

POLITECNICO DI TORINO

**Corso di Laurea Magistrale
in Ingegneria Biomedica**

Tesi di Laurea Magistrale

**Riduzione in situ di nanoparticelle d'argento sulla superficie
di un vetro bioattivo**



Relatori

Prof. Enrica VERNÈ

Ing. Marta MIOLA

Candidato

Federico VESPA

A.A. 2017/2018

Sommario

Introduzione	4
Capitolo 1	6
1. Biomateriali e biovetri.....	6
1.1 Biomateriali	6
1.1.1 Definizione e caratteristiche dei biomateriali.....	6
1.1.2 Interazione tra biomateriali e tessuti biologici	8
1.2. Storia del vetro	10
1.3. Caratteristiche dei vetri	11
1.3.1 Caratteristiche fisico-chimiche.....	12
1.3.2 Caratteristiche fisico-meccaniche	12
1.3.3 Caratteristiche termiche.....	13
1.3.4 Caratteristiche elettriche.....	15
1.3.5 Caratteristiche ottiche.....	15
1.4 Lavorazione del vetro	17
1.5 I vetri bioattivi	19
1.5.1 Classificazione dei vetri bioattivi.....	19
1.5.2 Il sistema Hench - Bioglass [®]	20
1.6.1 Il meccanismo di bioattività del Bioglass [®]	21
1.6.2 Apatite e bioattività	24
1.6.3 Composizione.....	25
1.7 Infezioni batteriche.....	27
1.7.1 Gli ioni metallici e il loro utilizzo nel drogaggio dei biovetri.....	28
1.8.1 L'argento	30
1.8.2 L'argento e le sue proprietà antibatteriche	30
1.8.3 Il meccanismo antibatterico degli ioni argento	30

1.8.4 Effetto dell'argento in forma di nanoparticelle	33
1.9 Esempi di funzionalizzazione nei vetri bioattivi	35
1.9.1 Scambio ionico	35
1.9.2 L'argento inserito come reagente del vetro	41
1.9.3 Funzionalizzazione con nanoparticelle	42
1.10 PVA	46
Capitolo 2	49
2.1 Sintesi delle polveri di SBA2	49
2.1.1 Pesata dei reagenti	49
2.1.2 Fusione e colata	51
2.1.3 Taglio e lucidatura	52
2.2 Riduzione delle nanoparticelle di Ag	52
2.3.1 Diffrazione a raggi X	54
2.3.2 Microscopia elettronica a scansione e spettrometria a dispersione di energia	56
2.3.3 Spettrometria UV	58
2.4 Bioattività <i>in vitro</i>	60
2.4.1 Preparazione dell'SBF e immersione dei campioni	60
Capitolo 3	62
3.1 Caratterizzazione visiva	62
3.2 Analisi FESEM-EDS	63
3.2 Analisi UV- Vis	92
3.3 Analisi UV- Vis campioni massivi	96
3.4 Analisi raggi X	102
3.5 Bioattività <i>in vitro</i>	106
3.5.1 Analisi a raggi X – post SBF	121
3.6 Considerazioni e conclusioni finali	127
Bibliografia	128
Ringraziamenti	132

Introduzione

Il problema delle infezioni batteriche risulta ancora oggi una delle principali cause di fallimento degli impianti protesici. Lo sviluppo dei biomateriali ha però creato la possibilità di rispondere adeguatamente a questo problema; i vetri bioattivi ed antibatterici rappresentano, ad esempio, una valida soluzione per migliorare il legame impianto-osso e contemporaneamente limitare lo sviluppo delle infezioni.¹

In particolare in questo lavoro di tesi si è sintetizzato un vetro bioattivo a base silice, sulla cui superficie sono state ridotte nanoparticelle d'argento utilizzando come agente riducente e stabilizzante il polivinilalcol (PVA)². I vetri bioattivi sono definiti tali in quanto, se inseriti nei tessuti biologici direttamente, come parte di componenti protesici o come filler (come avviene in campo odontoiatrico) possono innescare una risposta positiva da parte dell'organismo³; ad esempio a contatto con i fluidi biologici favoriscono la formazione di idrossiapatite e sono quindi in grado di instaurare un legame di tipo chimico con il tessuto osseo favorendone l'integrazione. È stato osservato che l'aggiunta dell'argento riduce la probabilità di infezioni post impianto, garantendo un migliore adattamento della protesi all'organismo con conseguente riduzione del dolore e del tempo di recupero per il paziente. Sono infatti note le proprietà dell'argento, come elemento antibatterico che, se inserito nel vetro, è in grado di interagire direttamente con il DNA della cellula batterica inibendone la replicazione ed interferendo nella respirazione cellulare.^{3,4}

Il vetro studiato in questa tesi sperimentale è stato sintetizzato e caratterizzato presso il Dipartimento di Scienza Applicata e Tecnologia del Politecnico di Torino. È chiamato SBA2 e appartiene al sistema di vetri Bioglass® (45S5) le cui caratteristiche sono trattate nel primo capitolo.

L'elemento innovativo di questa tesi è l'utilizzo del PVA come agente riducente che, come specificato in letteratura, permette di ottenere la riduzione di nanoparticelle con un ottimo controllo delle dimensioni ed una distribuzione spaziale delle stesse molto omogenea delle stesse. L'uso delle nanoparticelle garantisce inoltre una minore tossicità con un rilascio più controllato dell'argento e la possibile formazioni di ROS (specie reattive dell'ossigeno) che possono danneggiare le cellule batteriche.²

Nel secondo capitolo è descritta per intero la procedura sperimentale per la realizzazione dei campioni di vetro e la successiva riduzione delle nanoparticelle di argento sulla superficie.

Innanzitutto, è illustrata la sintesi del vetro a partire dalla fusione dei reagenti in forno seguendo la tecnica tradizionale. Il vetro, dopo la colata, è stato quindi tagliato in campioni per le caratterizzazioni successive e ciascuno di essi ha subito un processo di lucidatura al fine di eliminare eventuali disomogeneità superficiali. Viene inoltre descritto il processo di preparazione della soluzione di PVA-argento ed il successivo trattamento che permette la formazione delle nanoparticelle di argento sulla superficie del vetro. Sono inoltre descritte le diverse tecniche per la caratterizzazione dei campioni di vetro e le procedure condotte per le prove di bioattività *in vitro* e rilascio in acqua.

Nel terzo capitolo si sono infine commentati i risultati ottenuti in questo lavoro: i vetri sono stati caratterizzati dal punto di vista strutturale (analisi ai raggi X), dal punto di vista morfologico-composizionale (FESEM-EDS) e ne sono stati studiati la bioattività *in vitro* in soluzione fisiologica simulata. Sono inoltre state eseguite delle analisi UV della soluzione in cui è avvenuta la reazione di riduzione. Si è svolto un confronto tra i risultati ottenuti per i campioni trattati a diverse temperature e con diverse concentrazioni di argento evidenziando analogie e differenze presenti.

Capitolo 1

1. Biomateriali e biovetri

I biovetri appartengono ad una famiglia molto vasta: i biomateriali. In questo capitolo è introdotta la definizione di biomateriale e vengono descritti i meccanismi di interazione con i tessuti biologici al fine di comprendere le basi della ricerca; viene quindi presentata una breve storia dei vetri in generale con particolare interesse per i biovetri studiati dal gruppo di Hench e le loro applicazioni in clinica. Nella seconda parte del capitolo invece verrà esplorato il problema delle infezioni batteriche, con un'analisi delle possibili soluzioni con un focus sulle proprietà antibatteriche dell'argento e i vantaggi del suo uso sotto forma di nanoparticelle.

1.1 Biomateriali

1.1.1 Definizione e caratteristiche dei biomateriali

La definizione di biomateriale⁵ è evoluta nel corso degli anni seguendo gli sviluppi tecnologici nel campo:

- **1982:** Sostanza (diversa da un farmaco) o combinazioni di sostanze, di origine naturale o sintetica, che possono essere impiegate per un qualunque periodo, sia sole sia come parte di un sistema, al fine di trattare, potenziare, sostituire qualsiasi tessuto, organo o funzione del corpo.
- **1986:** Sostanza non vivente utilizzata nella fabbricazione di un dispositivo medico che ha in qualche punto un'interfaccia con un tessuto vivente.



Figura 1.1 - Biomateriali e tessuti⁵

Il biomateriale comunica quindi in maniera attiva con il tessuto scambiando informazioni di diversa natura.⁵

Dal 1940 ad oggi sono state poi presentate tre generazioni di biomateriali:

- **Bioinerti:** Biomateriali che garantiscono una reazione minima o nulla da parte del corpo una volta posti a contatto con il tessuto. In realtà questa caratteristica è in molti casi deleteria; spesso l'utilizzo di un materiale bioinerte porta infatti alla formazione di uno strato di tessuto fibroso attorno all'oggetto con conseguente fallimento dell'impianto.⁵
- **Bioattivi:** I biomateriali bioattivi stimolano una risposta biologica da parte dell'organismo, favorendo processi biologici di crescita e rigenerazione tessutale. Per la prima volta il materiale viene visto come attivo, capace di instaurare un rapporto con il tessuto dell'organismo ospite.⁵
- **Biomimetici:** I biomateriali appartenenti a questa categoria sono in grado di mimare con ottima approssimazione tessuti biologici e le loro caratteristiche, scambiando con essi segnali fisico-chimici^{5,6}

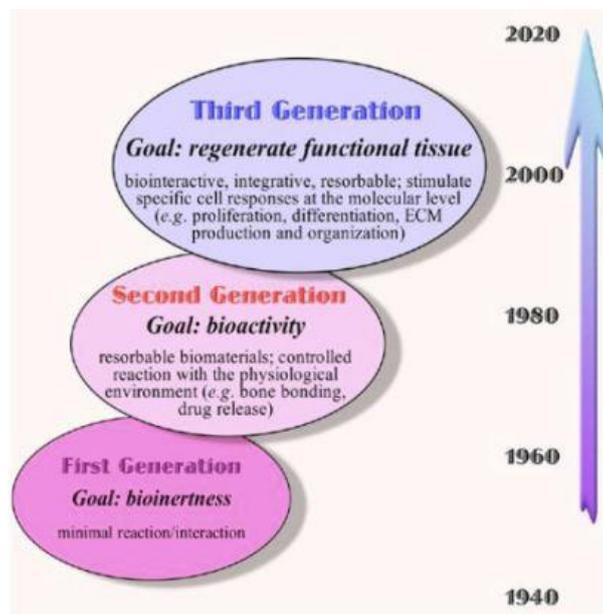


Figura 1.2 - Evoluzione delle generazioni di biomateriali⁵

1.1.2 Interazione tra biomateriali e tessuti biologici

L'interno del corpo umano rappresenta un ambiente particolarmente aggressivo dal punto di vista chimico; è infatti caratterizzato dalla presenza di numerose molecole biologiche (ad esempio proteine, enzimi, zuccheri), fluidi corporei, sangue e ioni. Quando un biomateriale è inserito all'interno del corpo questo si interfaccia con l'ambiente che lo circonda e si generano diversi processi come schematizzato in figura 1.3.

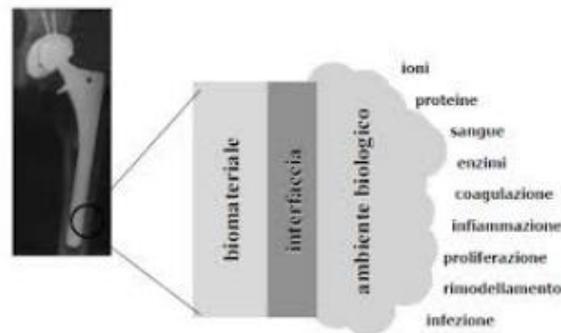


Figura 1.3 - Interfaccia tra biomateriale ed ambiente biologico⁵

La caratteristica generale che ogni biomateriale deve avere per poter essere considerato tale, è la biocompatibilità⁵, che può essere definita come la “capacità di un biomateriale di esplicare la propria funzione con un'appropriata risposta del sistema vivente che lo ospita”. I materiali biocompatibili possono essere classificati in quattro categorie in base all'effetto che hanno sull'organismo:

- Inerti: nessuna reazione, possibile formazione di tessuti fibrosi;
- Bioattivi: legame tra materiale e tessuto
- Biorisorbibili: dissoluzione del materiale e sostituzione con componente biologica
- Biomimetici: scambio di segnali con l'organismo

Quando un materiale viene inserito nell'organismo, si genera una risposta biologica, costituita da due eventi: la risposta del materiale e la risposta dell'organismo.

Risposta del materiale: In questo caso entra in gioco la superficie del materiale, la cui reattività è influenzata dai seguenti parametri⁶:

- origine del materiale
- presenza di contaminanti
- grado di frammentazione del solido
- cristallinità e piani cristallini esposti
- composizione e topografia superficiale
- grado di irregolarità superficiale
- idroficità/idrofobicità

In seguito al contatto del materiale con i tessuti viventi possono quindi avvenire una serie di modifiche superficiali⁶ quali:

- ossidazioni o riduzioni
- assorbimento di acqua o ioni idrati
- idrolisi
- diffusione di ioni da fluidi biologici alla superficie del materiale
- Rilascio di ioni metallici
- Rilascio di monomeri
- Rilascio di radicali liberi
- Degradazione del materiale
- Riarrangiamento di gruppi superficiali
- Reazione a forze meccaniche

Metalli e polimeri sono i materiali che subiscono le maggiori modifiche superficiali, mentre i ceramici da questo punto di vista risultano essere meno facilmente modificabili.

Risposta dell'organismo: Il corpo risponde all'inserimento di un corpo estraneo attraverso l'attivazione del processo di infiammazione⁶, si osserva quindi una risposta complessa in cui si modifica l'ambiente intorno al corpo estraneo col fine ultimo di degradarlo. In questo processo è di fondamentale importanza il ruolo delle cellule:

- Membranolisi ed emolisi: alterazione della permeabilità della membrana che comportano squilibri dei gradienti di concentrazione nei mezzi intracellulari ed extra-cellulari
- Citotossicità: interferenza nelle normali funzioni cellulari, alterazioni del metabolismo.
- Morte cellulare, necrosi, infiammazioni, danni cellulari irreversibili

- Proliferazione cellulare: le interazioni fra le cellule e i solidi sono differenti se le cellule sono in divisione
- Rilascio di mediatori, ad esempio mediatori di risposte infiammatorie
- Alterazioni genetiche

1.2. Storia del vetro

Le prime tracce del vetro nella storia risalgono al terzo millennio a.C. periodo in cui viene impiegato in Mesopotamia con funzione decorativa. Le prime forme di vetro però non sono quelle create dalla mano dell'uomo ma hanno origine naturale: quando la sabbia di quarzo viene fusa in seguito all'azione di fenomeni come fulmini o eruzioni vulcaniche si formano ossidiana o folgorite. Il vetro riveste un ruolo importante anche presso gli egizi dove è utilizzato per creare recipienti mentre in Fenicia si creano i primi utensili in vetro come piatti e stoviglie.



Figura 1.4 - Recipienti in vetro risalenti al 1500 a.C.⁷

La vera innovazione è però la scoperta della tecnica della soffiatura del vetro (100 a.C.): questa tecnica permette di ottenere oggetti dallo spessore ridotto e dalle forme più disparate. Successivamente è la città di Venezia a diventare patria della produzione del vetro, dal XI secolo si concentrano nella città lagunare le botteghe dei mastri vetrai più importanti dell'occidente. La lavorazione del vetro rimane una pratica di alto artigianato fino all'epoca della prima rivoluzione industriale, quando vengono sviluppate le prime tecniche moderne di produzione del vetro come ad esempio la pressatura.⁸

1.3. Caratteristiche dei vetri

I vetri costituiscono una classe di materiali amorfi ottenuti per progressivo irrigidimento di un liquido che non ha cristallizzato durante il raffreddamento. Il vetro così ottenuto è caratterizzato da un'organizzazione spaziale con un alto grado di disordine, analoga a quella del liquido da cui ha avuto origine; è quindi assente un reticolo cristallino ordinato. Esistono due tipi di ordine all'interno della struttura di un solido: a lungo raggio e a corto raggio. Un materiale ha ordine a lungo raggio se la disposizione ordinata degli atomi si ripete periodicamente in tutto il materiale creando una struttura cristallina. Parliamo invece di ordine a corto raggio quando la disposizione ordinata degli atomi si estende solo agli atomi più vicini senza creare una configurazione che si ripete in tutto il materiale. La silice cristallina (SiO_2) ad esempio presenta un ordine a lungo raggio, in quanto le strutture tetraedriche presenti nel reticolo si ripetono in maniera regolare per tutta la struttura. Invece il vetro di silice presenta un ordine solo a corto raggio in quanto, come si può notare dalla figura 1.5, i tetraedri sono legati in modo casuale fra loro.³

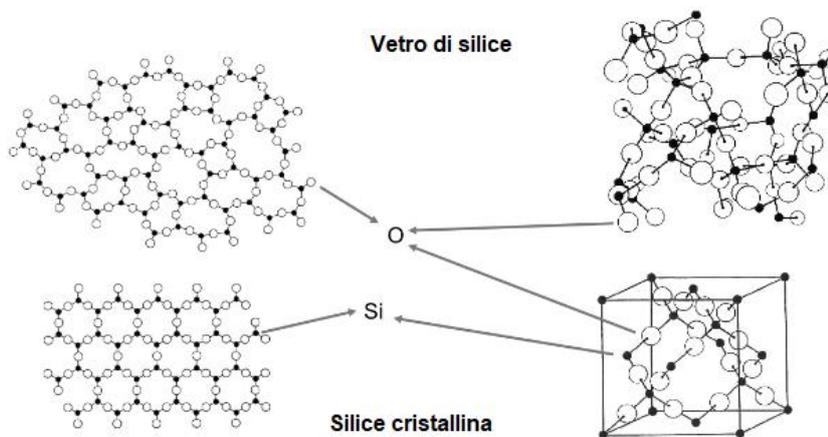


Figura 1.5 - Struttura della silice cristallina e del vetro a base silice³

1.3.1 Caratteristiche fisico-chimiche

La struttura del vetro è analoga a quella di un liquido, grazie appunto al raffreddamento veloce appena descritto. Gli elementi che costituiscono la struttura del vetro sono:

- **Ossidi formatori:** sono gli elementi vetrificanti, per il vetro in oggetto di questa tesi è la silice, ma per altri può essere anche l'anidride fosforica o l'ossido di boro. Sono gli ossidi che consentono di formare il reticolo amorfo.
- **Ossidi modificatori:** modificano il reticolo del vetro permettendo di modificare alcune caratteristiche, rendendo ad esempio il vetro più facile da lavorare o abbassando il punto di fusione. A questo gruppo appartengono ad esempio gli ossidi di calcio e sodio.
- **Ossidi intermediari:** questi ossidi non possono formare da soli un reticolo, ma possono unirsi a un reticolo preesistente. Questi tipi di ossidi sono aggiunti al vetro per ottenere particolari proprietà: ad esempio l'ossido di alluminio può entrare nel reticolo e permettere al vetro di supportare temperature superiori rispetto al vetro comune.³

1.3.2 Caratteristiche fisico-meccaniche

Il vetro è un materiale caratterizzato da frattura fragile e da una sensibilità elevata allo stato superficiale; è inoltre caratterizzato da valori di resistenza a compressione notevolmente maggiore rispetto alla resistenza a trazione.³

Nella tabella sono riportati i valori corrispondenti alle proprietà meccaniche fondamentali di un vetro a base silice.

Simbologia	Proprietà	Valore
P	Densità [kg m ⁻³]	2500
E	Modulo Elastico [N mm ⁻²]	68000-70000
N	Coefficiente di Poisson	0.23
α_T	Coefficiente di dilatazione termica lineare [°C ⁻¹]	7,7-8,8x10 ⁻⁶
	Durezza Mohs	6
	Res. Compressione [N mm ⁻²]	900-1000
	Res. Trazione [N mm ⁻²]	20-200

Tabella 1.1 - Proprietà meccaniche di un vetro⁹

La frattura fragile

In seguito alla formazione di difetti superficiali quali bolle, intagli o graffi, è abbastanza comune la formazione di microcricche che danno luogo al fenomeno della frattura fragile che obbedisce all'equazione di Griffith:⁹

$$\sigma_c = \sqrt{\frac{2E\gamma_s}{\pi a}}$$

Dove σ_c è la sollecitazione applicata, E è il modulo di Young del materiale, γ_s è l'energia superficiale del materiale e a è la lunghezza della cricca.

E' possibile calcolare la probabilità di sopravvivenza di un campione di vetro di volume V sfruttando la seguente relazione:⁹

$$P_s = e^{\left[-\frac{v}{v_0} \left(\frac{\sigma}{\sigma_0}\right)^m\right]}$$

Dove V_0 è il volume iniziale, σ_0 è la resistenza caratteristica, σ è il carico applicato ed m il modulo di Weibull. A valori di m bassi corrispondono velocità rapide di propagazione della cricca.

1.3.3 Caratteristiche termiche

Il parametro che descrive i fenomeni di scambi termici è il coefficiente di conduttività, che nei vetri assume valori molto bassi (circa 1 W/mK) a causa della disomogeneità chimica del vetro.

Lo scambio termico totale, costituito dall'insieme di conduzione, convezione e irraggiamento, per il vetro è calcolabile tramite il coefficiente di trasmittanza termica (U), il quale dipende dallo spessore della lastra di vetro.

Shock termici

Applicare una variazione brusca di temperatura ad un vetro genera uno shock termico e conseguenti dilatazioni termiche disomogenee tra la parte a contatto con la variazione di temperatura e le parti interne della struttura; questo porta a uno stress termico del materiale, che dà origine a tensioni interne e quindi può portare alla rottura del vetro.

La condizione superficiale è il parametro che influenza maggiormente gli shock termici: la presenza di intagli e crepe sulla superficie del vetro peggiora la resistenza ai bruschi cambiamenti di temperatura. Questo problema può essere ovviato migliorando la resistenza del vetro con tecniche quali la tempra.

Proprietà reologiche

Al di sopra della temperatura di transizione vetrosa (T_g), ossia la temperatura al di sotto della quale un materiale amorfo si comporta come un solido vetroso, il vetro si trova nello stato di fluido viscoso, pertanto è opportuno aprire una breve parentesi sulle sue proprietà reologiche, cioè sull'insieme di proprietà relative agli equilibri raggiunti in seguito a sollecitazioni in un materiale disomogeneo come questo. Se viene applicata una forza sulla struttura di un vetro, di conseguenza si ha una deformazione permanente. Il vetro ha quindi, dal punto di vista meccanico, un comportamento viscoso: lo scorrimento viscoso aumenta all'aumentare della temperatura, secondo l'equazione di Arrhenius:⁹

$$\eta = \eta_0 e^{Q/RT}$$

Dove η è la viscosità η_0 è un costante legata al peso molecolare ed al volume molare, Q è l'energia di attivazione per iniziare lo scambio termico, R è la costante dei gas e T è la temperatura assoluta.

Le temperature caratteristiche del vetro sono le seguenti:⁹

- **Working point:** temperatura alla quale la viscosità del vetro assume un valore pari a 10^3 Pa s. A questa temperatura il vetro è fluido e può essere lavorato.
- **Upper end:** temperatura alla quale il vetro è pronto ad essere lavorato
- **Lower end:** temperatura alla quale la viscosità è maggiore di 10^3 Pa s. A; il vetro è sufficientemente viscoso da conservare la forma che gli viene data.
- **Softening point:** temperatura corrispondente a un valore di viscosità pari a $10^{6,6}$ Pa s; a questo valore di viscosità il vetro scorre sotto l'azione del suo peso.
- **Annealing point:** temperatura alla quale gli stress interni sono ridotti al valore di 15 Mpa in 15 minuti, la viscosità è attorno al valore di 10^{12} Pa.s.
- **Strain point:** temperatura alla quale gli stress sono rilasciati in 4 ore con viscosità pari a $10^{13,5}$ Pa.s, è la temperatura corrispondente alla transizione da comportamento viscoelastico a comportamento fragile.

- **Upper use temperature:** coincide approssimativamente con lo strain point, è il punto al di sotto del quale il vetro è rigido.

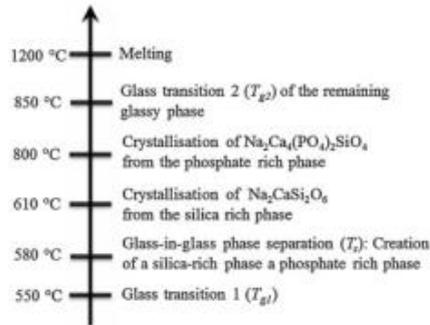


Figura 1.6- Relazione temperatura-fase del Bioglass®³

1.3.4 Caratteristiche elettriche

A temperatura ambiente, sempre a causa della sua disomogeneità chimica, il vetro si comporta come un isolante, mentre quando viene scaldato al di sopra degli 800 °C gli ioni all'interno della struttura danno origine ai fenomeni di conduzione elettrica ionica. Pertanto, la conducibilità elettrica del vetro dipende dal tipo di ioni e dalle interazioni di legame che si instaurano tra essi. Se all'interno della struttura sono presenti degli ioni alcalini, la conducibilità è resa più complessa, perché questi si spostano da un punto all'altro della struttura, causando una riorganizzazione strutturale.

