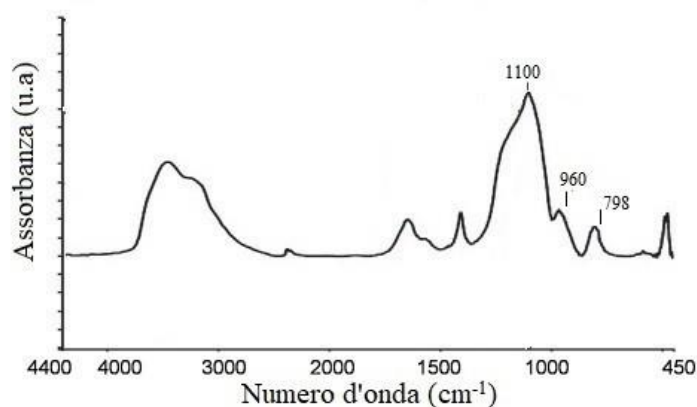


Figura 41. Spettro FTIR di riferimento relativo a NPs di pura silice (immagine adattata dal lavoro di K. Panwar et al. [114]).

I picchi di assorbimento caratteristici per la silice si osservano a 798 cm^{-1} (stretching simmetrico di Si-O-Si), a 960 cm^{-1} (stretching di Si-OH) e 1100 cm^{-1} (stretching asimmetrico di Si-O-Si).

Per quanto riguarda invece la valutazione dei risultati dei test di bioattività e l'avvenuta precipitazione di HAp sulla superficie delle particelle sintetizzate, si è considerato lo spettro e il lavoro di M. Mačković et al. [117], relativo a test di immersione in SBF effettuato su micro- e nano- particelle di BG 45S5. Lo spettro in questione è riportato in figura 42.

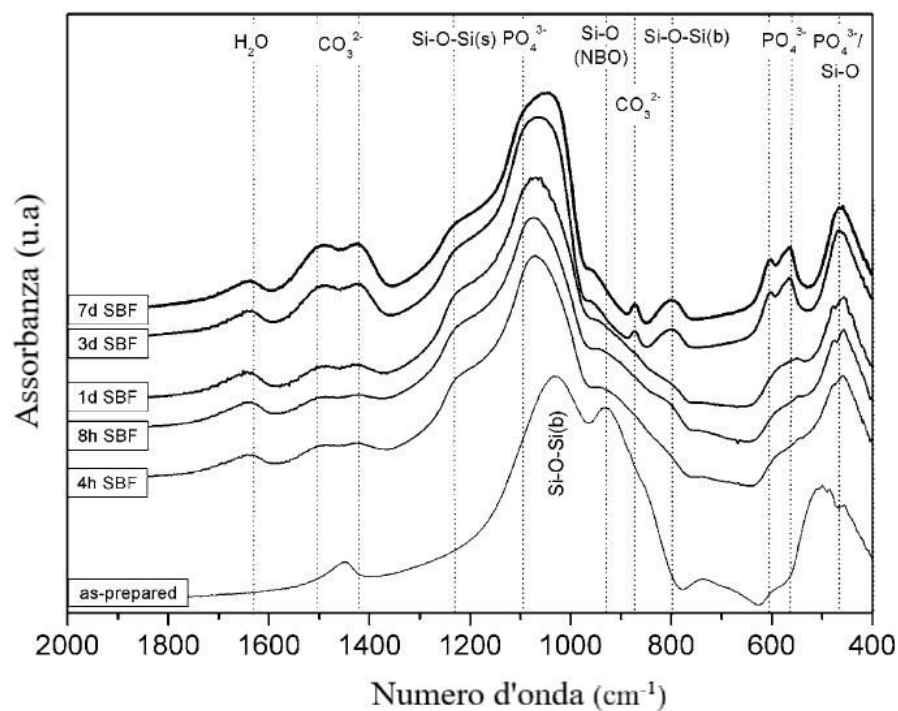


Figura 42. Analisi FTIR condotta su micro- e nano-particelle di BG 45S5 per valutare modifiche della chimica superficiale al variare del tempo di immersione in SBF [116] (immagine adattata).

Nella tabella 10 seguente vengono riportati i picchi di assorbimento IR, in uno spettro FTIR, caratteristici di un vetro bioattivo, sia nel caso del BTO che dello ZnO, e i relativi riferimenti bibliografici:

Tabella 10. Bande di assorbimento dello spettro FTIR e riferimenti, per la valutazione della formazione dello shell di vetro bioattivo, sia nel caso di BTO che ZnO.

numero d'onda (cm ⁻¹)	tipologia di legame/gruppo funzionale e modalità di vibrazione	considerazioni	rif.
~500, ~474	stretching simmetrico gruppo Si-O-Si/ rocking mode gruppo Si-O-Si	nella silice pura invece è ~450 cm ⁻¹ , quindi la presenza di cationi modificatori sposta il picco massimo di questa banda verso 500 cm ⁻¹ e questo può essere sfruttato come marker spettrale	[118], [117], [119]
~563, ~603	bending del legame P-O	la presenza di questi picchi di assorbimento stretti indica che P ₂ O ₅ funge da ossido formatore del network vetroso	[120]
~570-597	stretching del legame Ti-O		[121]
~799, ~806	picco associato ai gruppi SiO _{NBO} (non-binding oxygen)/ stretching simmetrico del gruppo Si-O-Si	presente nel caso in cui ioni modificatori sono entrati nel network vetroso	[122], [119]
~930	picco associato ai gruppi SiO _{NBO} (non-binding oxygen)	marker degli ioni modificatori all'interno del network vetroso, nel caso della silice pura viene associata allo stretching del legame Si-OH (intorno a 960 cm ⁻¹)	[117], [116]
~950	stretching del legame Si-OH	assorbimento presente in particelle colloidali di silice	[123]
~1200-1100	stretching asimmetrico del gruppo Si-O-Si		[120], [116], [123]
~1143	vibrazioni del gruppo Si-O-BaTiO ₃	condensazione dei gruppi silanoli del TEOS idrolizzato con i gruppi ossidrilici superficiali delle particelle di BTO	[121]
~1210	banda associata ai gruppi Si-O-Si	questa banda è tipica di una struttura di silice ad elevata area superficiale	[118]
~1450	stretching asimmetrico (ν ₃) dello ione carbonato CO ₃ ²⁻	per via dei carbonati assorbiti sulla superficie	[117]
~1631	vibrazioni associate ai gruppi -OH presenti nelle molecole d'acqua e adsorbite in superficie		[119]
~685, 1565	vibrazioni del legame ZnO		[110]
~1447	stretching asimmetrico del gruppo -COOH	indicatore della formazione di acetato di zinco	[124]
~1571	stretching simmetrico del gruppo -COOH	indicatore della formazione di acetato di zinco	[124]

Nella tabella 11 seguente invece vengono riportati i picchi di assorbimento IR importanti ai fini della valutazione del meccanismo di bioattività e della formazione di HAp, come si vedrà nel paragrafo 3.1.3. Come detto precedentemente, il riferimento è stato il lavoro di lavoro di M. Mačković et al. [117] e lo spettro riportato in figura 42.

Tabella 11. Bande di assorbimento dello spettro FTIR utilizzate per valutare la formazione di HAp sulle particelle core-shell di BTO sintetizzate. Il riferimento utilizzato è il lavoro di M. Mačković et al. [117].

numero d'onda (cm ⁻¹)	tipologia di legame/gruppo funzionale e modalità di vibrazione	considerazioni
~471	bending del gruppo P-O-P (v2) (all'interno dell'HAp precipitata)	picco associato al gruppo PO ₄ ³⁻ , presenta sovrapposizione con la banda associata allo stretching simmetrico del gruppo Si-O-Si
~570, ~600	bending del gruppo P-O-P (v4) (all'interno dell'HAp precipitata)	si passa da una banda ad un doppio picco con il tempo di immersione in SBF, associata ai gruppi PO ₄ ³⁻
~800	bending del gruppo Si-O-Si (δ)	banda associata alla formazione di una struttura di silice tridimensionale durante il test di immersione in SBF
~871	bending fuori dal piano (v2) dello ione carbonato CO ₃ ²⁻	banda associata al gruppo CO ₃ ²⁻ presente nell'HCA precipitata
~1210	banda associata alle vibrazioni del Si-O-Si	questa banda compare durante il trattamento in SBF per via della condensazione di gruppi silanoli Si-OH a formare gruppi silossanici Si-O-Si, a scapito della banda associata ai gruppi Si _{ONBO}
~1450	stretching asimmetrico (v3) dello ione carbonato CO ₃ ²⁻	per via dei carbonati adsorbiti sulla superficie, con il trattamento in SBF si osserva una divisione in due picchi (1430 cm ⁻¹ e 1500 cm ⁻¹)

Nel caso del BTO, l'analisi FTIR è stata condotta sulle polveri di BTO di partenza, sui campioni BTO AA TEOS TEP CN Tamb senza trattamento termico (NTT) e con trattamento termico (TT) (sintesi n.3) e sui campioni BTO AA TEOS TEP CN 40 senza trattamento termico (NTT) e con trattamento termico (TT) (sintesi n.4).

L'analisi FTIR è stata condotta anche sul campione BTO AA TEOS TEP CN 40 NTT a 0, 7 e 14 giorni di immersione in SBF, relativamente al test di bioattività condotto.

Nel caso dello ZnO, l'analisi FTIR è stata condotta sulle polveri di ZnO di partenza, sul campione ZnO AA TEOS 1h (sintesi n.2) e sul campione ZnO TEOS 24h (sintesi n.3).

L'analisi è stata condotta per mezzo dello spettrofotometro Thermo Scientific Nicolet iS50 FTIR in modalità riflettanza totale attenuata (ATR). L'intervallo analizzato è stato 4000-400 cm⁻¹, ma gli spettri riportati nelle figure sono stati tagliati in funzione della regione di assorbimento di interesse.

2.3.3 Bioattività: test di immersione in SBF

Questo tipo di analisi è stata condotta per valutare in vitro la bioattività delle particelle core-shell sintetizzate, quindi la loro capacità di indurre la formazione di precipitati di HAp sulla superficie. In questo modo si riesce indirettamente a predire la capacità del materiale di legarsi in vivo al tessuto osseo, per mezzo dello strato superficiale di HAp che si forma.

Il campione è stato posto in SBF (pH 7.4), a 37°C per diversi intervalli di tempo. La soluzione SBF è stata preparata secondo il protocollo di Kokubo-Takadama [125], inserendo in sequenza i reagenti riportati in tabella 12. Per prima cosa sono stati inseriti i primi otto reagenti all'interno di un becker in plastica contenente 700 ml di acqua deionizzata, ad una temperatura di 36 ± 1.5 °C con agitatore magnetico a 200 rpm. Successivamente sono stati aggiunti gli ultimi due reagenti in modo da tamponare la soluzione a $\text{pH } 7.4 \pm 0.1$, verificato mediante pHmetro.

La soluzione SBF così preparata presenta una concentrazione ionica simile a quella del plasma sanguigno umano, ma con un contenuto molare di ioni HCO_3^- inferiore [125]. Inoltre, manca della componente proteica.

Il test di bioattività in SBF è stato condotto soltanto sulle polveri di BTO, nello specifico sul campione BTO AA TEOS TEP CN 40 NTT, ottenuto con la sintesi n.4. Per semplicità di scrittura, il campione in oggetto verrà denominato BTO SBF.

Alla fine della suddetta sintesi sono stati ottenuti circa 21 mg di particelle di BTO rivestite. Sono stati quindi realizzati 2 batches (n.1 e n.2), ciascuno contenente 10.5 mg di polveri in 10.5 ml di SBF (concentrazione 1 mg/ml) all'interno di recipienti ermetici. I due diversi recipienti ermetici sono stati posti nell'orbital shaker a 37°C a 120 rpm, per 7 giorni nel caso del batch n.1 e per 14 giorni nel caso del batch n.2. Ai fini della valutazione della bioattività, sono state condotte misure di pH all'interno dei due batches, a 3 e 7 giorni per il batch n.1 e a 3 e 14 giorni per il batch n.2. In questo modo si sono ottenute misure di pH a 3 (in duplicato), 7 e 14 giorni. Per confermare la bioattività raggiunta sono state condotte analisi morfologiche al FESEM, analisi composizionali con EDS e analisi FTIR per valutare la chimica superficiale, questo alla fine del test di bioattività dopo 7 giorni per il batch n.1 e dopo 14 giorni per il batch n.2. La soluzione di SBF è stata rimossa dai contenitori ermetici dei due batches utilizzando una micro-pipetta e successivamente è stato eseguito un lavaggio con acqua. Infine, le polveri sono state poste in incubatore a essiccare, a 37°C. Le caratterizzazioni precedentemente menzionate sono state condotte sulle polveri essiccate.

Tabella 12. Elenco dei reagenti utilizzati nel protocollo Kokubo-Takadama per realizzare 1l di SBF.

Reagente		Quantità per 1l di SBF
n.1	NaCl	8,035 g
n.2	NaHCO ₃	0,355 g
n.3	KCl	0,225 g
n.4	K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O	0,231 g
n.5	MgCl ₂ ·6H ₂ O	0,311 g
n.6	HCl (1M)	39 ml
n.7	CaCl ₂	0,292 g
n.8	Na ₂ SO ₄	0,072 g
n.9	TRIS	6,118 g
n.10	HCl (1M)	0-5 ml

3. Risultati e discussione

In questo paragrafo verranno analizzati e discussi i risultati delle prove di caratterizzazione effettuate sui diversi materiali sintetizzati, secondo le diverse prove di sintesi condotte su BTO e ZnO e descritte rispettivamente nel paragrafo 2.1.1 e nel paragrafo 2.2.1.

3.1 Titanato di bario

3.1.1 Morfologia e composizione: FE-SEM/EDS

Si riportano di seguito i risultati relativi all'analisi morfologica e composizionale dei campioni ottenuti nelle diverse sintesi effettuate sulle polveri di BTO.

In figura 43 sono riportate le immagini FESEM relative alle polveri di BTO di partenza. La distribuzione di taglia è variabile con particelle che presentano una dimensione anche intorno ad 1-2 μm mentre altre intorno alle centinaia di nm, come si osserva dalle misure riportate sull'ingrandimento a 10000x (misure in μm). In figura 44 è riportato lo spettro EDS con i picchi di emissione caratteristici dell'ossigeno (O, 0.525 keV), del titanio (Ti, 0.452, 4.508 e 4.931 keV) e del bario (Ba, 4.465 keV). Il picco di emissione relativo al carbonio (C, 0.277 keV) è probabilmente dovuto al nastro adesivo in carbonio (carbon tape) su cui sono state poste le polveri. Non è riportata la composizione elementare in quanto non di interesse.

Figura 43. Immagini FESEM delle micropolveri di BTO di partenza, ad ingrandimenti crescenti (2000x, 10000x, 50000x).

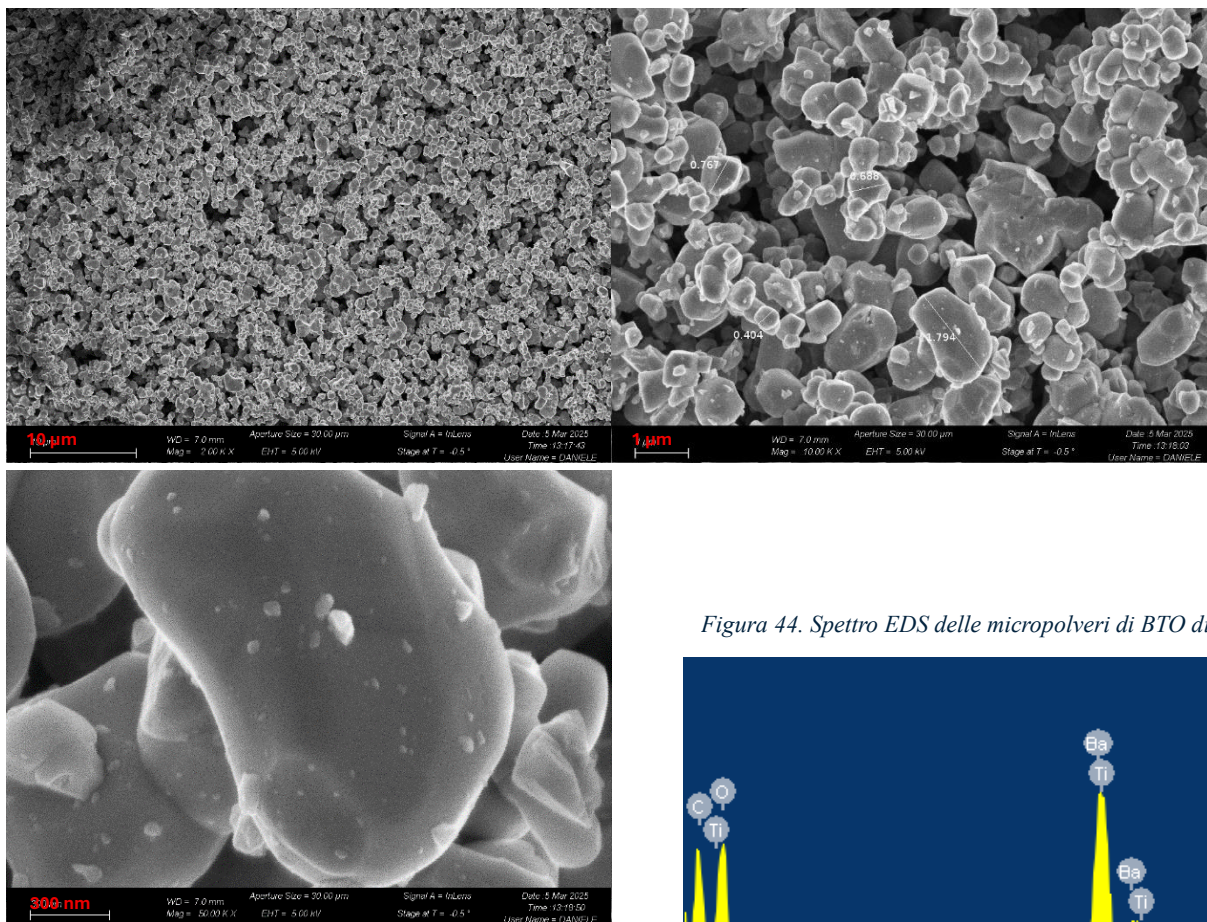
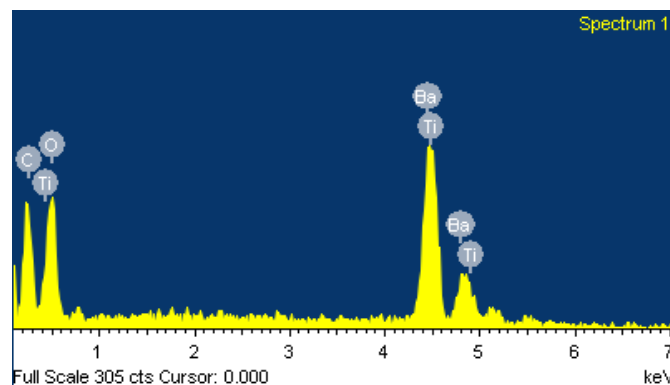


Figura 44. Spettro EDS delle micropolveri di BTO di partenza.



Riguardo alla *sintesi n.1*, le immagini FESEM riportate mostrano che a Tamb (figura 45) non sono presenti differenze morfologiche rispetto alle polveri di partenza mentre a 40°C (figura 47) è visibile soltanto una tendenza delle particelle all'aggregazione ma non un rivestimento su di esse che tenda in qualche modo a legarle. Quest'ultima considerazione è confermata dai risultati dell'analisi EDS, riportati nelle figure 46 e 48, in cui non si distinguono picchi di emissione relativi al silicio (Si, 1.739 keV) e la percentuale atomica rilevata è molto bassa e inferiore allo 0.3 at%. Le immagini FESEM inoltre mostrano piccoli nano-precipitati superficiali, non associabili però a particelle di silice depositate in superficie poichè presenti anche sulle polveri di BTO di partenza. Questi risultati indicano che la sintesi n.1 non ha portato allo sviluppo dello shell di silice.

Figura 45. Immagini FESEM del campione BTO TEOS Tamb (sintesi n.1), ad ingrandimenti crescenti (2000x, 10000x, 50000x).

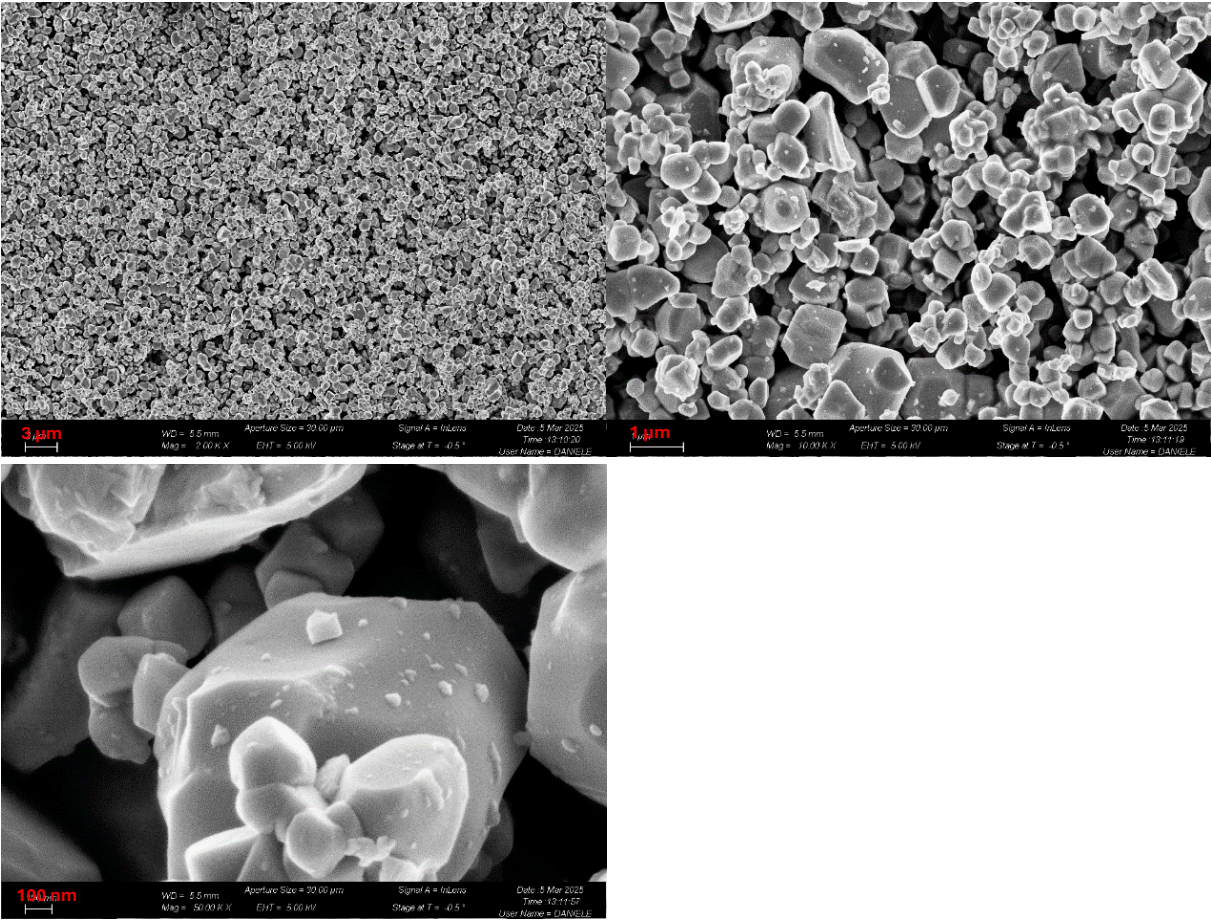
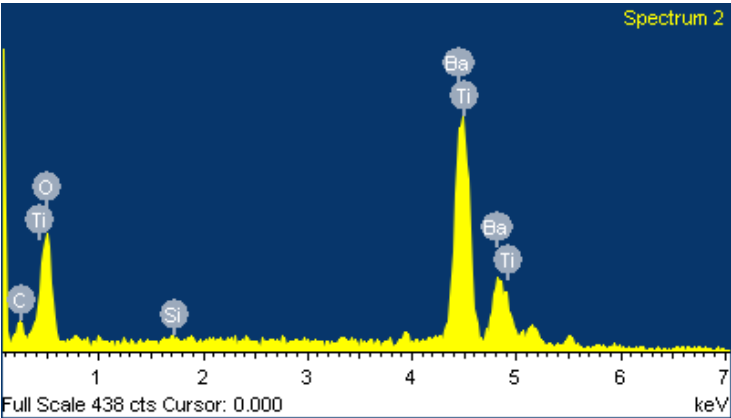


Figura 46. Spettro EDS a sinistra e analisi composizionale a destra del campione BTO TEOS Tamb (sintesi n.1).