1.3.5 Caratteristiche ottiche

la rifrazione è un fenomeno legato al rapporto tra le velocità di propagazione nei due mezzi in cui viaggia la radiazione e quindi legata agli angoli di incidenza e di rifrazione e alla radiazione della luce incidente, secondo la legge di Snell:

$$n_1 \sin\theta_1 = n_2 \sin\theta_2$$

Dove n_1 e n_2 rappresentano gli indici di rifrazione dei due corpi attraversati mentre θ_1 e θ_2 sono rispettivamente l'angolo di entrata e l'angolo di uscita. Nei vetri di uso comune l'indice di

rifrazione vale 1.5. La trasmittanza ottica misura invece la capacità del materiale di farsi attraversare dal fascio della radiazione luminosa, e può essere espressa come il rapporto tra l'intensità di luce incidente sulla superficie e l'intensità della luce trasmessa. Gli indici di trasmittanza del vetro nel campo del visibile sono attorno al 99%.

La riflessione invece è legata all'indice di rifrazione dall'equazione:

$$R = \frac{(n - 1)^2}{(n + 1)^2}$$

A seconda della composizione chimica del vetro si possono ottenere vetri con colori differenti. È stato dimostrato che la trasmittanza del vetro è legata alla sua colorazione; è possibile aggiungere uno di questi elementi o composti per ottenere il colore voluto e quindi far passare attraverso la superficie solo alcune lunghezze d'onda piuttosto che altre.

Elemento/composto		Colorazione risultante	
Colorante ionico	Cond. Ossidanti	Cond. Riducenti	
Ossido di cobalto	Blu		Blu
Ossido di rame	Acquamarina		Verde
Manganese	Viola		
Cobalto-Manganese	Ametista-nero		Ametista-nero
Ferro	Giallo		Verde-blu
Zolfo-Ferro			Giallo-ambra
Coloranti colloidali			
Zolfo-cadmio-selenio			Rosso
Rame			Rosso rubino
Oro			Rosso rubino
Argento			Giallo

Tabella 1.2- Relazione tra elemento o composto aggiunto e colorazione risultante del vetro¹⁰

1.4 Lavorazione del vetro

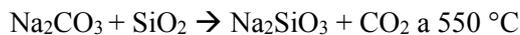
Il tipo di vetro più diffuso è quello sodico-calcico, categoria alla quale appartiene anche il vetro sintetizzato in questo lavoro. Questo tipo di vetro viene preparato tramite fusione dei reagenti ad altissime temperature (circa 1500 °C), molto più alte della Tg e successiva colata e raffreddamento piuttosto rapido, in modo che gli atomi non abbiano il tempo di formare strutture ordinate, dando quindi origine a un solido amorfo. I principali elementi di colata sono:

- Elemento vetrificante, ad esempio la silice (SiO₂)
- Elemento fondente, ad esempio la soda o la potassa
- Elemento stabilizzante che rende il vetro insolubile in H₂O

Reazioni chimiche in un forno fusorio

Le principali reazioni chimiche che avvengono all'interno di un forno fusorio sono due:

- **Fusione:** gli elementi più refrattari, come la silice, subiscono una dissoluzione da parte dei fondenti. Le reazioni che più comunemente avvengono in questa fase sono qui di seguito riportate:



- **Fining:** operazione di tipo fisico chimico che consiste nella riduzione delle bolle. L'evoluzione dei gas risulta dalla decomposizione di carbonati solfati, dall'aria e dall'acqua intrappolate, dai cambiamenti nello stato di ossidazione. Vi sono alcuni elementi, detti fining agents, in grado di evolvere bolle con facilità; queste bolle, durante la risalita, inglobano le bolle di più piccole dimensioni.

Dopo che è stata fatta la colata, il vetro allo stato liquido può essere pressato in stampi rotanti (per effetto della forza centrifuga il vetro forma in questo caso pareti a spessore uniforme) oppure sottoposto a lavorazioni quali la laminazione o la soffiatura.



Figura 1.7 - Soffiatura del vetro¹¹

Tempra

Il vetro può essere sottoposto al processo di tempra tramite due diverse tipologie:

- **Tempra termica:** è un trattamento effettuato per indurre in uno stato di compressione la superficie del vetro. Il vetro viene inizialmente scaldato al di sopra della temperatura di transizione vetrosa, per poi essere raffreddato in modo molto rapido tramite dei getti d'acqua superficiali. La superficie si raffredda prima, rispetto al bulk, e solidifica. Questo processo può avvenire perché il vetro ha una migliore resistenza a compressione rispetto a quella a trazione.
- **Tempra chimica:** si basa su un processo di scambio ionico, aumenta la resistenza del vetro per effetto dell'introduzione di atomi che vanno ad inserirsi nella struttura del vetro, innescando uno stato di compressione. Di solito si effettua in un bagno di nitrato di potassio fuso a 50°C in 6-8 ore.

La tempra termica è effettuata a temperatura notevolmente maggiore rispetto alla tempra chimica però la tempra chimica è più efficace nell'aumentare la resistenza di lastre sottili rispetto alla tempra termica, in figura è possibile osservare un confronto tra il profilo di stress di un vetro temprato termicamente e quello di uno temprato chimicamente.

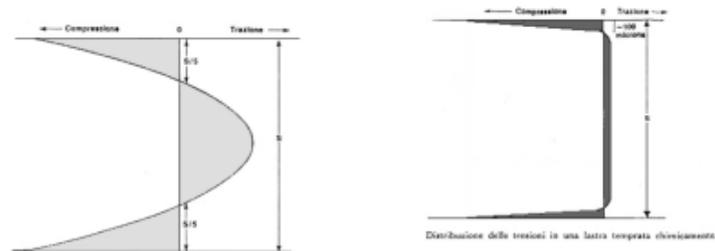


Figura 1.8 - Grado di sollecitazione: confronto tra tempra termica e tempra chimica⁸

1.5 I vetri bioattivi

I vetri sono diventati importanti in ambito medico in quanto, agendo sulla loro composizione, possono essere resi biocompatibili e bioattivi. Se essi vengono inseriti a contatto con un tessuto osseo o un fluido biologico viene stimolata la formazione di idrossiapatite, che va a depositarsi sulla superficie del vetro favorendo l'osteointegrazione.

1.5.1 Classificazione dei vetri bioattivi

I vetri usati oggi in applicazioni biomedicali possono essere classificati in base alla loro composizione chimica³; in particolare i più famosi sono:

- Sistema Hench: $\text{SiO}_2 - \text{CaO} - \text{Na}_2\text{O} - \text{P}_2\text{O}_5$
- Sistema Kokubo: $\text{SiO}_2 - \text{CaO} - \text{MgO} - \text{P}_2\text{O}_5 - \text{F}$
- Sistema Beall: $\text{SiO}_2 - \text{Al}_2\text{O}_3 - \text{CaO} - \text{MgO} - \text{Na}_2\text{O} - \text{K}_2\text{O} - \text{P}_2\text{O}_5 - \text{F}$
- Sistema Bromer: $\text{SiO}_2 - \text{CaO} - \text{MgO} - \text{Na}_2\text{O} - \text{K}_2\text{O} - \text{P}_2\text{O}_5$

Il vetro utilizzato in questo lavoro appartiene al sistema Hench: nel secondo capitolo verranno descritte nel dettaglio la sua composizione e le sue proprietà.

1.5.2 Il sistema Hench - Bioglass[®]



Figura 1.9 - Larry Hench¹²

Verso la fine degli anni '60 è il professore e ricercatore universitario Larry Hench ad avere l'intuizione di usare il vetro come materiale in grado di interfacciarsi con il corpo. La fine della missione americana in Vietnam aveva infatti riportato a casa migliaia di reduci rimasti gravemente feriti durante la guerra che mal sopportavano i problemi derivanti dalle infiammazioni causate dalle protesi. Nasce quindi il Bioglass[®], vetro bioattivo che segna l'inizio delle ricerche sui vetri bioattivi. La composizione originale del Bioglass[®] era la seguente:

	SiO ₂	CaO	Na ₂ O	P ₂ O ₅
%Wt	45	24,5	24,5	6

Tabella 1.3 - Composizione del Bioglass[®] (% wt)

Questa composizione ha subito diverse modifiche nel corso degli anni, sono stati aggiunti infatti ossidi diversi con gli obiettivi di modificarne alcune proprietà.¹³ Oggi i vetri bioattivi trovano applicazione come spaziatori intervertebrali, nella chirurgia del cranio e del collo, in odontoiatria, in vari settori della stomatologia ed in ortopedia nella ricostruzione dell'orecchio medio.³

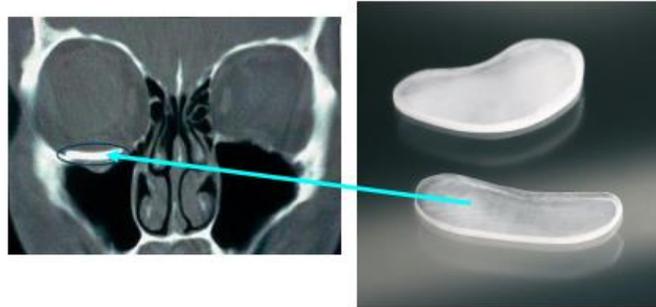


Figura 1.10 - Esempio di applicazione dei biovetri come spaziatori intervertebrali³

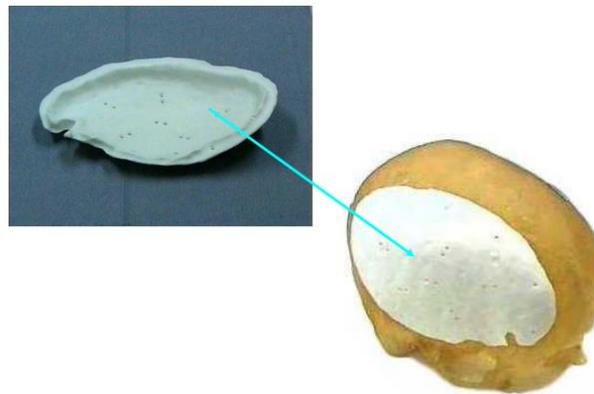


Figura 1.11 - Applicazione dei biovetri: cranioplastica³

1.6.1 Il meccanismo di bioattività del Bioglass®

Il meccanismo di bioattività in vitro del sistema Hench è costituito da 5 fasi:

- 1- Scambio ionico all'interfaccia tra vetro e fluidi biologici: gli ioni Na^+ e gli ioni Ca^{2+} del vetro vengono gradualmente sostituiti da ioni H^+ o da ioni H_3O^+ provenienti dai fluidi biologici. Perché in soluzione si rompono i legami degli ioni modificatori con gli atomi di ossigeno cosiddetti non pontanti. Gli atomi di ossigeno pontanti di un vetro evidenziati nello schema in figura, sono così chiamati in quanto legano le unità fondamentali del reticolo, mentre gli atomi di ossigeno non pontati sono legati ai modificatori di reticolo.

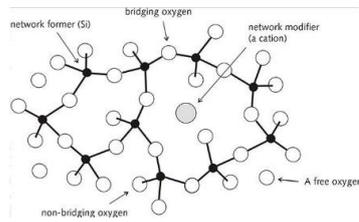


Figura 1.12 - Ossigeni pontanti³

- 2- In soluzione si ha una perdita di silice da parte del vetro, nella forma SiOH_4 (acido silicico) che si origina dalla rottura dei legami $\text{Si} - \text{O} - \text{Si}$ dovuta all'azione dell'acqua. Questo meccanismo è dipendente dal tempo.
- 3- Gli OH che si trovano esposti sulla superficie del vetro condensano tra loro e si forma uno strato di gel di silice.

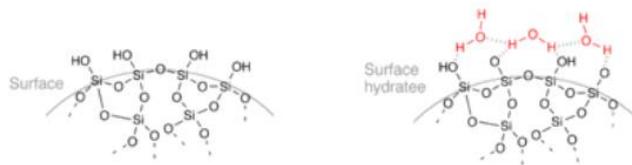


Figura 1.13 - Struttura del gel di silice³

- 4- Grazie alla migrazione degli ioni Ca^{2+} e PO_4^{3-} all'interno dello strato di silice si forma uno strato amorfo ricco di ossidi di calcio e fosforo.
- 5- Gli ossidi di calcio e fosforo possono poi formare dei cristalli di apatite, presente naturalmente nel corpo umano. La formazione di apatite conferisce al vetro la proprietà di bioattività.

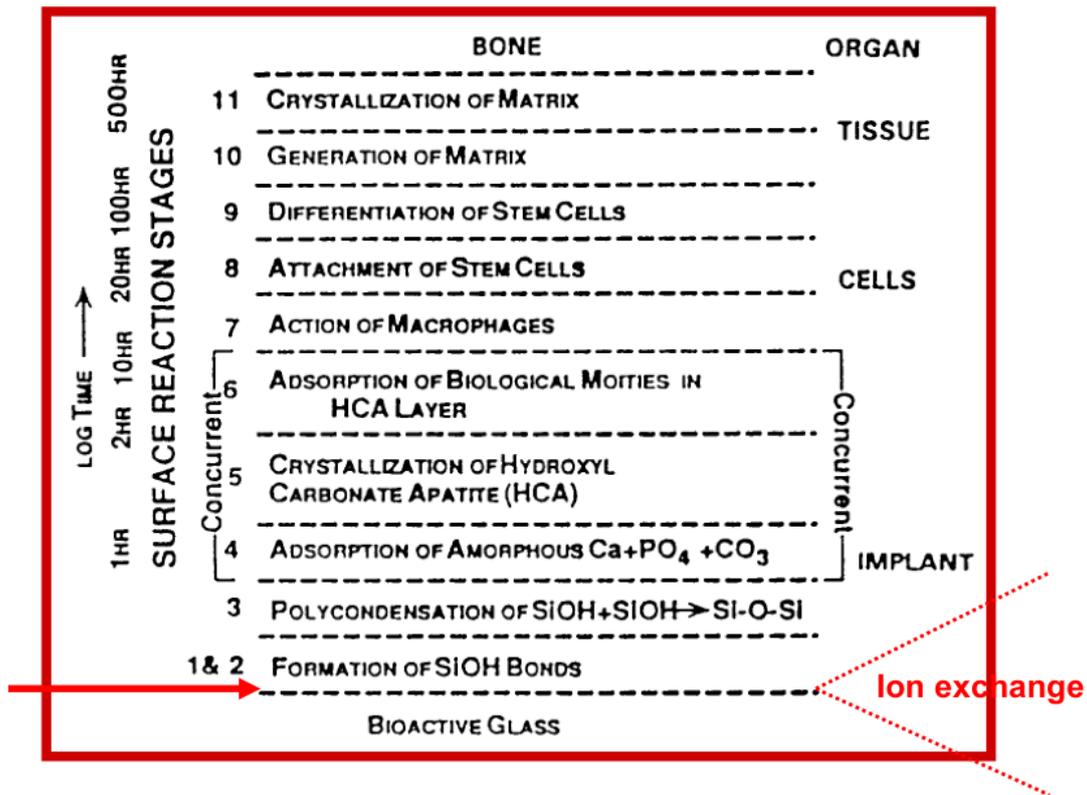


Figura 1.14 - Meccanismo di bioattività in vivo³

Il meccanismo di bioattività *in vivo* (figura 1.14) invece risulta essere più complicato infatti, oltre ai 5 passaggi appena descritti bisogna considerare anche la presenza delle cellule, quindi si aggiungono quindi ulteriori 6 passaggi³. Dentro lo strato ricco di calcio e di fosforo vengono assorbiti anche fattori di crescita e molecole biologiche responsabili della vita delle cellule che vanno ad aderire sulla superficie del vetro. Le prime cellule ad essere assorbite sono i macrofagi che tentano di innescare la reazione di corpo estraneo; in seguito troviamo le cellule progenitrici del tessuto osseo non ancora differenziate. Le cellule progenitrici del tessuto osseo una volta differenziate sono in grado di deporre ECM che si calcifica formando tessuto osseo sano, il risultato in vivo è la completa integrazione con i tessuti calcificati (osteointegrazione) o non calcificati. Il diagramma in figura rappresenta le composizioni dei vetri costituiti dal 6% in peso di P₂O₅ e quantità variabili di SiO₂, CaO e Na₂O per le quali si può avere legame unicamente con l'osso (regione A) oppure con l'osso ed i tessuti molli (regione S).

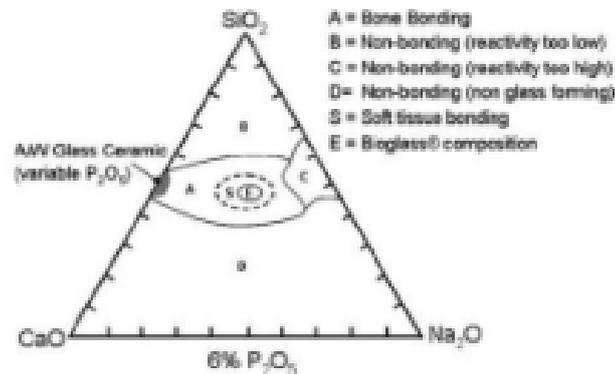


Figura 1.15- Diagramma delle composizioni dei vetri bioattivi³

1.6.2 Apatite e bioattività

Il fattore che permette di definire la bioattività del vetro è la formazione, sulla superficie, di cristalli di apatite. Con il termine apatite si intende una famiglia di minerali con formula generica $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3[\text{F},\text{OH},\text{Cl}]$; si tratta di una struttura ionica caratterizzata da un alto punto di fusione (oltre 1400°C). La formazione di apatite che avviene in vivo può essere riprodotta in vitro in SBF (simulated body fluid); è bene tenere presente che i campioni trattati in SBF subiscono una modifica chimica in superficie, con fenomeni quali corrosione, leaching, degradazione e precipitazione. La precipitazione fa sì che si crei sulla superficie del vetro una fase ricca di calcio e fosfati inizialmente amorfa. In soluzione sono presenti numerosi anioni carbonati, che causano la cristallizzazione di questa fase amorfa e la conseguente formazione di HAC (idrossiapatite cristallina) un'apatite con reticolo cristallino a forma di prisma esagonale (figura 1.14) presente in grande quantità nelle ossa. La formula chimica dell'idrossiapatite è $\text{Ca}(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$.

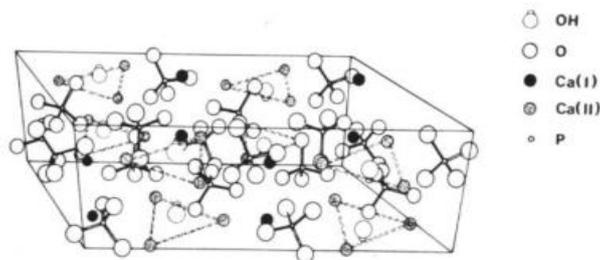


Figura 1.16- Struttura della idrossiapatite cristallina⁹

1.6.3 Composizione

La composizione (%wt) tradizionale del Bioglass[®] è la seguente: 45% SiO₂ 6%P₂O₅ 24.5% CaO 24.5% Na₂O; tuttavia questi valori sono stati modificati da diversi ricercatori al fine di ottenere migliori proprietà meccaniche, migliore lavorabilità del vetro e permettere il rilascio di ioni terapeutici dal vetro.

Di seguito sono elencati le formulazioni (%wt) di vetri bioattivi più note con le loro formulazioni:

Vetro	SiO ₂	P ₂ O ₅	CaO	Ca(PO ₃) ₂	CaF ₂	Na ₂ O	Altri
Bioglass[®] 42S5.6	42,1	2,6	29	-	-	26,3	-
Bioglass[®] 46S5.2[®]	46,1	2,6	26,9	-	-	24,4	-
Bioglass[®] 49S4.9	49,1	2,6	25,3	-	-	23,8	-
Bioglass[®] 52S4.9	52,1	2,6	25,3	-	-	23,8	-
Bioglass[®] 55S4.3	55,1	2,6	22,2	-	-	20,1	-
Bioglass[®] 60S3.8	60,1	2,6	19,6	-	-	17,7	-
Bioglass[®] 4585	45	6	24,5	-	-	24,5	-
Bioglass[®] 4585F	45	6	12,25	-	12,25	24,5	-
Bioglass[®] 45S5.4F	45	6	14,7	-	9,8	24,5	-
Bioglass[®] 40S5B5	40	6	24,5	-	-	24,5	5 B ₂ O ₃
Bioglass[®] 52S4.6	52	6	21	-	-	21	-
Bioglass[®] 55S4.3	55	6	19,5	-	-	19,5	-

Ceravital KGC	46,2	-	20,2	25,5	-	4,8	2,9 MgO 0,4 K ₂ O
Ceravital KGS	38	-	31	13,5	-	5	-
Ceravital KGy213	38	-	31	13,5	-	4	7 Al ₂ O ₃ 6,5 Ta ₂ O ₅
Ceravital Bioactive	40-50	10-15	30-35	-	-	5-10	2,5-5 MgO 0,5-2 K ₂ O
Ceravital non bioactive	30-35	7,5-12	25-30	-	-	3,5-7,5	1-2,5 MgO 0,5-2 K ₂ O 5-15 Al ₂ O ₃ 5-15 Ta ₂ O ₅ 1-5 TiO ₂
Cerabone	34,2	16,3	44,9	-	0,5	-	4,6 MgO

Tabella 1.4 – Principali modifiche alla composizione tradizionale del vetro Bioglass®¹⁴

1.7 Infezioni batteriche

Il problema delle infezioni batteriche è ancora oggi una delle maggiori cause di fallimento dell'impianto; il trattamento antibiotico è infatti spesso complesso e l'unica soluzione risulta essere la rimozione della protesi con conseguente sofferenza ed aumento del tempo di ospedalizzazione per il paziente.

I numeri non devono trarre in inganno, infatti se da un lato solamente l'1% degli interventi di impianto protesico sono soggetti a questo genere di problemi, dall'altro parliamo di un disagio altissimo per il paziente che porta anche ad un aumento esponenziale dei costi della sanità pubblica.

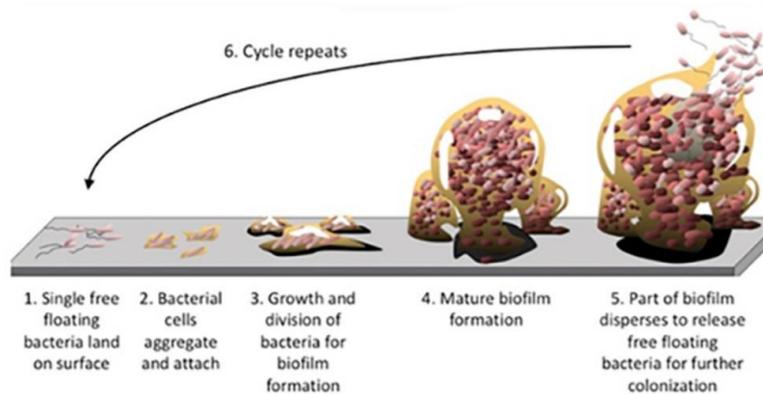


Figura 1.17 - Colonizzazione batterica e formazione del biofilm

I batteri a contatto con una superficie tendono a depositarsi su di essa aggregandosi. Quando i batteri colonizzano una superficie essi crescono ed iniziano a produrre un biofilm (figura 1.17) cioè uno strato proteico che sigilla i batteri e costituisce un microambiente protettivo contro molti agenti antimicrobici. Protetti dal biofilm i batteri riducono la loro attività metabolica, questo rende necessario un aumento delle concentrazioni minime di antibiotici (fino a 800 volte) affinché essi agiscano sui batteri. Sfortunatamente gli antibiotici sistemici non possono raggiungere una tale concentrazione in situ, perciò diventano inefficaci.

Si è quindi cercato di arginare il problema impiantando materiali con proprietà antibatteriche che, in sinergia con il trattamento antibiotico per via sistemica, aiutino a contrastare e combattere l'infezione.

1.7.1 Gli ioni metallici e il loro utilizzo nel drogaggio dei biovetri

Diversi studi^{15 16 18} hanno dimostrato che è possibile drogare alcuni materiali, tra i quali i vetri, con ioni metallici: è stato quindi introdotto il concetto di MITA (Metallic Ions Therapeutic Agents), ossia ioni metallici con ruoli di agenti terapeutici; che secondo la letteratura sono efficaci come cofattori di enzimi nei processi biologici. I MITA sono infatti in grado di interagire con altri ioni e legarsi a macromolecole biologiche quali appunto gli enzimi; inoltre essi sono caratterizzati da un basso costo, da un'elevata stabilità e comportano meno rischi rispetto alle proteine ricombinanti ed altri approcci dell'ingegneria genetica.

I MITA ricoprono ruoli di grande importanza nell'organismo in presenza di situazioni patologiche di tipo diverso, ad esempio tumori, neuropatie, patologie del sistema gastrointestinale e del sistema endocrino. È importante controllare alcuni parametri come la concentrazione ed il rilascio dei MITA al fine di evitare la diffusione sistemica che potrebbe causare una potenziale tossicità. Il modo migliore è legare i MITA a matrici che costituiscono un substrato adatto, ad esempio zoolite, idrossiapatite, fibre di carbonio, o vetri bioattivi. È stato osservato¹⁵ che i MITA rilasciati dai biovetri hanno un potenziale antibatterico significativo e inoltre un forte potenziale pro-angiogenetico.