Element	Weight%		Atomic%	
	mean	SD	mean	SD
O K	19,27	0,02	57,65	0,16
Si K	0,15	0,06	0,26	0,09
Ti K	21,52	0,32	21,50	0,27
Ba L	59,06	0,36	20,59	0,18

Figura 47. Immagini FESEM del campione BTO TEOS 40 (sintesi n.1), ad ingrandimenti crescenti (2000x, 10000x, 50000x).

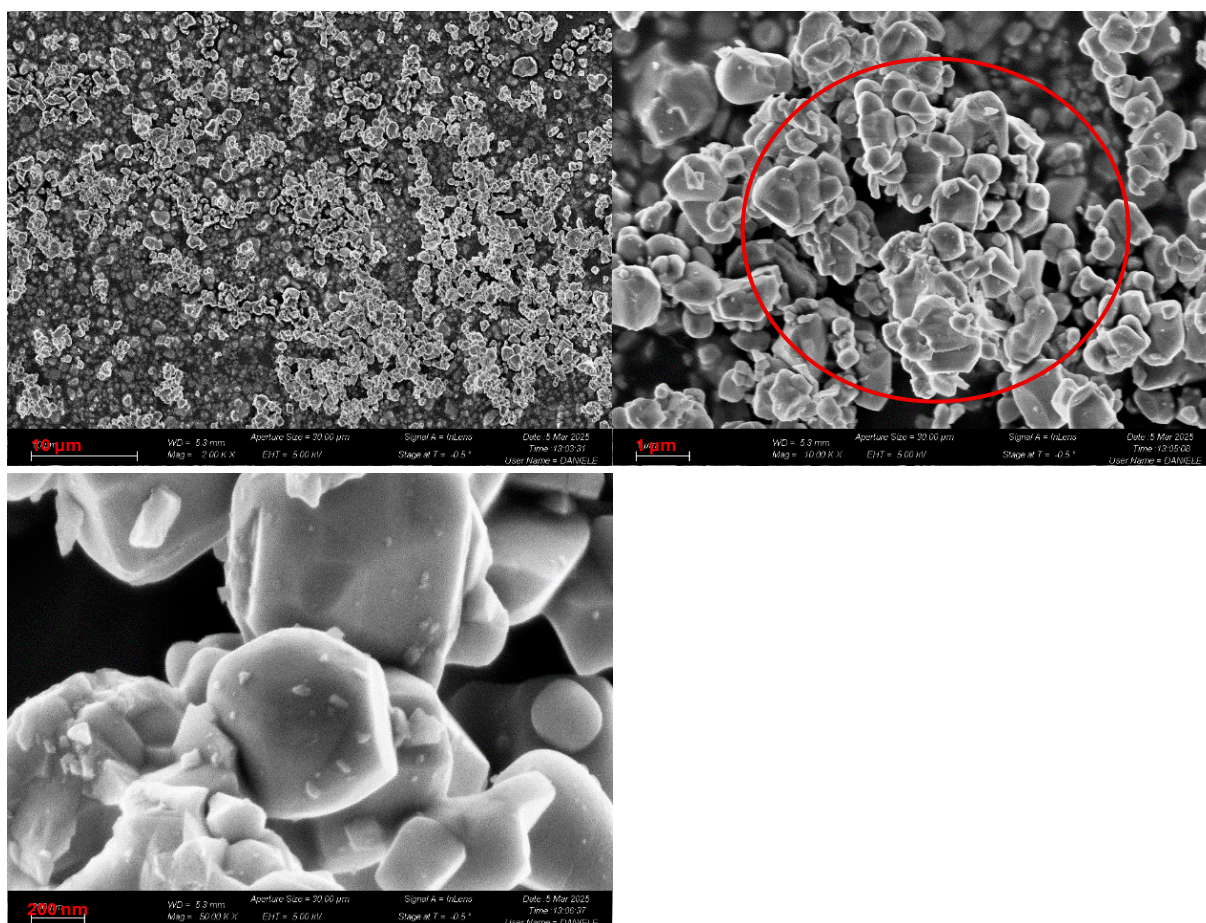
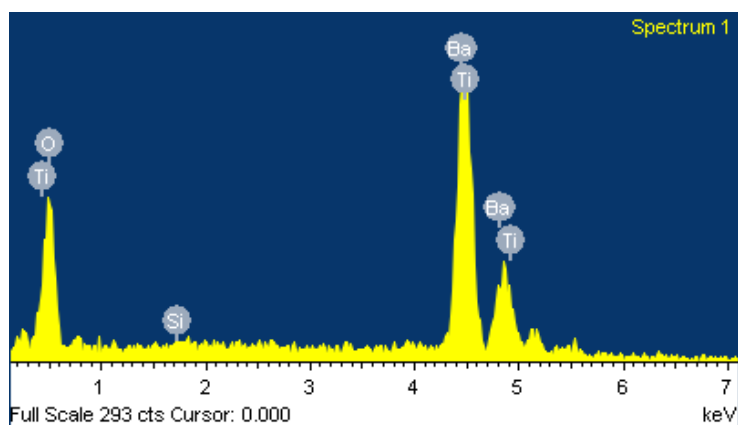


Figura 48. Spettro EDS a sinistra e analisi composizionale a destra del campione BTO TEOS 40 (sintesi n.1).



Element	Weight%		Atomic%	
	mean	SD	mean	SD
O K	20,84	1,56	59,85	2,18
Si K	0,13	0,02	0,22	0,04
Ti K	21,45	0,46	20,61	0,93
Ba L	57,57	1,60	19,31	1,31

Relativamente alla *sintesi n.2*, le immagini FESEM riportate nelle figure 49 e 51 mostrano il formarsi di colli tra le particelle, interpretabili come un rivestimento a base di silice che ingloba aggregati di particelle, questo in entrambi i campioni BTO AA TEOS Tamb e BTO AA TEOS 40. Ciò è in linea con quanto osservato in altri lavori utilizzando il processo Stober per rivestire particelle [85]. Nella sintesi realizzata a 40°C, in figura 51, nell'ingrandimento a 10000x sono indicate le misure dimensionali di alcuni aggregati micrometrici intorno a 3-4 μm . La presenza del Si è confermata dai risultati dell'analisi EDS riportati nelle figure 50 e 52: negli spettri di entrambi i campioni sono ben visibili i picchi di emissione relativi al Si e si ha una buona percentuale atomica di Si rilevata, pari a circa $3.58 \pm 0.28 \text{ at\%}$ nel caso del campione BTO AA TEOS Tamb e pari a circa $18.12 \pm 1.57 \text{ at\%}$ nel caso del campione BTO AA TEOS 40. Si può concludere che il pre-trattamento con acido acetico ha avuto un effetto positivo e che una temperatura di sintesi post-aggiunta dell'ammoniaca pari a 40°C fornisce risultati migliori rispetto ad una temperatura pari a Tamb. Sugli spettri EDS riportati sono visibili anche picchi di emissione relativi al platino (Pt, 2.048 keV) dovuti al processo di metallizzazione precedentemente effettuato sulle polveri sintetizzate.

Figura 49. Immagini FESEM del campione BTO AA TEOS Tamb (*sintesi n.2*), ad ingrandimenti crescenti (2000x, 10000x, 50000x).

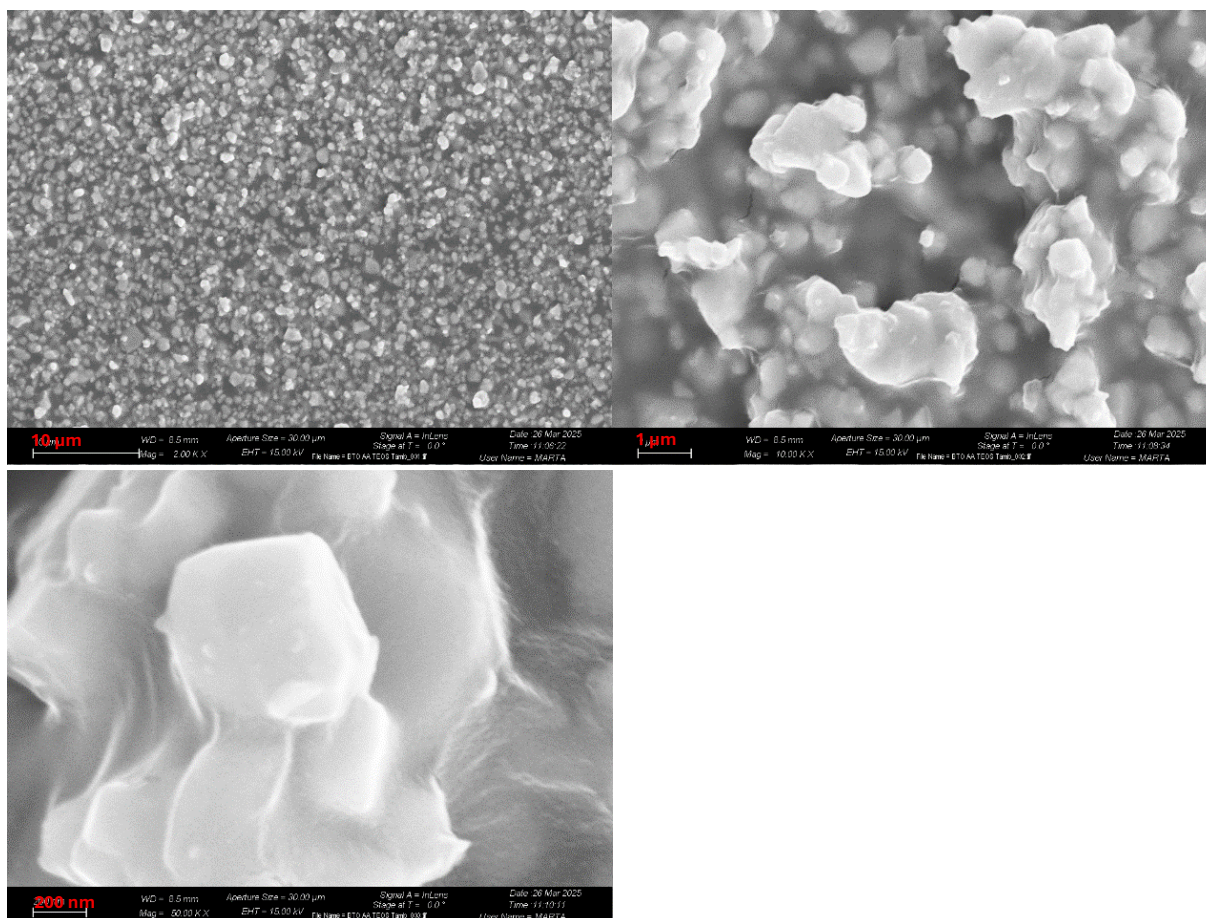


Figura 50. Spettro EDS a sinistra e analisi composizionale a destra del campione BTO AA TEOS Tamb (sintesi n.2).

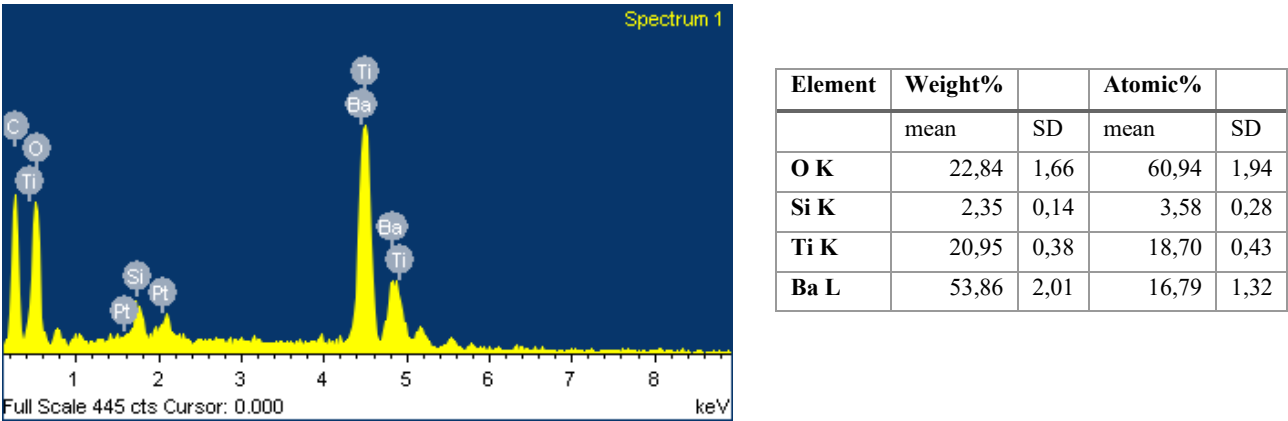


Figura 51. Immagini FESEM del campione BTO AA TEOS 40 (sintesi n.2), ad ingrandimenti crescenti (2000x, 10000x, 50000x).

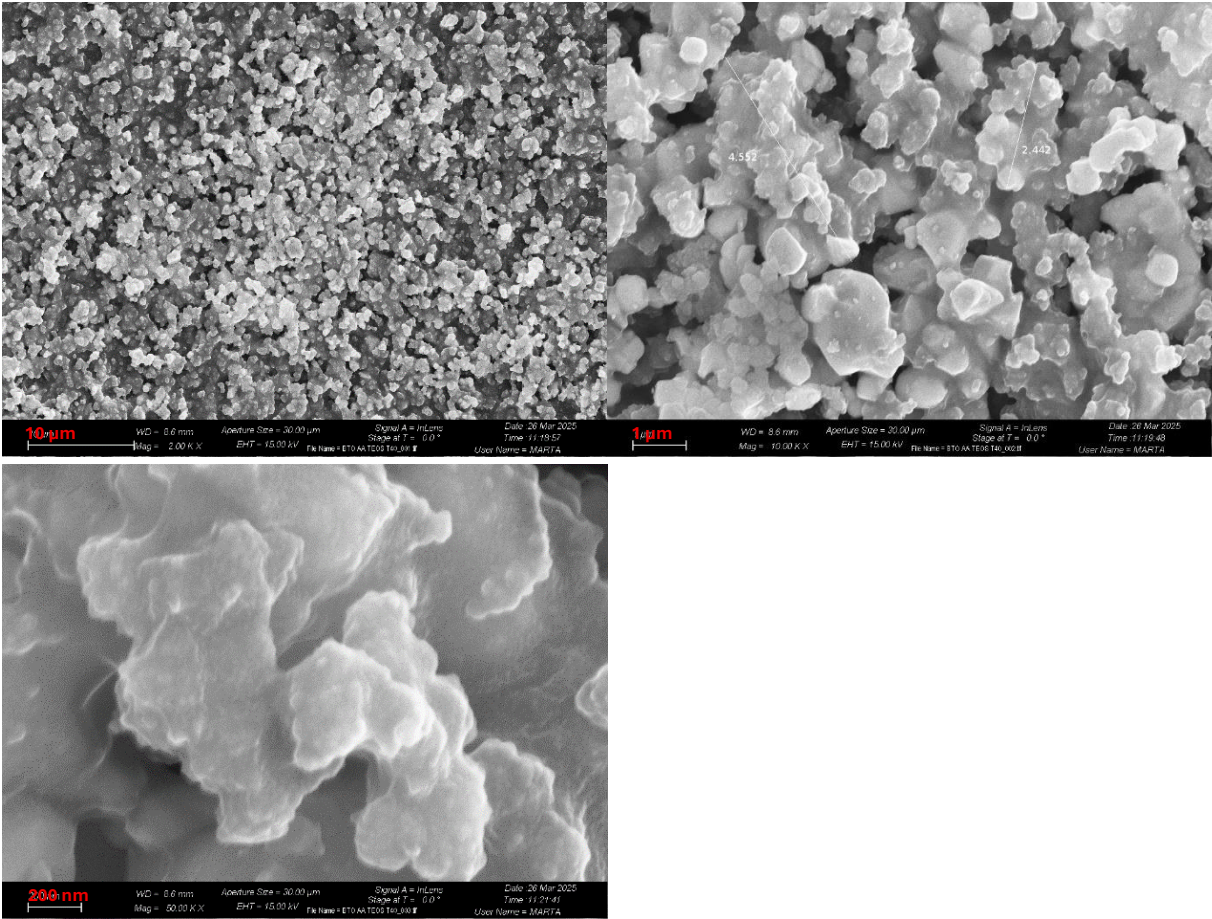
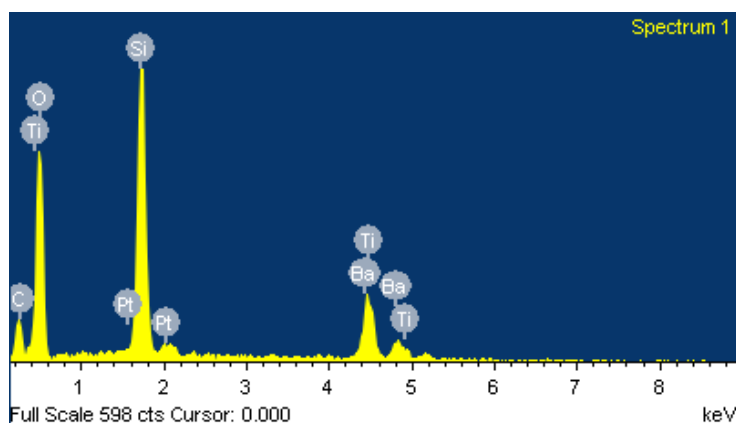


Figura 52. Spettro EDS a sinistra e analisi composizionale a destra del campione BTO AA TEOS 40 (sintesi n.2).



Element	Weight%		Atomic%	
	mean	SD	mean	SD
O K	52,56	1,95	75,33	1,49
Si K	22,20	2,02	18,12	1,57
Ti K	7,47	0,10	3,58	0,09
Ba L	17,77	2,41	2,97	0,47

Dal momento che, in base all'analisi morfologica e composizionale, la sintesi n.2 ha mostrato ottimi risultati, come illustrato nel paragrafo 2.1.1, il passaggio successivo è stato inserire TEP e CN all'interno dello shell ottenuto, con le prove di sintesi n.3 e n.4.

Le immagini FESEM relative alla *sintesi n.3*, nelle figure 53 e 55, mostrano nuovamente uno strato legante attorno ai core di BTO, che tende ad incapsularli. Nel caso del campione BTO AA TEOS TEP CN Tamb TT, in figura 55, sono maggiormente visibili nano-aggregati superficiali sulle particelle, probabilmente rappresentanti precipitati di BG. Su questo campione trattato termicamente non è stata effettuata l'analisi composizionale con EDS a causa del quantitativo limitato e insufficiente di polveri ottenute alla fine della sintesi. Per quanto riguarda invece l'analisi composizionale EDS del campione BTO AA TEOS TEP CN Tamb NTT, riportata in figura 54, nello spettro EDS sono visibili i picchi di emissione relativi al calcio (Ca, 0.341 e 3.690 keV) e al fosforo (P, 2.013 keV). Le percentuali atomiche di Si, Ca e P rilevate sono rispettivamente 3.83 ± 0.51 at%, 1.22 ± 0.36 at% e 0.30 ± 0.10 at%. Si evidenzia quindi l'introduzione degli ioni calcio e fosforo nello shell di silice. Questo è meglio confermato dalla tabella 13, contenente le percentuali in peso e atomiche corrette in rapporto al contenuto di Si, in modo da avere un'idea più chiara della distribuzione limitatamente allo shell di silice: le percentuali atomiche ricalcolate in rapporto al silicio sono 71.40 at% per il Si, 22.98 at% per il Ca e 5.62 at% per il P.

Figura 53. Immagini FESEM del campione BTO AA TEOS TEP CN Tamb NTT (sintesi n.3), ad ingrandimenti crescenti (2000x, 10000x, 50000x).

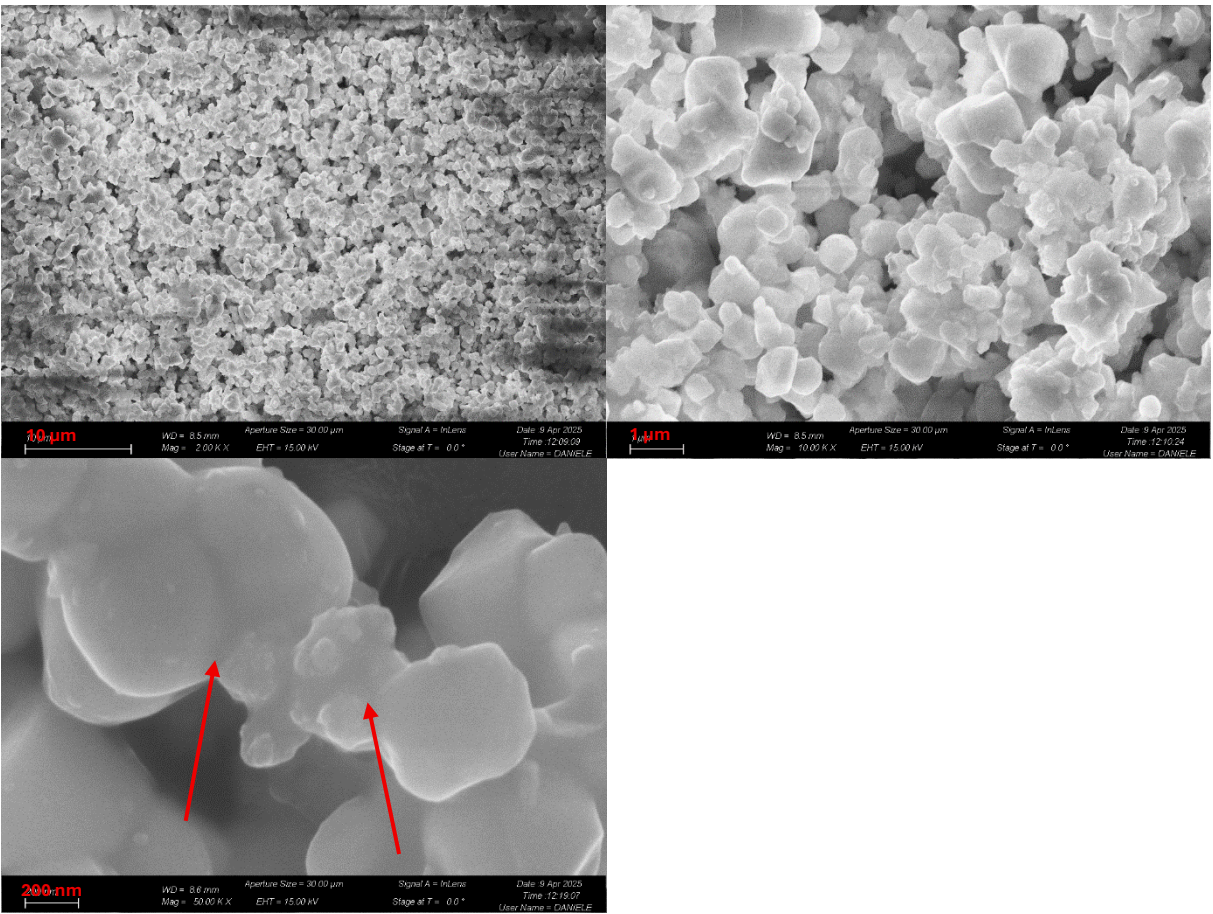
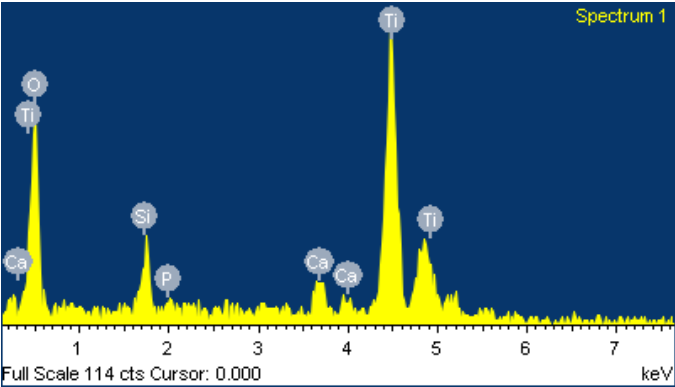


Figura 54. Spettro EDS a sinistra e analisi composizionale a destra del campione BTO AA TEOS TEP CN Tamb NTT (sintesi n.3).

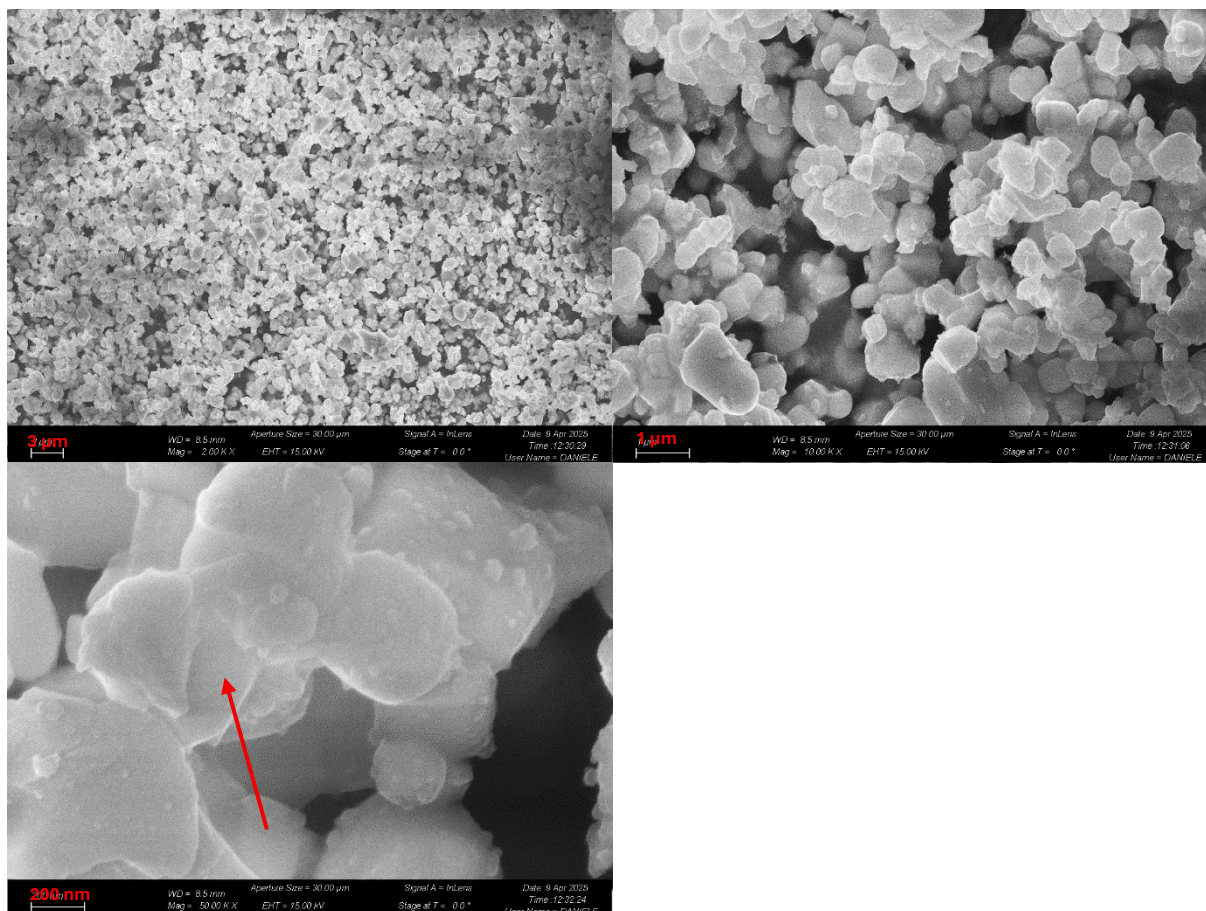


Element	Weight%		Atomic%	
	mean	SD	mean	SD
O K	31,72	2,06	69,56	1,72
Si K	3,05	0,37	3,83	0,51
P K	0,26	0,08	0,30	0,10
Ca K	1,39	0,43	1,22	0,36
Ti K	18,16	0,69	13,34	0,69
Ba L	45,42	2,26	11,66	1,06

Tabella 13. Percentuali in peso e atomiche ottenute tramite analisi EDS, ricalcolate considerando come elementi solo Si, Ca e P, per il campione BTO AA TEOS TEP CN Tamb NTT (sintesi n.3).

Element	Weight%	SD	Atomic%	SD
Si K	64,94	7,81	71,40	6,75
P K	5,55	1,67	5,62	1,53
Ca K	29,52	9,08	22,98	7,84

Figura 55. Immagini FESEM del campione BTO AA TEOS TEP CN Tamb TT (sintesi n.3), ad ingrandimenti crescenti (2000x, 10000x, 50000x).



Confrontando visivamente le figure 49 e 53 relative rispettivamente al campione BTO AA TEOS Tamb (sintesi n.2) e al campione BTO AA TEOS TEP CN Tamb NTT (sintesi n.3), notiamo che nel secondo caso il rivestimento che ingloba e lega le particelle sembra più omogeneo.

Nelle immagini FESEM relative alla *sintesi n.4*, figura 56 per il campione BTO AA TEOS TEP CN 40 NTT e figura 58 per il campione BTO AA TEOS TEP CN 40 TT, si nota una maggiore agglomerazione delle particelle, probabilmente dovuta anche alla preparazione del campione. Per quanto riguarda invece i risultati dell'analisi composizionale con EDS, riportati nelle figure 57 e 59, nuovamente negli spettri EDS sono visibili i picchi di emissione degli elementi di interesse, ovvero Si, Ca e P. La percentuale atomica di Si passa dal valore 3.83 at% del campione BTO AA TEOS TEP CN Tamb NTT (sintesi n.3) ai valori 21.72 at% per il campione BTO AA TEOS TEP CN 40 NTT e 16.27 at% per il campione BTO AA TEOS TEP CN 40 TT. Quindi possiamo affermare che si ha una maggiore deposizione di silice nella sintesi n.4 rispetto alla sintesi n.3. Inoltre, facendo un confronto incrociato tra i due campioni della sintesi n.4 a 40°C, si osserva una diminuzione percentuale di Si nel passaggio dal caso non trattato termicamente al caso trattato termicamente. Considerando tutti gli

elementi e quindi anche quelli del core, le percentuali atomiche di Ca e P individuate non variano in maniera significativa rispetto ai valori ottenuti con la sintesi n.3, per il Ca (~ 1.2 - 1.4 at%) e per il P (~ 0.2 - 0.4 at%). Limitatamente però allo shell di silice, l'ordine dei campioni a contenuto decrescente di ioni calcio e fosforo entrati nello shell di silice è il seguente: BTO AA TEOS TEP CN 40 Tamb NTT, BTO AA TEOS TEP CN 40 TT e BTO AA TEOS TEP CN 40 NTT. In questo stesso ordine si ha un aumento della percentuale atomica di Si rilevata sul core di BTO. Questo si evince confrontando le tabelle ricalcolate 13, 14 e 15, in rapporto alla percentuale atomica di Si.

Figura 56. Immagini FESEM del campione BTO AA TEOS TEP CN 40 NTT (sintesi n.4), ad ingrandimenti crescenti (2000x, 10000x, 50000x).

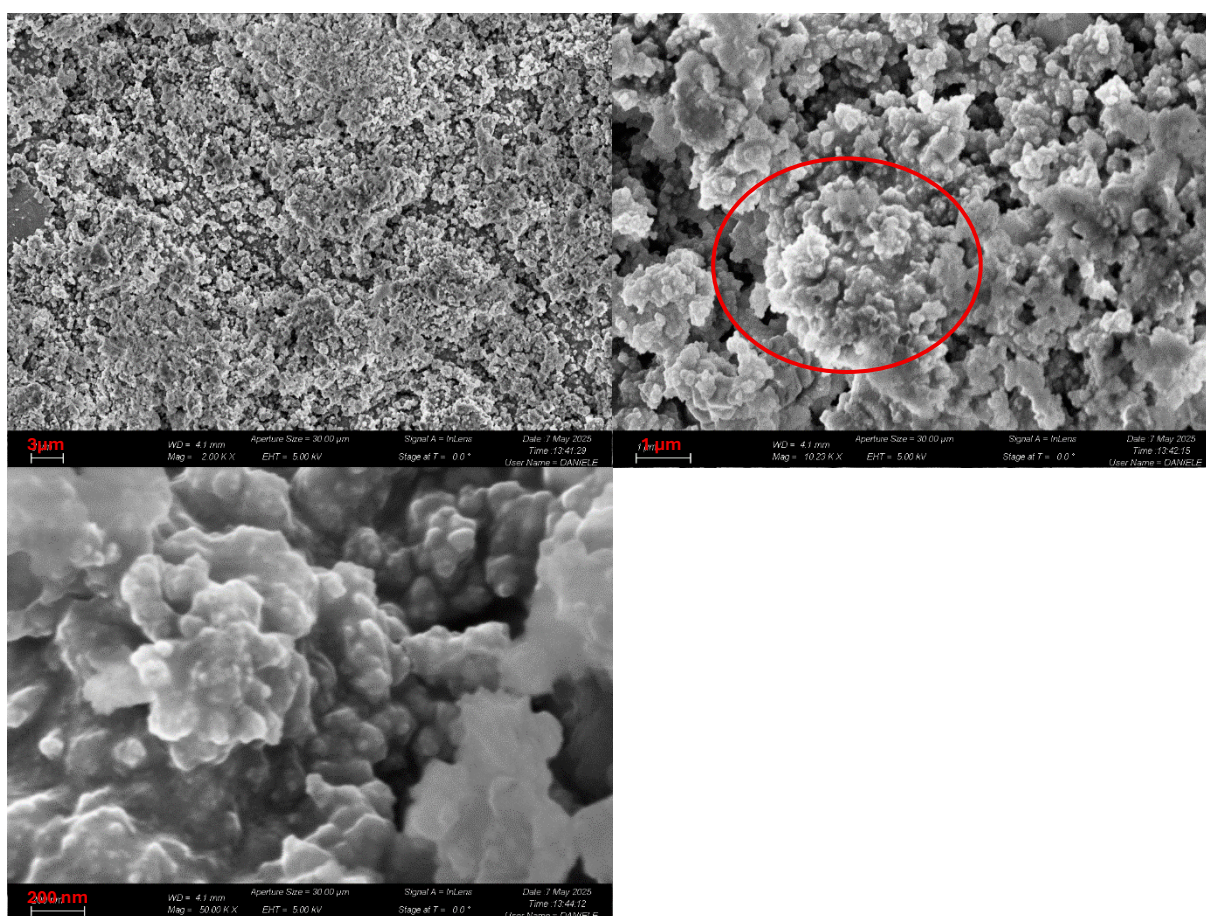


Figura 57. Spettro EDS a sinistra e analisi composizionale a destra del campione BTO AA TEOS TEP CN 40 NTT (sintesi n.4).

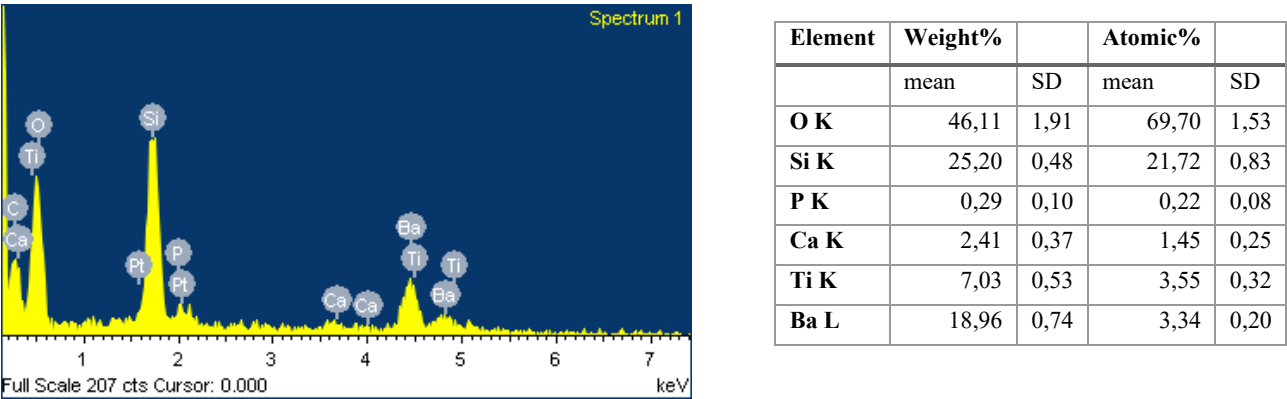


Tabella 14. Percentuali in peso e atomiche ottenute tramite analisi EDS, ricalcolate considerando come elementi solo Si, Ca e P, per il campione BTO AA TEOS TEP CN 40 NTT (sintesi n.4).

Element	Weight%	SD	Atomic%	SD
Si K	90,34	1,02	92,86	0,76
P K	1,04	0,37	0,95	0,35
Ca K	8,62	1,09	6,19	0,81

Figura 58. Immagini FESEM del campione BTO AA TEOS TEP CN 40 TT (sintesi n.4), ad ingrandimenti crescenti (2000x, 10000x, 50000x).

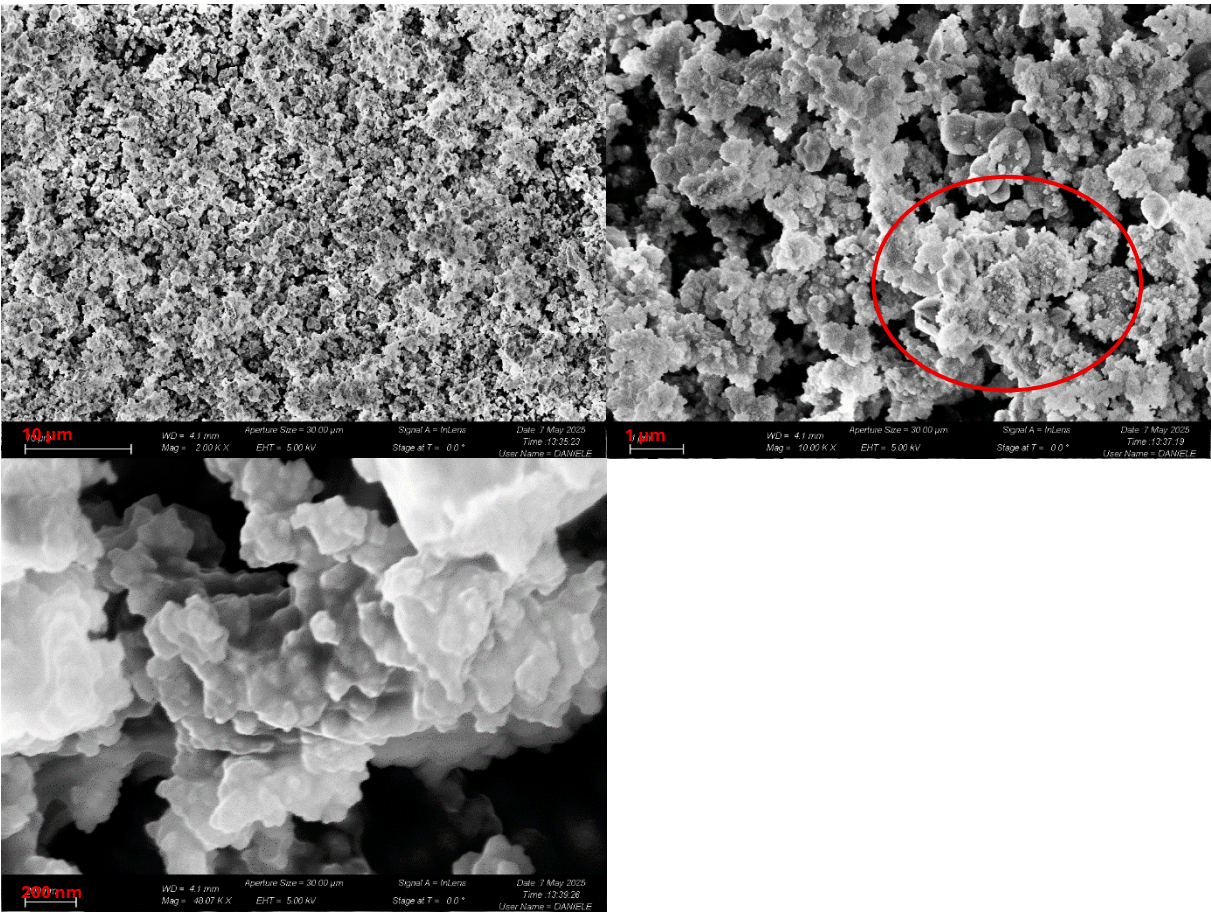
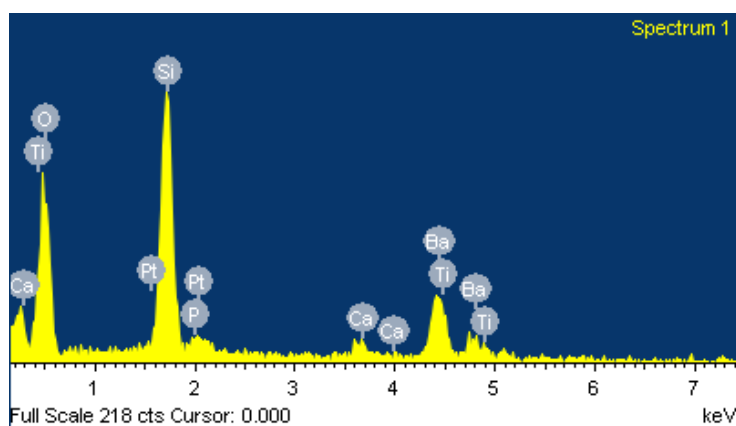


Figura 59. Spettro EDS a sinistra e analisi composizionale a destra del campione BTO AA TEOS TEP CN 40 TT (sintesi n.4).



Element	Weight%		Atomic%	
	mean	SD	mean	SD
O K	45,59	2,62	72,33	1,26
Si K	18,02	1,97	16,27	1,13
P K	0,47	0,14	0,39	0,12
Ca K	2,14	0,30	1,36	0,16
Ti K	9,73	2,08	5,19	1,34
Ba L	24,04	2,52	4,46	0,65

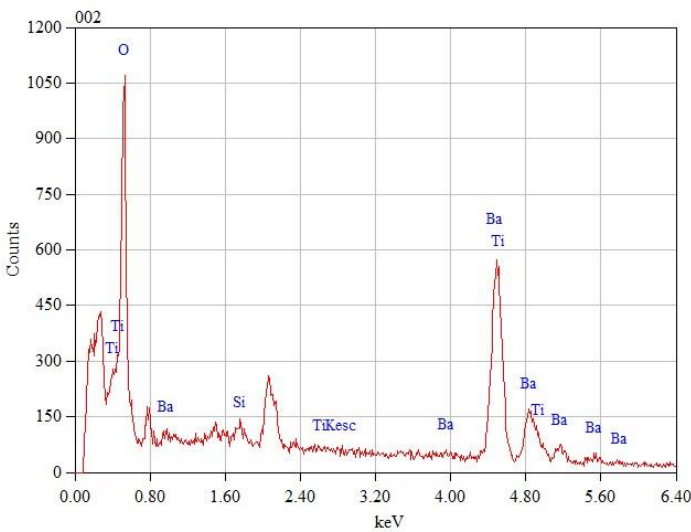
Tabella 15. Percentuali in peso e atomiche ottenute tramite analisi EDS ricalcolate considerando come elementi solo Si, Ca e P, per il campione BTO AA TEOS TEP CN 40 TT (sintesi n.4).

Element	Weight%	SD	Atomic%	SD
Si K	87,31	0,84	90,30	0,73
P K	2,31	0,82	2,18	0,78
Ca K	10,39	0,98	7,53	0,72

Arrivati a questo punto, una prima conclusione che si può trarre è che a fornire i risultati migliori dal punto di vista composizionale è il campione BTO AA TEOS TEP CN 40 NTT (sintesi n.4), con una buona percentuale atomica di Si, di Ca e di P. Dal punto di vista morfologico invece si è notata un'agglomerazione maggiore nel campione BTO AA TEOS TEP CN 40 TT (sintesi n.4). Il campione BTO AA TEOS TEP CN Tamb NTT (sintesi n.3) mostra una buona composizione dal punto di vista dell'analisi EDS ma la percentuale atomica di Si è minore rispetto ai due campioni della sintesi n.4. Dal punto di vista della formazione dello shell di silice, il caso a 40 °C è risultato essere migliore rispetto al caso a Tamb mentre il trattamento termico sembrerebbe aumentare le percentuali atomiche di Ca e P in rapporto al Si.

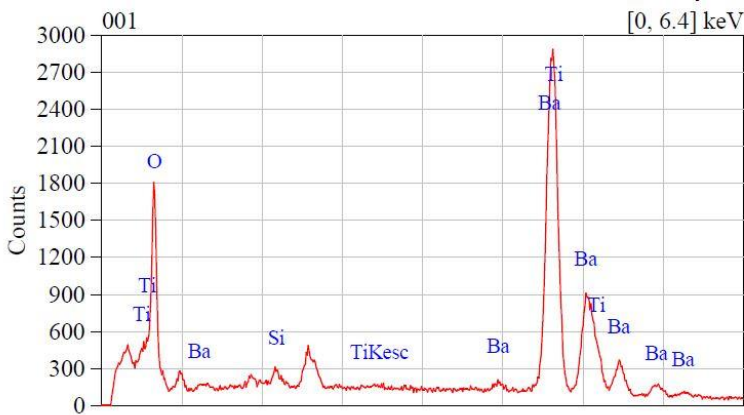
I risultati delle *sintesi n.5 e n.6*, in cui sono stati aumentati il quantitativo di polvere di BTO di partenza (0.5 g, 1 g) e il volume di TEOS dello stesso fattore (5.6 ml, 11.2 ml), non hanno mostrato risultati soddisfacenti. Infatti, le percentuali atomiche di Si rilevate sono diminuite rispetto ai valori della sintesi n.2 (0.1g di BTO, 1.12 ml di TEOS), sia nel caso in cui la temperatura di sintesi post-aggiunta dell'ammoniaca sia pari a Tamb sia nel caso in cui sia pari a 40°C. Questo è quanto si evince confrontando le tabelle EDS riportate nelle figure 50, 60 e 62 per quanto riguarda il caso a Tamb e confrontando le tabelle EDS riportate nelle figure 52, 61 e 63 per quanto riguarda il caso a 40°C.

Figura 60. Spettro EDS a sinistra e analisi composizionale a destra del campione BTO AA TEOS Tamb 0.5g (sintesi n.5).