Nella tabella seguente sono elencati i principali MITA con una descrizione dei loro effetti biologici, in particolare si farà riferimento all'argento, materiale oggetto di questa attività di tesi:

Ione	Funzione ed effetti biologici	Sperimentazione
Calcio	Formazione di idrossiapatite nelle ossa; ruolo nell'esocitosi ed altri processi che regolano la contrazione muscolare; incrementa l'espressione di fattori di crescita IGF (insulina); gli ioni calcio sostituiscono gli ioni sodio nella depolarizzazione delle cellule cardiache quando queste devono aumentare il rilascio di glutammato da parte degli osteoblasti	In vitro ed in vivo

Cobalto	Contribuisce alla produzione della vitamina B12 e quindi dei globuli rossi; il cloruro di cobalto può attivare il fattore di crescita HIF-1 nelle cellule mesenchimali e il VEGF; favorisce la produzione di cellule stromali del midollo osseo, che hanno un ruolo fondamentale nella vascolarizzazione dei muscoli danneggiati in seguito ad infarto o ictus	In vitro
Rame	Stimolazione e proliferazione di cellule endoteliali umane; inibizione di diversi tipi di enzimi; regolazione della proliferazione delle cellule mesenchimali; facilita il rilascio di fattori di crescita e citochine dalle cellule; ha proprietà antibatteriche nei confronti dei batteri Gram positivi; stimola l'angiogenesi in vivo e l'angiogenesi in associazione con FGF-2.	In vitro ed in vivo
Gallio	Alterazione della permeabilità della membrana plasmatica e delle funzioni dei mitocondri; effetti nel trattamento dell'ipercalcemia associata alle metastasi tumorali, lo ione Ga ³⁺ inibisce il riassorbimento degli osteoclasti ed abbassa i livelli di calcio nel sangue, ha inoltre effetti antibatterici	In vivo ed in vitro
Argento	Lo ione Ag ha effetto antibatterico, si lega al DNA	In vivo ed in vitro

	<p>microbico (impedendo la replicazione) o ai gruppi solfidrici degli enzimi batterici. Dimostra inoltre effetti pro angiogenetici.</p>	
--	---	--

Tabella 1.5. Proprietà dei principali ioni metallici¹⁵

1.8.1 L'argento

L'argento, numero atomico 47, è un metallo di transizione tenero, bianco e lucido. È stato utilizzato fin dall'antichità per creare gioielli e monete ma oggi il suo principale campo di applicazione riguarda il settore industriale dove sono sfruttate le sue proprietà termiche ed elettriche: l'argento risulta infatti essere il conduttore migliore tra i metalli e presenta forti capacità anti corrosive. L'argento trova quindi la sua maggiore applicazione in elettronica, dove è usato per creare connessioni ad alta qualità, circuiti stampati e batterie ad alta capacità. È inoltre importante il suo impiego nei pannelli fotovoltaici dove la sua fotosensibilità è sfruttata per generare corrente.

1.8.2 L'argento e le sue proprietà antibatteriche

Le proprietà antibatteriche dell'argento sono conosciute in tutto il mondo da diversi secoli e le loro applicazioni sono le più disparate. I Fenici conservavano acqua ed altri liquidi in bottiglie rivestite d'argento per evitarne la contaminazione, inoltre per secoli è stato usato per trattare le ustioni. Dal 1700 il nitrato d'argento è stato usato per combattere le malattie veneree, fistole delle ghiandole salivari ed ascessi. Verso la fine del XX secolo era pratica comune somministrare alcune gocce di una soluzione contenente nitrato d'argento ai neonati per prevenire la trasmissione della gonorrea dalle madri infette. Negli anni '40, dopo la scoperta della penicillina, l'impiego dell'argento come antibatterico è drasticamente calato, ma negli ultimi anni è tornato in auge a causa del problema della resistenza agli antibiotici.

1.8.3 Il meccanismo antibatterico degli ioni argento

Il meccanismo antibatterico degli ioni argento non è ancora stato completamente chiarito, ma può essere compreso osservando i cambiamenti morfologici e strutturali riscontrabili nelle cellule batteriche. Secondo studi recenti¹⁹ gli ioni argento interagiscono con i gruppi solfidrilici, amminici, imidazolici, carbonilici e fosfato presenti nelle proteine di membrana e negli enzimi dei microorganismi batterici. Durante l'interazione tra gli ioni argento e l'idrogeno presente nei gruppi

funzionali, quest'ultimo viene rimpiazzato dall'argento ionizzato con la creazione di un legame S-Ag. Gli ioni argento bloccano così la catena respiratoria della cellula batterica interagendo al livello degli enzimi respiratori citocromo ossidasi e succinato deidrogenasi. Gli ioni argento inoltre sono in grado di formare dei complessi con gli acidi nucleici (RNA o DNA) bloccandone la trascrizione mentre gli ioni che si legano alla superficie della cellula bloccano la respirazione batterica e la sintesi dell'ATP. In particolare nello studio¹⁷ di Feng et al. sono presentati gli effetti degli ioni argento su due ceppi batterici differenti: l'*Escherichia coli* (Gram negativo) e *Staphylococcus aureus* (Gram positivo).¹⁷

E.coli: In seguito all'azione degli ioni Ag^+ dalle immagini ottenute al microscopio elettronico (figura 1.18) si notano numerose modifiche di tipo strutturale. Al centro della cellula batterica, si forma una zona a basso peso molecolare, riconoscibile dalla colorazione chiara; al suo interno è evidente un accumulo di DNA in forma condensata ed arrotolata. Intorno alla zona chiara si accumulano granuli elettrodensi, granuli che risultano totalmente assenti all'interno di quest'ultima: si pensa quindi che la zona chiara abbia la funzione di impedire ai granuli di entrare, si tratta quindi di un meccanismo protettivo della cellula. L'analisi ai raggi X dei granuli evidenzia inoltre la presenza di argento e zolfo, segno che gli ioni argento sono penetrati all'interno della cellula ed hanno interagito con i gruppi tiolo. Si osserva inoltre, attraverso un confronto con una cellula batterica non trattata, il distacco della membrana citoplasmatica dalla parete cellulare. Gli ioni argento hanno quindi un duplice effetto: bloccano la capacità della cellula di replicare e interferiscono con l'attività enzimatica. Il DNA è infatti capace di replicarsi solamente quando si trova in forma rilassata, perde invece la capacità di replicazione quando si trova in forma condensata. I gruppi tiolo sono invece un importante gruppo di proteine che regolano l'attività enzimatica; gli ioni argento, combinandosi con i gruppi tiolo, compromettono l'attività enzimatica della cellula portandola all'apoptosi.¹⁷

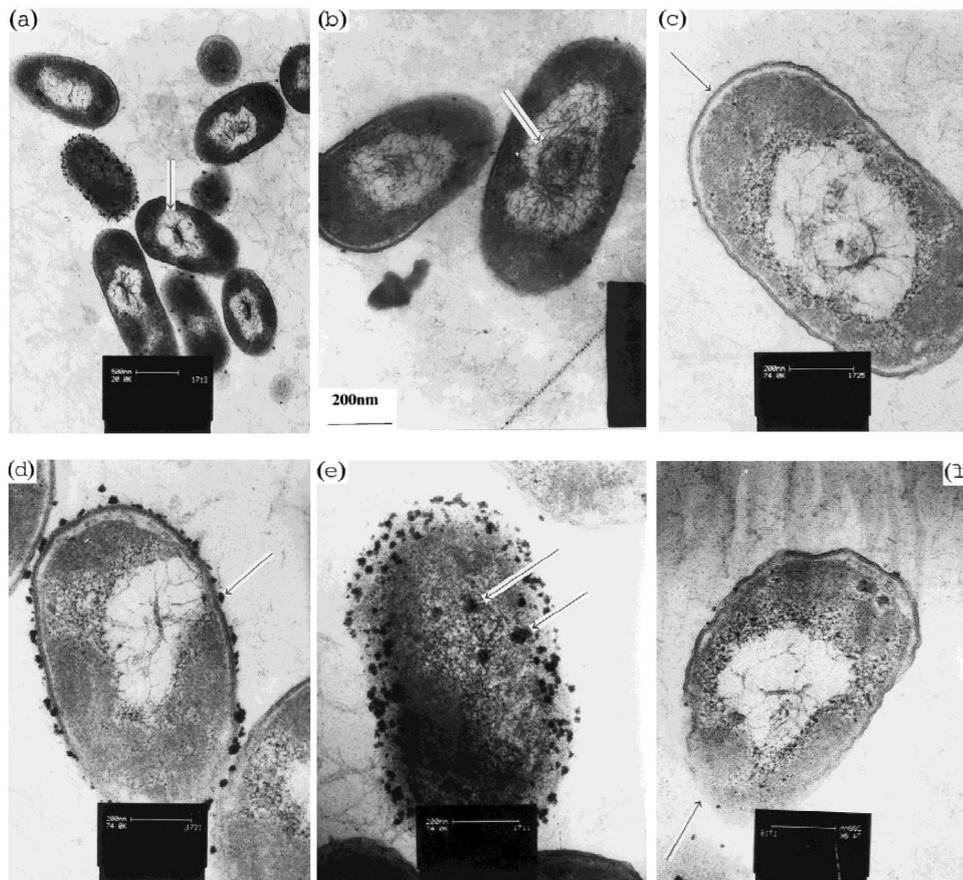


Figura 1.18 - Azione dell'argento su *E. coli*, (A-B): si nota una zona chiara centrale che presenta all'interno DNA condensato, (C) distacco della membrana citoplasmatica dalla parete cellulare, (D) granuli elettrodensi intorno alla parete cellulare, (E) cellula composta da molti granuli elettrodensi, (F) parete cellulare gravemente danneggiata.¹⁷

- **S. aureus:** Nelle immagini ottenute al microscopio elettronico (figura 1.19) si osservano cambiamenti simili a quelli dell'*E. coli*, si forma una zona chiara al centro della cellula con all'interno del DNA in forma condensata, si osserva il distacco della membrana citoplasmatica dalla parete cellulare anche se in maniera meno marcata rispetto al caso precedente. Rispetto all'*E. coli*, la zona centrale risulta essere più scura ed il numero di granuli elettrodensi risulta minore, questo sta a significare una maggiore resistenza dello *S. aureus* all'azione dell'argento dovuta probabilmente al maggiore spessore dello strato di peptoglicani che costituiscono la parete cellulare.¹⁷

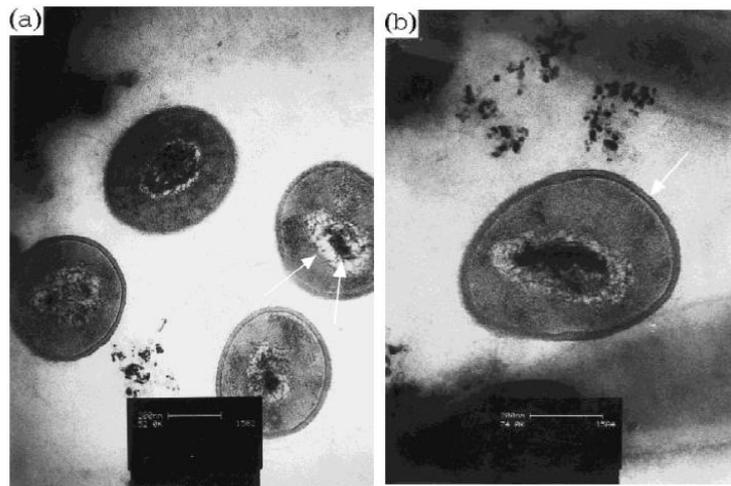


Figura 1.19 - Azione dell'argento su *S. aureus*, (A) regione chiara al centro della cellula batterica con all'interno DNA in forma condensata, (B) distacco della parete cellulare¹⁷

1.8.4 Effetto dell'argento in forma di nanoparticelle

L'uso delle nanoparticelle d'argento (figura 1.20) offre diversi vantaggi rispetto agli ioni argento. Innanzitutto le nanoparticelle grazie alle loro dimensioni ed al vantaggioso rapporto superficie-volume permettono un rilascio controllato degli ioni argento e limitano la quantità di argento impiegata, riducendo i costi ed evitando problemi di citotossicità²⁰. Le nanoparticelle sono caratterizzate dalla capacità di generare ROS (specie reattive dell'ossigeno) che sono in grado di danneggiare le cellule batteriche andando a compromettere l'integrità della membrana, alterandone la permeabilità e interferendo nei meccanismi di trasporto all'interno della cellula invece i ROS sono responsabili dell'ossidazione delle proteine e dei lipidi, interagiscono inoltre con gli acidi nucleici impedendone la replicazione.²¹ (figura 1.22)

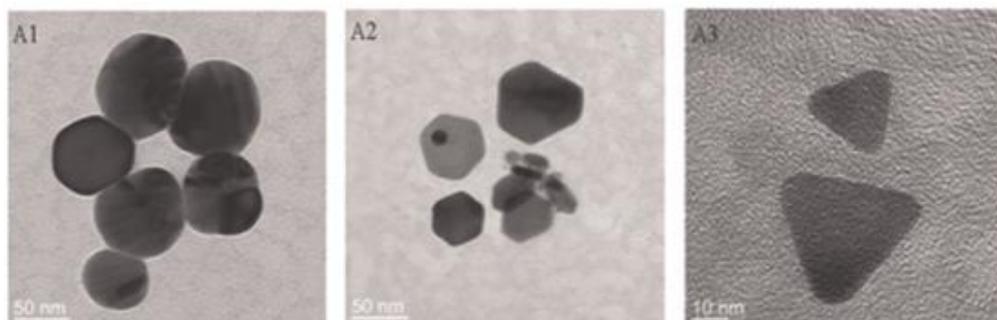


Figura 1.20 - (A1) (A2) (A3) Nanoparticelle di argento di varie forme²²

Tutti questi motivi hanno portato a considerare le nanoparticelle, come dimostrano le numerose ricerche, come la principale via per funzionalizzare in maniera efficace un substrato.

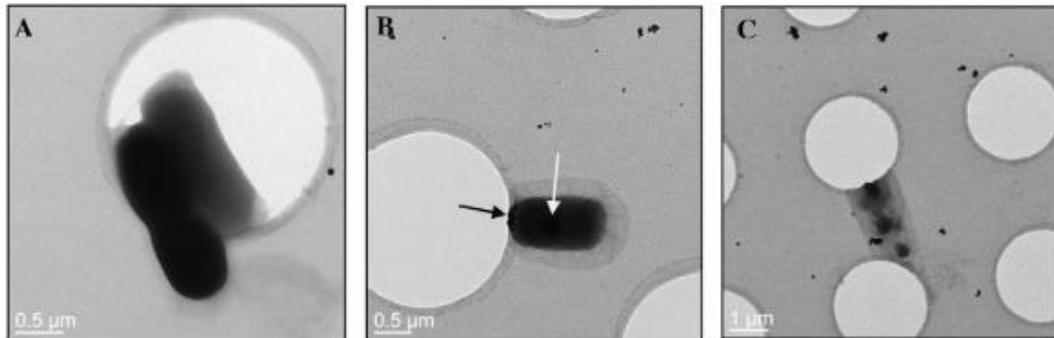


Figura 1.21 - (A) immagine SEM di *E.coli* non trattato, (B) *E.coli* trattato con 8×10^{-8} mg/ml di PEG AgNPs per 4 ore (C) *E.coli* trattato con 8×10^{-8} mg/ml di PEG AgNPs per 24 ore²²

Ad esempio nello studio²¹ condotto da Jun Sung Kim et al. vengono descritti gli effetti delle nanoparticelle d'argento contro lieviti, *E. coli* e *S. aureus*. I risultati mostrano la presenza di radicali liberi, confermando la teoria sull'origine del forte potere antibatterico delle nanoparticelle d'argento. Come osservato anche precedentemente nel caso degli ioni argento, si nota che il potere antimicrobico delle nanoparticelle è maggiore nei confronti di lieviti e *E. coli* (figura 1.21) mentre il risultato è minore nel caso di *S. aureus*; questo è probabilmente dato dalla particolare struttura del batterio che essendo Gram positivo presenta una membrana costituita da uno strato di peptoglicani.

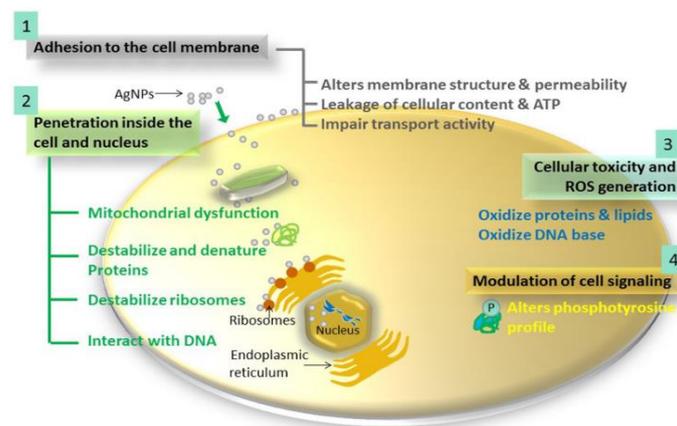


Figura 1.22 - Nanoparticelle d'argento: meccanismo antibatterico²³

1.9 Esempi di funzionalizzazione nei vetri bioattivi

Sono di seguito descritte una serie di applicazioni avvenute con successo che testimoniano la possibilità di funzionalizzare con argento vetri o vetro-ceramici bioattivi.

1.9.1 Scambio ionico

La tecnica dello scambio ionico permette di introdurre l'argento nello strato più esterno dei vetri/vetro-ceramici, preservando la bioattività e garantendo un rilascio controllato degli ioni dalla superficie del vetro. Si tratta di una tecnica strettamente controllata, questo aspetto è particolarmente importante in numerose applicazioni in ambito biomedico infatti l'argento sopra una certa concentrazione critica risulta essere citotossico per le cellule.

Nello studio²⁴ di Vernè et al. si valuta la possibilità di indurre proprietà antibatteriche superficiali ad un vetro bioattivo con un processo di scambio ionico. Il vetro scelto per questo studio è chiamato SCNA e si differenzia dalle formulazioni tradizionali per l'alto contenuto di silice e perché comprende nella sua formulazione il 3% di allumina; questo lo rende un vetro caratterizzato da un basso indice di bioattività ed è quindi utilizzabile per realizzare dispositivi caratterizzati da una lunga durata. L'SCNA è quindi consigliato per la realizzazione di rivestimenti su substrati inerti (metallici o ceramici) in modo da indurre un certo grado di bioattività senza però inficiare sulla capacità di adesione all'osso. La composizione del SCNA lo rende, grazie alla sua struttura molto stabile, un tipo di vetro selezionato per ottenere un migliore controllo sul rilascio ionico.²⁴

Una volta ottenuti i campioni di SCNA tramite la fusione dei reagenti il vetro è soggetto ad un processo di scambio ionico per modificarne la superficie introducendo una quantità controllata di ioni argento. Il processo è basato su un trattamento termo-chimico in una opportuna soluzione contenente argento, capace di scambiare gli ioni monovalenti provenienti dal vetro con ioni argento provenienti dalla soluzione stessa in cui immerso il vetro. I parametri che regolano il processo sono la concentrazione degli ioni argento in soluzione, la temperatura ed il tempo del processo.²⁴ Modificando questi valori è possibile regolare il quantitativo di argento introdotto nei campioni di SCNA che dopo il trattamento sono chiamati Ag-SCNA. I campioni di Ag-SCNA sono caratterizzati per testare gli effetti del processo di scambio ionico utilizzando come confronto i campioni di SCNA non trattati con l'argento.

Le analisi XRD condotte sui campioni di Ag-SCNA e SCNA mostrano le stesse caratteristiche: un alone amorfo senza picchi di diffrazioni definiti, questo dimostra la natura vetrosa di entrambi i materiali. I parametri scelti per il processo di scambio ionico non inducono quindi cambiamenti

nella struttura del vetro e la quantità di argento introdotta è abbastanza bassa da evitare la formazione di ogni forma di argento cristallino.²⁴ Allo stesso modo le osservazioni SEM non mostrano evidenza della presenza dell'argento. Le analisi EDS mostrano però la presenza di tracce di argento sulla superficie del campione di Ag-SCNA. L'argento è presente a composizioni inferiori alla sensibilità dello strumento e per questa ragione non è possibile stimarne l'esatta percentuale in peso. I test di rilascio in SBF mostrano però un rilascio di ioni argento non trascurabile, rilascio che risulta essere più elevato immediatamente dopo il contatto tra il campione di Ag-SCNA e l'SBF e che lentamente degrada con l'aumentare del tempo di immersione del campione Ag-SCNA.²⁴

L'osservazione SEM dei campioni di Ag-SCNA sottoposti al test di bioattività in SBF non mostra sostanziali differenze rispetto ai campioni di controllo, dopo 14 giorni non è stata riscontrata la presenza né di gel di silice né di idrossiapatite tuttavia si può osservare la presenza di strutture simili all'idrossiapatite sia su Ag-SCNA che sui campioni di vetro non trattato dopo 28 giorni di immersione in SBF, confermando la moderata bioattività dell'SCNA.²⁴

I test di biocompatibilità dimostrano la compatibilità del materiale nei confronti delle cellule: sia la conta cellulare che la morfologia delle cellule incubate sui campioni di SCNA e Ag-SCNA non mostrano differenze fra i due materiali. La biocompatibilità delle cellule è stata valutata a 24 h in quanto in questo periodo la maggior parte dell'argento viene rilasciato dai campioni mentre il rilascio di argento per tempi superiori raggiunge valori minimi ²⁴ (figure 1.23,1.24)

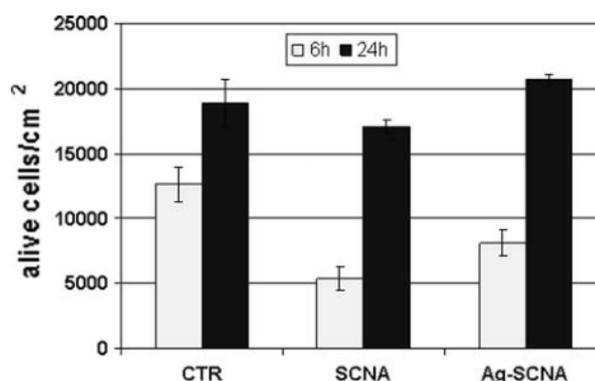


Figura 1.25 - Conta delle cellule adese (6h) e proliferazione (24h), confronto tra SCNA, Ag-SCNA e controllo²⁴

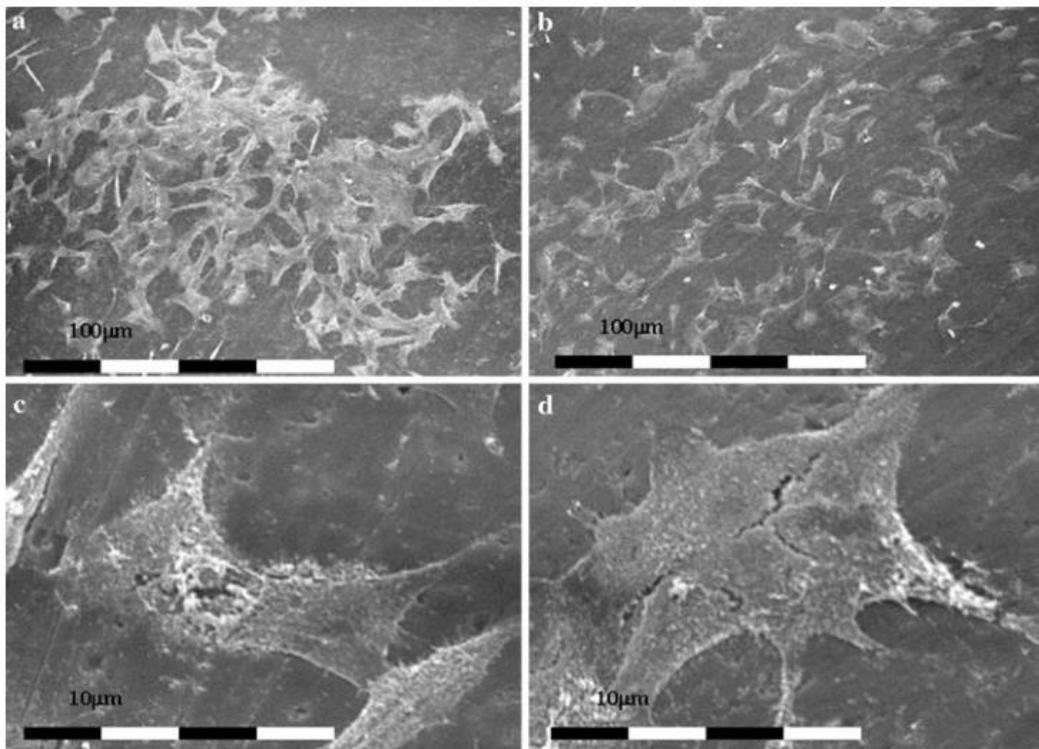


Figura 1.24 - Valutazione della citocompatibilità (a)(c) SCNA e (b)(d) ag-SCNA²⁴

I test di antibattericità sono effettuati considerando come parametro di riferimento l'indice di McFarland: i risultati dimostrano l'efficacia nell'argento nel donare capacità antibatteriche ai campioni di Ag-SCNA, la differenza fra gli indici di McFarland tra Ag-SCNA e SCNA è di circa 4,6 per *S. aureus* e 4 per *E. coli*. I test di antibattericità mostrano anche che il campo di azione per i campioni di Ag-SCNA è pari a 2 mm mentre i batteri proliferano direttamente sui campioni di SCNA non modificato come si vede dalla figura 1.25.²⁴