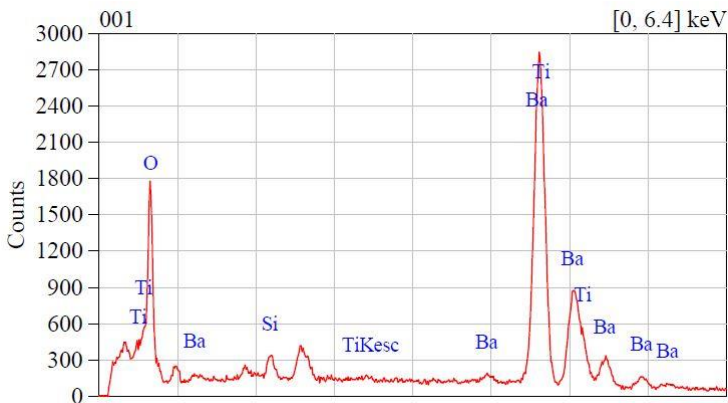
Element	Weight%		Atomic%	
	mean	SD	mean	SD
O K	16,95	1,11	53,86	2,00
Si K	0,57	0,07	1,04	0,13
Ti K	21,00	0,58	22,32	1,06
Ba L	61,47	0,95	22,79	1,03

Figura 61. Spettro EDS a sinistra e analisi composizionale a destra del campione BTO AA TEOS 40 0.5g (sintesi n.5).



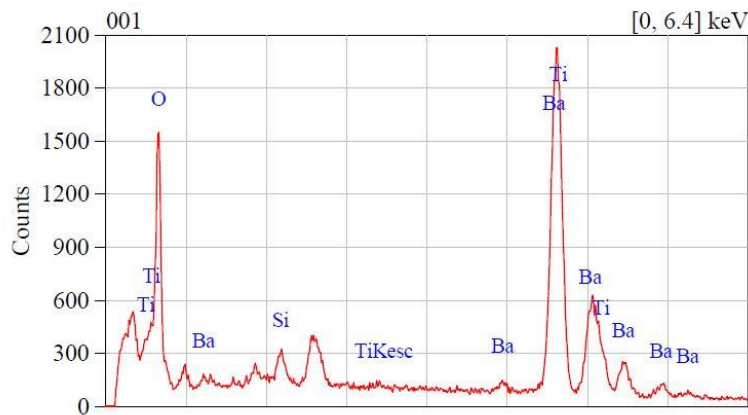
Element	Weight%		Atomic%	
	mean	SD	mean	SD
O K	19,74	0,55	57,77	0,60
Si K	0,79	0,28	1,31	0,44
Ti K	21,68	0,07	21,19	0,37
Ba L	57,77	0,79	19,70	0,60

Figura 62. Spettro EDS a sinistra e analisi composizionale a destra del campione BTO AA TEOS Tamb 1g (sintesi n.6).



Element	Weight%		Atomic%	
	mean	SD	mean	SD
O K	19,71	0,27	57,59	0,38
Si K	1,00	0,14	1,67	0,22
Ti K	21,67	0,28	21,14	0,39
Ba L	57,62	0,21	19,61	0,20

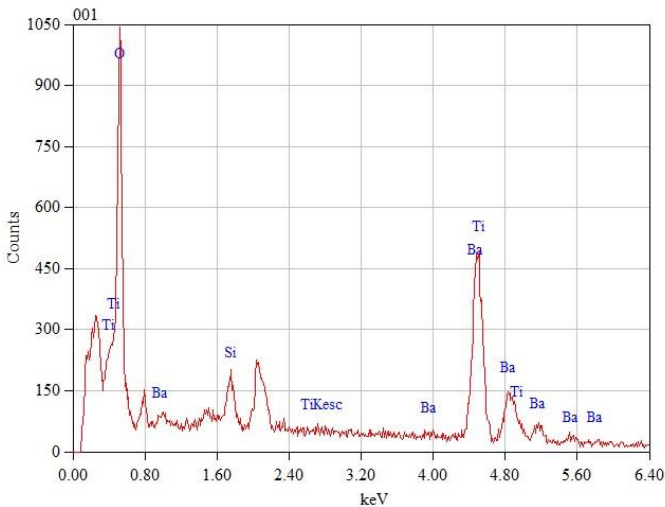
Figura 63. Spettro EDS a sinistra e analisi composizionale a destra del campione BTO AA TEOS 40 1g (sintesi n.6).



Element	Weight%		Atomic%	
	mean	SD	mean	SD
O K	23,21	1,14	62,27	1,44
Si K	1,19	0,05	1,81	0,12
Ti K	20,99	0,19	18,83	0,54
Ba L	54,61	1,09	17,09	0,81

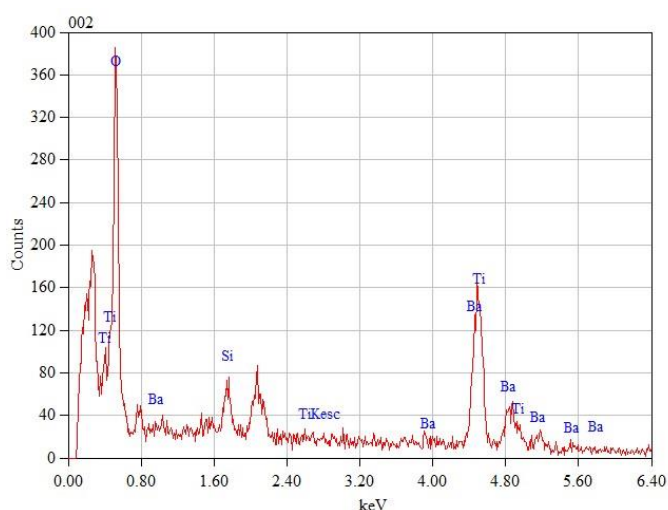
Nel passare dalla sintesi n.6 alla *sintesi n.7* è stato aumentato il volume di acqua utilizzato nella sintesi, da 10 ml a 30 ml, mantenendo costante il volume di etanolo. Di conseguenza è diminuito il rapporto in volume etanolo/acqua. I risultati EDS hanno mostrato un aumento della percentuale atomica di Si rilevata, sia nel caso a Tamb che nel caso a 40°C. Questo è quanto si evince confrontando le tabelle EDS riportate nelle figure 62 e 64 per quanto riguarda il caso a Tamb e confrontando le tabelle EDS riportate nelle figure 63 e 65 per quanto riguarda il caso a 40°C. Questo è in linea con la teoria del processo Stober, presentata nel paragrafo 1.5.1, secondo cui l’acqua promuove le reazioni di idrolisi e condensazione del TEOS e quindi favorisce la formazione di uno shell di silice. Inoltre, se si aumenta il volume di TEOS è importante aumentare di pari passo anche il volume di acqua, per evitare che rimanga del TEOS in soluzione non idrolizzato e non reagito.

Figura 64. Spettro EDS a sinistra e analisi composizionale a destra del campione BTO AA TEOS Tamb 1g 100-30 (sintesi n.7).



Element	Weight%		Atomic%	
	mean	SD	mean	SD
O K	20,51	0,01	58,65	0,59
Si K	2,15	0,26	3,50	0,44
Ti K	19,46	1,82	18,58	1,56
Ba L	57,87	1,67	19,28	0,74

Figura 65. Spettro EDS a sinistra e analisi composizionale a destra del campione BTO AA TEOS 40 1g 100-30 (sintesi n.7).

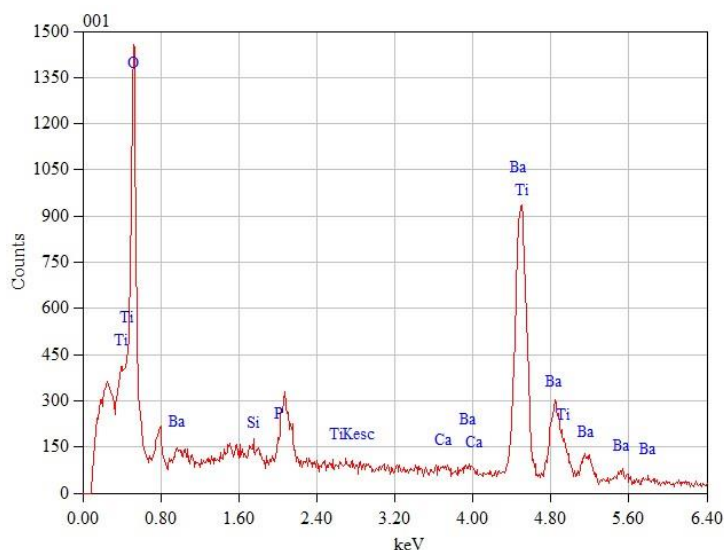


Element	Weight%		Atomic%	
	mean	SD	mean	SD
O K	21,71	2,88	59,96	3,34
Si K	2,07	0,20	3,26	0,12
Ti K	19,94	1,30	18,47	0,93
Ba L	56,29	4,08	18,31	2,84

Rispetto alle sintesi dalla n.2 alla n.4, in cui su 100 mg di polveri di BTO sono stati utilizzati 100 ml di etanolo, nelle sintesi dalla n.5 alla n.7 si è aumentato il quantitativo di BTO senza aumentare il volume di etanolo, ma mantenendolo pari a 100 ml. I risultati non ottimali indicano quindi che è difficile ottenere buoni risultati di sintesi, ovvero una percentuale atomica di Si ottimale sulla superficie, senza aumentare anche il volume di etanolo. Questo limita la scalabilità del metodo.

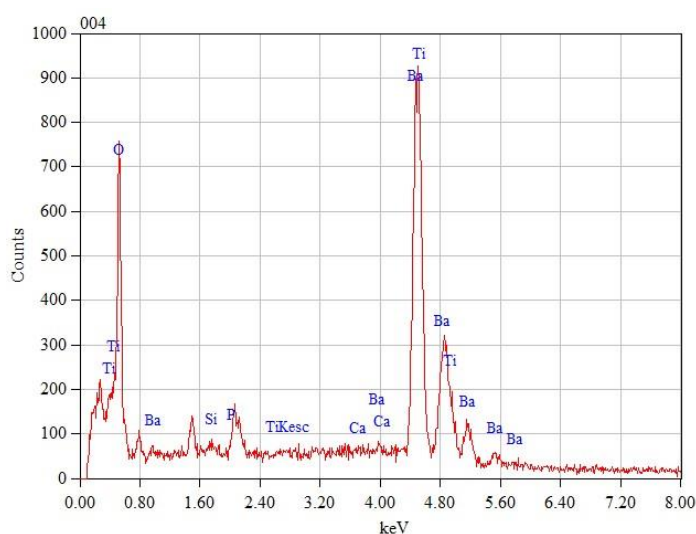
Come descritto nel paragrafo 2.1.1, nelle *sintesi n.8 e n.9* si è cercato di replicare quanto fatto nella sintesi n.4, adottando nuovamente una temperatura di sintesi pari a 40°C e non impiegando un trattamento termico. Il quantitativo di reagenti è stato aumentato, mantenendo costanti però i rapporti tra essi. In entrambe le sintesi in questione, come riportato nelle tabelle EDS nelle figure 66 e 67, si è osservata una brusca riduzione della percentuale atomica di Si rispetto alla sintesi n.4. Questi risultati potrebbero voler indicare difficoltà nella scalabilità del protocollo adottato nella sintesi n.4. È da indagare il ruolo che può avere il lavaggio con etanolo, effettuato in seguito al pre-trattamento con acido acetico, in quanto presente nelle sintesi n.8 e n.9 ma assente nella sintesi n.4. Si può ipotizzare che l'effetto di attivazione superficiale tramite acido acetico sui core di BTO sia effettivo solo se non si effettua un lavaggio di etanolo.

Figura 66. Spettro EDS a sinistra e analisi composizionale a destra del campione BTO AA TEOS TEP CN 40 NTT 750 mg (sintesi n.8).



Element	Weight%		Atomic%	
	mean	SD	mean	SD
O K	14,23	0,54	48,75	1,35
Si K	0,22	0,07	0,43	0,13
P K	0,30	0,20	0,52	0,35
Ca K	0,24	0,10	0,34	0,14
Ti K	21,50	1,00	24,61	1,20
Ba L	63,51	0,90	25,35	0,59

Figura 67. Spettro EDS a sinistra e analisi composizionale a destra del campione BTO AA TEOS TEP CN 40 NTT 200 mg (sintesi n.9).

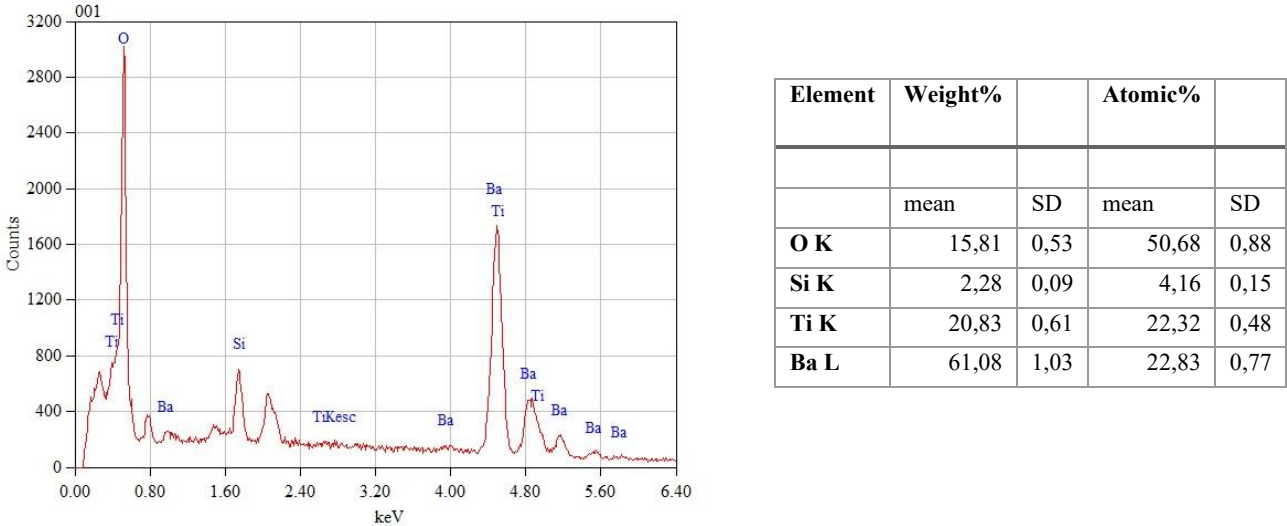


Element	Weight%		Atomic%	
	mean	SD	mean	SD
O K	8,56	1,13	34,54	2,85
Si K	0,11	0,03	0,25	0,06
P K	0,05	0,06	0,10	0,12
Ca K	0,35	0,21	0,55	0,30
Ti K	24,53	0,71	33,18	0,72
Ba L	66,41	2,00	31,38	2,40

Per quanto riguarda l'ultima *sintesi n.10*, in cui si è portato il pH della sospensione ad un valore misurato pari a 10.5 utilizzando un volume fisso di ammoniaca (28%) pari a 2.2 ml, è stata rilevata una percentuale atomica di Si pari a 4.16 ± 0.15 at%, come riportato in figura 68. Si tratta di un valore inferiore rispetto alla percentuale di Si pari a 18.12 ± 1.57 at% ottenuta nella *sintesi n.2*, ma comunque superiore rispetto ad altre sintesi. Questo risultato è importante poichè sottolinea l'importanza del pH: come descritto dal punto di vista teorico nel paragrafo 1.5.1, una maggiore concentrazione di ammoniaca favorisce la formazione di più oligomeri silanoli in soluzione e anche una maggiore

condensazione del TEOS. Aumentarne il contenuto, entro un certo limite, può favorire quindi la formazione dello shell di silice.

Figura 68. Spettro EDS a sinistra e analisi composizionale a destra del campione BTO AA TEOS ammonia 2h 40 (sintesi n.10).



In definitiva, dal punto di vista morfologico e per quanto riguarda la percentuale atomica di Si rilevata in superficie, i risultati migliori sono stati ottenuti con il campione in polvere BTO AA TEOS TEP CN 40 NTT della sintesi n.4. È su questo campione che sono stati effettuati i successivi test di bioattività in SBF. Anche il campione BTO AA TEOS TEP CN Tamb NTT della sintesi n.3 ha mostrato ottimi risultati, soprattutto per quanto riguarda le percentuali atomiche di Ca e P in rapporto al Si, ma la percentuale atomica di Si rilevata è stata più bassa.

3.1.2 Chimica superficiale: FTIR-ATR

In figura 69 sono riportati gli spettri FTIR delle polveri di BTO di partenza, dei campioni BTO AA TEOS TEP CN Tamb senza trattamento termico (NTT) e con trattamento termico (TT) (sintesi n.3) e dei campioni BTO AA TEOS TEP CN 40 senza trattamento termico (NTT) e con trattamento termico (TT) (sintesi n.4). L’obiettivo è stato valutare la formazione dello shell di silice, la presenza nel network vetroso di ioni calcio e fosforo ma anche l’effetto della temperatura di sintesi e dell’eventuale trattamento termico finale.

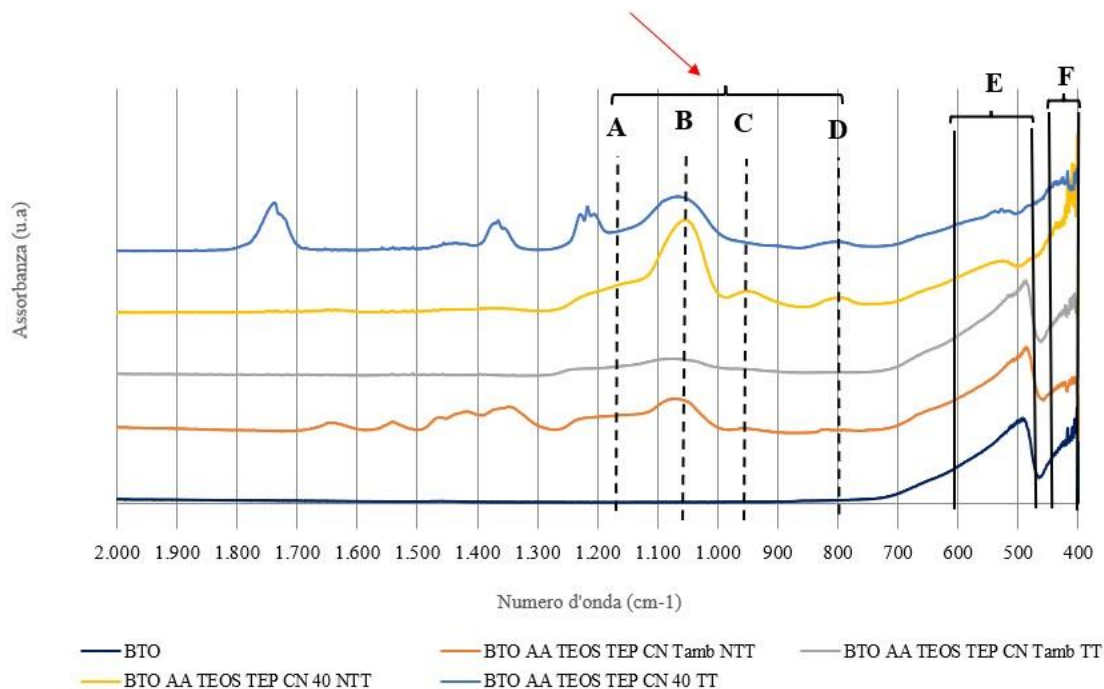


Figura 69. Spettri FTIR delle polveri di BTO di partenza, dei campioni BTO AA TEOS TEP CN Tamb NTT e BTO AA TEOS TEP CN Tamb TT (sintesi n.3) e dei campioni BTO AA TEOS TEP CN 40 NTT e BTO AA TEOS TEP CN 40 TT (sintesi n.4).

I riferimenti di letteratura utilizzati per l'interpretazione dei risultati spettrali sono riportati nella tabella del paragrafo 2.3.2. Le bande e i picchi di assorbimento di interesse sono indicati con linee tratteggiate e continue in figura. Nello specifico:

- La banda intorno a 1200 cm^{-1} (A) è associata alle vibrazioni dei gruppi silossanici Si-O-Si. In questo caso specifico in cui si stanno rivestendo particelle sub-micrometriche di BTO, può anche essere associata alla formazione di legami Si-O-BaTiO₃ [121] per via della condensazione dei gruppi silanoli del TEOS idrolizzato con i gruppi ossidrilici superficiali delle particelle sub-micrometriche di BTO. Il picco di assorbimento intorno a circa 1050 cm^{-1} (B), indicativo della corretta formazione di uno shell di silice, è associato allo stretching asimmetrico dei gruppi Si-O-Si.
- La zona di assorbimento intorno a 960 cm^{-1} (C) è associata alle vibrazioni dei legami SiO_{NBO} (con ossigeno non pontante) nel caso di BG o dei legami Si-OH nel caso di silice pura. Questa banda è indicativa della presenza di ioni modificatori come Ca²⁺ nel network vetroso e, in figura 72, risulta visibile in maniera marcata sullo spettro dei campioni BTO AA TEOS TEP CN 40 NTT (curva in giallo) e BTO AA TEOS TEP CN Tamb NTT (curva in arancione).

- La banda di assorbimento intorno a 800 cm^{-1} (D) è associata allo stretching simmetrico dei legami Si-O o anche al bending del legame Si-O-Si.
- La banda di assorbimento nel range $600\text{-}500\text{ cm}^{-1}$ (E) corrisponde allo stretching del legame Ti-O [121]. Infatti, risulta visibile anche sullo spettro delle polveri di BTO di partenza non rivestite.
- Infine, la banda intorno nel range $480\text{-}400\text{ cm}^{-1}$ (F) è associata allo stretching simmetrico/rocking dei gruppi Si-O-Si. Nel caso di particelle di BG l'assorbimento associato a questi gruppi si trova intorno a 500 cm^{-1} , mentre nel caso di particelle di sola silice si trova intorno a 450 cm^{-1} . L'assorbimento in questa zona tende a spostarsi verso 500 cm^{-1} nei campioni a 40°C con e senza trattamento termico, forse più evidente nel caso con trattamento termico. Questo può indicare l'avvenuto ingresso di ioni modificatori Ca^{2+} all'interno del network vetroso e quindi la formazione di uno shell non solo a base di silice ma di vetro bioattivo.

In definitiva la zona di maggior interesse ricade nel range $1200\text{-}900\text{ cm}^{-1}$, come indicato in figura 69. Dall'analisi FTIR si vede che i campioni BTO AA TEOS TEP CN Tamb NTT, BTO AA TEOS TEP CN 40 NTT e BTO AA TEOS TEP CN 40 TT mostrano in maniera marcata ed evidente le bande B, C e D, segno che il rivestimento con silice è avvenuto. Inoltre, queste bande di interesse sembrano essere maggiormente pronunciate nel caso senza trattamento termico rispetto al caso con trattamento termico. Lo spettro FTIR relativo al campione BTO AA TEOS TEP CN Tamb TT invece appare piatto e non mostra queste bande tipiche. Questo relativamente alla formazione dello shell di silice. Per quanto riguarda invece l'ingresso degli ioni Ca^{2+} nel network vetroso a base silice, se ci si focalizza sulla banda C i campioni più promettenti sembrano essere BTO AA TEOS TEP CN Tamb NTT e BTO AA TEOS TEP CN 40 NTT, mentre se ci si focalizza sulla banda F i campioni più promettenti sembrano essere BTO AA TEOS TEP CN 40 TT e BTO AA TEOS TEP CN 40 NTT.

Quanto detto è in linea con i risultati dell'analisi composizionale con EDS, riportati nelle figure 54, 57 e 59 e nelle tabelle 13, 14 e 15.

Nel caso del campione BTO AA TEOS TEP CN 40 TT (curva in blu), l'elevato assorbimento nelle zone $1800\text{-}1700$, $1400\text{-}1300$ e intorno a 1230 cm^{-1} potrebbe essere causato dal rumore di fondo e dal background non opportunamente rimossi dallo spettrofotometro, o anche dall'umidità ambientale. Questa considerazione vale anche per il campione BTO AA TEOS TEP CN Tamb NTT (curva in arancione) in cui si ha un assorbimento nel range $1700\text{-}1300\text{ cm}^{-1}$.

In definitiva, considerando i risultati delle analisi FTIR, possiamo affermare che la modifica chimica sulla superficie del core di BTO ha avuto successo nei campioni BTO AA TEOS TEP CN 40 NTT e TT (sintesi n.4) e anche nel campione BTO AA TEOS TEP CN Tamb NTT (sintesi n.3). Lo spettro FTIR del campione BTO AA TEOS TEP CN Tamb TT (sintesi n.4) risulta invece molto piatto e non mostra gli assorbimenti tipici dei legami a base di silicio. Questo è in linea con i risultati dell'analisi composizionale con EDS. Dall'analisi degli spettri FTIR invece non è chiaro l'effetto del trattamento termico sull'ingresso degli ioni modificatori nel vetro, o per lo meno dipende dalle zone dello spettro che si considerano.

Risulta difficoltoso valutare la presenza del fosforo nello shell di silice a partire dagli spettri FTIR, dal momento che i picchi di assorbimento corrispondenti alle vibrazioni di bending del legame P-O (~ 563 e ~ 603 cm^{-1}), all'interno dei tetraedri PO_4 [120], ricadono nel range di assorbimento relativo anche allo stretching del legame Ti-O del core di BTO (570 - 597 cm^{-1}) [121], venendo coperti.

Per chiarezza, di seguito in figura 70 è riportato lo spettro FTIR del campione BTO AA TEOS TEP CN 40 NTT che è risultato essere il migliore, dal punto di vista della deposizione dello shell di silice. Sono ricapitolati i picchi più importanti.

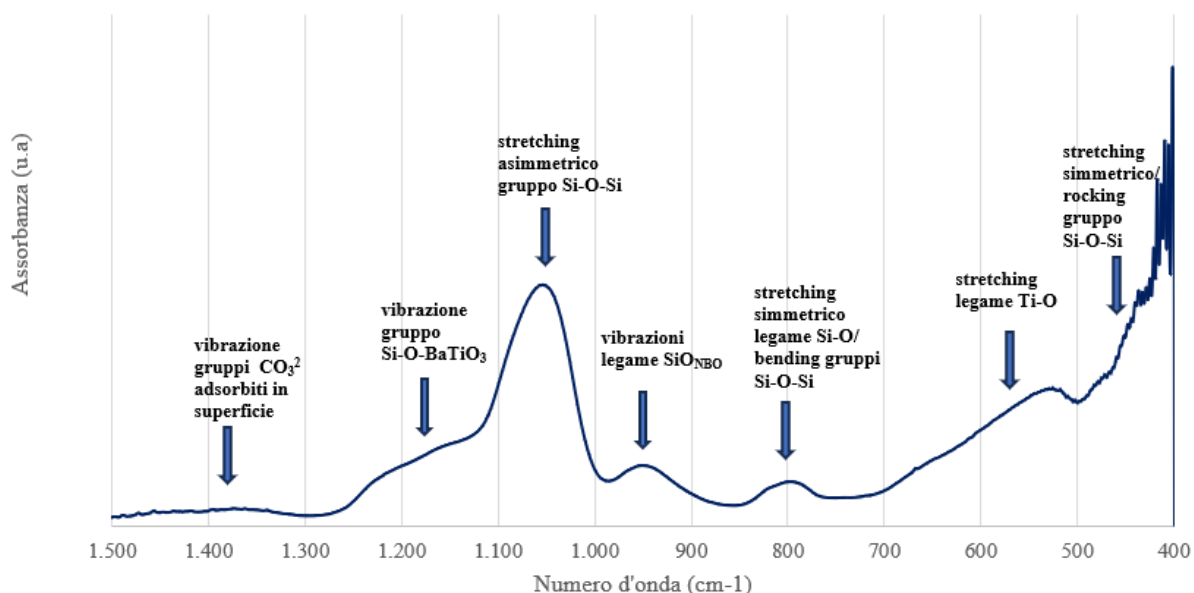


Figura 70. Spettro FTIR del campione BTO AA TEOS TEP CN 40 NTT (sintesi n.4), con indicati i picchi di assorbimento principali e indicativi della corretta formazione di uno shell di BG.

3.1.3 Bioattività: test di immersione in SBF

In questo paragrafo verranno descritti i risultati del test di bioattività in vitro, relativamente alla morfologia, composizione e chimica superficiale del campione posto in SBF. Come già detto nel paragrafo 2.3.3, il test in questione è stato condotto soltanto sul BTO, nello specifico sulle particelle core-shell definite come il campione BTO AA TEOS TEP CN 40 NTT, ottenuto con la sintesi n.4, in quanto si è presentato come il più promettente. Per semplicità di scrittura, il campione in questione è stato indicato di seguito come BTO SBF.

Il pH misurato all'interno della soluzione di SBF, in cui il campione è stato incubato, mostra variazioni minime, come riportato in tabella 16. Passando dal giorno 0 al giorno 3, il valore diminuisce di 0.05. Successivamente, a partire dal giorno 3 il pH aumenta raggiungendo il valore di 7.38 al giorno 7 e il valore di 7.43 al giorno 14. Il pH tende quindi ad aumentare leggermente nel tempo, ovvero la soluzione di SBF che circonda le polveri rivestite tende a diventare leggermente più basica. Questo potrebbe indicare il verificarsi dello scambio ionico tra gli ioni modificatori della parte più superficiale dello shell ottenuto sulle polveri di BTO, ovvero gli ioni Ca^{2+} , e gli idrogenioni H^+ presenti in soluzione. Questo scambio ionico è il primo importante evento alla base del meccanismo di bioattività, dal momento che porta alla formazione di gruppi silanoli superficiali Si-OH che fungono da siti di nucleazione per l'HAp. Inoltre, l'aumento di pH determina la dissoluzione dello shell di silice. Il fatto che l'aumento di pH sia limitato può essere dovuto al modesto contenuto di ioni modificatori Ca^{2+} in relazione al fatto che non si ha un vetro bioattivo in forma di particella ma di shell.

Tabella 16. Valori di pH della soluzione di SBF in cui è stato immerso il campione BTO AA TEOS TEP CN 40 NTT (sintesi n.4) per 3, 7 e 14 giorni.

giorno	0	3	7	14
pH	7.4	7.35*	7.38	7.43

*misura effettuata in duplicato ($\text{SD}=\pm 0.04$)

Per quanto riguarda i cambiamenti morfologici sulla superficie delle particelle core-shell poste in SBF, le immagini FESEM sono riportate nelle figure 71 e 72, rispettivamente dopo 7 e 14 giorni di incubazione.

A 7 giorni sono visibili precipitati con una morfologia tipica dell'HAp cresciuta in vitro. La precipitazione non risulta essere omogenea: in alcune zone sono visibili nano-precipitati (figura 71-c), altre hanno mostrato HAp superficiale più formata con una morfologia a foglio (71-a). Dal punto di vista dell'analisi composizionale con EDS, come riportato nella tabella di figura 72, si è assistito ad una diminuzione della percentuale atomica di Si e ad aumenti delle percentuali atomiche di Ca e P, rispetto al giorno 0 (tabella in figura 57). Questo si può osservare anche considerando le percentuali atomiche di Ca e P corrette, in rapporto al Si, e facendo un confronto tra i dati riportati in tabella 17 e quelli riportati in tabella 14. Queste variazioni composizionali, in seguito all'immersione in SBF, sono coerenti con la precipitazione di HAp [122] e pertanto confermano la bioattività delle polveri sintetizzate. Il campione già dopo 7 giorni di immersione in SBF mostra quindi una nucleazione superficiale di HAp, con una morfologia ben chiara.

Figura 71. Immagini FESEM del campione BTO AA TEOS TEP CN 40 NTT (sintesi n.4) dopo 7 giorni in SBF, ad ingrandimenti crescenti: a e c) 20000x, b e d) 50000x.

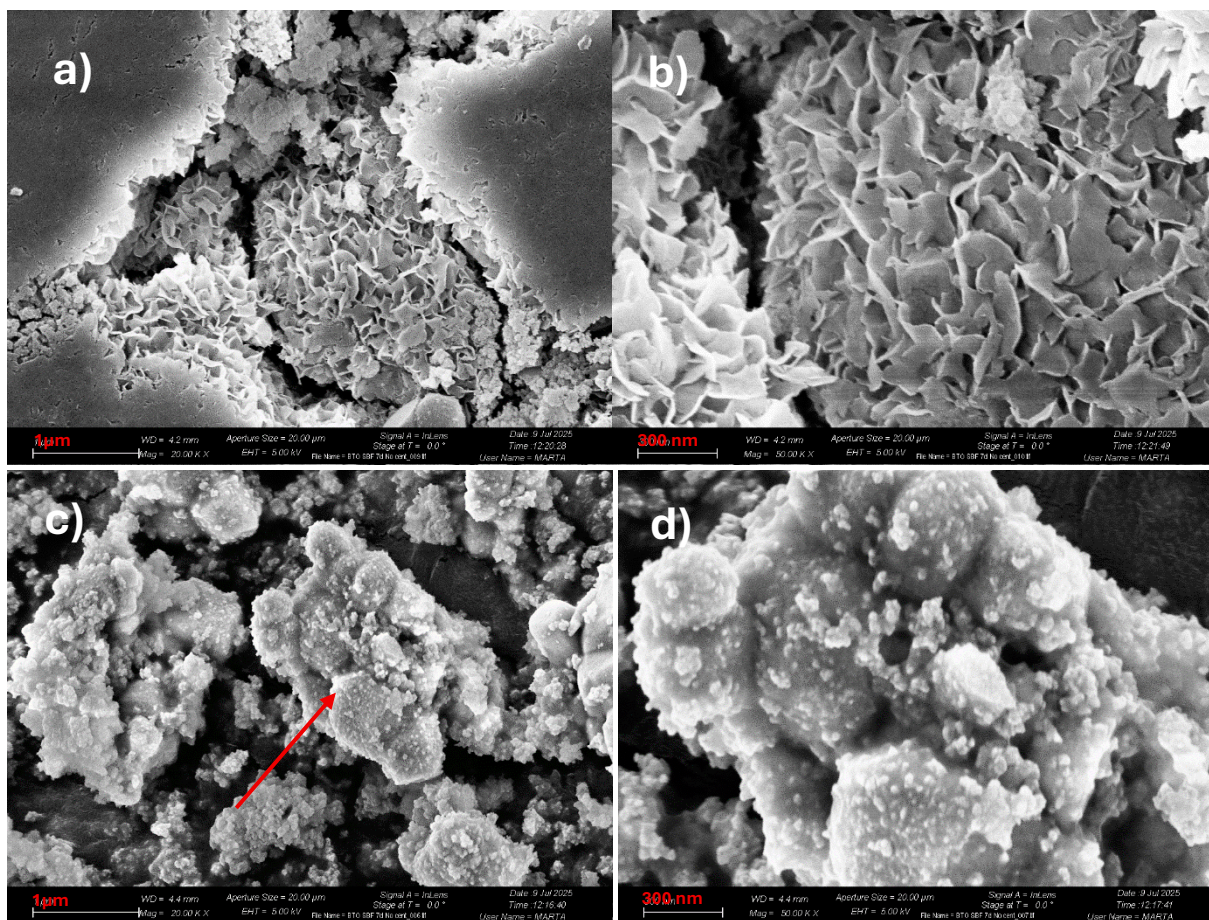
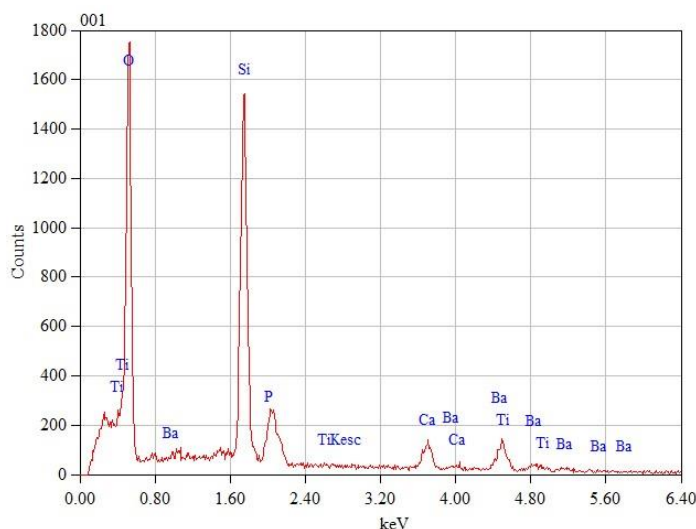


Figura 72. Spettro EDS a sinistra e analisi composizionale a destra del campione BTO AA TEOS TEP CN 40 NTT (sintesi n.4) dopo 7 giorni in SBF. Le percentuali in peso e atomiche sono state ottenute facendo una media su tre aree.



Element	Weight%		Atomic%	
	mean	SD	mean	SD
O K	42,58	0,97	65,56	0,79
Si K	24,47	1,67	21,46	1,23
P K	3,51	1,21	2,80	1,00
Ca K	6,42	2,16	3,96	1,37
Ti K	6,26	0,86	3,22	0,41
Ba L	16,76	0,13	3,01	0,06

Tabella 17. Percentuali in peso e atomiche ottenute tramite analisi EDS, ricalcolate considerando come elementi solo Si, Ca e P, per il campione BTO AA TEOS TEP CN 40 NTT (sintesi n.4) dopo 7 giorni in SBF. Le percentuali in peso e atomiche sono state ottenute facendo una media su tre aree.

Element	Weight%	SD	Atomic%	SD
Si K	71,41	8,23	76,25	7,33
P K	10,11	3,00	9,84	3,11
Ca K	18,48	5,25	13,91	4,24

Relativamente a quello che succede a *14 giorni*, la morfologia superficiale diventa più definita: le immagini FESEM riportate in figura 73 mostrano una cristallizzazione in stato più avanzato, con la morfologia a fogli dell'HAp che tende verso una morfologia a fiore sulle particelle sintetizzate. Questo si può notare confrontando la figura 71-b e la figura 73-c. Studi di letteratura sostengono che una morfologia a foglio (o piatto) suggerisca la formazione di apatite ricca di calcio. In effetti, considerando i dati EDS della tabella 18, in rapporto alla percentuale di Si, si ottiene un rapporto $Ca/P=1.79$, superiore rispetto al valore di 1.67 dell'apatite stechiometrica. Si arriva quindi ad una completa formazione di HAp sul rivestimento delle particelle sintetizzate. Dal punto di vista della composizione elementare, nel passare dal giorno 7 al giorno 14 si osserva una leggera diminuzione della percentuale atomica di Si (da 21.46 ± 1.23 at% a 20.23 ± 1.63 at%) e un aumento delle percentuali atomiche di Ca (da 3.69 ± 1.37 a 7.29 ± 3.58 at%) e di P (da 2.80 ± 1.00 at% a 3.98 ± 1.51 at%). Nuovamente, queste variazioni composizionali, durante il trattamento in SBF, sono coerenti con la precipitazione di HAp [122] e confermano la bioattività delle polveri sintetizzate.

Figura 73. Immagini FESEM del campione BTO AA TEOS TEP CN 40 NTT (sintesi n.4) dopo 14 giorni in SBF, ad ingrandimenti crescenti: a) 15000x, b) 20000x, c) 50000x e d) 100000x.

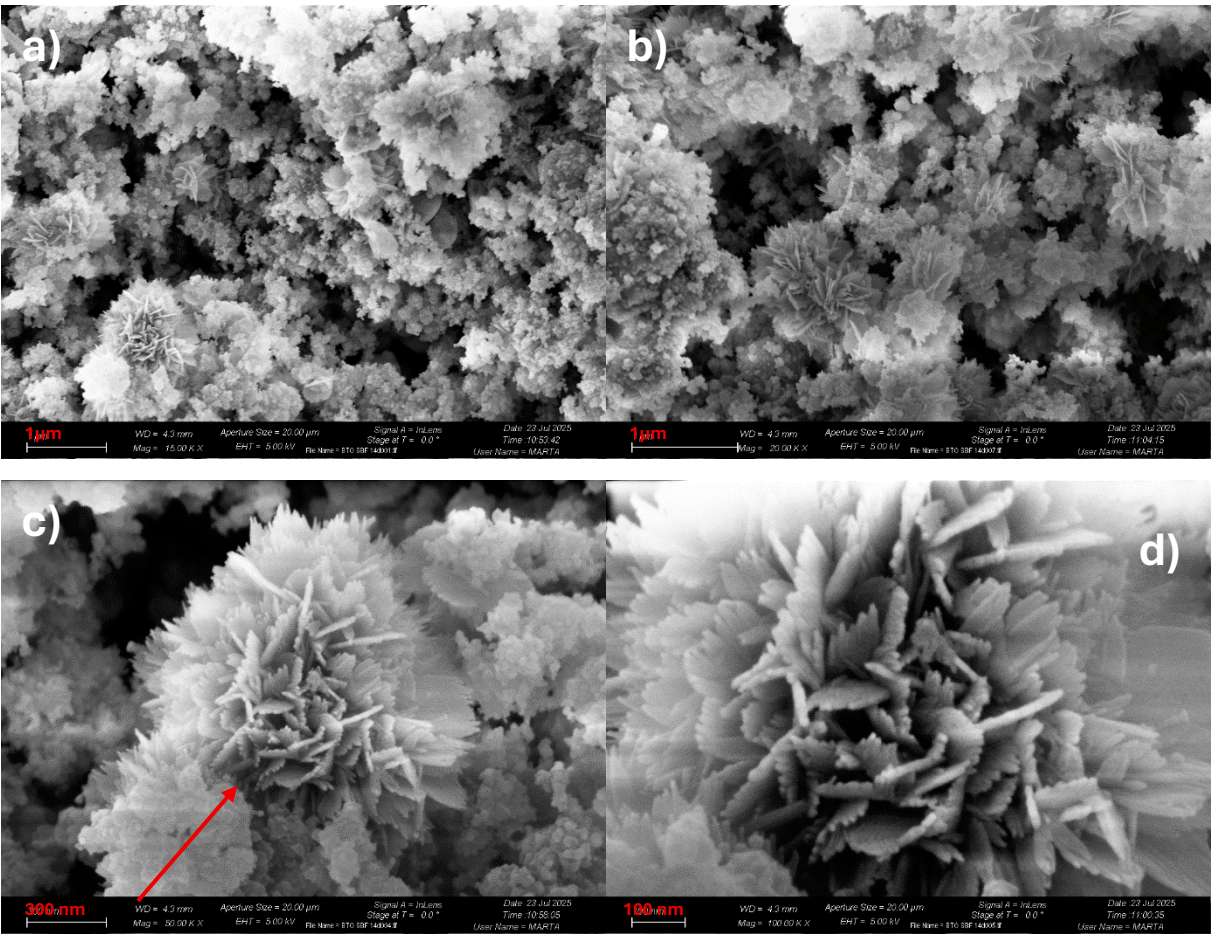


Figura 74. Spettro EDS a sinistra e analisi composizionale a destra del campione BTO AA TEOS TEP CN 40 NTT (sintesi n.4) dopo 14 giorni in SBF. Le percentuali in peso e atomiche sono state ottenute facendo una media su nove aree.

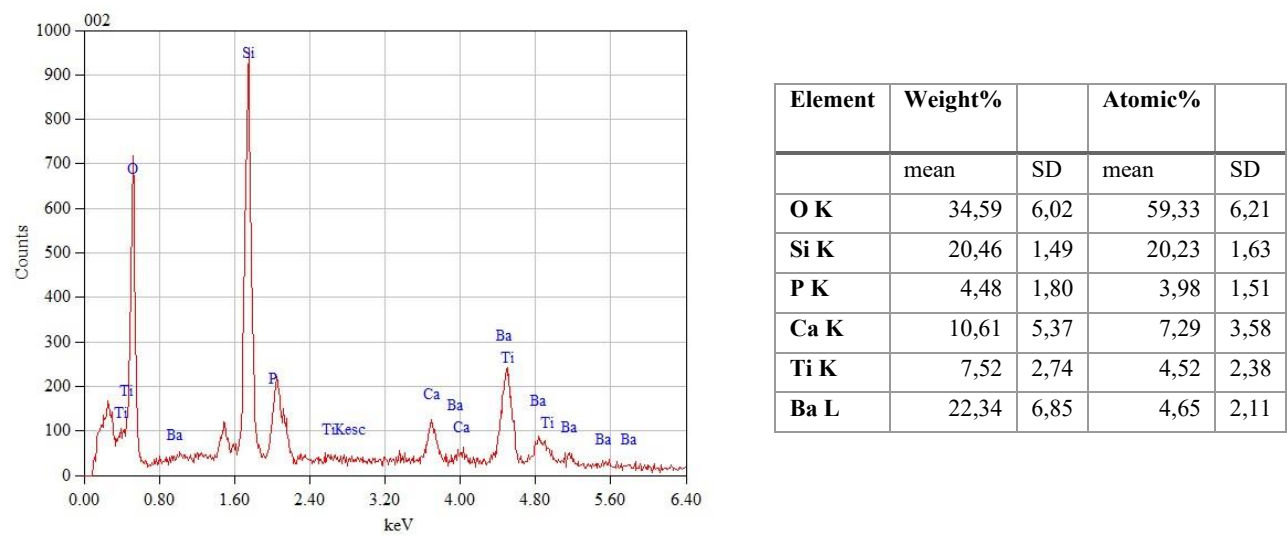


Tabella 18. Percentuali in peso e atomiche ottenute tramite analisi EDS, ricalcolate considerando come elementi solo Si, Ca e P, per il campione BTO AA TEOS TEP CN 40 NTT (sintesi n.4) dopo 14 giorni in SBF. Le percentuali in peso e atomiche sono state ottenute facendo una media su tre aree.

Element	Weight%	SD	Atomic%	SD
Si K	53,60	2,70	60,88	2,81
P K	14,07	1,42	14,49	1,19
Ca K	32,61	2,12	25,95	1,16

In figura 75 sono riportati gli spettri ottenuti tramite l'analisi FTIR sulle particelle core-shell di BTO sintetizzate, a 0, 7 e 14 giorni di immersione in SBF. In questo modo è possibile valutare i cambiamenti nella chimica superficiale all'aumentare del tempo di reazione. Sul grafico sono indicate le zone di assorbimento più rilevanti. Come detto nel paragrafo 2.3.3, il campione BTO AA TEOS TEP CN 40 NTT (sintesi n.3) è stato rinominato BTO SBF per semplicità. I riferimenti di letteratura utilizzati per l'interpretazione dei risultati spettrali sono riportati nelle tabelle 10 e 11 del paragrafo 2.3.2.

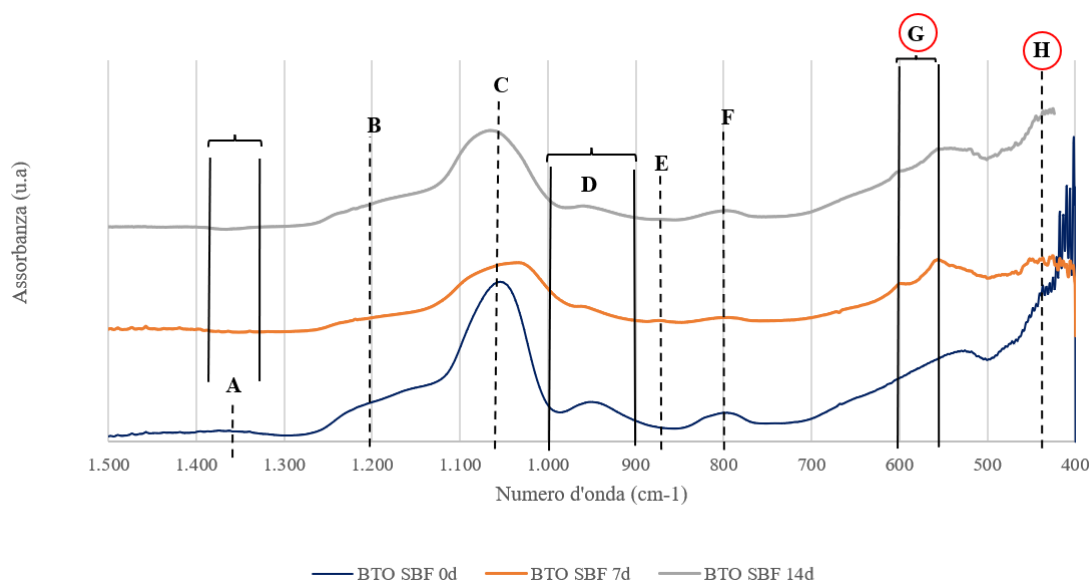


Figura 75. Spettri FTIR relativi alle particelle core-shell di BTO sintetizzate, a 0, 7 e 14 giorni di immersione in SBF.