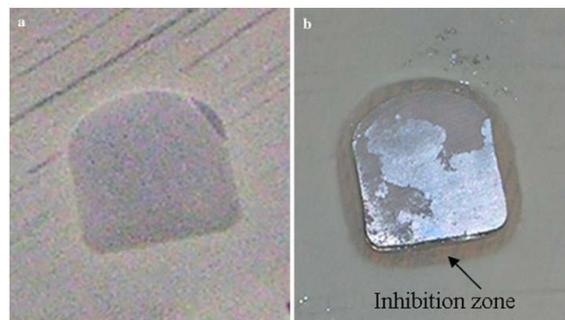


Figura 1.25 - (A) SCNA e (B) ag-SCNA effetto dell'argento, i campioni sono depositati su una piastra di Mueller-Hinton si nota una zona di inibizione che circonda il campione funzionalizzato con l'argento.²⁴

Questi risultati permettono di confermare l'effetto positivo degli ioni argento nel conferire proprietà antibatteriche a dispositivi medici totalmente o parzialmente costituiti da vetro senza nessuno danno alla bioattività.²⁴

In un altro studio²⁵ di Vernè et al. si utilizza lo scambio ionico per modificare la superficie di un vetro bioattivo introducendo ioni argento. In questo caso per minimizzare il contenuto di argento introdotto senza compromettere l'antibattericità si sono scelte due differenti condizioni di scambio ionico: in sale fuso ed in soluzione acquosa.²⁵

Il vetro bioattivo scelto per questo studio è chiamato SCN e presenta la seguente composizione 50% SiO₂, 25% CaO, 25% Na₂O; questo vetro appartiene ad una composizione ternaria studiata da Kokubo e dai suoi collaboratori durante uno studio sulla bioattività dei vetri senza P₂O₅.²⁵

I campioni di vetro sono inseriti in una soluzione di AgNO₃ in NaNO₃ a 380 °C per effettuare lo scambio ionico in sale fuso, questi campioni vengono chiamati S-SCN. I campioni di SCN scelti per lo scambio ionico in soluzione acquosa sono invece inseriti in una soluzione 0.5 M di AgNO₃ per 70 giorni a temperatura ambiente, questi vengono definiti A-SCN.²⁵

Una volta terminati i trattamenti i campioni vengono caratterizzati per analizzare il risultato dei due trattamenti. I pattern XRD dei campioni sono molto simili: si osserva solamente un alone amorfo a testimonianza del fatto che le condizioni di processo non modificano la struttura del vetro.²⁵ Le osservazioni SEM del campione non mostrano sostanziali differenze ad eccezione del campione S-SCN dove l'osservazione in backscattering mostra la presenza di uno strato molto luminoso posizionato sulla superficie, questo indica la presenza di un elemento elettrodenso (Ag). Le analisi EDS sia sul campione SCN che su A-SCN non mostrano evidenze di argento, nel campione S-SCN invece si nota come il quantitativo di argento aumento fino al 17% con però un calo del Na che passa dal 29% riscontrabile nei campioni SCN e A-SCN fino a 5%. I valori di sodio ed argento risultano quindi complementari: ogni ione Ag⁺ sostituisce uno ione Na⁺ durante un processo di scambio ionico.²⁵

Dopo i test di bioattività in SBF i campioni sono analizzati con le analisi XRD. Come si può vedere in figura 1.26 i campioni SCN mostrano la formazione di uno strato di gel di silice mentre sui S-SCN si nota la precipitazione di AgCl e successivamente la formazione di CaCO₃. Sui campioni A-SCN solo i picchi più intensi di idrossiapatite e CaCO₃ sono evidenti.²⁵

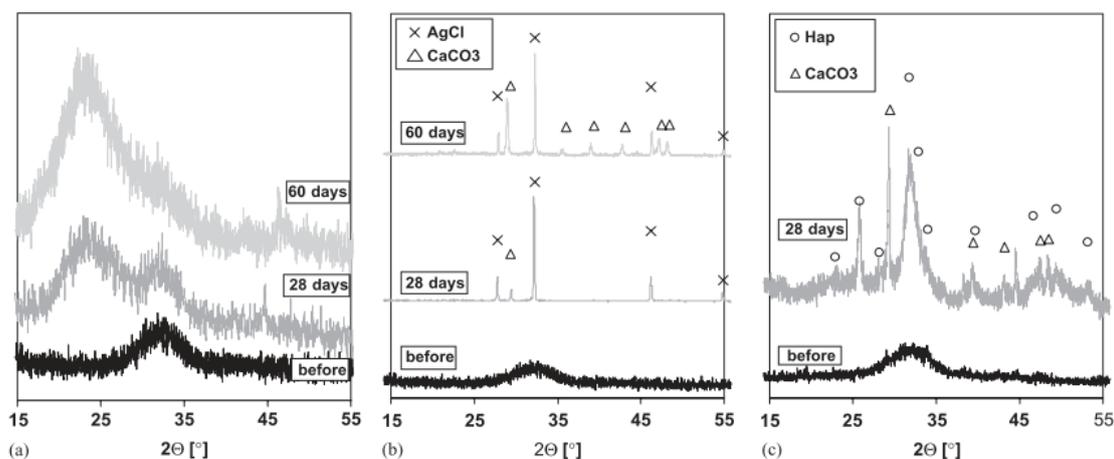


Figura 1.26 - Pattern XRD (a) SCN, (b) S-SCN and (c) A-SCN (c) prima e dopo l'immersione in SBF per diversi periodi di tempo²⁵

I test di rilascio sono condotti valutando la quantità di ioni argento rilasciati in SBF dai campioni A-SCN e S-SCN tramite la tecnica GFASS. Il profilo di rilascio è simile per entrambi i campioni e può essere rappresentato con una funzione dipendente dalla radice quadrata del tempo. Il processo di rilascio degli ioni argento dipende da numerosi fattori tra i quali anche il processo di dissoluzione coinvolto nel meccanismo di bioattività del vetro stesso, il rilascio degli ioni argento è contrastato dalla formazione dello strato di idrossiapatite che rende la superficie più spessa rallentando il processo. Bisogna inoltre considerare l'influenza di AgCl che può precipitare sulla superficie.²⁵

Le immagini SEM dopo la coltura cellulare (figura 1.27) mostrano la presenza di cellule sane, con un buon livello di spreading sui i campioni SCN mentre i campioni S-SCN mostrano la presenza di materiale organica disorganizzato e l'assenza totale di cellule vive. Queste osservazione ci permettono di dimostrare l'effetto citossico della superficie dei campioni S-SCN.²⁵ Per questo motivo i test di attività LDH sono effettuati solo sui campioni SCN e A-SCN.

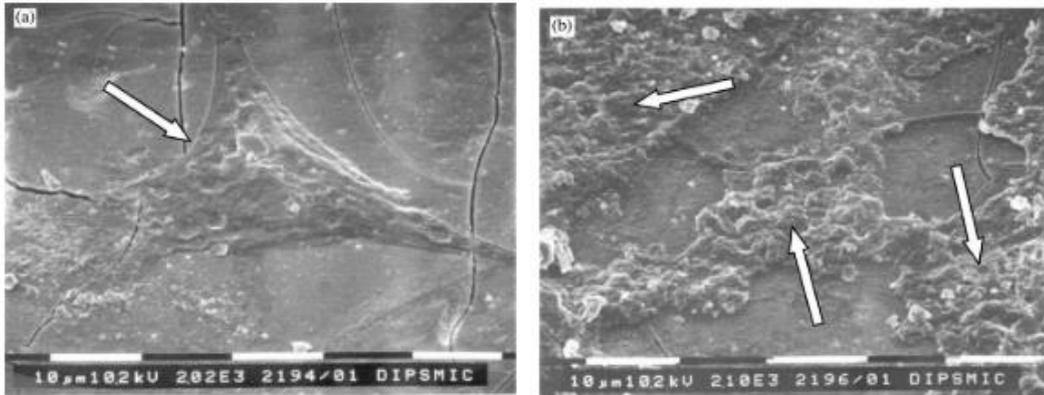


Figura 1.27 - Immagini SEM delle cellule sui campioni di (a) SCN e (b) S-SCN²⁵

Un lieve aumento dei valori dell'attività LDH è riscontrabile su entrambi i campioni di vetro considerati per lunghi tempi di incubazione, questo indica un aumento della citotossicità.²⁵ A-SCN su entrambi i materiali a tempi di incubazione maggiori. Bisogna però sottolineare che esperimenti di conta cellulare non evidenziano sostanziali differenze fra i due vetri SCN e A-SCN, anzi in figura 1.28 si nota come le cellule proliferano su entrambi i campioni senza sostanziali differenze.²⁵ Dopo tre giorni di proliferazione un numero maggiore di cellule è osservabile sui campioni A-SCNA.²⁵

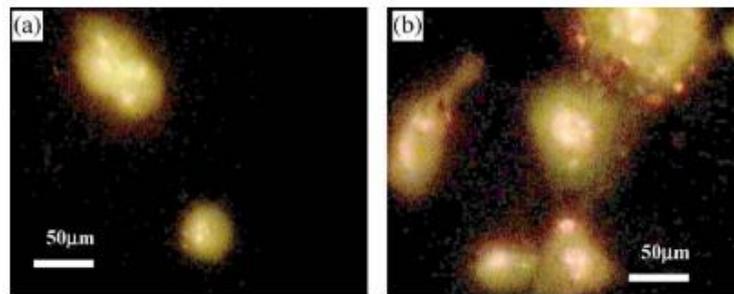


Figura 1.28 - Immagini a fluorescenza di cellule in coltura sulla superficie del campione (a) SCN e (b) A-SCN. Colorazione arancio di acridina²⁵

Tramite ulteriori analisi XRD sui campioni S-SCN condotte dopo la bioattività in SBF si osserva un forte segnale dovuto all'AgCl che è invece assente nelle altre configurazioni testate. Quindi la citotossicità dei campioni S-SCN può essere dovuta alle precipitazioni di AgCl, che sono dovute dall'elevato quantitativo di argento introdotto tramite lo scambio ionico in sale fuso.

In conclusione possiamo osservare che le due configurazioni S-SCN e A-SCN pur avendo un profilo di rilascio simile si comportano molto diversamente a contatto con le cellule. Risulta quindi chiaro l'importanza di utilizzare tecniche di scambio ionico che introducano nel vetro una quanto più possibile bassa concentrazione di ioni Ag^+ e soprattutto che tali ioni siano successivamente interamente rilasciati in soluzione senza creare precipitati come AgCl .²⁵

1.9.2 L'argento inserito come reagente del vetro

Una ulteriore possibilità è quella di inserire l'argento direttamente nel vetro inserendolo tra i reagenti. In letteratura sono presenti pochi esempi di questa strategia però nello studio ²⁶ di Wilkinson et al. vengono valutate le proprietà antibatteriche di un vetro chiamato Theraglass® Ag la cui composizione è 70% SiO_2 28% CaO 2% AgO . Le potenzialità antibatteriche del vetro in esame sono studiate confrontando gli effetti sue due ceppi batterici differenti: *P. aeruginosa* e *S. aureus*. I risultati ottenuti sono confrontati con i risultati delle analoghe prove condotte sul campione di controllo di Theraglass®. I risultati²⁶ mostrano che il vetro contenente argento risultata essere efficace nel combattere la crescita di entrambi i ceppi batterici considerati, mentre il campione di controllo mostra una inibizione della crescita solo nei confronti del *P. aeruginosa*. Questo comportamento antibatterico anche del campione non contenente argento è spiegabile²⁶ valutando la particola struttura del batterio che essendo Gram negativo esibisce una struttura più semplice ed è quindi sufficiente l'aumento del pH dovuto al meccanismo di bioattività del vetro per creare stress ossidativo e danneggiare la cellula batterica. Il vetro di controllo non mostra però nessuna efficacia nel combattere lo *S. aureus*, efficacia che invece ha il Theraglass® Ag.²⁶

1.9.3 Funzionalizzazione con nanoparticelle

Un'altra opzione è l'utilizzo dell'argento sotto forma di nanoparticelle, metodica seguita anche in questo lavoro di tesi. Le nanoparticelle d'argento trovano vasta applicazione in ambito biomedicale sia per le loro interessanti proprietà ottiche^{27 28} sia il loro forte potere anti microbico^{20 23}. Più nel dettaglio nello studio di Chen Y. et al²⁷ l'argento è depositato sotto forma di nanoparticelle sfruttando un doppio processo di scambio ionico: gli ioni argento sono prima introdotti nel vetro attraverso un primo scambio ionico, successivamente le particelle vengono ridotte attraverso un processo di equilibrio con gli ioni potassio. Osservando il processo più nel dettaglio, il vetro viene immerso in una soluzione contenente 5% di AgNO₃ in una soluzione con rapporto 50/50 di NaNO₃ e KNO₃ a 300 °C per 6 ore per scambiare gli ioni argento con il vetro. In seguito viene depositato uno strato di alluminio tramite un evaporatore a fascio di elettroni. In questo studio sono stati creati in tutto tre formulazioni diverse, in modo da poter comprendere a fondo il meccanismo di formazione delle nanoparticelle. Il primo campione, dopo la deposizione dell'alluminio, è stato immerso in un sale di KNO₃ a 400 °C per 2 ore per promuovere la formazione delle nanoparticelle. Il secondo campione preparato è invece stato fatto raffreddare in aria mentre il terzo è stato sottoposto allo stesso processo del campione numero uno, la differenza è che in questo caso non è stato depositato lo strato di alluminio.

	Process #1	Process #2	Process #3	
	Ag ⁺ ion exchange	Evaporation of Al film	K ⁺ ion exchange	Annealed in the air
Sample #1	300 °C / 6 h	100 nm	400 °C / 2 h	-
Sample #2	300 °C / 6 h	100 nm	-	400 °C / 2 h
Sample #3	300 °C / 6 h	-	400 °C / 2 h	-

Figura 1.29 - I campioni preparati durante il lavoro²⁰

Per caratterizzare i campioni si sono osservati i gli spettri UV e le immagini al microscopio elettronico a trasmissione (TEM) (figura 1.30). Osservando il picco di assorbimento UV (figura 1.31), si nota come i due campioni che hanno subito anche la deposizione dell'alluminio, mostrino un evidente picco di risonanza, più accentuato nel campione che ha anche subito il trattamento con il sale di potassio. Il risultato rivela il ruolo fondamentale dello strato di alluminio e del sale di potassio nella formazione delle nanoparticelle.

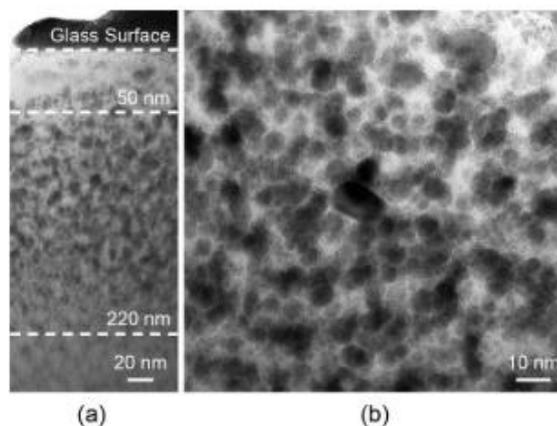


Figura 1.30 - (a) Distribuzione delle nanoparticelle al di sotto della superficie del vetro, (b) immagine TEM delle nanoparticelle²⁰

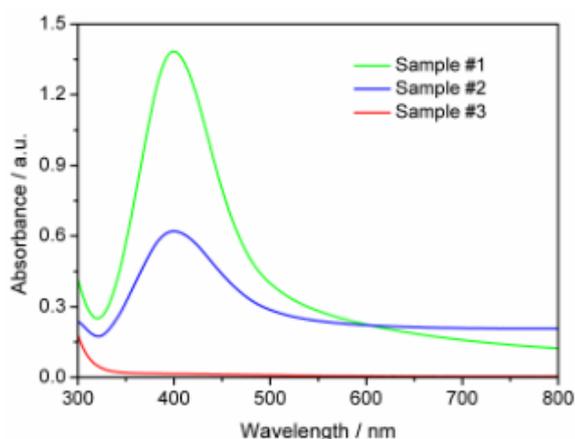


Figura 1.31 - Spettro di assorbimento UV dei tre campioni considerati²⁰

Possiamo ora spiegare il meccanismo che porta alla formazione delle nanoparticelle, si tratta di un meccanismo di sostituzione galvanica che avviene quando si posiziona un metallo sacrificale in una soluzione acquosa contenente uno ione metallico meno attivo. La forza che guida questa reazione è la differenza di potenziale di riduzione standard (E^0) fra questi due metalli. Nel caso qui considerato il layer di Al è usato come materiale sacrificale visto che il suo potenziale di riduzione (-1,676 V) è molto inferiore a quello dell'argento (0.8 V). La differenza però con la sostituzione galvanica tradizionale è che in questo caso gli ioni Ag^+ non sono dissolti nel precursore cristallino ma sono dispersi nella matrice del vetro; nonostante questo il vetro ad alte temperature può essere considerato come un elettrolita solido, la struttura del vetro è infatti molto stabile e solo gli ioni

Ag sono sufficientemente liberi di muoversi. Questo permette la reazione di sostituzione galvanica che implica l'ossidazione degli ioni Al^{3+} e la riduzione degli Ag^+ in argento metallico (figura 1.32).

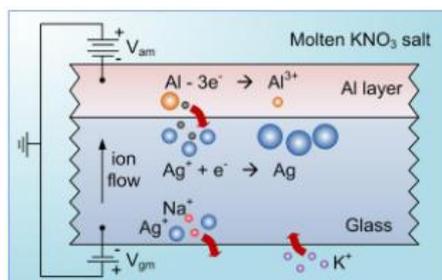


Figura 1.32 - Meccanismo di scambio ionico che interessa il vetro²⁰

Anche nello studio²⁹ di Taglietti et al. si valuta la possibilità di ancorare nanoparticelle d'argento sulla superficie del vetro. In questo caso il vetro viene prima modificato silanizzando la superficie, quindi le nanoparticelle sono vincolate alla superficie del vetro attraverso il legame non covalente che si forma tra i gruppi $-\text{NH}_2$ e gli atomi d'argento (figura 1.33).²⁹

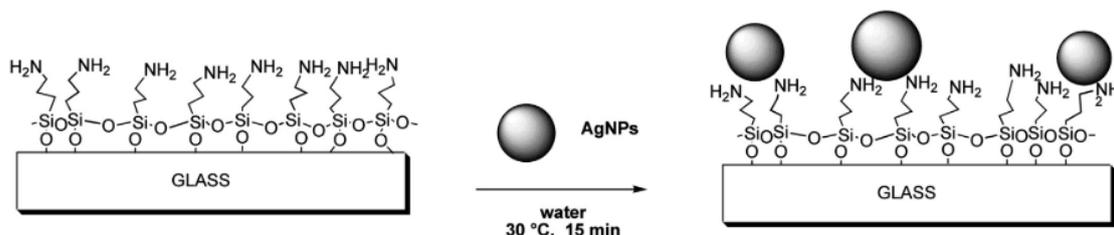


Figura 1.33- Riduzione delle nanoparticelle sulla superficie del vetro silanizzato²⁹

I campioni così creati sono testati a contatto con *S. epidermids RP62A*²⁹, confrontando il comportamento con un campione di controllo di vetro non trattato. Si osserva una marcata riduzione della capacità di sopravvivenza delle cellule batteriche: il numero di cellule batteriche presenti sul vetro su cui sono ridotte le nanoparticelle d'argento è 10^5 volte inferiore rispetto a quello del vetro di controllo.²⁹ Le analisi condotte sui campioni di vetro funzionalizzati con le nanoparticelle mostrano che oltre ad esibire un promettente comportamento in termini di proprietà

antibatteriche si osserva un rilascio controllato di ioni argento dalle nanoparticelle e soprattutto un legame molto vigoroso fra le nanoparticelle d'argento e la superficie del vetro²⁹

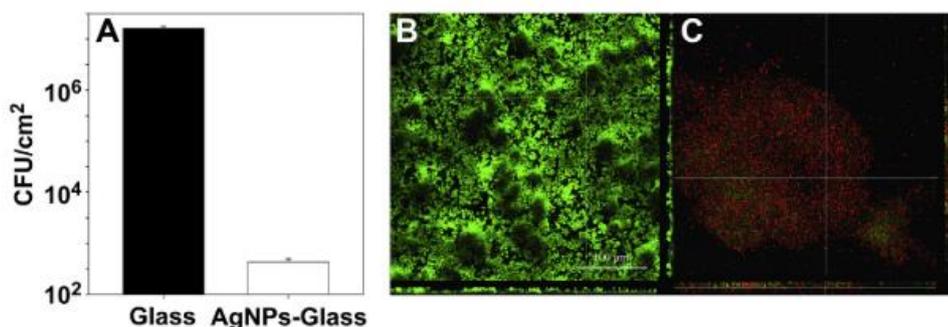


Figura 1.34 – Attività antibatterica delle nanoparticelle d'argento: (A) numero di cellule batteriche vitali presenti nel campione di vetro dopo 24 h, confronto con il vetro modificato con nanoparticelle d'argento, (B, C) cellule batteriche vive (colore verde) dopo 24 h: confronto fra il vetro di controllo (B) e il vetro modificato con le nanoparticelle (C)²⁹

Nello studio¹⁸ di Ferraris et al. si valuta invece la possibilità di ridurre nanoparticelle d'argento sulla superficie di un vetro bioattivo utilizzando l'acido gallico come agente riducente; questa molecola costituisce infatti un semplice modello utile a rappresentare la reattività dei polifenoli, molecole naturali che possono essere facilmente estratte dai residui di lavorazione dell'industria agroalimentare con benefici sia dal punto di vista economico sia in termini di impatto ambientale¹⁸. Il vetro viene inizialmente modificato ancorando l'acido gallico sulla superficie del vetro, in questo modo vengono esposti gruppi OH utili per la successiva riduzione in situ delle nanoparticelle d'argento. I campioni di vetro modificati vengono quindi immersi in una soluzione 0.005 M di nitrato d'argento in modo da ottenere la riduzione in situ delle nanoparticelle d'argento sulla superficie del vetro.¹⁸ Per valutare il potenziale antibatterico del vetro trattato con nanoparticelle sono effettuati test di antibattericità confrontando i risultati con i dati relativi ad un campione di controllo di vetro non trattato.¹⁸ I risultati mostrano una significativa differenza fra il vetro modificato con le nanoparticelle d'argento ed il campione di controllo, con una diminuzione della capacità di sopravvivenza batterica osservabile nel vetro modificato.¹⁸

1.10 PVA

Il PVA (polyvinyl alcohol) è un polimero solubile in acqua ottenuto per idrolisi degli esteri polivinilici che, grazie alla sua biocompatibilità e biodegradabilità, rappresenta un polimero di altissimo interesse in ambito biomedico³⁰; è infatti utilizzato per la fabbricazione di lenti a contatto, cartilagine artificiale, cateteri e per la produzione di idrogeli³⁰. È inoltre possibile sfruttarne le lunghe catene alchiliche come spaziatori per legare e stabilizzare alcune molecole come ad esempio gli idrocarburi stirene, butilacrilato, butilmetacrilato o piccole molecole metalliche come oro o argento.

Il PVA può anche utilizzato come riducente, anche se in ambito biomedicale questa caratteristica è ancora poco sfruttata. In particolare nello studio² di Sagitha et al. si sfrutta il PVA come agente riducente e stabilizzante per le nanoparticelle d'argento, come si può vedere dalla figura 1.35 la presenza dei gruppi OH nel PVA aiuta infatti a ridurre gli ioni argento in nanoparticelle d'argento.



Figura 1.35 - Meccanismo di riduzione delle nanoparticelle d'argento: ruolo del PVA²

Nell'articolo si prepara una soluzione 0.3 M di PVA in acqua distillata, la soluzione viene quindi riscaldata e soggetta a miscelazione per ottenere una miscela omogenea di PVA in acqua. Alla soluzione si aggiunge quindi 1 ml di una soluzione 0.2 M di AgNO_3 e 0,2 ml di una soluzione 0,3 M di NaOH. Il colore della soluzione vira quindi verso il giallo (figura 1.36), questo testimonia la formazione delle nanoparticelle di argento.

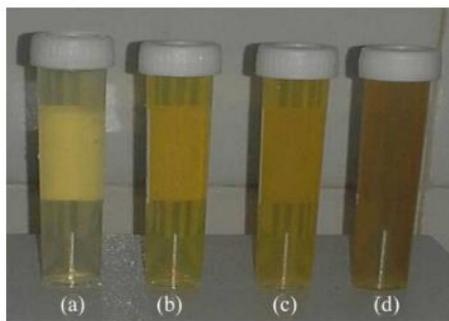


Figura 1.36 - Soluzione di nanoparticelle d'argento formate a diverse temperature (a) 30 °C (b) 60 °C (c) 120 °C (d) 180 °C²

La formazione delle nanoparticelle è confermata dalle analisi UV-vis (figura 1.37), in particolare si nota un picco a 426 nm che corrisponde alla lunghezza d'onda caratteristica delle nanoparticelle d'argento.