La banda di assorbimento intorno a circa 1470 cm^{-1} (A) è relativa alla vibrazione dei gruppi carbonato CO_3^{2-} adsorbiti sulla superficie dello shell. Con il trattamento in SBF, come documentato in letteratura, si verifica una divisione di questa banda in due picchi distinti, visibili in maniera minima solo a 14 giorni. Ai gruppi carbonato è anche associato un picco a circa 870 cm^{-1} (E). Negli spettri ottenuti sul campione in esame, a 7 e 14 giorni, l'assorbimento in queste zone è praticamente assente e questo indica che a formarsi non è HCA ma HAp. Questo è giustificato anche dal fatto che la

soluzione SBF presenta una concentrazione molare di ioni HCO_3^- inferiore rispetto al plasma sanguigno umano.

La banda di assorbimento intorno a 1200 cm^{-1} (B) è associata alle vibrazioni del gruppo silossanico Si-O-Si. Nel passare dal campione al giorno 0 al campione al giorno 7, l'assorbimento in questa zona diminuisce per via della rottura dei legami silossanici Si-O-Si a formare legami silanoli Si-OH. Nel passare invece dal campione al giorno 7 al campione al giorno 14, l'assorbimento in questa zona aumenta probabilmente per la condensazione dei gruppi silanoli a formare un gel di silice amorfa. La stessa considerazione vale anche per il picco di assorbimento intorno a 1050 cm^{-1} (C), associato allo stretching asimmetrico dei gruppi Si-O-Si, e per la banda di assorbimento intorno a 800 cm^{-1} (F) relativa al bending dei gruppi Si-O-Si, quest'ultima associata alla formazione di una struttura di silice tridimensionale durante il test di bioattività in SBF.

La banda di assorbimento $1000\text{-}900\text{ cm}^{-1}$ (D), associata alle vibrazioni dei legami SiO_{NBO} , tende a diminuire nel passaggio dal giorno 0 al giorno 7. Questo trova spiegazione nello scambio ionico tra shell bioattivo e la soluzione di immersione, con il rilascio in questo caso degli ioni Ca^{2+} .

La banda di assorbimento nel range $600\text{-}570\text{ cm}^{-1}$ (G), con due picchi visibili a 7 e 14 giorni, è la più importante ai fini della valutazione del test di bioattività in SBF ed è relativa al bending del gruppo P-O-P presente nell'HAp precipitata. La presenza di questa banda, quindi, conferma l'avvenuta precipitazione superficiale durante il test di immersione. Si può osservare anche un assorbimento intorno a 430 cm^{-1} (H): questo è di difficile interpretazione in quanto può riferirsi sia allo stretching simmetrico/rocking dei gruppi Si-O-Si del network vetroso che al bending dei gruppi P-O-P all'interno dell'HAp precipitata. Il rumore di fondo in questa zona rende complicato trarre conclusioni, ma se si considera l'assorbimento in questa zona come rappresentativo del bending dei gruppi P-O-P, vale la pena menzionare l'aumento di assorbimento nel passaggio dal giorno 7 al giorno 14.

3.2 Ossido di zinco

3.2.1 Morfologia e composizione: FE-SEM/EDS

Di seguito si riportano i risultati dell'analisi morfologica e composizionale dei campioni ottenuti nelle diverse sintesi effettuate sulle polveri di ZnO.

In figura 76 sono riportate le immagini FESEM relative alle polveri di ZnO di partenza. Visivamente si può notare una distribuzione di taglia variabile, dell'ordine di centinaia di nanometri. In particolare, negli ingrandimenti a 50000x sono indicate alcune particelle con le loro dimensioni: $Pa_1=605.5$ nm, $Pa_2=102.9$ nm e $Pa_3=242.4$ nm. Si può notare una marcata tendenza all'aggregazione superficiale per via dell'elevata area superficiale tipica delle particelle nanometriche di ZnO. In figura 77 invece è riportato lo spettro EDS con i picchi di emissione caratteristici dell'ossigeno (O, 0.525 keV) e dello zinco (Zn, 1.012 e 8.630 keV). Il picco di emissione relativo al carbonio è probabilmente dovuto al nastro adesivo in carbonio (carbon tape) su cui sono state poste le polveri, mentre quello relativo al platino è dovuto alla metallizzazione delle polveri. Non è riportata la composizione elementare in quanto non di interesse.

Figura 76. Immagini FESEM delle nanopolveri di ZnO di partenza, ad ingrandimenti crescenti (2000x, 10000x, 20000x, 20000x). Nelle ultime due foto sono indicate le dimensioni delle nanopolveri.

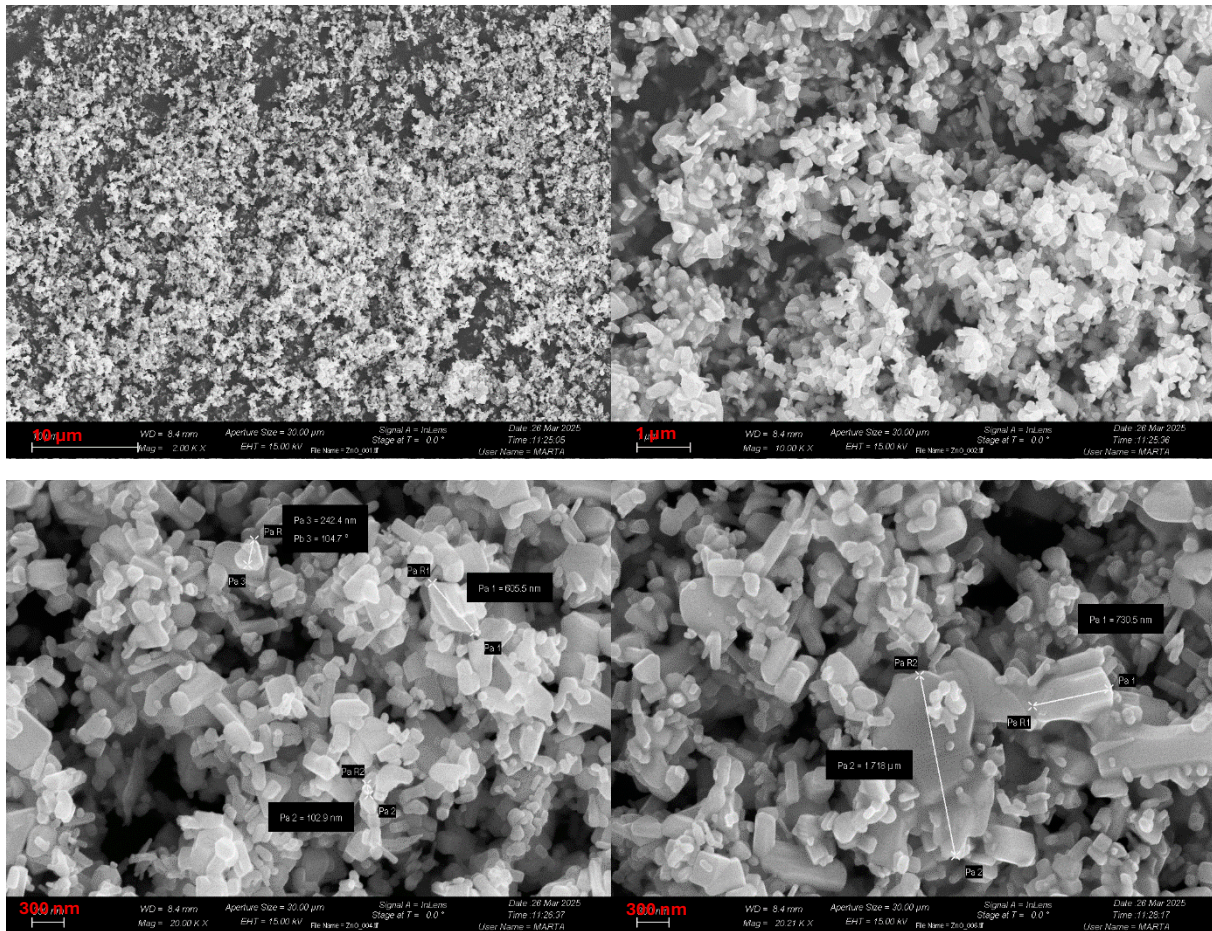
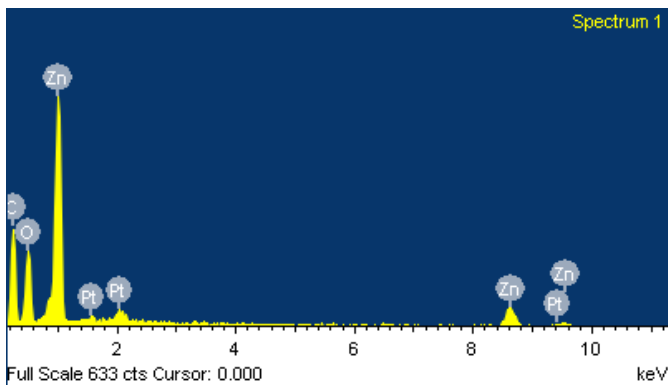


Figura 77. Spettro EDS delle nanopolveri di ZnO di partenza.



Per quanto riguarda la *sintesi n.1* relativa al campione ZnO TEOS, come si osserva in figura 78, non sono visibili cambiamenti della morfologia superficiale delle nanopolveri di partenza. La percentuale atomica di Si rilevata con l'analisi EDS è trascurabile (<0.5 at%), in base a quanto riportato nella tabella di figura 79. Il primo tentativo di sintesi non è andato quindi a buon fine.

Figura 78. Immagini FESEM del campione ZnO TEOS (sintesi n.1), ad ingrandimenti crescenti (2000x, 10000x, 50000x).

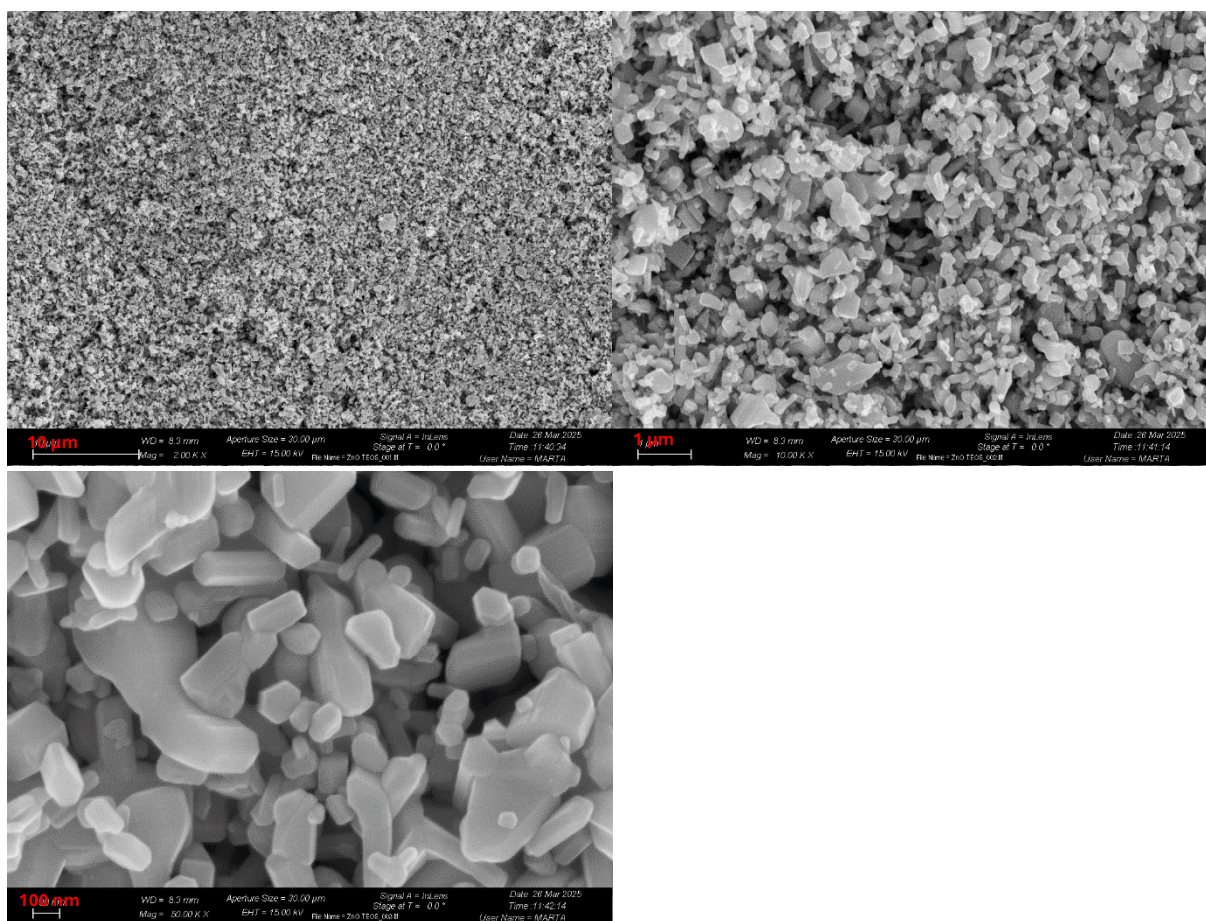
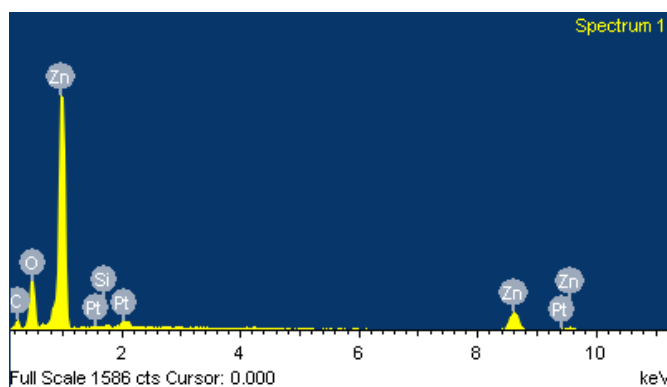


Figura 79. Spettro EDS a sinistra e analisi composizionale a destra del campione ZnO TEOS (sintesi n.1).



Element	Weight%		Atomic%	
	mean	SD	mean	SD
O K	20,61	1,39	51,35	2,18
Si K	0,2	0,19	0,29	0,26
Zn L	79,18	1,36	48,36	2,11

Passando alla *sintesi n.2*, caratterizzata dal pre-trattamento con acido acetico, non si è notato un aumento significativo della percentuale atomica di Si, come si evince dalla tabella in figura 81. Dal punto di vista morfologico, confrontando le immagini FESEM a 50000x delle figure 78 e 80, sembra che la superficie delle polveri diventi più granulosa e rugosa. Dal punto di vista macroscopico, le polveri risultanti da questa prova di sintesi, in seguito alla fase di essiccamento in incubatore, hanno

mostrato un aspetto compatto tipo film. Questo induce a pensare che il pre-trattamento con acido acetico possa aver prodotto acetato di zinco. Ciò è stato indagato con la successiva analisi FTIR, come riportato nel paragrafo 3.2.2.

Figura 80. Immagini FESEM del campione ZnO AA TEOS 1h (sintesi n.2), ad ingrandimenti crescenti (2000x, 10000x, 50000x).

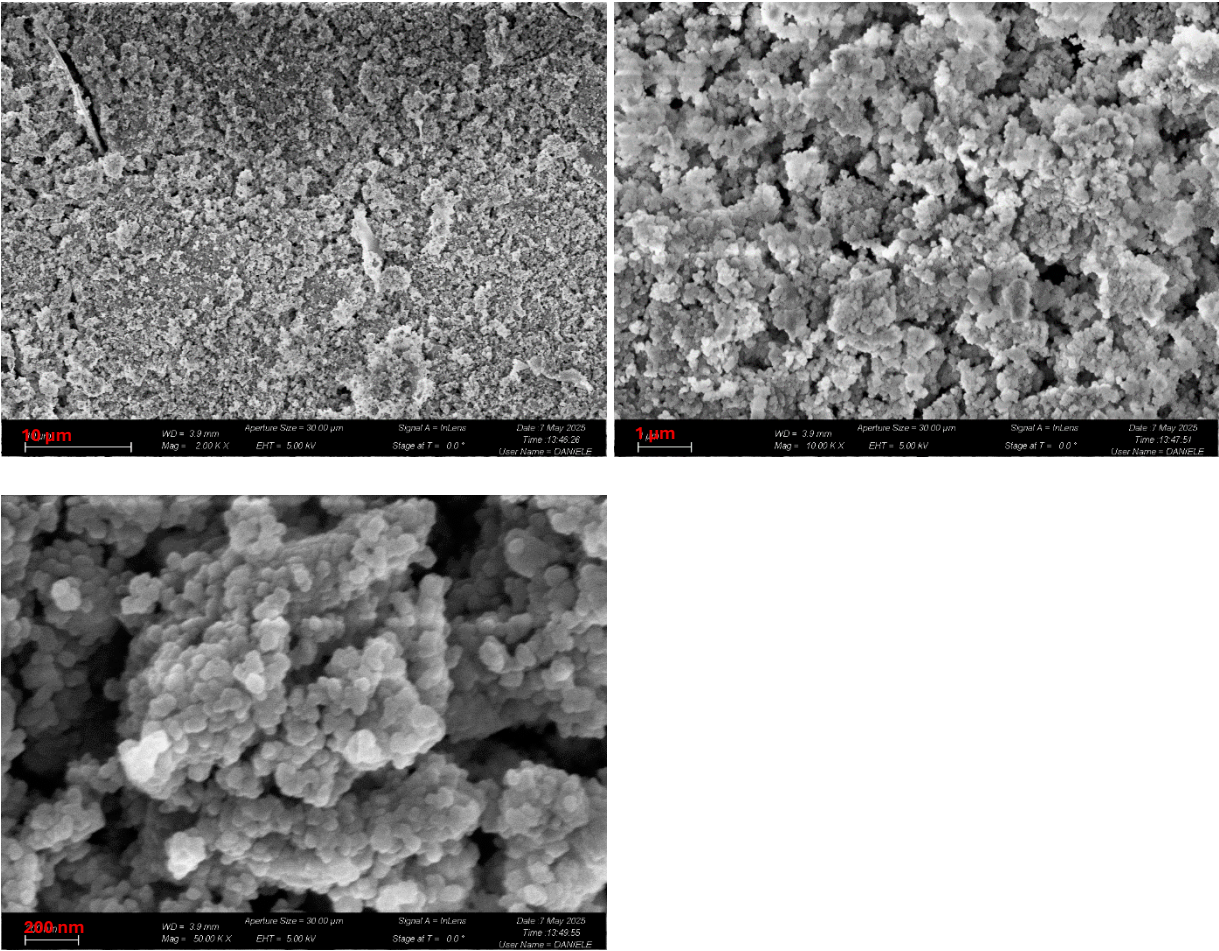
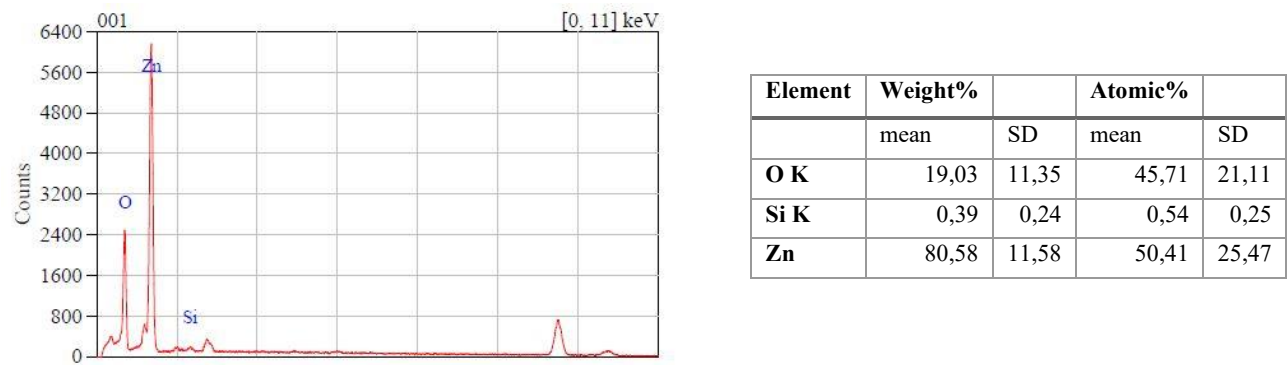
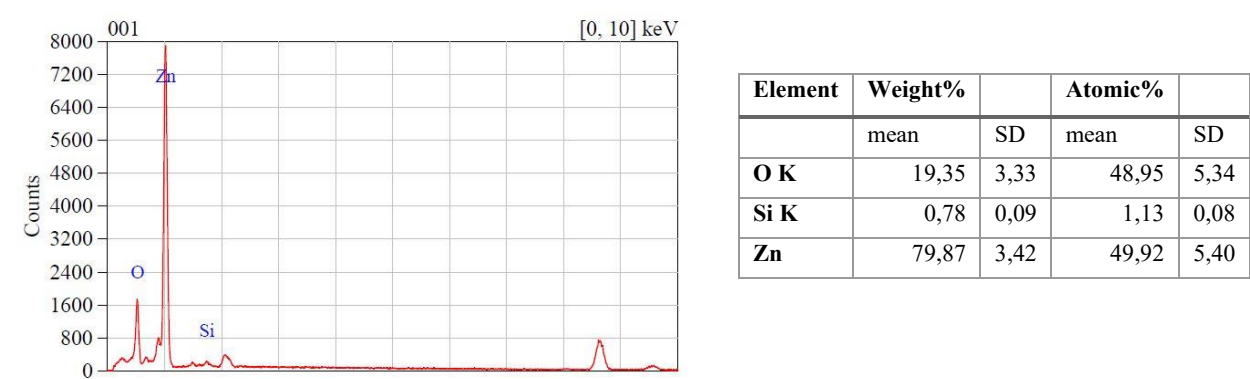


Figura 81. Spettro EDS a sinistra e analisi composizionale a destra del campione ZnO AA TEOS 1h (sintesi n.2).



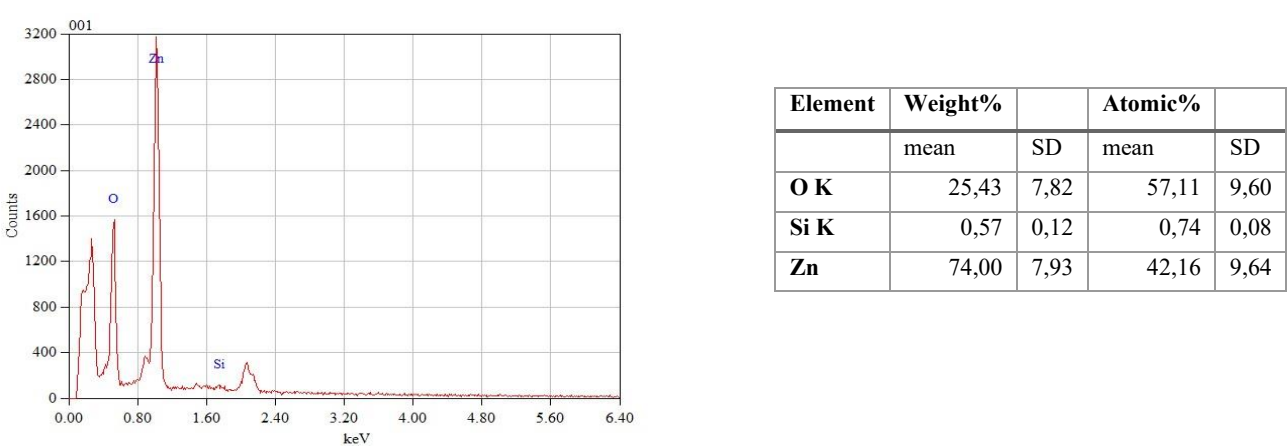
I risultati dell'analisi EDS relativi alla *sintesi n.3*, riportati in figura 82, suggeriscono un leggero aumento della percentuale atomica di Si, pari a 1.13 ± 0.08 at%. Questo risultato è stato ottenuto aumentando il tempo di stirring da 1 h a 24 h. Si tratta comunque di un valore troppo basso per parlare di shell di silice, soprattutto se paragonato al valore ottenuto per il campione BTO AA TEOS TEP CN 40 NTT, descritto nel paragrafo 3.1.1.

Figura 82. Spettro EDS a sinistra e analisi composizionale a destra del campione ZnO TEOS 24h (*sintesi n.3*).



L'ultima *sintesi n.4* è stato un tentativo finale sfruttando un pre-trattamento diverso con acetone. È stato mantenuto un tempo di stirring pari a 24 h dal momento che, in base ai risultati EDS della *sintesi n.3*, è risultato essere migliorativo. Come riportato nella tabella di figura 83, anche quest'ultima prova di sintesi non ha consentito di depositare sufficiente silice sul core di ZnO (<1 at%).

Figura 83. Spettro EDS a sinistra e analisi composizionale a destra del campione ZnO acetone TEOS 24h (*sintesi n.4*).



In conclusione, le analisi morfologiche e composizionali condotte sulle polveri di ZnO, trattate tramite processo Stober, non hanno fornito ottimi risultati. È importante individuare un metodo di pre-trattamento del core di ZnO che favorisca la condensazione superficiale del TEOS idrolizzato. In aggiunta, i risultati EDS sono risultati migliorati nel caso di stirring a 24 h piuttosto che a 1h.

3.2.2 Chimica superficiale: FTIR-ATR

In figura 84 sono riportati gli spettri FTIR ottenuti sulle polveri di ZnO di partenza, sul campione ZnO AA TEOS 1h (sintesi n.2) e sul campione ZnO TEOS 24h (sintesi n.3). L'obiettivo è stato valutare la formazione dello shell di silice.

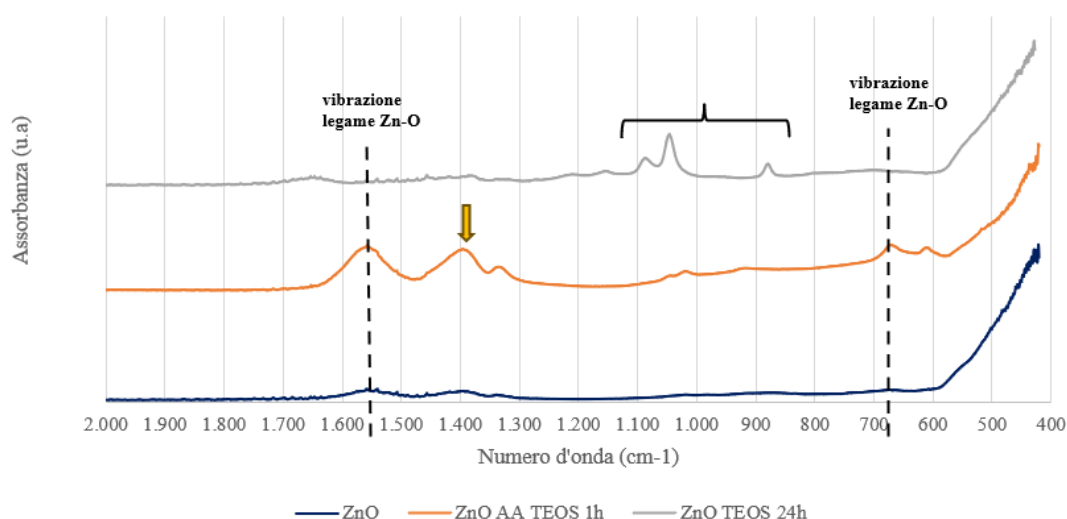


Figura 84. Spettri FTIR delle polveri di ZnO di partenza, del campione ZnO AA TEOS 1h (sintesi n.2) e del campione ZnO TEOS 24h (sintesi n.3).

Le linee tratteggiate sono riportate in corrispondenza dei picchi di assorbimento relativi alle vibrazioni dei legami Zn-O (intorno a 1565 cm^{-1} e intorno a 685 cm^{-1}), dovuti al core di ZnO [110].

Lo spettro FTIR del campione ZnO AA TEOS 1h (curva in arancione) conferma la formazione di acetato di zinco per via del pre-trattamento con acido acetico, in quanto sono presenti due larghi picchi intorno a 1400 cm^{-1} (come indicato dalla freccia in arancione) e intorno a 1600 cm^{-1} . Si tratta di due picchi associati allo stretching dei gruppi carbossilici dell'acetato di zinco [124]. Questo è in linea con l'aspetto simile ad un film compatto mostrato dalle polveri rivestite, alla fine della fase di essiccamento in incubatore a 37°C . Il picco intorno a 1600 cm^{-1} presenta però una sovrapposizione con la banda associata alla vibrazione del legame Zn-O.

La banda di assorbimento caratteristica del rivestimento di silice ($1200\text{-}900\text{ cm}^{-1}$) è leggermente visibile soltanto sullo spettro del campione ZnO TEOS 24h (curva in grigio): infatti sono presenti due picchi di assorbimento intorno a 1050 cm^{-1} (stretching asimmetrico gruppo Si-O-Si) e intorno a circa 880 cm^{-1} (stretching simmetrico gruppo Si-O-Si). L'analisi di quest'ultimo campione, quindi, mostra che si è verificata una minima condensazione superficiale, sul core, del TEOS idrolizzato. Questo è in linea con i risultati dell'analisi composizionale EDS che hanno rilevato una percentuale atomica pari a 1.13 at%, come riportato in figura 82.

4. Conclusioni

L'*analisi di letteratura* ha mostrato che negli ultimi 5 anni diversi gruppi di ricerca hanno cercato di unire in un'unica formulazione BTO o ZnO con una fase vetrosa bioattiva. È stato osservato che gli studi relativi al BTO si sono incentrati maggiormente sulle sue proprietà piezoelettriche e/o dielettriche, mentre per quanto riguarda lo ZnO si è ancora poco propensi ad indagarne la piezoelettricità ma ci si focalizza maggiormente su altre proprietà quali antibatteriche e fotocatalitiche. In aggiunta, il numero di lavori e articoli scientifici relativi al BTO superiori rispetto a quelli sullo ZnO.

Nel caso del BTO la direzione applicativa è quella degli scaffold, utilizzando tecniche di 3D printing quali gas extrusion, binder jetting o la tecnica convenzionale freeze-casting. Le polveri di partenza vengono mescolate insieme ad un legante polimerico in modo da ottenere uno slurry poi sottoposto a stampa, sinterizzazione e polarizzazione nel caso in cui si vogliano studiare le proprietà piezoelettriche. Sicuramente la tecnica di miscelamento allo stato solido delle diverse polveri di partenza, della fase piezoelettrica e della fase bioattiva, è più consolidata e ha già permesso di ottenere degli scaffold multifunzionali, sui quali sono stati condotti studi relativi alle proprietà piezoelettriche e bioattive e sull'equilibrio tra essi. Per quanto riguarda l'approccio core-shell per rivestire core di BTO con uno shell bioattivo, l'analisi di letteratura ha riscontrato un solo lavoro rilevante, risalente al 2020: quello di Z. Yang et al. [108], in cui un core di BTO viene rivestito da uno shell di BG a composizione $\text{SiO}_2\text{-CaO}$, utilizzando un metodo sol-gel assistito da ultrasuoni. Gli autori si sono spinti sino alla realizzazione di uno scaffold vero e proprio ed hanno effettuato test di piezoelettricità e di bioattività a breve termine. A parte questo, diversi lavori si sono concentrati sul rivestimento del core di BTO con shell a base di sola silice, senza però introdurre ioni modificatori. In generale gli studi si sono rilevati carenti per quanto riguarda la valutazione del rilascio di ioni Ba^{2+} , per idrolisi a contatto con soluzioni fisiologiche.

Nel caso dello ZnO, invece, la direzione applicativa è quella di riempitivi all'interno di matrici polimeriche o di rivestimenti utilizzando tecniche come l'EPD. Diversi studi hanno cercato di rivestire un core di ZnO ma soltanto con uno shell a base di silice, con l'obiettivo di migliorarne la dispersibilità e ridurre l'aggregazione o per modulare le proprietà di fotocatalisi. Il lavoro più rilevante individuato è quello di F. Aghili et al. [113], in cui anche qui lo shell è base di BG a composizione $\text{SiO}_2\text{-CaO}$. In questo studio la bioattività, del rivestimento finale realizzato tramite EPD, è stata indagata ma non sono state considerate invece le proprietà piezoelettriche. Anche nel caso dello ZnO, mancano in generale test cellulari e valutazioni del rilascio di ioni Zn^{2+} . Uno spunto

interessante, derivante l'analisi dei lavori, riguarda la possibilità di indurre la formazione dello shell bioattivo contemporaneamente alla nucleazione del core piezoelettrico in soluzione, tramite il metodo sol-gel.

In entrambi i casi, core di BTO o core di ZnO, il metodo che è stato più utilizzato è il processo Stober modificato o anche un metodo sol-gel modificato con ultrasuoni. In nessun lavoro analizzato è stato ottenuto uno shell a composizione ternaria $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$, utilizzando anche il precursore TEP oltre ai precursori TEOS e CN.

Come detto, lo ZnO risulta poco indagato dal punto di vista delle proprietà piezoelettriche. Sviluppo futuro può essere quello di utilizzare come core di partenza non nanoparticelle o nanopolveri bensì altre nanostrutture più funzionali da questo punto di vista. Si è infatti osservato che alla nanoscala la piezoelettricità è mantenuta e che ottime risposte piezoelettriche sono fornite da nanowires, nanosheets, nanobelts e nanorods. Non tutte queste nanostrutture sono però acquistabili in commercio, quindi è necessario anche valutare la possibilità di sintetizzarle in laboratorio utilizzando per esempio la sintesi idrotermale.

Per quanto riguarda la *parte sperimentale di laboratorio*, uno specifico protocollo di sintesi identificato come sintesi n.4, ha fornito risultati incoraggianti. Nel dettaglio, una temperatura post-aggiunta dell'ammoniaca pari a 40°C e l'assenza di un trattamento termico finale hanno portato una maggiore deposizione di silice prima e di un vetro bioattivo in seguito. La più elevata temperatura rispetto a quella ambientale, in base a considerazione teoriche di letteratura, favorirebbe la formazione e nucleazione di monomeri idrolizzati di TEOS piuttosto che la loro aggregazione e in generale fornisce energia al processo. Per quanto riguarda l'effetto del trattamento termico, i risultati EDS suggeriscono un effetto positivo per quanto riguarda l'ingresso degli ioni modificatori nello shell di silice formatosi sul core di BTO, come già dimostrato in letteratura per i vetri bioattivi. Altri parametri di sintesi che hanno avuto un ruolo importante sono stati il pre-trattamento con acido acetico, l'aumento del rapporto etanolo/acqua e l'aumento del contenuto di ammoniaca per portare il pH da 9.5 a 10.5. I risultati di caratterizzazione hanno mostrato che nello shell di BG sintetizzato è entrato un buon quantitativo di ioni modificatori calcio e fosforo, supportato dalla riscontrata bioattività delle polveri a 7 e 14 giorni e dalla morfologia a foglio dei precipitati superficiali di HAp. Anche nella sintesi a Tamb e senza trattamento termico si è ottenuto uno shell bioattivo, ma la percentuale atomica di silicio in superficie è risultata essere minore rispetto ai campioni ottenuti a 40°C.

Per quanto riguarda le sintesi sullo ZnO, queste non hanno portato ad una condensazione sufficiente di monomeri idrolizzati di TEOS. Sarà necessario in futuro indagare pre-trattamenti superficiali che

garantiscono la realizzazione del rivestimento, per esempio utilizzando metodi di idrossilazione più efficaci o agendo sulla carica superficiale dei core in modo da facilitare il legame con i gruppi Si-OH carichi negativamente in condizioni basiche (pH 10-11). Una considerazione interessante è che uno stirring finale più lungo, fino a 24h, permette un rivestimento migliore.

L'aspetto innovativo di questa tesi è l'aver rivestito polveri di BTO con uno shell bioattivo di composizione $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$ e soprattutto l'aver dimostrato la bioattività a livello particellare. In futuro sarà necessario utilizzare queste polveri per ottenere scaffolds o rivestimenti con proprietà piezoelettriche e bioattive o utilizzarle come riempitivo in matrici polimeriche. Futuri test saranno svolti per valutare la piezoelettricità dei campioni ottenuti, fondamentale sarà anche effettuare test di rilascio ionico e valutare la citocompatibilità.

Bibliografia

- [1] X. Feng, ‘Chemical and Biochemical Basis of Cell-Bone Matrix Interaction in Health and Disease’, *Current chemical biology*, vol. 3, no. 2, p. 189, May 2009, doi: 10.2174/187231309788166398.
- [2] X. Lin, S. Patil, Y.-G. Gao, and A. Qian, ‘The Bone Extracellular Matrix in Bone Formation and Regeneration’, *Frontiers in Pharmacology*, vol. 11, p. 757, May 2020, doi: 10.3389/fphar.2020.00757.
- [3] S. A. Kamel-ElSayed, T. A. Nezwek, and M. A. Varacallo, ‘Physiology, Bone’, in *StatPearls*, Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2025. Accessed: July 22, 2025. [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK441968/>
- [4] R. Florencio-Silva, G. R. da S. Sasso, E. Sasso-Cerri, M. J. Simões, and P. S. Cerri, ‘Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells’, *Biomed Res Int*, vol. 2015, p. 421746, 2015, doi: 10.1155/2015/421746.
- [5] ‘Bone Cortical And Cancellous’, Physiopedia. Accessed: July 22, 2025. [Online]. Available: https://www.physio-pedia.com/Bone_Cortical_And_Cancellous
- [6] Y. Bai *et al.*, ‘Application of Bioactive Materials for Osteogenic Function in Bone Tissue Engineering’, *Small Methods*, vol. 8, no. 8, Aug. 2024, doi: 10.1002/smt.202301283.
- [7] J. Huang *et al.*, ‘Effect of Angiogenesis in Bone Tissue Engineering’, *Annals of Biomedical Engineering*, vol. 50, no. 8, pp. 898–913, Aug. 2022, doi: 10.1007/s10439-022-02970-9.
- [8] N. Abbasi, S. Hamlet, R. M. Love, and N. T. Nguyen, ‘Porous scaffolds for bone regeneration’, *Journal of Science: Advanced Materials and Devices*, vol. 5, no. 1, pp. 1–9, Mar. 2020, doi: 10.1016/j.jsamd.2020.01.007.
- [9] A. R. Amini, C. T. Laurencin, and S. P. Nukavarapu, ‘Bone Tissue Engineering: Recent Advances and Challenges’, 2012.
- [10] G. Fernandez de Grado *et al.*, ‘Bone substitutes: a review of their characteristics, clinical use, and perspectives for large bone defects management’, *Journal of Tissue Engineering*, vol. 9, June 2018, doi: 10.1177/2041731418776819.
- [11] V. Perrotti, A. Piattelli, A. Quaranta, G. Gómez-Moreno, and G. Iezzi, ‘Biocompatibility of dental biomaterials’, in *Biocompatibility of Dental Biomaterials*, Elsevier, 2016, pp. 1–7. doi: 10.1016/B978-0-08-100884-3.00001-1.
- [12] D. W. Hutmacher, ‘Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage’, 2000.
- [13] E. Vernè, ‘Dispensa Bioattività’, Politecnico di Torino, 2021.
- [14] P. Kazimierzczak and A. Przekora, ‘Osteoconductive and osteoinductive surface modifications of biomaterials for bone regeneration: A concise review’, *Coatings*, vol. 10, no. 10, pp. 1–25, Oct. 2020, doi: 10.3390/coatings10100971.

- [15] P. He, S. Sahoo, K. S. Ng, K. Chen, S. L. Toh, and J. C. H. Goh, 'Enhanced osteoinductivity and osteoconductivity through hydroxyapatite coating of silk-based tissue-engineered ligament scaffold', *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, vol. 101 A, no. 2, pp. 555–566, Feb. 2013, doi: 10.1002/jbm.a.34333.
- [16] T. Albrektsson and C. Johansson, 'Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration', *European Spine Journal*, vol. 10, pp. S96–S101, 2001, doi: 10.1007/s005860100282.
- [17] M. Santin and G. Phillips, 'History of Biomimetic, Bioactive and Bioresponsive Biomaterials', in *Biomimetic, Bioresponsive, and Bioactive Materials: An Introduction to Integrating Materials with Tissues*, John Wiley and Sons, 2012, pp. 1–34. doi: 10.1002/9781118129906.ch1.
- [18] H. Qu, H. Fu, Z. Han, and Y. Sun, 'Biomaterials for bone tissue engineering scaffolds: A review', *RSC Advances*, vol. 9, no. 45, pp. 26252–26262, 2019, doi: 10.1039/c9ra05214c.
- [19] L. L. Hench and Polak Julia M., 'Third-generation biomedical materials', *Science* 295, Feb. 2002. doi: 10.1126/science.1067404.
- [20] L. L. Hench, 'Journal of the American Ceramic Society - 2005 - Hench - Bioceramics', *Journal of the American Ceramic Society*, vol. 81, no. Bioceramics, pp. 1705–1728, 1998.
- [21] F. Baino *et al.*, 'Glasses and Glass–Ceramics for Biomedical Applications', in *PoliTO Springer Series*, Springer Science and Business Media Deutschland GmbH, 2021, pp. 153–201. doi: 10.1007/978-3-030-85776-9_5.
- [22] D. T. J. Barone, J. M. Raquez, and P. Dubois, 'Bone-guided regeneration: From inert biomaterials to bioactive polymer (nano)composites', *Polymers for Advanced Technologies*, vol. 22, no. 5, pp. 463–475, May 2011, doi: 10.1002/pat.1845.
- [23] D. A. Florea, V. Grumezescu, A. M. Grumezescu, and E. Andronescu, 'Clinical applications of bioactive materials', in *Materials for Biomedical Engineering: Bioactive Materials, Properties, and Applications*, Elsevier, 2019, pp. 527–543. doi: 10.1016/B978-0-12-818431-8.00016-7.
- [24] L. L. Hench, D. L. Wheeler, and D. C. Greenspan, 'Molecular Control of Bioactivity in Sol-Gel Glasses', *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, vol. 13, no. 1–3, pp. 245–250, Jan. 1998, doi: 10.1023/a:1008643303888.
- [25] L. L. Hench, 'The story of Bioglass®', in *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, Nov. 2006, pp. 967–978. doi: 10.1007/s10856-006-0432-z.
- [26] V. Krishnan and T. Lakshmi, 'Bioglass: A novel biocompatible innovation', in *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology and Research*, Wolters Kluwer Medknow Publications, 2013, pp. 78–83. doi: 10.4103/2231-4040.111523.
- [27] Y. Gao, M. A. Seles, and M. Rajan, 'Role of bioglass derivatives in tissue regeneration and repair: A review', *Reviews on Advanced Materials Science*, vol. 62, no. 1, Jan. 2023, doi: 10.1515/rams-2022-0318.

- [28] S. Mondal *et al.*, ‘Hydroxyapatite: A journey from biomaterials to advanced functional materials’, *Advances in Colloid and Interface Science*, vol. 321, Nov. 2023, doi: 10.1016/j.cis.2023.103013.
- [29] E. Vernè, ‘Dispensa Riempitivi ossei’, Politecnico di Torino, 2021.
- [30] D. S. Brauer, ‘Bioactive glasses - Structure and properties’, *Angewandte Chemie - International Edition*, vol. 54, no. 14, pp. 4160–4181, Mar. 2015, doi: 10.1002/anie.201405310.
- [31] A. Shearer, M. Montazerian, and J. C. Mauro, ‘Modern definition of bioactive glasses and glass-ceramics’, *Journal of Non-Crystalline Solids*, vol. 608, May 2023, doi: 10.1016/j.jnoncrysol.2023.122228.
- [32] G. Turnbull *et al.*, ‘3D bioactive composite scaffolds for bone tissue engineering’, *Bioactive Materials*, vol. 3, no. 3, pp. 278–314, Sept. 2018, doi: 10.1016/j.bioactmat.2017.10.001.
- [33] A. De, P. Martín, and D. S. Brauer, ‘2 Crystallization of Glasses and Its Impact on Bioactivity and Other Properties’, 2022.
- [34] M. Wang, ‘Developing bioactive composite materials for tissue replacement’, *Biomaterials*, vol. 24, no. 13, pp. 2133–2151, 2003, doi: 10.1016/S0142-9612(03)00037-1.
- [35] M. N. Rahaman, W. Xiao, and W. Huang, ‘Bioactive glass composites for bone and musculoskeletal tissue engineering’, in *Bioactive Glasses: Materials, Properties and Applications, Second Edition*, Elsevier, 2017, pp. 285–336. doi: 10.1016/B978-0-08-100936-9.00013-7.
- [36] G. Kaur, G. Pickrell, N. Sriranganathan, V. Kumar, and D. Homa, ‘Review and the state of the art: Sol–gel and melt quenched bioactive glasses for tissue engineering’, *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials*, vol. 104, no. 6, pp. 1248–1275, Aug. 2016, doi: 10.1002/jbm.b.33443.
- [37] L. L. Hench and J. K. West, ‘The Sol-Gel Process’, *Chemical Reviews*, vol. 90, no. 1, pp. 33–72, Jan. 1990, doi: 10.1021/cr00099a003.
- [38] A. E. Danks, S. R. Hall, and Z. Schnepp, ‘The evolution of “sol-gel” chemistry as a technique for materials synthesis’, *Materials Horizons*, vol. 3, no. 2, pp. 91–112, Mar. 2016, doi: 10.1039/c5mh00260e.
- [39] C. J. Brinker and G. W. Scherer, ‘Sol-Gel Science The Physics and Chemistry of Sol-Gel Processing’, 1990, doi: <https://doi.org/10.1016/C2009-0-22386-5>.
- [40] A. T. Contreras Jaimes, G. Poologasundarampillai, and D. S. Brauer, ‘Bioactive Glasses’, in *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*, Wiley, 2019, pp. 1–41. doi: 10.1002/0471238961.koe00050.
- [41] V. Pawar and V. Shinde, ‘Bioglass and hybrid bioactive material: A review on the fabrication, therapeutic potential and applications in wound healing’, *Hybrid Advances*, vol. 6, Aug. 2024, doi: 10.1016/j.hybadv.2024.100196.