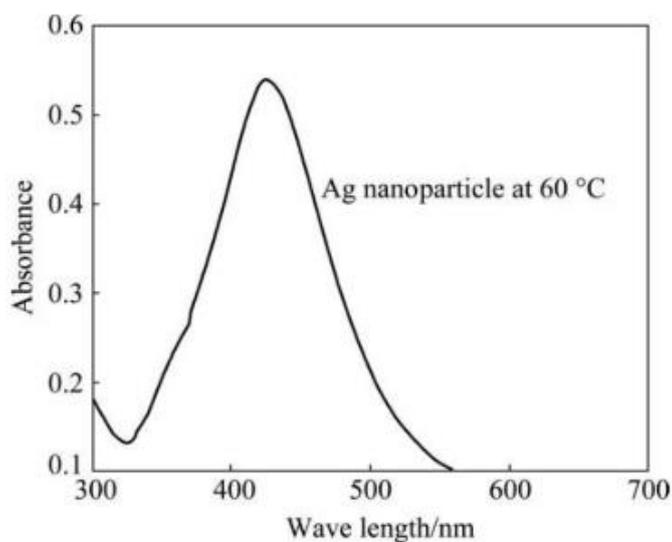


Figura 1.37 - Spettro UV- vis della soluzione considerata²

Si osserva inoltre che il colore della soluzione diventa più scuro aumentando il tempo di reazione, questo a causa dall'aumento del numero di particelle sintetizzate all'aumentare del tempo di reazione. Durante il trattamento, la riduzione degli ioni Ag^+ avviene perché il PVA si comporta da agente riducente che riduce gli ioni argento in argento metallico. Osservando il variare dell'ampiezza del picco UV-vis al variare del tempo di reazione (figura 1.38) si nota che l'assorbanza aumenta con il passare del tempo; inizialmente l'aumento è molto marcato, ma si stabilizza con il passare del tempo: questo può dipendere dal fatto che la reazione che porta alla riduzione delle nanoparticelle raggiunge un equilibrio dopo un certo tempo

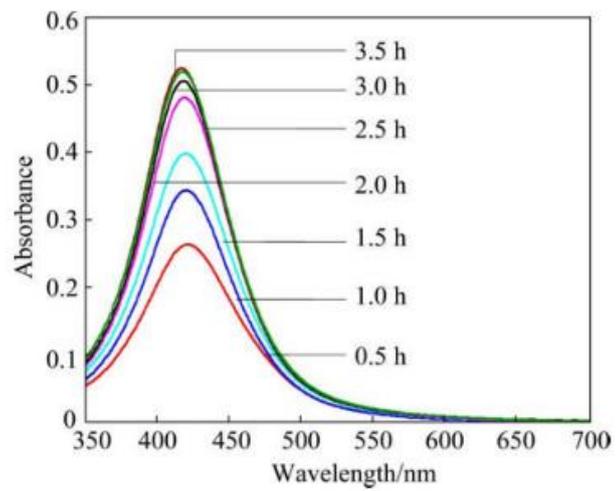


Figura 1.38 - Effetto del tempo di reazione sul numero di nanoparticelle²

Prendendo spunto da questo articolo, nel presente lavoro di tesi si è cercato di funzionalizzare la superficie di un vetro bioattivo con nanoparticelle di Ag sfruttando il potere riducente del PVA.

Capitolo 2

Materiali e metodi

In questo capitolo è descritta la procedura sperimentale per realizzare i campioni di vetro SBA2 ed i successivi passaggi per la riduzione *in situ* delle nanoparticelle d'argento. Sono inoltre descritti i metodi e gli strumenti per la caratterizzazione dei campioni e le procedure seguite per eseguire i test di bioattività e di antibattericità.

2.1 Sintesi delle polveri di SBA2

2.1.1 Pesata dei reagenti

Il vetro SBA2, come già detto, appartiene alla famiglia del Bioglass®, la sua composizione riportata in tabella 2.1.

Ossidi	% Wt
Na ₂ O	18,03
SiO ₂	46,53
CaO	27,14
P ₂ O ₅	6,88
B ₂ O ₃	0,48
Al ₂ O ₃	0,94

Tabella 2.1 - composizione dello SBA2

La composizione del vetro SBA2 differisce da quella tradizionale del Bioglass® in quanto alla silice (SiO₂), all'ossido di sodio (Na₂O), all'ossido di calcio e all'anidride fosforica (P₂O₅), sono stati aggiunti ossido di boro (B₂O₃) e a allumina (Al₂O₃).

	% mol	PM ossidi	PM reagenti	Numero di moli
Na₂O	18	62	106	0,290322
SiO₂	48	60	60	0,8
CaO	30	50	100	0,6
P₂O₅	3	142	310	0,021126
B₂O₃	0,42	69,6	61,8	0,006034
Al₂O₃	0,94	102	102	0,009215
TOT	100			1,726697

Tabella 2.2 - Composizione dello SBA2

A partire dalle quantità degli ossidi occorrenti per formare il vetro è effettuato il calcolo delle percentuali in grammi dei reagenti necessari per ottenere il vetro secondo la seguente formula:

$$\%g_{reagente} = \frac{g_{vetro}}{100} \cdot \%Wt_{componente} \cdot \frac{PM_{reagente}}{PM_{componente}}$$

Dove $\%Wt_{componente}$ è la percentuale in peso del reagente considerato e PM sono i pesi molecolari. Applicando la formula si ottengono risultati elencati in tabella 2.3. Come si può notare l'ossido di calcio si ottiene sia a partire dal fosfato di calcio, sia dal carbonato di calcio; è quindi opportuno fare ulteriori calcoli per sapere con precisione le quantità in peso di fosfato e di carbonato necessarie per ottenere il 27,14% in peso di ossido di calcio. Dal fosfato di calcio si origina anche l'anidride fosforica quindi inizialmente si è calcolata la quantità in peso per ottenere questa (ipotizzando un quantitativo di vetro di 100 g):

$$\%g_{reagente} = \frac{g_{vetro}}{100} \cdot 6,88 \cdot \frac{310}{142}$$

Da cui si ottiene che 15,02 g di fosfato di calcio necessari. A questi sono sottratti i grammi di anidride fosforica pari a 6,88, quindi dalla reazione del fosfato di calcio si ottengono 6,88 g di anidride fosforica e 8,14 g di ossido di calcio. Possiamo ora calcolare il contributo del carbonato di calcio alla formazione dell'ossido di calcio valutando la differenza tra i 27,14 g di CaO richiesto e gli 8,14 g derivanti dal fosfato di calcio. Possiamo infine applicare la seguente formula:

$$\%g_{reagente} = \frac{g_{vetro}}{100} \cdot 19 \cdot \frac{100}{56}$$

I restanti 19 di grammi di ossido di calcio si ottengono quindi dalla reazione di 33,92 g di carbonato di calcio.

Le quantità effettive da pesare risultano quindi essere elencate in tabella 2.3:

Reagenti	PM reagenti	g reagenti
SiO₂	60	46,53
Na₂CO₃	106	30,82
CaCO₃	100	33,92
Ca₃(PO₄)₂	310	15,02
H₃BO₃	61,8	0,43
Al₂O₃	102	0,94

Tabella 2.3 - Grammi di reagenti considerati per produrre il vetro

I reagenti sono pesati con una bilancia (figura 2.1) con capacità pari a 150 g e risoluzione pari a 0,0001 g.



Figura 2.1 - La bilancia usata per pesare i reagenti

2.1.2 Fusione e colata

Una volta pesati, i reagenti sono posti in un crogiolo di platino, materiale caratterizzato da un alto punto di fusione e quindi in grado di resistere alle temperature elevate raggiunte all'interno del forno, e inerte. Il crogiolo è quindi posto in forno a camera, dove abbiamo impostato una velocità

di riscaldamento pari a 10 °C/min fino al raggiungimento della temperatura di 1450 °C. Questa temperatura è mantenuta per circa un'ora per consentire l'omogeneizzazione del fuso.

Successivamente i reagenti fusi sono estratti e colati in stampi in modo da creare delle barrette di vetro. Le barrette di vetro sono quindi state annilate a una temperatura di 500 °C per 10 ore per eliminare eventuali tensioni interne.

2.1.3 Taglio e lucidatura

Le barrette di vetro sono quindi state tagliate per ottenere delle fettine di circa 10x10x1mm. A questo scopo è stata utilizzata una troncatrice meccanica che utilizza una lama diamantata. Per ottenere delle superfici il più omogenee possibili, i campioni sono quindi lucidati per eliminare eventuali asperità derivanti dalla fase di taglio. Per raggiungere lo scopo sono utilizzate carte abrasive con tre gradi di rugosità diverse (600,800,1000) in maniera progressiva lucidando rispettivamente per 30 secondi, 1 minuto e 2 minuti. Maggiore è il numero che indica la grana della carta più liscia sarà la finitura.

2.2 Riduzione delle nanoparticelle di Ag

Per ottenere la riduzione in situ degli ioni di argento sulla superficie del vetro, è stata preparata una soluzione di PVA in acqua bi-distillata facendo sciogliere 0.2 g di polimero in 100 ml di acqua bidistillata²; la soluzione è stata scaldata (circa 70-80 °C) e soggetta a miscelazione per consentire la dissoluzione del PVA.



Figura 2.2 - Preparazione della soluzione di PVA

Per introdurre l'argento, sono state preparate due diverse soluzioni acquose di nitrato di Ag:

- Soluzione 0.3 molare di AgNO₃ in acqua bidistillata
- Soluzione 0.03 molare di AgNO₃ in acqua bidistillata

Dalla definizione di molarità (M):

$$M = \frac{\text{numero moli di soluto}}{\text{volume di soluzione}}$$

E noto il peso molecolare del soluto, possiamo quindi calcolare i grammi di soluto necessari con la seguente formula:

$$\text{grammi di soluto necessari} = M \cdot \text{peso molecolare del soluto} \cdot \text{volume soluzione}$$

Ogni campione di vetro è stato quindi immerso in 25 ml di soluzione di PVA con 1 ml di soluzione contenente argento. Una volta inserito il campione di vetro, facendo attenzione che la faccia prescelta per il trattamento sia rivolta verso l'alto, i campioni sono stati mantenuti a diverse temperature per tempi differenti come specificato nelle tabelle 2.4 e 2.5:

0.3 M	37 °C	50 °C	100 °C
15 minuti	-	-	-
60 minuti	x	x	x

Tabella 2.4 - Configurazioni testate per le soluzioni 0,3 M

0.03 M	37 °C	50 °C	100 °C
15 minuti	x	x	x
60 minuti	x	x	x

Tabella 2.5 - Configurazioni testate per le soluzioni 0,03 M

Al termine del trattamento i campioni sono stati prelevati, lavati in acqua bi-distillata e sono stati lasciati asciugare a temperatura ambiente prima di essere sottoposti alle successive analisi. La soluzione in cui è avvenuta la reazione è invece stata sottoposta ad analisi UV per verificare la presenza di argento.

2.3 Caratterizzazione dei campioni

Per studiare le proprietà dei campioni prodotti sono state utilizzate le seguenti tecniche:

- Diffrazione a raggi X (XRD) per osservare la presenza di fasi cristalline e la loro natura
- Microscopia elettronica a scansione ed emissione di campo e spettrometria a dispersione di energia (FESEM-EDS) per valutare la morfologia e la composizione dei campioni
- Spettrometria UV, per verificare la nucleazione di particelle di argento metallico, sia in soluzione che sulla superficie del vetro
- Test di bioattività *in vitro* per verificare che il vetro drogato si mantenga bioattivo anche in seguito ai trattamenti per la riduzione in situ dell'argento

Sono inoltre in corso i test di antibattericità e citocompatibilità per verificare il comportamento dei campioni *in vivo* e valutarne l'effettiva efficacia antibatterica; per analizzare il rilascio dell'argento dai campioni invece sono in corso delle analisi ICP (inducted coupled plasma) per valutare il rilascio di argento in acqua.

2.3.1 Diffrazione a raggi X

La diffrazione a raggi X (XRD) è stata utilizzata per studiare la presenza di fasi cristalline nucleate sulla superficie del vetro. In questo tipo di analisi il materiale viene attraversato da un fascio monocromatico di raggi X (lunghezza d'onda compresa tra 10 nanometri e 1 picometro), che è deviato dagli atomi che costituiscono il materiale stesso. A uno specifico angolo di incidenza delle radiazioni, i raggi X si trovano in fase e producono un fascio secondario intensificato; avviene il fenomeno della diffrazione che è una riflessione dei raggi X sul piano degli atomi. La diffrazione è dovuta quindi alla somma coerente di tutte le onde elettromagnetiche diffuse dagli atomi che si trovano lungo gli stessi piani reticolari.

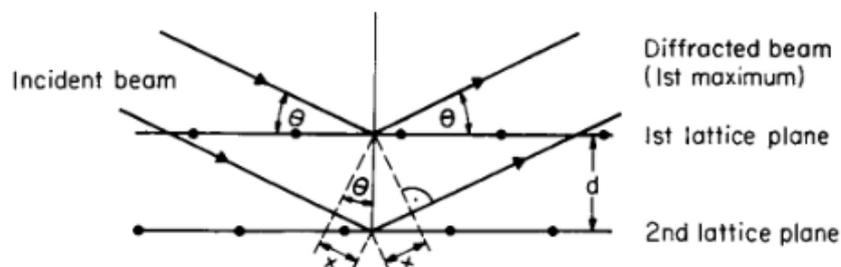


Figura 2.3 - Schema di funzionamento della diffrazione a raggi X³¹

Il fenomeno della diffrazione si basa sull'equazione di Bragg:

$$n\lambda = 2d \sin \theta$$

Dove n è l'ordine di diffrazione, λ è la lunghezza d'onda del raggio incidente, θ è l'angolo d'incidenza e d è la distanza tra i piani interatomici.

Lo strumento con il quale si effettua l'analisi XRD è chiamato diffrattometro a raggi x, ed è costituito da un tubo a raggi X, dal quale si origina la radiazione, che viene monocromizzata e collimata da un goniometro che serve a posizionare il cristallo in esame e da un rivelatore di raggi X, che consente la misura delle intensità difratte.

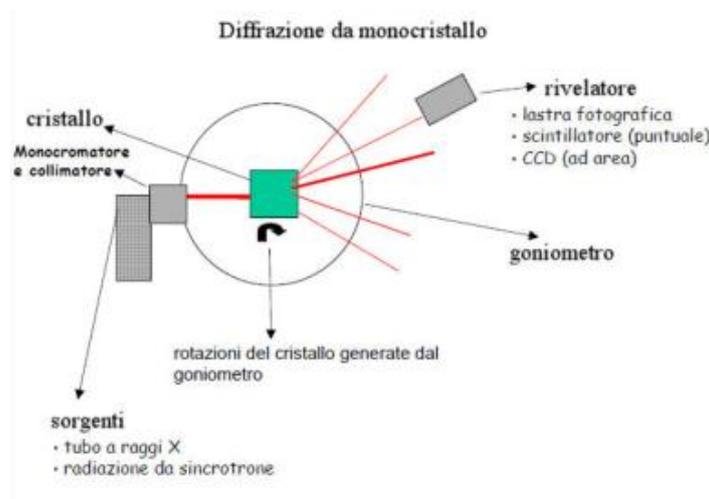


Figura 2.4 - Schema di uno strumento per l'analisi XRD³²

Il principale problema dell'analisi XRD è la sua incapacità di essere sensibile alla superficie³³: le radiazioni a raggi X essendo ad alta energia penetrano in profondità nel substrato in esame rendono impossibile discriminare il contributo della superficie. Una possibile soluzione è l'utilizzo della diffrattometria a raggi x ad angoli radenti (GI-XD); questa tecnica permette di analizzare la composizione superficiale di un substrato inviando raggi x con un angolo di incidenza radente (angolo di penetrazione compreso tra 0.05° e 1.5°)³³. In questo modo la penetrazione dei raggi x è molto limitata, l'indice di rifrazione di molti materiali per i raggi x è infatti poco inferiore ad uno ed è quindi possibile realizzare una condizione prossima alla riflessione totale. La limitazione principale di questa tecnica riguarda la finitura della superficie, infatti con un angolo di incidenza così ridotto, se la superficie non è perfettamente liscia, bastano piccole variazioni per uscire dalla condizione di riflessione totale³³. In particolare in questo lavoro di tesi questa tecnica è sfruttata per verificare la riduzione delle nanoparticelle di argento sulla superficie del vetro.

2.3.2 Microscopia a elettronica a scansione e spettrometria a dispersione di energia

Le analisi FESEM (Microscopia elettronica a scansione ad emissione di campo) e EDS (spettrometria a dispersione di energia) sono effettuate per condurre uno studio qualitativo e quantitativo della morfologia e della composizione chimica dei campioni di vetro dopo il trattamento.

La microscopia elettronica sfrutta come radiazione incidente un fascio di elettroni localizzato, che va a colpire la superficie del campione e analizza gli elettroni emessi e trasmessi dagli atomi che lo compongono; da quest'analisi risulta un'immagine microscopica del campione che dà appunto informazioni sulla sua morfologia superficiale. Il fascio di elettroni è molto energetico e quindi consente di ottenere immagini con alto potere risolutivo, cioè con una distanza minima percepibile tra due oggetti molto piccola. A seconda che vengano analizzati gli elettroni emessi (detti retrodiffusi) dal campione piuttosto che gli elettroni trasmessi da questo, è possibile distinguere diverse tecniche di microscopia elettronica: la SEM (microscopia a scansione) e la TEM (microscopia a trasmissione). La SEM possiede un potere risolutivo dell'ordine della decina di nanometri, ingrandimenti fino a 100000x e profondità di analisi dell'ordine del micron. Questa tecnica consente un'osservazione della morfologia della superficie del campione mediante un sistema di lenti, il fascio elettronico viene focalizzato su diversi punti della superficie. Il microscopio elettronico a scansione è costituito da un cannone elettronico che emette il fascio di elettroni, che vengono poi accelerati e focalizzati sulla superficie del campione, i cui atomi di conseguenza emettono elettroni che vengono catturati da un rivelatore e convertiti in impulsi elettrici. Questi impulsi vengono inviati ad un elaboratore che ricostruisce l'immagine e la visualizza su uno schermo. L'intero sistema è sottovuoto (10^{-7} Pa) per evitare che gli elettroni emessi dal campione si scontrino con le molecole del gas presenti in aria e quindi non riescano a essere catturati dal rivelatore.

È di fondamentale importanza che il campione analizzato sia conduttore e se non lo è di per sé deve essere reso conduttivo, per evitare che in corrispondenza del campione colpito dal fascio elettronico si abbia un accumulo di carica negativa che produce una scarica elettrica. Per questo motivo i campioni non conduttivi devono essere resi tali mediante un'opera di metallizzazione, che comporta il rivestimento del campione con un sottile strato di metallo, ad esempio oro, argento, carbonio grafittico o cromo (come in questo lavoro di tesi) senza danneggiare la superficie del campione. La tecnica FESEM è un variante della SEM, in quanto utilizza una sorgente di elettroni a emissione di campo: l'emissione è dovuta alla capacità di estrazione di elettroni da un monoblocco di Tungsteno appuntito da parte di campi elettrici di elevata intensità (a differenza

della emissione termoionica che si ottiene scaldando un filamento di tungsteno ad elevate temperature). Con la FESEM è possibile avere risoluzioni fino al livello atomico e ingrandimenti pari a 1000000x.

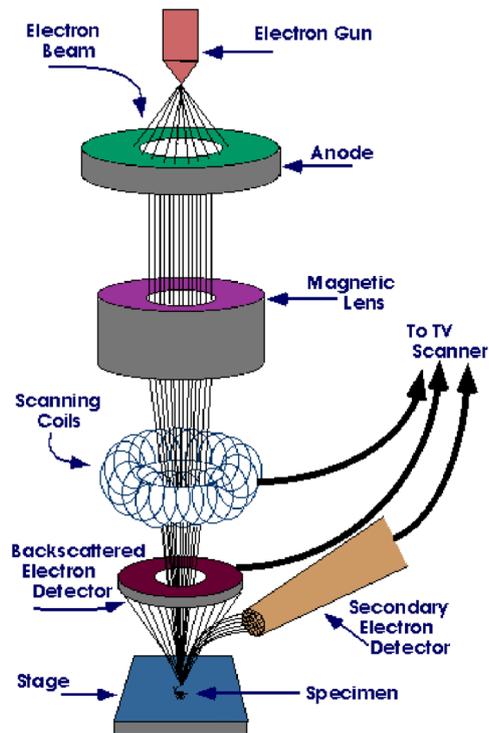


Figura 2.5 - Schema a blocchi di un dispositivo FESEM³⁴

L'analisi EDS (spettrometria a dispersione di energia) è un'analisi qualitativa e quantitativa degli elementi chimici che compongono il materiale e sfrutta l'emissione di raggi X provocata da un fascio elettronico accelerato incidente sulla superficie del campione. Il rivelatore a dispersione di energia sfrutta l'interazione tra i raggi X e un opportuno materiale, ed è costituito da un monocristallo di silicio drogato con litio, rivestito alle due estremità con uno strato conduttivo in oro, mantenuto a -192°C tramite azoto liquido. L'interazione tra i fotoni e il cristallo genera una corrente elettrica che viene amplificata e dà origine allo spettro in uscita.

Per l'analisi FESEM-EDS sono stati preparati i campioni di Ag-SBA2, metallizzandoli con cromo per renderli conduttivi e disposti su un portacampione circolare (stub). La potenza usata per l'analisi è compresa tra i 3 e i 15 kV per le immagini SEM e di 20 kV per ottenere gli spettri EDS, e con una distanza tra la punta dello strumento ed il campione di circa 6 mm per il FESEM e 8,5 mm per l'EDS.

2.3.3 Spettrometria UV

I metodi spettroscopici sono tecniche sperimentali basate sull'interazione tra energia e materia per la determinazione di proprietà fisiche e chimiche. Le molecole interagiscono con una radiazione elettromagnetica assorbendo o cedendo energia, passando cioè da stati ad energia minore a stati ad energia maggiore (assorbimento) o da stati ad energia maggiore a stati ad energia minore (emissione).³⁵

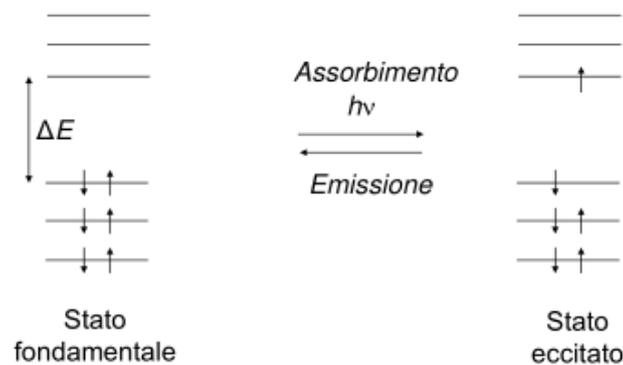


Figura 2.6 - Effetto dei raggi UV sugli elettroni³⁶

La spettroscopia UV considera l'assorbimento di luce UV dalle molecole, che causa la promozione di un elettrone dallo stato fondamentale ad uno stato eccitato.

In particolare nella spettroscopia ad assorbimento si utilizzano due grandezze (misurate strumentalmente): trasmittanza e assorbanza³⁵

- I_0 : intensità del flusso luminoso all'ingresso della cella con il campione
- I : intensità de flusso luminoso all'uscita della cella con il campione

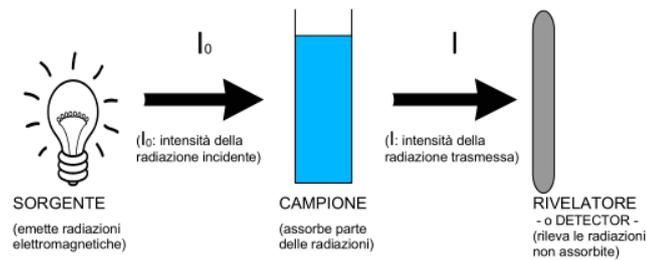


Figura 2.7 - Schema del percorso della radiazione all'interno del dispositivo³⁶

Dalla misura dei flussi I_0 e I gli strumenti forniscono direttamente i valori di trasmittanza e assorbanza, che rappresentano le grandezze caratteristiche della spettroscopia di assorbimento. Il rapporto tra l'intensità del raggio uscente e quella del raggio entrante si chiama trasmittanza:

$$T = \frac{I}{I_0}$$

Questa grandezza esprime quale frazione della luce incidente ha attraversato il campione senza essere assorbita. T può assumere valori compresi tra 0 e 1. Comunemente si utilizza però la trasmittanza percentuale, che si ottiene semplicemente moltiplicando per 100 il valore precedente.

Altra grandezza di fondamentale importanza è l'assorbanza, detta anche "densità ottica" o "estinzione":

$$A = -\log T$$

L'assorbanza risulta direttamente proporzionale alla concentrazione, questa relazione è dimostrata dalla legge di Lambert-Beer.

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot d$$

Dove A è l'assorbanza del campione, ε il coefficiente di estinzione molare specifico per la sostanza, d il cammino ottico e c la concentrazione. Il coefficiente ε dipende da diversi parametri della soluzione come pH, natura del solvente, lunghezza d'onda della radiazione assorbita e dalla specie chimica che assorbe.³⁷

L'equazione della legge di Lambert-Beer rappresenta quella di una retta passante per l'origine nel piano concentrazione-assorbanza, con ε che rappresenta proprio il coefficiente angolare di tale retta.³⁵

Le radiazioni UV sono generate da speciali lampade al deuterio costituite da un bulbo di quarzo riempito di deuterio sollecitato da scariche elettriche

Le radiazioni monocromatiche di tale raggio passano attraverso la sostanza in esame, la quale assorbirà in modo diverso, cioè con diversa intensità le diverse radiazioni. Riportando i valori registrati in un grafico lunghezza d'onda-assorbimento, si ottiene lo spettro di assorbimento della sostanza esaminata. Per il fatto che ogni sostanza ha il proprio spettro di assorbimento, l'esame di tali spettri ne permette l'identificazione.³⁶

In questo lavoro di tesi l'analisi UV-vis è condotta sia sulle soluzioni ottenute al termine del trattamento sia sui campioni massivi del vetro per valutare la presenza delle nanoparticelle d'argento. In particolare sono analizzate le differenze presenti negli spettri UV-vis fra la soluzione pura e la soluzione in cui è effettivamente inserito il campione di SBA2-Ag al fine di valutare l'influenza del vetro durante il trattamento.

2.4 Bioattività in vitro

Al fine di valutare la bioattività in vitro i campioni sono immersi in SBF (simulated body fluid), cioè una soluzione che mima la composizione e la concentrazione ionica del plasma sanguigno, andando ad osservare l'evoluzione del pH della soluzione e l'eventuale formazione di idrossiapatite sulla superficie del campione. In particolare abbiamo valutato la bioattività a 14,7,3 giorni e dopo 24 ore, cambiando l'SBF ad intervalli regolari per meglio simulare la condizione fisiologica.

2.4.1 Preparazione dell'SBF e immersione dei campioni

L'SBF è preparato seguendo il protocollo descritto da Kokubo³⁸, considerando di preparare due litri di soluzione sono quindi disciolti in acqua bi-distillata i seguenti reagenti:

1) NaCl:	<i>16,070g</i>
2) NaHCO ₃	<i>0,710g</i>
3) KCl	<i>0,450g</i>
4) K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O	<i>0,462g</i>
5) MgCl ₂ .6H ₂ O	<i>0,622g</i>
6) 1M-HCl	<i>78ml</i>
7) CaCl ₂	<i>0,584g</i>

8) Na ₂ SO ₄	0,144g
9) TRIS	12,236g
10) 1M-HCl	0-5ml

La soluzione così ottenuta è quindi scaldata fino a raggiungere $36,5 \pm 1,5^{\circ}\text{C}$ e un pH di $7,40 \pm 0,01$. I campioni di vetro funzionalizzati con le nanoparticelle d'argento sono quindi inseriti all'interno di contenitori di plastica e ricoperti con 25 ml di SBF; i contenitori così ottenuti sono posizionati in incubatore per mantenere il più possibile omogenee la temperatura fisiologica di 37°C . Si procede quindi alla misura del pH: il pH è misurato ad intervalli regolari e ne abbiamo annotato l'andamento per valutare la risposta del campione. Al termine di ogni misura del pH è sostituito l'SBF al fine di mimare la condizione fisiologica dinamica.

Capitolo 3

Risultati e discussione

In questo capitolo vengono presentati i risultati ottenuti in seguito alle caratterizzazioni effettuate sui campioni di vetro SBA2 su cui sono state ridotte nanoparticelle di argento sfruttando il PVA come agente riducente. In questo capitolo viene scelta per semplicità la notazione “SBA2-Ag” per indicare i campioni di SBA2 su cui sono ridotte le nanoparticelle, mentre sono indicati con “SBA2” i campioni di vetro che non hanno subito il trattamento.

3.1 Caratterizzazione visiva

Una prima caratterizzazione sfruttata per controllare l'avvenuta riduzione delle nanoparticelle è l'osservazione visiva. Al termine del trattamento si può facilmente notare che il colore della soluzione in cui è avvenuta la reazione sia cambiato, virando verso il giallo. È possibile osservare un cambiamento di colore analogo sulla superficie dei campioni SBA2-Ag che presentano aloni giallo-marroni.



Figura 3.1 - Soluzione dopo la reazione, si nota come il colore della soluzione vira verso il giallo

EDS	37°C - 0,3 - 1h	37°C - 0,03 - 1h	50°C - 0,3 - 1h	50°C - 0,03 - 1h	100°C - 0,3 - 1h	100°C - 0,03 - 1h	37°C - 0,03 - 15min	50°C - 0,03 - 15min	100°C - 0,03 - 15min
Na	28,1	23,4	23,0	19,6	14,4	25,6	19,9	19,8	22,8
Al	1,1	0,8	1,6	1,1	1,2	1,4	1,3	1,2	1,2
Si	45,4	43,4	43,9	44,5	35,6	44,5	46,1	43,4	43,2
P	5,8	5,4	6,0	5,9	6,1	6,5	5,6	5,7	5,6
Ca	19,2	26,8	23,7	28,1	22,0	20,8	26,8	29,8	25,9
Ag	0,3	0,2	1,9	0,8	20,6	1,3	0,3	0,2	1,4

Tabella 3.1 - Confronto composizionali EDS (At %) delle varie configurazioni testate

3.2 Analisi FESEM-EDS

Le analisi FESEM – EDS sono state utilizzate sia per verificare la formazione delle nanoparticelle d'argento sulla superficie dei campioni SBA2 sia per verificare la formazione dello strato di apatite in seguito alle prove di bioattività *in vitro*. Sono qui di seguito presentati e commentati i risultati delle analisi condotte per analizzare il processo di formazione delle nanoparticelle. Per tutte le immagini FESEM-EDS effettuate sui campioni si sono utilizzati i software Smartsem Zeiss (FESEM) e Inca Oxford Instruments (EDS)

SBA2-Ag – 0.3 - 100 °C – 1 ora

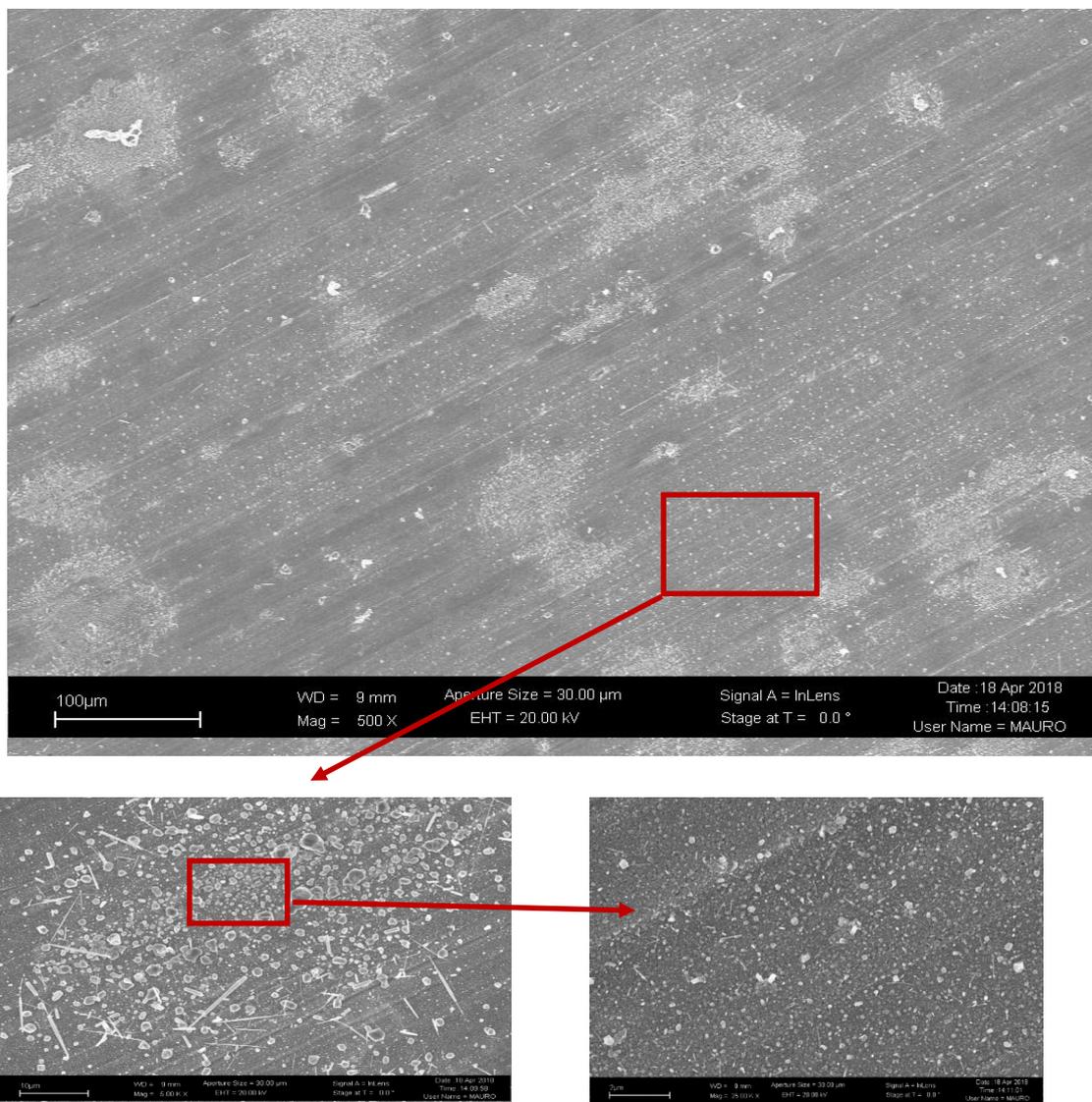


Figura 3.2 - Immagini FESEM e relativi ingrandimenti del campione SBA2-Ag - 0,3 M - 100 °C - 1 ora

La figura 3.2 mostra le immagini SEM del campione SBA2-Ag - 0,3 M - 100 °C - 1 ora; come si può osservare sulla superficie dei campioni sono presenti delle particelle di dimensioni comprese tra 1 e 2 micron distribuite in maniera omogenea su tutta la superficie del vetro, si possono notare anche formazioni di dimensione maggiore (fino a 10 micron) con una caratteristica forma allungata.

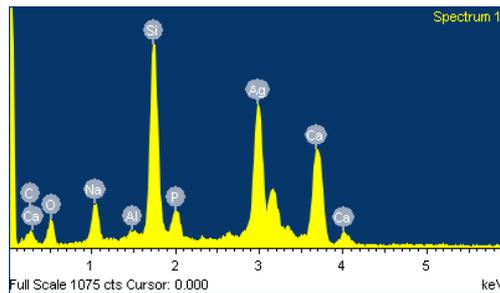


Figura 3.3 - Spettro EDS di area del campione SBA2-Ag - 0,3 M - 100 °C - 1 ora

Elemento	Weight %	STD	Atomic %	STD
Na	7,1	0,47	14,4	0,50
Al	0,7	0,15	1,2	0,24
Si	21,5	1,10	35,6	0,72
P	4,1	0,26	6,1	0,20
Ca	18,9	1,22	22,0	0,81
Ag	47,7	3,01	20,6	2,01

Tabella 3.2 - Composizioni EDS (media-STD) del campione 0,3 M - 100 °C - 1 h

La tabella 3.2 mostra la media della analisi quantitative di area, mentre la figura 3.3 mostra lo spettro EDS. Come si evince dalle analisi effettuate la superficie del campione contiene un elevato quantitativo di Ag (circa 20% atomico) sotto forma di microparticelle.

SBA2-Ag – 0.03 - 100 °C – 1 ora

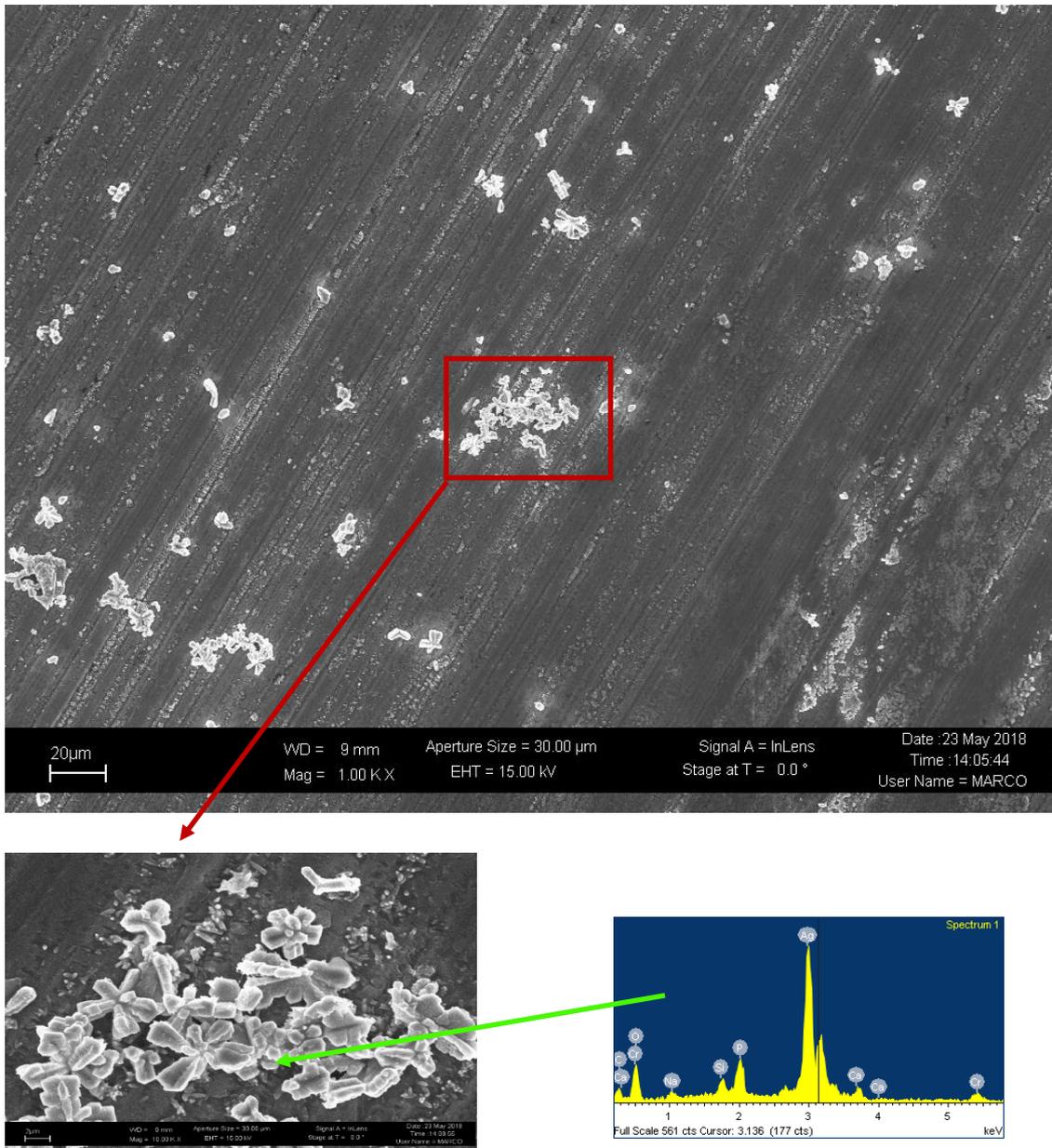


Figura 3.4 - Immagine FESEM con relativi ingrandimenti e spettro EDS locale del campione SBA2-Ag - 0,03 M - 100 °C - 1 ora

La figura 3.4 mostra le immagini SEM del campione SBA2-Ag - 0,03 M - 100 °C - 1 ora; come si può osservare sulla superficie dei campioni sono presenti delle particelle di dimensioni comprese tra 2 e 3 micron distribuite in maniera da formare piccoli aggregati su tutta la superficie del vetro. Lo spettro delle analisi EDS locali condotte sulla formazione in esame mostra alti valori dell'argento.

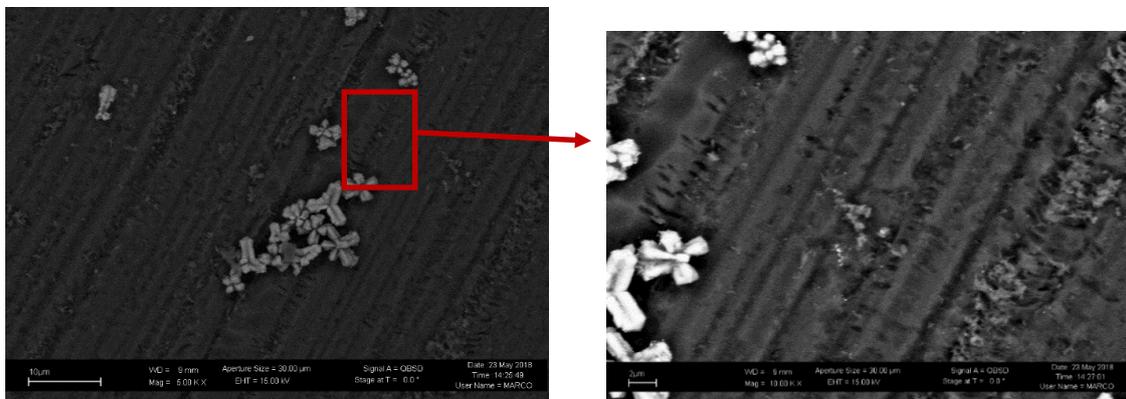
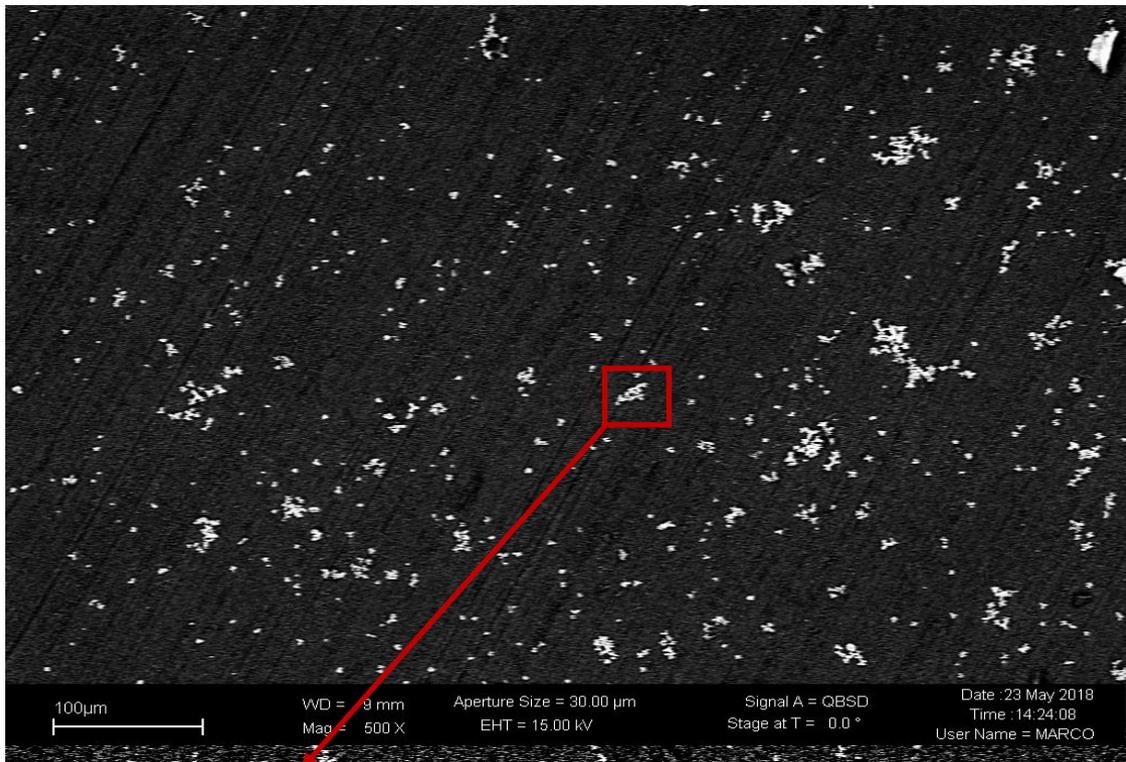


Figura 3.5 - Immagine FESEM e relativi ingrandimenti del campione SBA2-Ag - 0,03 M - 100 °C - 1 ora, queste immagini sono ottenute con la tecnica del backscattering

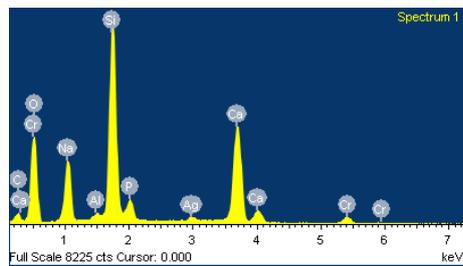


Figura 3.6 - Spettro EDS di area del campione SBA2-Ag - 0,03 M - 100 °C - 1 ora

Elemento	Weight %	STD	Atomic %	STD
Na	19,4	5,66	25,6	6,46
Al	1,2	0,42	1,4	0,42
Si	41,0	0,96	44,5	1,16
P	6,6	0,47	6,5	0,25
Ca	27,2	7,74	20,8	6,45
Ag	4,5	1,36	1,3	0,39

Tabella 3.3 - Composizionali EDS (media-STD) del campione 0,03 M - 100 °C - 1 h

La figura 3.5 mostra le immagini SEM ottenute in modalità backscattering del campione SBA2-Ag - 0,03 M - 100 °C - 1 ora; la figura 3.6 mostra invece lo spettro EDS delle superficie del campione. La tabella 3.3 mostra la media delle analisi quantitative: la superficie del campione contiene un quantitativo di argento molto inferiore al caso precedente.