- [42] K. Deshmukh, T. Kovářík, T. Křenek, D. Docheva, T. Stich, and J. Pola, ‘Recent advances and future perspectives of sol-gel derived porous bioactive glasses: a review’, *RSC Advances*, vol. 10, no. 56, pp. 33782–33835, Sept. 2020, doi: 10.1039/d0ra04287k.
- [43] D. E. Clark, ‘Infrared spectroscopy of silica sols-effects of water concentration, catalyst, and aging’, *Spectroscopy Letters*, vol. 25, no. 2, pp. 201–220, 1992, doi: 10.1080/00387019208020687.
- [44] M. Erol-Taygun, K. Zheng, and A. R. Boccaccini, ‘Nanoscale Bioactive Glasses in Medical Applications’, *International Journal of Applied Glass Science*, vol. 4, no. 2, pp. 136–148, June 2013, doi: 10.1111/ijag.12029.
- [45] L. Krishnan, P. Chakrabarty, K. Govarthan, S. Rao, and T. S. Santra, ‘Bioglass and nano bioglass: A next-generation biomaterial for therapeutic and regenerative medicine applications’, *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 277, Oct. 2024, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2024.133073.
- [46] A. dos Santos da Silva and J. H. Z. dos Santos, ‘Stöber method and its nuances over the years’, *Advances in Colloid and Interface Science*, vol. 314, Apr. 2023, doi: 10.1016/j.cis.2023.102888.
- [47] Y. Naka, Y. Komori, and H. Yoshitake, ‘One-pot synthesis of organo-functionalized monodisperse silica particles in W/O microemulsion and the effect of functional groups on addition into polystyrene’, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, vol. 361, no. 1–3, pp. 162–168, 2010, doi: 10.1016/j.colsurfa.2010.03.034.
- [48] W. Stober, A. Fink, and D. Ernst Bohn, ‘Controlled Growth of Monodisperse Silica Spheres in the Micron Size Range 1’, 1968.
- [49] K. Tadanaga, K. Morita, K. Mori, and M. Tatsumisago, ‘Synthesis of monodispersed silica nanoparticles with high concentration by the Stöber process’, *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, vol. 68, no. 2, pp. 341–345, Nov. 2013, doi: 10.1007/s10971-013-3175-6.
- [50] P. P. Ghimire and M. Jaroniec, ‘Renaissance of Stöber method for synthesis of colloidal particles: New developments and opportunities’, *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 584, pp. 838–865, Feb. 2021, doi: 10.1016/j.jcis.2020.10.014.
- [51] Y. Han *et al.*, ‘Unraveling the growth mechanism of silica particles in the stöber method: In situ seeded growth model’, *Langmuir*, vol. 33, no. 23, pp. 5879–5890, June 2017, doi: 10.1021/acs.langmuir.7b01140.
- [52] X. Jiang, X. Tang, L. Tang, B. Zhang, and H. Mao, ‘Synthesis and formation mechanism of amorphous silica particles via sol–gel process with tetraethylorthosilicate’, *Ceramics International*, vol. 45, no. 6, pp. 7673–7680, Apr. 2019, doi: 10.1016/j.ceramint.2019.01.067.
- [53] N. Pajares-Chamorro and X. Chatzistavrou, ‘Bioactive Glass Nanoparticles for Tissue Regeneration’, *ACS Omega*, vol. 5, no. 22, pp. 12716–12726, June 2020, doi: 10.1021/acsomega.0c00180.
- [54] K. Zheng and A. R. Boccaccini, ‘Sol-gel processing of bioactive glass nanoparticles: A review’, *Advances in Colloid and Interface Science*, vol. 249, pp. 363–373, Nov. 2017, doi: 10.1016/j.cis.2017.03.008.

- [55] X. Yuan, J. Shi, Y. Kang, J. Dong, Z. Pei, and X. Ji, 'Piezoelectricity, Pyroelectricity, and Ferroelectricity in Biomaterials and Biomedical Applications', *Advanced Materials*, vol. 36, no. 3, p. 2308726, Jan. 2024, doi: 10.1002/adma.202308726.
- [56] N. A. Kamel, 'Bio-piezoelectricity: fundamentals and applications in tissue engineering and regenerative medicine', *Biophysical Reviews*, vol. 14, no. 3, pp. 717–733, June 2022, doi: 10.1007/s12551-022-00969-z.
- [57] S. Jiang, L. Jin, H. Hou, and L. Zhang, 'Chapter 8 - Polymer-Based Nanocomposites with High Dielectric Permittivity', in *Polymer-Based Multifunctional Nanocomposites and Their Applications*, K. Song, C. Liu, and J. Z. Guo, Eds, Elsevier, 2019, pp. 201–243. doi: 10.1016/B978-0-12-815067-2.00008-1.
- [58] M. Ohring, '11 - ELECTRICAL PROPERTIES OF METALS, INSULATORS, AND DIELECTRICS', in *Engineering Materials Science*, M. Ohring, Ed., San Diego: Academic Press, 1995, pp. 559–610. doi: 10.1016/B978-012524995-9/50035-0.
- [59] A. K. Bain and P. Chand, *Ferroelectrics: Principles and Applications*. Newark, GERMANY: John Wiley & Sons, Incorporated, 2017. Accessed: Aug. 02, 2025. [Online]. Available: <http://ebookcentral.proquest.com/lib/polito-ebooks/detail.action?docID=4794334>
- [60] L. Jing-Feng, *Lead-Free Piezoelectric Materials*. 2021.
- [61] T. Zhang and Q. Hua, 'Piezoelectric materials and their applications', in *Emergent Micro and Nanomaterials for Optical, Infrared, and Terahertz Applications*, CRC Press, 2022, pp. 329–362. doi: 10.1201/9781003202608-12.
- [62] S. Gorfman and N. Zhang, 'Piezoelectric Coefficients and Crystallographic Symmetry', in *Piezoelectric Materials*, 1st edn, J. Wu, Ed., Wiley, 2024, pp. 1–15. doi: 10.1002/9783527841233.ch1.
- [63] S. S. Dani, A. Tripathy, N. R. Alluri, S. Balasubramaniam, and A. Ramadoss, 'A critical review: the impact of electrical poling on the longitudinal piezoelectric strain coefficient', *Mater. Adv.*, vol. 3, no. 24, pp. 8886–8921, 2022, doi: 10.1039/D2MA00559J.
- [64] M. T. Chorsi *et al.*, 'Piezoelectric Biomaterials for Sensors and Actuators', *Advanced Materials*, vol. 31, no. 1, Jan. 2019, doi: 10.1002/adma.201802084.
- [65] H. Huang *et al.*, 'Piezoelectric biomaterials for providing electrical stimulation in bone tissue engineering: Barium titanate', *Journal of Orthopaedic Translation*, vol. 51, pp. 94–107, Mar. 2025, doi: 10.1016/j.jot.2024.12.011.
- [66] J. Jacob, N. More, K. Kalia, and G. Kapusetti, 'Piezoelectric smart biomaterials for bone and cartilage tissue engineering', *Inflammation and Regeneration*, vol. 38, no. 1, Feb. 2018, doi: 10.1186/s41232-018-0059-8.
- [67] A. H. Rajabi, M. Jaffe, and T. L. Arinzeh, 'Piezoelectric materials for tissue regeneration: A review', *Acta Biomaterialia*, vol. 24, pp. 12–23, Sept. 2015, doi: 10.1016/j.actbio.2015.07.010.

- [68] X. Zhang *et al.*, ‘Electrical stimulation system based on electroactive biomaterials for bone tissue engineering’, *Materials Today*, vol. 68, pp. 177–203, Sept. 2023, doi: 10.1016/j.mattod.2023.06.011.
- [69] E. Fukada and I. Yasuda, ‘Piezoelectric Effects in Collagen’, *Jpn. J. Appl. Phys.*, vol. 3, no. 2, p. 117, Feb. 1964, doi: 10.1143/JJAP.3.117.
- [70] A. A. Marino, R. O. Becker, and S. C. Soderholm, ‘Origin of the piezoelectric effect in bone’, *Calc. Tis Res.*, vol. 8, no. 1, pp. 177–180, Dec. 1971, doi: 10.1007/BF02010135.
- [71] M. Minary-Jolandan and M.-F. Yu, ‘Nanoscale characterization of isolated individual type I collagen fibrils: polarization and piezoelectricity’, *Nanotechnology*, vol. 20, no. 8, p. 085706, Feb. 2009, doi: 10.1088/0957-4484/20/8/085706.
- [72] E. Fukada and I. Yasuda, ‘On the Piezoelectric Effect of Bone’, *J. Phys. Soc. Jpn.*, vol. 12, no. 10, pp. 1158–1162, Oct. 1957, doi: 10.1143/JPSJ.12.1158.
- [73] N. More and G. Kapusetti, ‘Piezoelectric material – A promising approach for bone and cartilage regeneration’, *Medical Hypotheses*, vol. 108, pp. 10–16, Oct. 2017, doi: 10.1016/j.mehy.2017.07.021.
- [74] M. Acosta *et al.*, ‘BaTiO₃-based piezoelectrics: Fundamentals, current status, and perspectives’, *Applied Physics Reviews*, vol. 4, no. 4, Dec. 2017, doi: 10.1063/1.4990046.
- [75] A. Sood *et al.*, ‘A Comprehensive Review on Barium Titanate Nanoparticles as a Persuasive Piezoelectric Material for Biomedical Applications: Prospects and Challenges’, *Small*, vol. 19, no. 12, p. 2206401, 2023, doi: 10.1002/smll.202206401.
- [76] H. Huang *et al.*, ‘Piezoelectric biomaterials for providing electrical stimulation in bone tissue engineering: Barium titanate’, *Journal of Orthopaedic Translation*, vol. 51, pp. 94–107, Mar. 2025, doi: 10.1016/j.jot.2024.12.011.
- [77] M. Fakhar-e-Alam *et al.*, ‘Synthesis, Characterization, and Application of BaTiO₃ Nanoparticles for Anti-Cancer Activity’, *J Clust Sci*, vol. 34, no. 4, pp. 1745–1755, July 2023, doi: 10.1007/s10876-022-02346-y.
- [78] B. Wu *et al.*, ‘Origin of ultrahigh-performance barium titanate-based piezoelectrics: Stannum-induced intrinsic and extrinsic contributions’, *Nat Commun*, vol. 15, no. 1, p. 7700, Sept. 2024, doi: 10.1038/s41467-024-52031-z.
- [79] S. M. Gaytan *et al.*, ‘Fabrication of barium titanate by binder jetting additive manufacturing technology’, 2015.
- [80] H. Takahashi, Y. Numamoto, J. Tani, K. Matsuta, J. Qiu, and S. Tsurekawa, ‘Lead-Free Barium Titanate Ceramics with Large Piezoelectric Constant Fabricated by Microwave Sintering’, *Jpn. J. Appl. Phys.*, vol. 45, no. 1L, p. L30, Jan. 2006, doi: 10.1143/JJAP.45.L30.
- [81] B. Dai *et al.*, ‘Piezoelectric grain-size effects of BaTiO₃ ceramics under different sintering atmospheres’, *Journal of Materials Science: Materials in Electronics*, vol. 28, no. 11, pp. 7928–7934, June 2017, doi: 10.1007/s10854-017-6494-5.

- [82] H. Budharaju *et al.*, ‘Ceramic materials for 3D printing of biomimetic bone scaffolds – Current state-of-the-art & future perspectives’, *Materials and Design*, vol. 231, July 2023, doi: 10.1016/j.matdes.2023.112064.
- [83] Y.-J. Park, K.-S. Hwang, J.-E. Song, J. L. Ong, and H. R. Rawls, ‘Growth of calcium phosphate on poling treated ferroelectric BaTiO₃ ceramics’, 2002.
- [84] R. Schönlein *et al.*, ‘Enhanced Piezoelectric Properties of Poly(L-lactide) Nanocomposite Microfiber Scaffolds Due to Polydopamine-Coating of Barium Titanate Nanoparticles’, *Advanced Materials Interfaces*, vol. 12, no. 1, p. 2400546, 2025, doi: 10.1002/admi.202400546.
- [85] R. H. Huang *et al.*, ‘Comparison of Methods for Surface Modification of Barium Titanate Nanoparticles for Aqueous Dispersibility: Toward Biomedical Utilization of Perovskite Oxides’, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 12, no. 46, pp. 51135–51147, Nov. 2020, doi: 10.1021/acsami.0c10063.
- [86] M. C. Blanco-Lopez, B. Rand, and F. L. Riley, ‘The properties of aqueous phase suspensions of barium titanate’, *Journal of the European Ceramic Society*, vol. 17, no. 2, pp. 281–287, Jan. 1997, doi: 10.1016/S0955-2219(96)00116-1.
- [87] C. Polley *et al.*, ‘3D printing of piezoelectric barium titanate-hydroxyapatite scaffolds with interconnected porosity for bone tissue engineering’, *Materials*, vol. 13, no. 7, Apr. 2020, doi: 10.3390/MA13071773.
- [88] J. Kaur and H. Singh, ‘Fabrication and analysis of piezoelectricity in 0D, 1D and 2D Zinc Oxide nanostructures’, *Ceramics International*, vol. 46, no. 11, pp. 19401–19407, Aug. 2020, doi: 10.1016/j.ceramint.2020.04.283.
- [89] K. S. Srikanth, A. Wazeer, P. Mathiyalagan, S. Vidya, K. Rajput, and H. S. Kushwaha, ‘Piezoelectric properties of ZnO’, in *Nanostructured Zinc Oxide: Synthesis, Properties and Applications*, Elsevier, 2021, pp. 717–736. doi: 10.1016/B978-0-12-818900-9.00024-3.
- [90] S. Goel and B. Kumar, ‘A review on piezo-/ferro-electric properties of morphologically diverse ZnO nanostructures’, *Journal of Alloys and Compounds*, vol. 816, Mar. 2020, doi: 10.1016/j.jallcom.2019.152491.
- [91] N. Bhadwal, R. Ben Mrad, and K. Behdinin, ‘Review of Zinc Oxide Piezoelectric Nanogenerators: Piezoelectric Properties, Composite Structures and Power Output’, *Sensors*, vol. 23, no. 8, Apr. 2023, doi: 10.3390/s23083859.
- [92] ‘Search: Zinc Oxide - Alfa Chemistry’. Accessed: Aug. 27, 2025. [Online]. Available: <https://www.alfa-chemistry.com/search?q=Zinc+Oxide&navi.id=291>
- [93] ‘Ossido di zinco | Sigma-Aldrich’. Accessed: Aug. 27, 2025. [Online]. Available: <https://www.sigmaaldrich.com/IT/it/search/ossido-di-zinco?focus=products&page=1&perpage=30&sort=relevance&term=ossido%20di%20zinco&type=product>
- [94] ‘Zinc Oxide Nanowire’. Accessed: Aug. 27, 2025. [Online]. Available: <https://www.acsmaterial.com/zinc-oxide-nanowire.html>

- [95] 'Semiconductor Materials Zinc Oxide ZnO Nanowires'. Accessed: Aug. 27, 2025. [Online]. Available: https://www.hwnanomaterial.com/semiconductor-materials-zinc-oxide-zno-nanorods-for-sale_p148.html
- [96] M. G. Kang *et al.*, 'Enhanced piezoelectricity of composite piezoelectric nanogenerators by varying the aspect ratio of zinc oxide nanoparticles', *Energy*, vol. 314, p. 134188, Jan. 2025, doi: 10.1016/j.energy.2024.134188.
- [97] R. Chowdhury, S. Adhikari, and F. Scarpa, 'Elasticity and piezoelectricity of zinc oxide nanostructure', *Physica E: Low-Dimensional Systems and Nanostructures*, vol. 42, no. 8, pp. 2036–2040, June 2010, doi: 10.1016/j.physe.2010.03.018.
- [98] Z. Chen *et al.*, 'Ultrasound-driven electrical stimulation based on 3D hierarchical porous piezoelectric nanofiber-aerogel scaffold promotes bone defect repair', *Chemical Engineering Journal*, vol. 470, p. 144305, Aug. 2023, doi: 10.1016/j.cej.2023.144305.
- [99] H. Ghaedsharafi, Z. Sherafat, M. Sani, and N. Azarpira, 'Piezoelectric core-shell fibrous scaffolds of PVDF-ZnO/PCL for bone regeneration', *Materials Today Chemistry*, vol. 37, p. 102017, Apr. 2024, doi: 10.1016/j.mtchem.2024.102017.
- [100] Y. Zhou *et al.*, 'Collagen-enhanced piezoelectric PLLA/ZnO microfiber barrier membranes for superior bone regeneration', *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 319, p. 145443, Aug. 2025, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2025.145443.
- [101] C. Polley *et al.*, '3D printing of piezoelectric and bioactive barium titanate-bioactive glass scaffolds for bone tissue engineering', *Materials Today Bio*, vol. 21, p. 100719, Aug. 2023, doi: 10.1016/j.mtbio.2023.100719.
- [102] C. Polley, A. Riaz, H. Lund, A. R. Boccaccini, and H. Seitz, 'Field-assisted sintering of barium titanate and 45S5 bioactive glass for biomedical applications', *Ceramics International*, vol. 50, no. 19, pp. 37314–37321, Oct. 2024, doi: 10.1016/j.ceramint.2024.07.107.
- [103] B. Saeidi, M. R. Derakhshandeh, M. Delshad Chermahini, and A. Doostmohammadi, 'Novel Porous Barium Titanate/Nano-bioactive Glass Composite with High Piezoelectric Coefficient for Bone Regeneration Applications', *Journal of Materials Engineering and Performance*, vol. 29, no. 8, pp. 5420–5427, Aug. 2020, doi: 10.1007/s11665-020-05016-0.
- [104] H. L. Ding, Y. X. Zhang, S. Wang, J. M. Xu, S. C. Xu, and G. H. Li, 'Fe₃O₄@SiO₂ core/shell nanoparticles: The silica coating regulations with a single core for different core sizes and shell thicknesses', *Chemistry of Materials*, vol. 24, no. 23, pp. 4572–4580, Dec. 2012, doi: 10.1021/cm302828d.
- [105] Y. Zhang *et al.*, 'Effects of silica coating on the microstructures and energy storage properties of BaTiO₃ ceramics', *Materials Research Bulletin*, vol. 67, pp. 70–76, 2015, doi: 10.1016/j.materresbull.2015.01.056.
- [106] X. Lu *et al.*, 'Effects of SiO₂ coating on the dielectric and ferroelectric properties of BaTiO₃ - SiO₂ composites', in *2017 Joint IEEE International Symposium on the Applications of Ferroelectric (ISAF)/International Workshop on Acoustic Transduction Materials and Devices (IWATMD)/Piezoresponse Force Microscopy (PFM)*, Atlanta, GA: IEEE, May 2017, pp. 56–58. doi: 10.1109/ISAF.2017.8000211.

- [107] B. Hoomehr, K. Raeissi, F. Ashrafizadeh, S. Labbaf, and M. Kharaziha, 'Electrophoretic deposition of bioactive glass/zirconia core-shell nanoparticles on Ti6Al4V substrate', *Ceramics International*, vol. 47, no. 24, pp. 34959–34969, Dec. 2021, doi: 10.1016/j.ceramint.2021.09.037.
- [108] Z. Yang, X. He, Y. Chen, M. Zhu, and P. Xu, '3D-printed piezoelectric scaffolds composed of uniform core-shell structured BaTiO₃@ bioactive glasses particles for bone regeneration', *Ceramics International*, vol. 50, no. 11, pp. 18303–18311, June 2024, doi: 10.1016/j.ceramint.2024.02.314.
- [109] F. Heidari Laybidi and A. Bahrami, 'Antibacterial properties of ZnO-containing bioactive glass coatings for biomedical applications', *Materials Letters*, vol. 365, June 2024, doi: 10.1016/j.matlet.2024.136433.
- [110] L. Qomariyah, T. Hirano, N. R. Putra, S. Suprpto, H. A. Ajiz, and M. Fauziyah, 'Innovative surfactant-free synthesis of core-shell SiO₂/ZnO particles: rapid ultrasonication and photocatalytic inhibition', *RSC Advances*, vol. 14, no. 18, pp. 12665–12675, Apr. 2024, doi: 10.1039/d4ra01309c.
- [111] M. Ramasamy, Y. J. Kim, H. Gao, D. K. Yi, and J. H. An, 'Synthesis of silica coated zinc oxide-poly(ethylene-co-acrylic acid) matrix and its UV shielding evaluation', *Materials Research Bulletin*, vol. 51, pp. 85–91, Mar. 2014, doi: 10.1016/j.materresbull.2013.12.004.
- [112] M. Ramasamy, M. Das, S. S. A. An, and D. K. Yi, 'Role of surface modification in zinc oxide nanoparticles and its toxicity assessment toward human dermal fibroblast cells', *International Journal of Nanomedicine*, vol. 9, no. 1, pp. 3707–3718, Aug. 2014, doi: 10.2147/IJN.S65086.
- [113] F. Aghili, B. Hoomehr, R. Saidi, and K. Raeissi, 'Synthesis and electrophoretic deposition of zinc oxide and zinc oxide-bioactive glass composite nanoparticles on AZ31 Mg Alloy for biomedical applications', *Ceramics International*, vol. 48, no. 22, pp. 34013–34024, Nov. 2022, doi: 10.1016/j.ceramint.2022.08.001.
- [114] D. Völtzke, H.-P. Abicht, J. Woltersdorf, and E. Pippel, 'Surface modification of pre-sintered BaTiO₃ particles', *Materials Chemistry and Physics*, vol. 73, no. 2–3, pp. 274–280, Jan. 2002, doi: 10.1016/S0254-0584(01)00389-3.
- [115] M. Abd Mutalib, M. A. Rahman, M. H. D. Othman, A. F. Ismail, and J. Jaafar, 'Chapter 9 - Scanning Electron Microscopy (SEM) and Energy-Dispersive X-Ray (EDX) Spectroscopy', in *Membrane Characterization*, N. Hilal, A. F. Ismail, T. Matsuura, and D. Oatley-Radcliffe, Eds, Elsevier, 2017, pp. 161–179. doi: 10.1016/B978-0-444-63776-5.00009-7.
- [116] K. Panwar, M. Jassal, and A. K. Agrawal, 'In situ synthesis of Ag–SiO₂ Janus particles with epoxy functionality for textile applications', *Particuology*, vol. 19, pp. 107–112, Apr. 2015, doi: 10.1016/j.partic.2014.06.007.
- [117] M. Mačković *et al.*, 'Bioactive glass (type 45S5) nanoparticles: in vitro reactivity on nanoscale and biocompatibility', *J Nanopart Res*, vol. 14, no. 7, p. 966, June 2012, doi: 10.1007/s11051-012-0966-6.
- [118] M. Cerruti, D. Greenspan, and K. Powers, 'Effect of pH and ionic strength on the reactivity of Bioglass® 45S5', *Biomaterials*, vol. 26, no. 14, pp. 1665–1674, May 2005, doi: 10.1016/j.biomaterials.2004.07.009.

- [119] K. Zheng, X. Dai, M. Lu, N. Hüser, N. Taccardi, and Aldo. R. Boccaccini, ‘Synthesis of copper-containing bioactive glass nanoparticles using a modified Stöber method for biomedical applications’, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 150, pp. 159–167, Feb. 2017, doi: 10.1016/j.colsurfb.2016.11.016.
- [120] H. Wang, X. Hou, W. Zhang, D. Kong, and Y. Zhou, ‘The influencing mechanism of phosphorus component on network structure and bioactivity of bioactive glass’, *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, vol. 140, p. 105719, Apr. 2023, doi: 10.1016/j.jmbbm.2023.105719.
- [121] T. T. M. Phan *et al.*, ‘Enhancement of polarization property of silane-modified BaTiO₃ nanoparticles and its effect in increasing dielectric property of epoxy/BaTiO₃ nanocomposites’, *Journal of Science: Advanced Materials and Devices*, vol. 1, no. 1, pp. 90–97, Mar. 2016, doi: 10.1016/j.jsamd.2016.04.005.
- [122] Q. Nawaz *et al.*, ‘Synthesis and characterization of manganese containing mesoporous bioactive glass nanoparticles for biomedical applications’, *Journal of Materials Science Materials in Medicine*, vol. 29, May 2018, doi: 10.1007/s10856-018-6070-4.
- [123] T. Zhang, J. Ge, Y. Hu, Q. Zhang, S. Aloni, and Y. Yin, ‘Formation of Hollow Silica Colloids through a Spontaneous Dissolution–Regrowth Process’, *Angewandte Chemie*, vol. 120, no. 31, pp. 5890–5895, 2008, doi: 10.1002/ange.200800927.
- [124] Z. Luo *et al.*, ‘Preparation and Properties of Enzyme-Modified Cassava Starch–Zinc Complexes’, *J. Agric. Food Chem.*, vol. 61, no. 19, pp. 4631–4638, May 2013, doi: 10.1021/jf4016015.
- [125] T. Kokubo and H. Takadama, ‘How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity?’, *Biomaterials*, vol. 27, no. 15, pp. 2907–2915, May 2006, doi: 10.1016/j.biomaterials.2006.01.017.