SBA2-Ag – 0.3 M- 37 °C – 1 ora

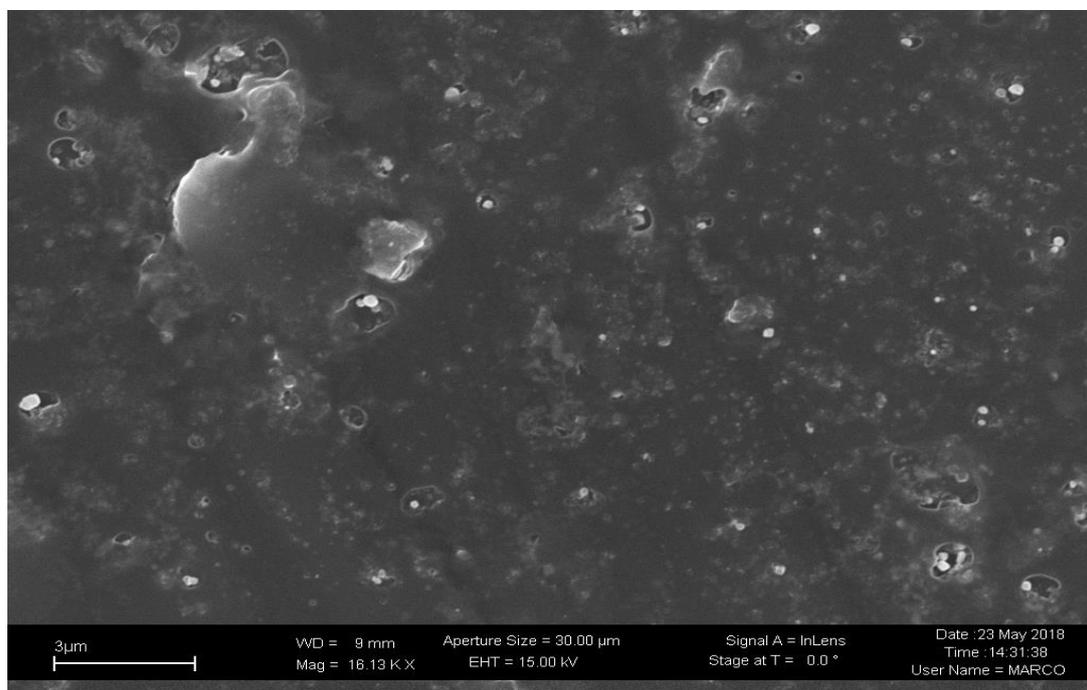


Figura 3.7 - Immagine FESEM del campione SBA2-Ag - 0,3 M - 37 °C - 1 ora

La figura 3.7 mostra le immagini SEM del campione SBA2-Ag - 0,3 M - 37 °C - 1 ora; come si può osservare sulla superficie dei campioni sono presenti delle particelle di dimensioni comprese tra 1 e 2 micron distribuite in maniera da formare piccoli cluster sulla superficie del campione

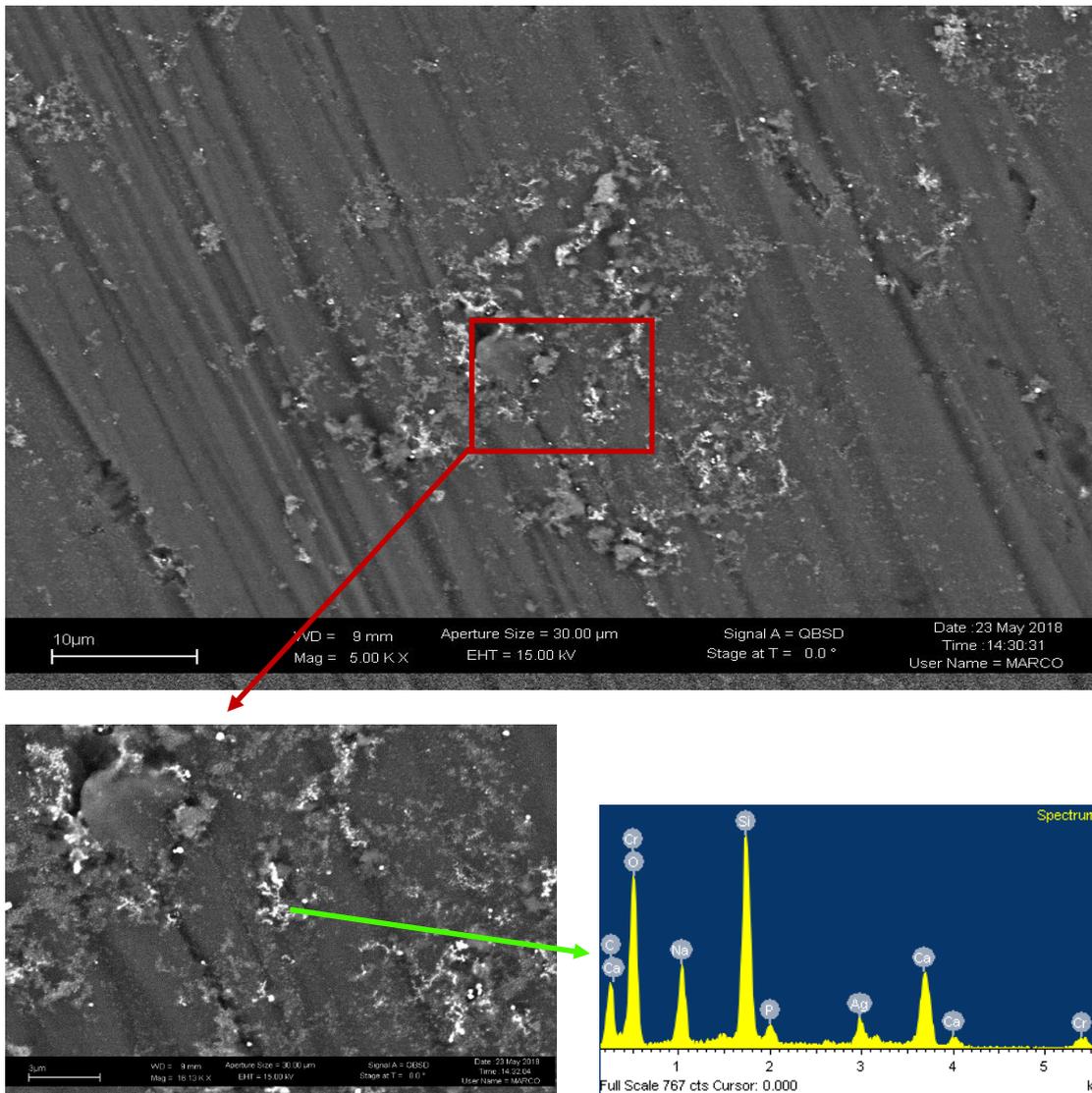


Figura 3.8 - Immagine FESEM con relativi ingrandimenti e spettro EDS locale del campione SBA2-Ag - 0,3 M - 37 °C - 1 ora, queste immagini sono ottenute con la tecnica del backscattering.

La figura 3.8 mostra le immagini SEM ottenute in modalità backscattering del campione SBA2-Ag - 0,3 M - 37 °C - 1 ora; è inoltre presente lo spettro EDS locale relativo al campione in esame. Nello spettro EDS si nota la presenza del picco relativo all'argento.

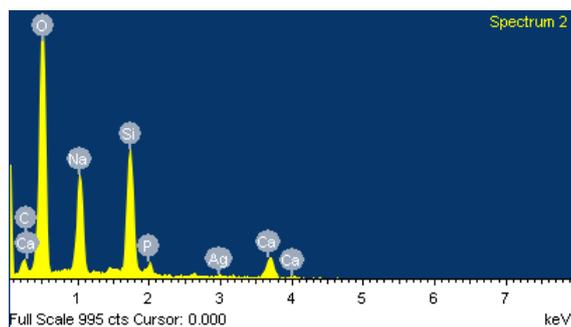


Figura 3.9 - Spettro EDS di area del campione SBA2-Ag - 0,3 M - 37 °C - 1 ora

L'immagine 3.9 mostra lo spettro EDS della superficie del campione, mentre la tabella mostra la media delle analisi quantitative di area. Si possono notare i bassi valori di argento rilevati sul campione.

Elemento	Weight %	STD	Atomic %	STD
Na	22,2	8,41	28,1	9,17
Al	1,0	0,20	1,1	0,26
Si	43,5	2,38	45,4	0,50
P	6,1	0,19	5,8	0,09
Ca	25,9	12,02	19,2	9,47
Ag	1,3	1,24	0,3	0,31

Tabella 3.4 - Composizionali EDS (media-STD) del campione 0,3 M - 37 °C - 1 h

SBA2-Ag – 0.03 - 37 °C – 1 ora

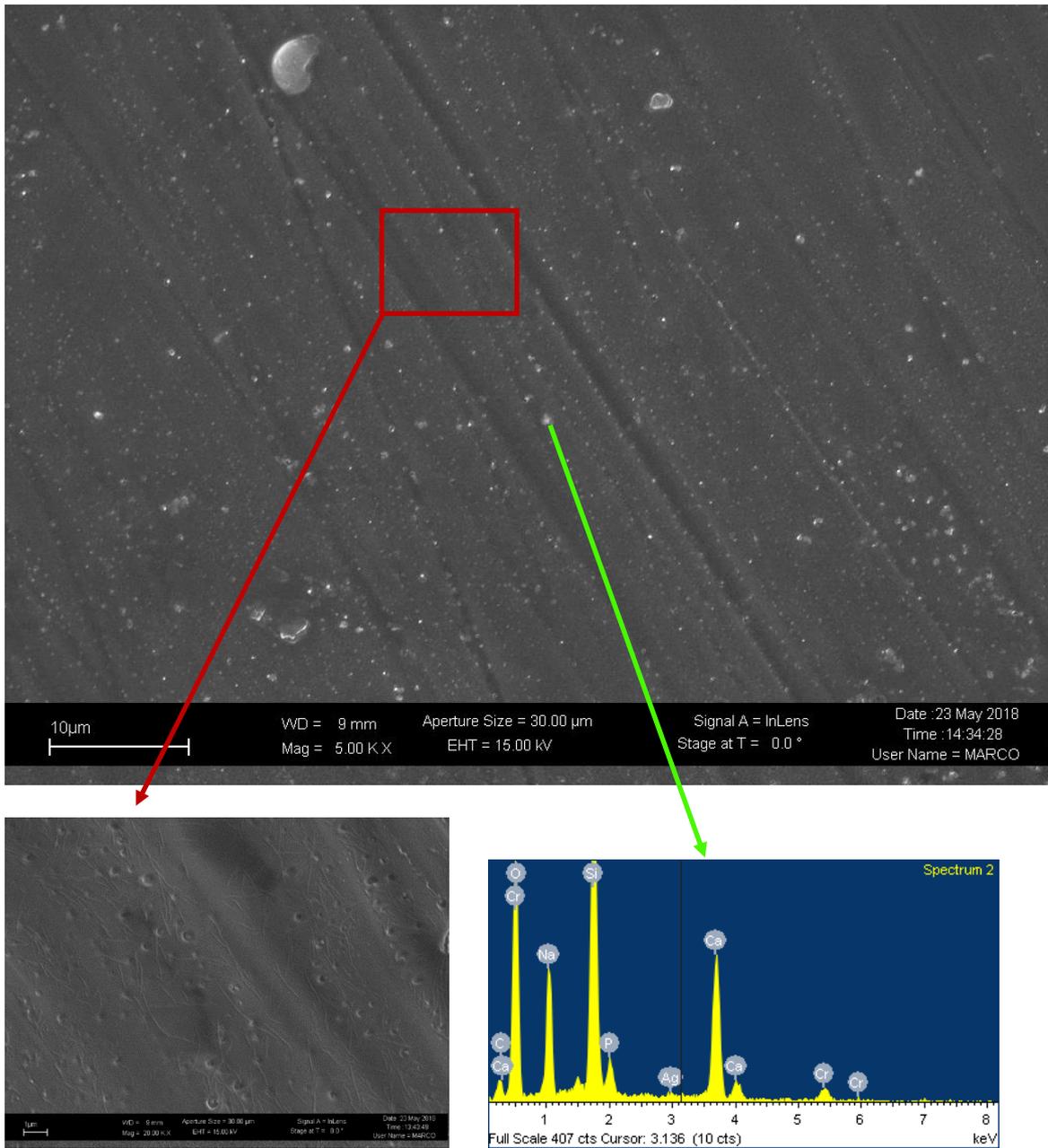


Figura 3.10 - Immagine FESEM con relativi ingrandimenti e spettro EDS locale del campione SBA2-Ag - 0,03 M - 37 °C - 1 ora

La figura 3.10 mostra le immagini SEM ottenute del campione SBA2-Ag - 0,03 M - 37 °C - 1 ora; è inoltre presente lo spettro EDS relativo ad una analisi locale. Si può osservare la presenza di particelle con dimensione media compresa tra 0.5 ed 1 micron.

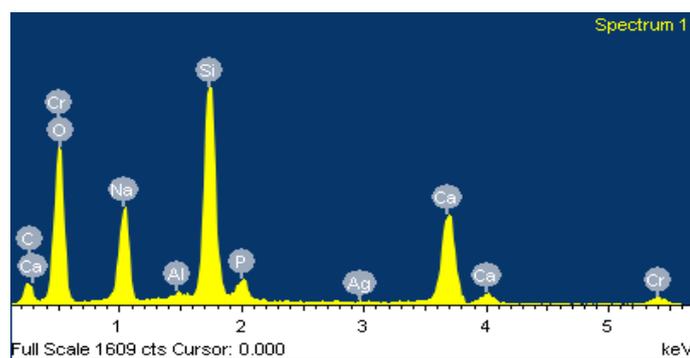


Figura 3.11 - Spettro EDS di area del campione SBA2-Ag - 0,03 M - 37 °C - 1 ora

Elemento	Weight %	STD	Atomic %	STD
Na	17,7	0,32	23,4	0,40
Al	0,7	0,04	0,8	0,04
Si	40,0	0,03	43,4	0,01
P	5,5	0,20	5,4	0,20
Ca	35,3	0,19	26,8	0,18
Ag	0,8	0,08	0,2	0,02

Tabella 3.5 - Composizionali EDS (media-STD) del campione 0,03 M - 37 °C - 1 h

La tabella 3.5 mostra la media della analisi quantitative di area, mentre la figura 3.11 mostra lo spettro EDS. Come si evince dalle analisi effettuate la superficie del campione contiene un basso quantitativo di argento (0,2 % atomico)

SBA2-Ag – 0.03 - 50 °C – 1 ora

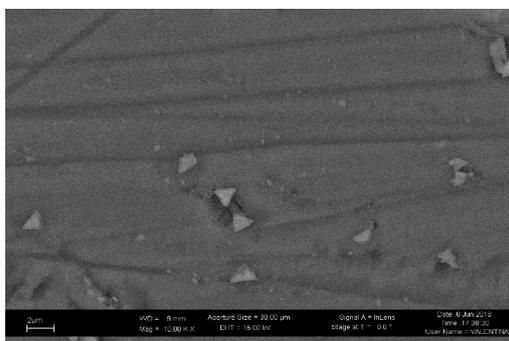
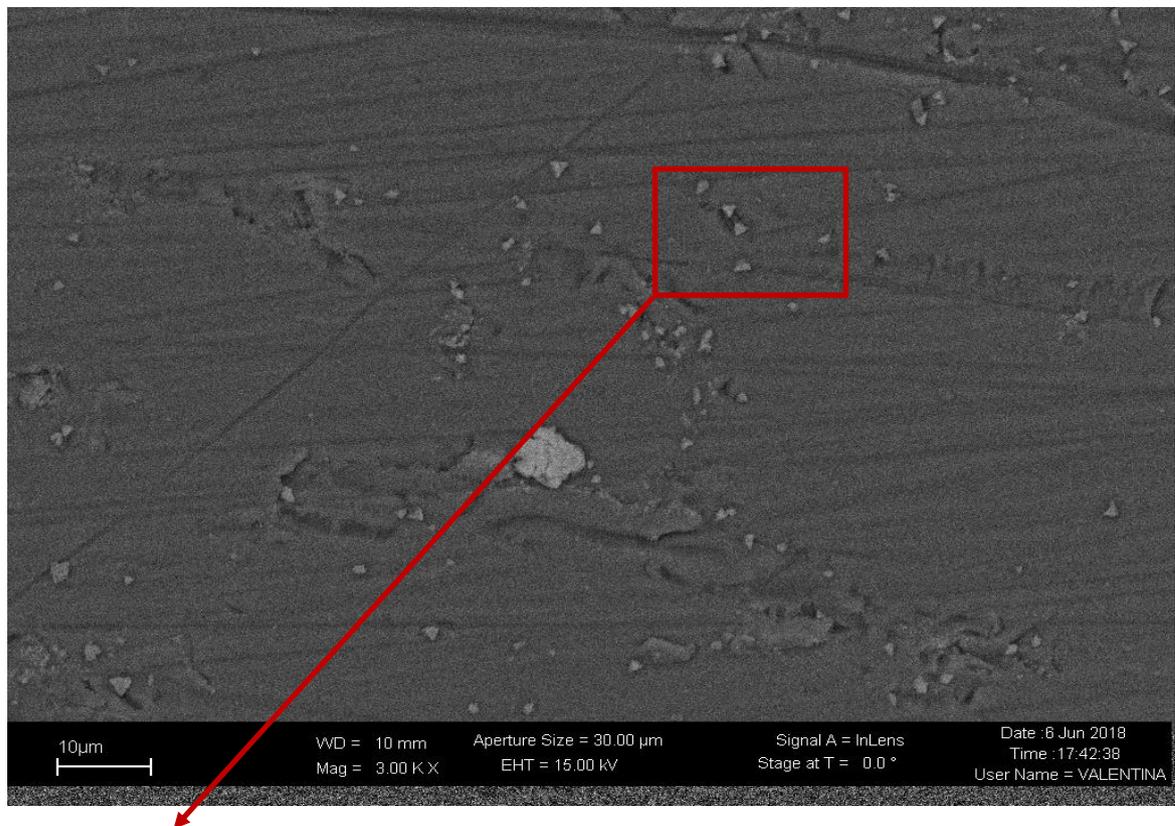


Figura 3.12 - Immagine FESEM con relativi ingrandimenti del campione SBA2-Ag - 0,03 M - 50 °C - 1 ora

La figura 3.12 mostra le immagini SEM ottenute del campione SBA2-Ag - 0,03 M - 50 °C - 1 ora. Si può osservare la presenza di particelle dalla forma triangolare con dimensione media di circa 1 micron

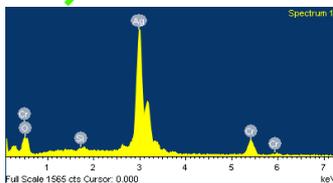
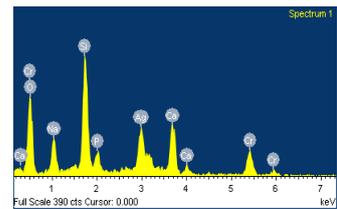
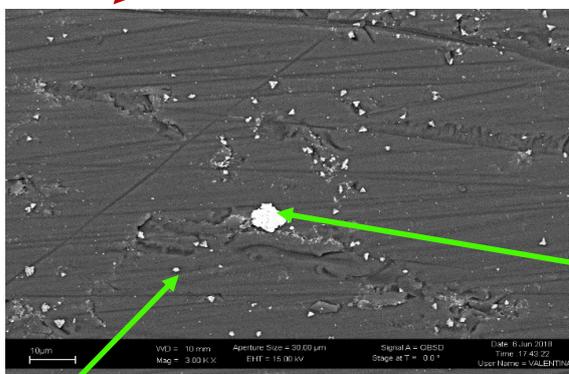


Figura 3.13 - Immagine FESEM con relativi ingrandimenti e spettri EDS locali del campione SBA2-Ag - 0,03 M - 50 °C - 1 ora, queste immagini sono ottenute con la tecnica del backscattering

La figura 3.13 mostra le immagini SEM ottenute in modalità backscattering del campione SBA2-Ag - 0,03 M - 50 °C - 1 ora. Come si può osservare le particelle sono distribuite in maniera omogenea sulla superficie del campione, si può inoltre notare la formazione di un numero limitato di aggregati. Sono inoltre presenti due spettri EDS locali relativi al campione dove si può osservare l'alto contenuto di argento delle particelle.

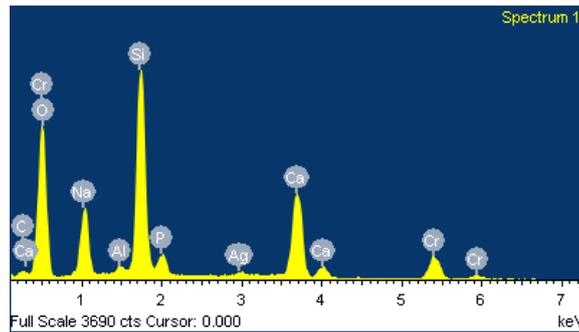


Figura 3.14 - Spettro EDS di area del campione SBA2-Ag - 0,03 M - 50 °C - 1 ora

Elemento	Weight %	STD	Atomic %	STD
Na	14,4	0,35	19,6	0,30
Al	1,0	0,16	1,1	0,19
Si	40,0	1,03	44,5	0,74
P	5,8	0,21	5,9	0,27
Ca	36,0	0,04	28,1	0,30
Ag	2,9	0,98	0,8	0,30

Tabella 3.6 - Composizionali EDS (media-STD) del campione 0,03 M - 50 °C - 1 h

La tabella 3.6 mostra la media della analisi quantitative di area, mentre la figura 3.14 mostra lo spettro EDS. Come si evince dalle analisi effettuate la superficie del campione contiene ridotti quantitativi di Ag (circa 0,8% atomico) sotto forma di microparticelle.

SBA2- Ag - 0.3 - 50 °C - 1 ora

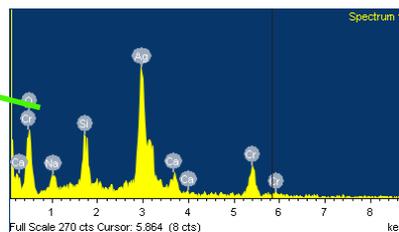
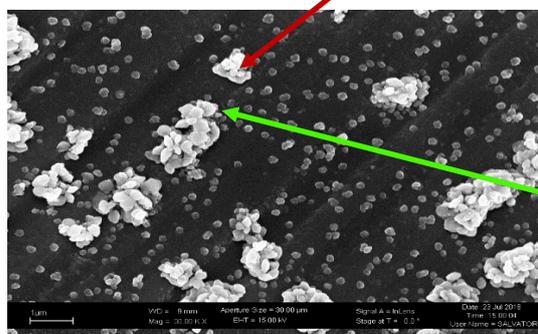
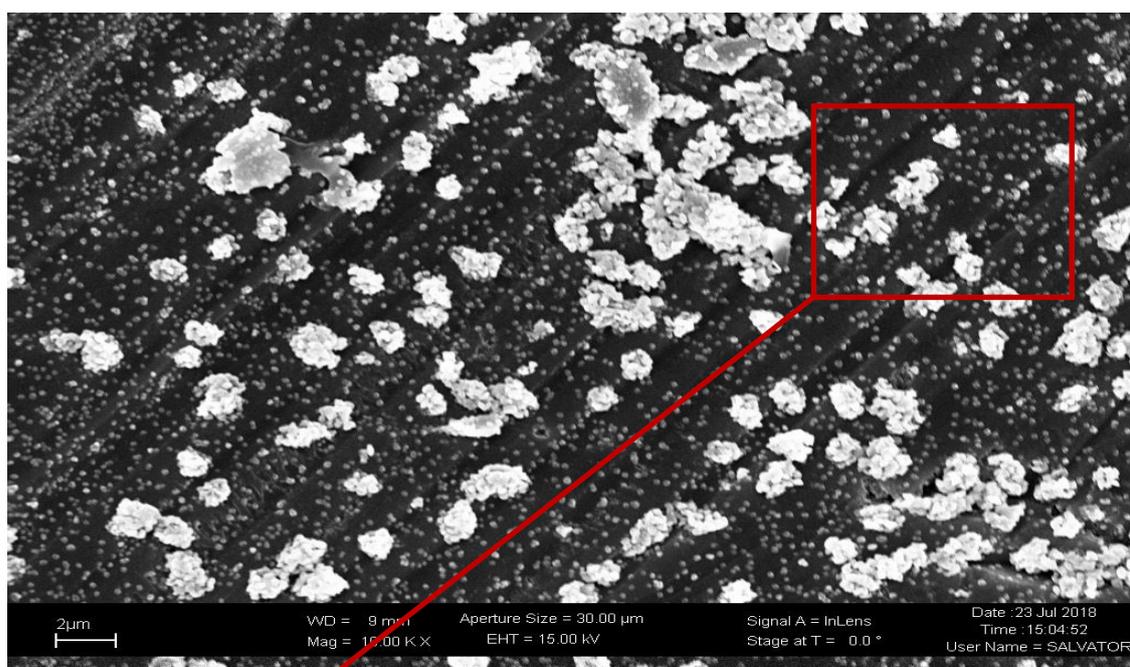
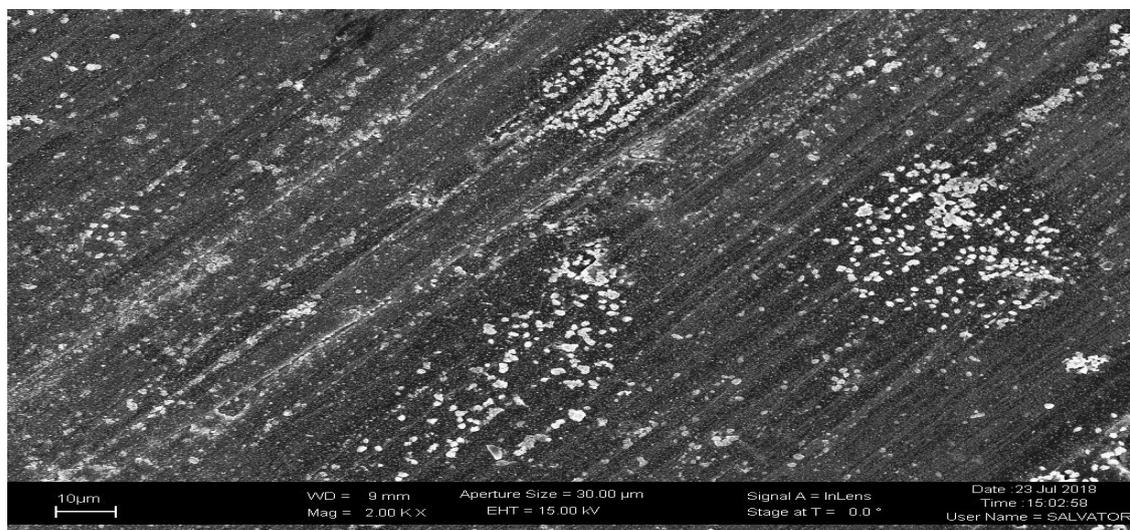


Figura 3.15 - Immagine FESEM con relativi ingrandimenti e spettro EDS locale del campione SBA2-Ag - 0,3 M - 50 °C - 1 ora

La figura 3.15 mostra le immagini SEM ottenute del campione SBA2-Ag - 0,3 M - 50 °C - 1 ora. Si può osservare la presenza di particelle con dimensione media di circa 1 micron affiancate da particelle di dimensioni minori dalla forma triangolare 0,2 micron

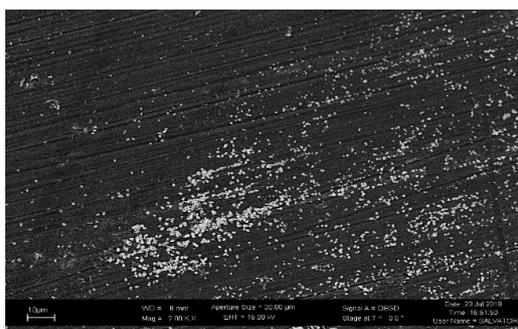


Figura 3.16 - Immagine FESEM con relativi ingrandimenti del campione SBA2-Ag - 0,3 M - 50 °C - 1 ora, queste immagini sono ottenute con la tecnica del backscattering

L'immagine 3.16 mostra le immagini SEM ottenuta in modalità backscattering del campione SBA2-Ag - 0,3 M - 50 °C - 1 ora, si può osservare la presenza di particelle distribuite in maniera omogenea su tutta la superficie del campione

Elemento	Weight %	STD	Atomic %	STD
Na	14,9	0,28	19,9	0,14
Al	1,1	0,08	1,3	0,11
Si	42,2	2,40	46,1	2,08
P	5,7	0,41	5,6	0,47
Ca	35,0	1,45	26,8	1,43
Ag	1,0	0,74	0,3	0,21

Tabella 3.7- Composizionali EDS (media-STD) del campione 0,3 M - 50 °C - 1 h

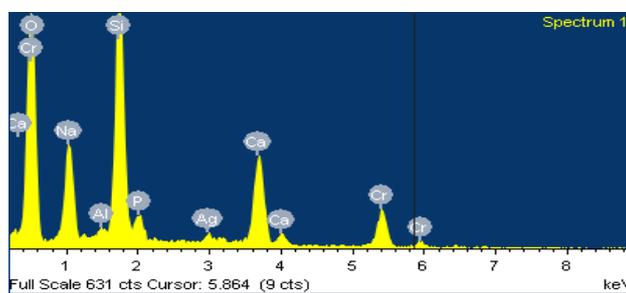


Figura 3.17- Spettro EDS di area del campione SBA2-Ag - 0,3 M - 50 °C - 1 ora

La tabella 3.7 mostra la media della analisi quantitative di area, mentre la figura 3.17 mostra lo spettro EDS. Come si evince dalle analisi effettuate la superficie del campione contiene ridotti quantitativi di Ag (circa 0,3% atomico) sotto forma di microparticelle.

SBA2 - Ag - 0.03 - 37 °C - 15 minuti

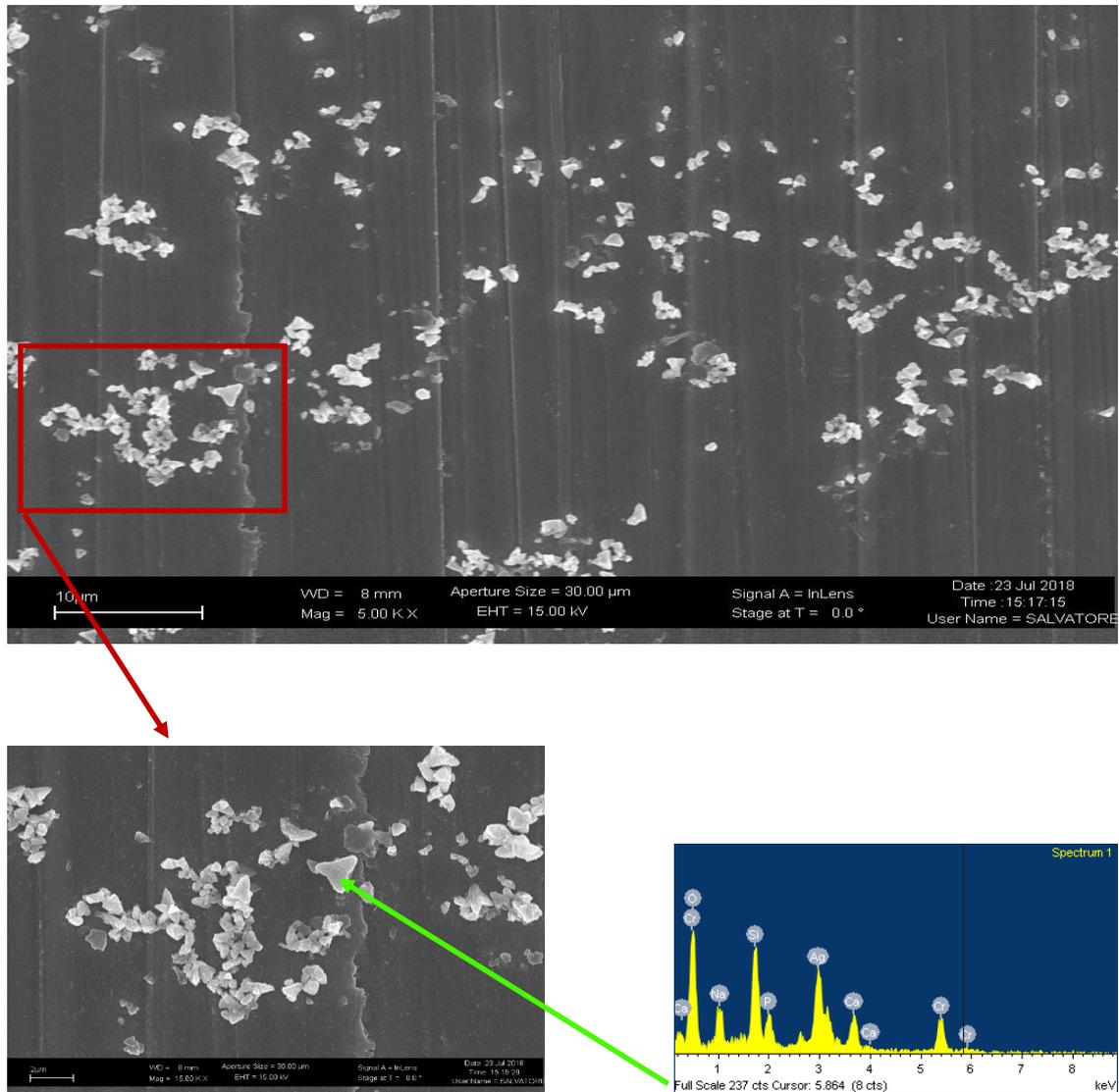


Figura 3.18 - Immagine FESEM con relativi ingrandimenti e spettro EDS locale del campione SBA2-Ag - 0,03 M - 37 °C - 15 minuti

La figura 3.18 mostra le immagini SEM ottenute del campione SBA2-Ag - 0,03 M - 37 °C - 15 minuti. Si può osservare la presenza di particelle di forma triangolare con dimensione media di circa 0,5 micron. È inoltre presente uno spettro EDS locale relativo alla particella che mostra l'alto contenuto di argento

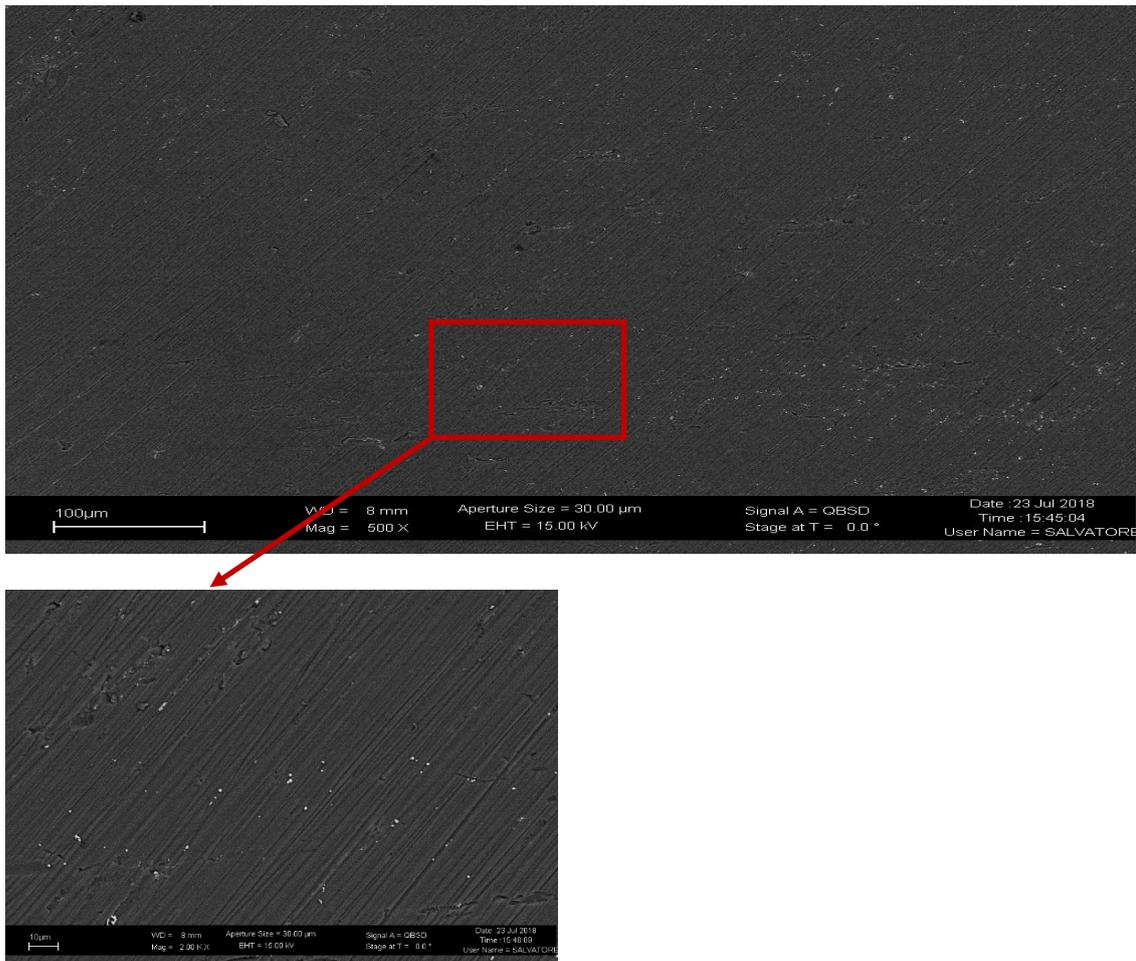


Figura 3.19 - Immagine FESEM con relativi ingrandimenti del campione SBA2-Ag - 0,03 M - 37 °C - 15 minuti, queste immagini sono ottenute con la tecnica del backscattering

L'immagine 3.19 mostra le immagini SEM ottenuta in modalità backscattering del campione SBA2-Ag - 0,03 M - 37 °C - 15 minuti. Si può osservare la distribuzione delle particelle sulla superficie del campione

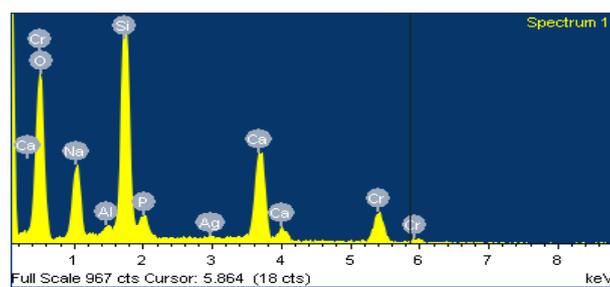


Figura 3.20- Spettro EDS di area del campione SBA2-Ag - 0,03 M - 37 °C - 15 minuti

Elemento	Weight %	STD	Atomic %	STD
Na	14,9	0,28	19,9	0,14
Al	1,1	0,08	1,3	0,11
Si	42,2	2,40	46,1	2,08
P	5,7	0,41	5,6	0,47
Ca	35,0	1,45	26,8	1,43
Ag	1,0	0,74	0,3	0,21

Tabella 3.8 - Composizionali EDS (media-STD) del campione 0,03 M - 37 °C - 15 minuti

La tabella 3.8 mostra la media della analisi quantitative di area, mentre la figura 3.20 mostra lo spettro EDS. Come si evince dalle analisi effettuate la superficie del campione contiene ridotti quantitativi di Ag (circa 0,3% atomico) sotto forma di microparticelle.

SBA2 - Ag - 0.03 -50°C - 15 minuti

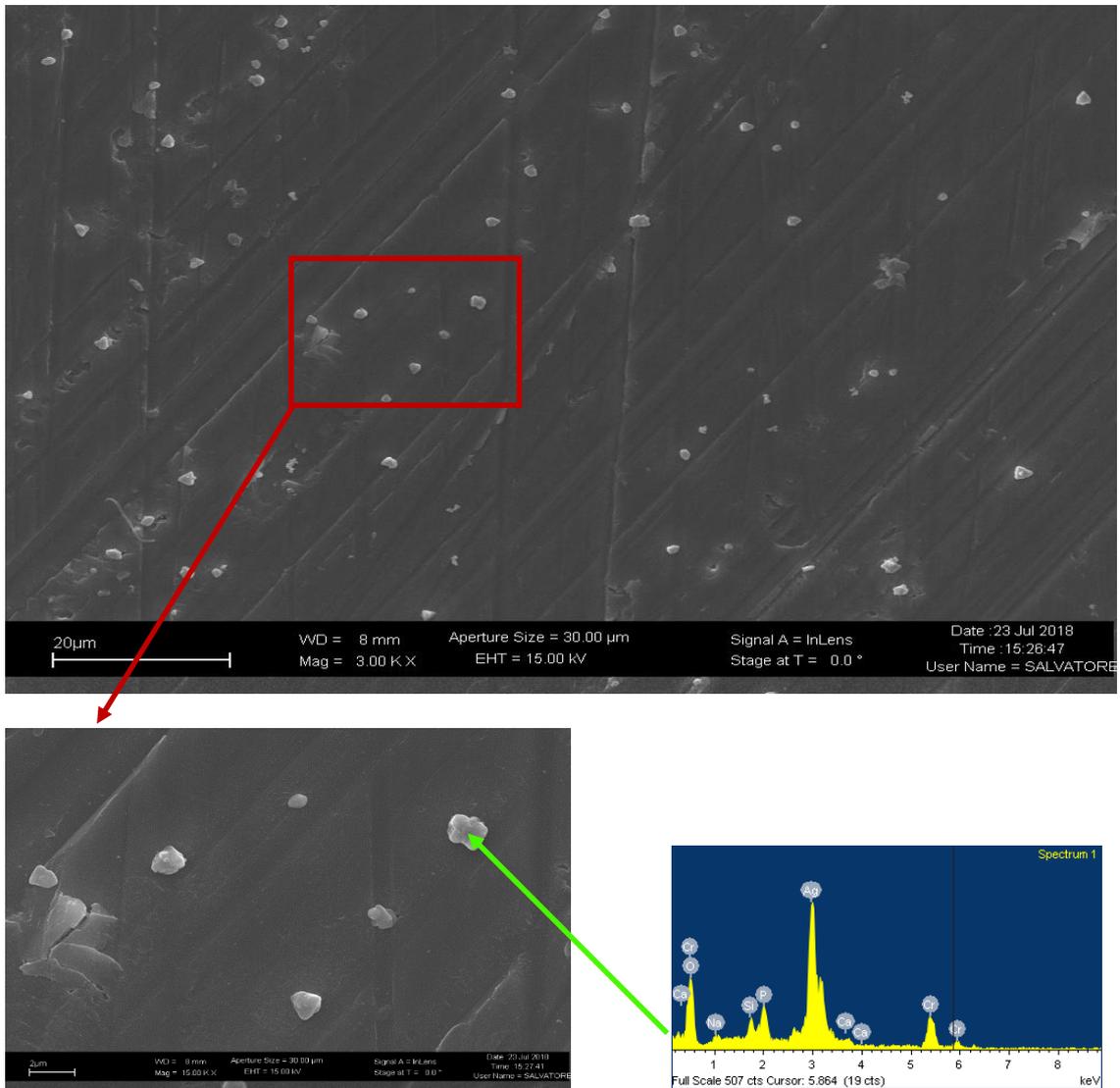


Figura 3.21 - Immagine FESEM con relativi ingrandimenti e spettro EDS locale del campione SBA2-Ag - 0,03 M - 50 °C - 15 minuti

La figura 3.21 mostra le immagini SEM ottenute del campione SBA2-Ag - 0,03 M - 50 °C - 15 minuti. Si può osservare la presenza di particelle di forma triangolare con dimensione media di circa 0,5 micron. È inoltre presente uno spettro EDS locale relativo alla particella che mostra alti valori di argento.

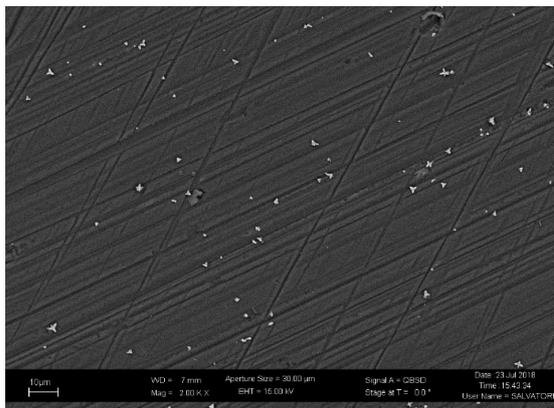
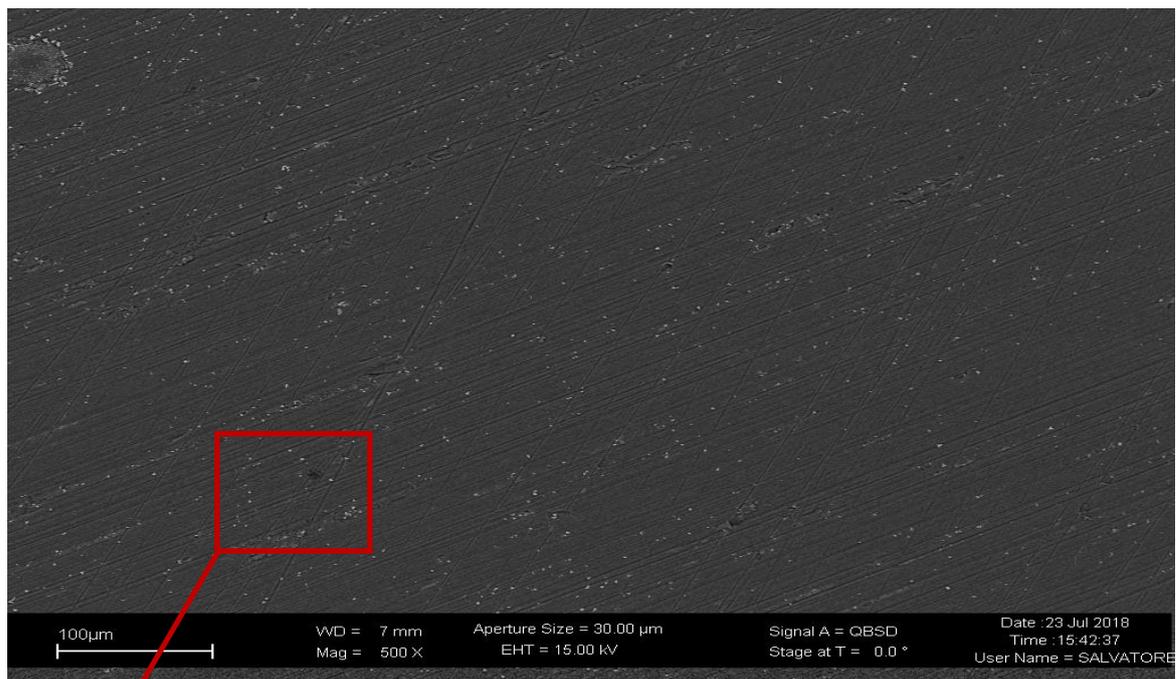


Figura 3.22 - Immagine FESEM con relativi ingrandimenti del campione SBA2-Ag - 0,03 M - 50 °C – 15 minuti, queste immagini sono ottenute con la tecnica del backscattering

L'immagine 3.22 mostra le immagini SEM ottenuta in modalità backscattering del campione SBA2-Ag - 0,03 M - 50 °C – 15 minuti. Si può osservare la distribuzione delle particelle sulla superficie del campione

Elemento	Weight %	STD	Atomic %	STD
Na	14,7	0,06	19,8	0,05
Al	1,1	0,13	1,2	0,03
Si	39,4	0,40	43,4	0,38
P	5,7	0,17	5,7	0,18
Ca	38,6	0,20	29,8	0,21
Ag	0,6	0,07	0,2	0,02

Tabella 3.9 - Composizionali EDS (media-STD) del campione 0,03 M - 50 °C - 15 minuti

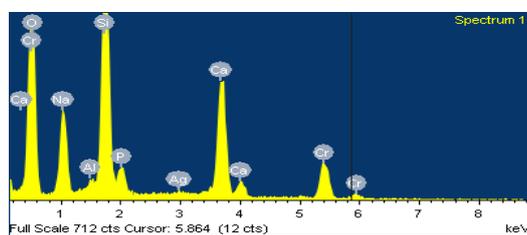


Figura 3.23 - Spettro EDS di area del campione SBA2- Ag - 0,03 M - 50 °C - 15 minuti

La tabella 3.9 mostra la media della analisi quantitative di area, mentre la figura 3.23 mostra lo spettro EDS. Come si evince dalle analisi effettuate la superficie del campione contiene ridotti quantitativi di Ag (circa 0,2% atomico) sotto forma di microparticelle.

SBA2 - Ag – 0.03 –100°C – 15 minuti

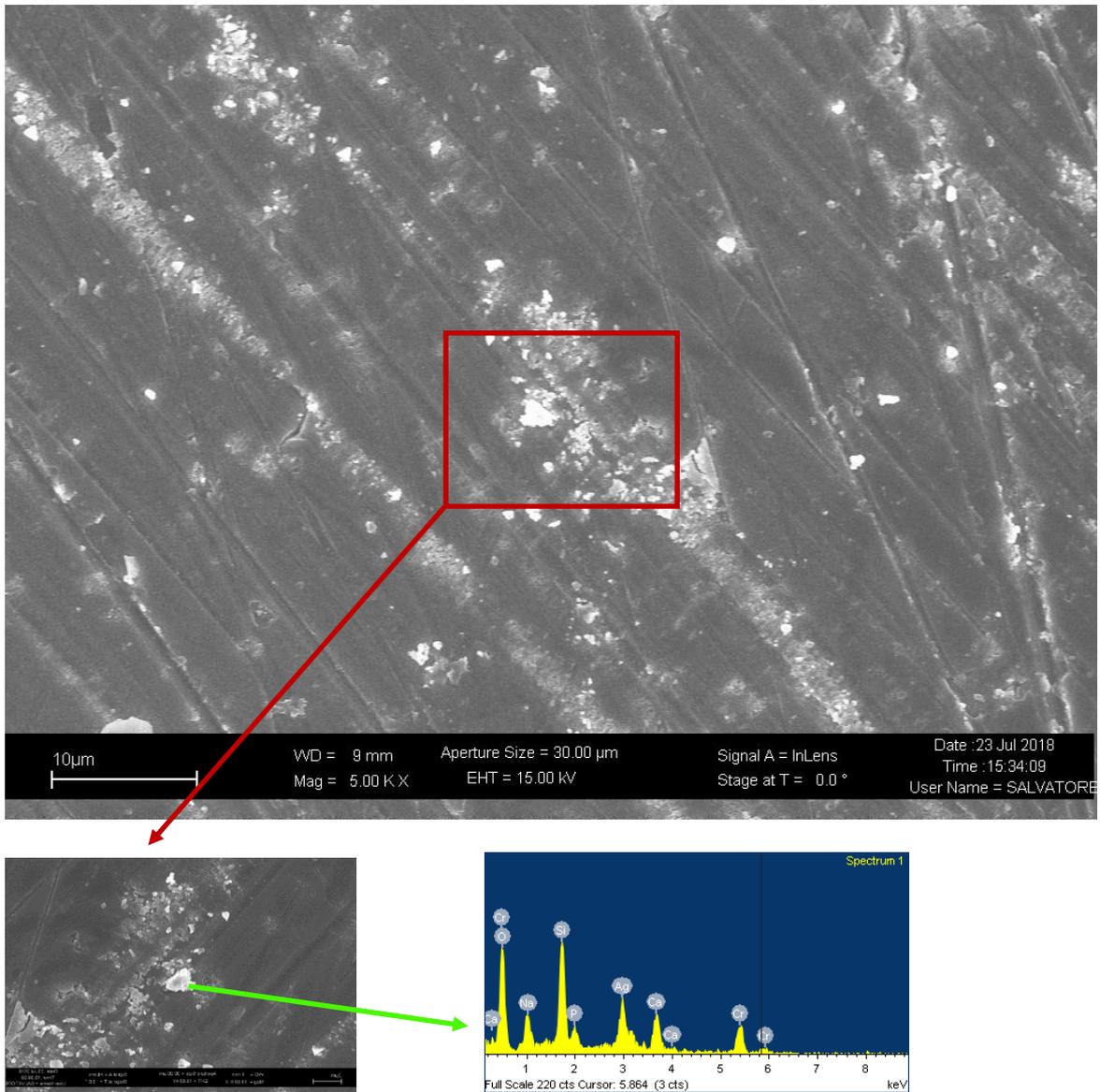


Figura 3.23 - Immagine FESEM con relativi ingrandimenti e spettro EDS locale del campione SBA2-Ag - 0,03 M - 100 °C – 15 minuti

La figura 3.23 mostra le immagini SEM ottenute del campione SBA2-Ag - 0,03 M - 100 °C – 15 minuti. Si può osservare la presenza di particelle con dimensione media di circa 1 micron. È inoltre presente uno spettro EDS locale relativo alla particella che mostra gli alti valori di argento rilevabili sulla particella

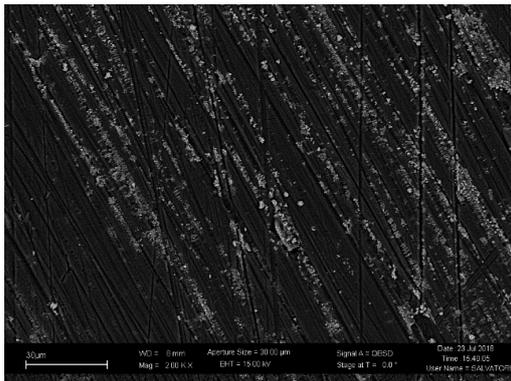
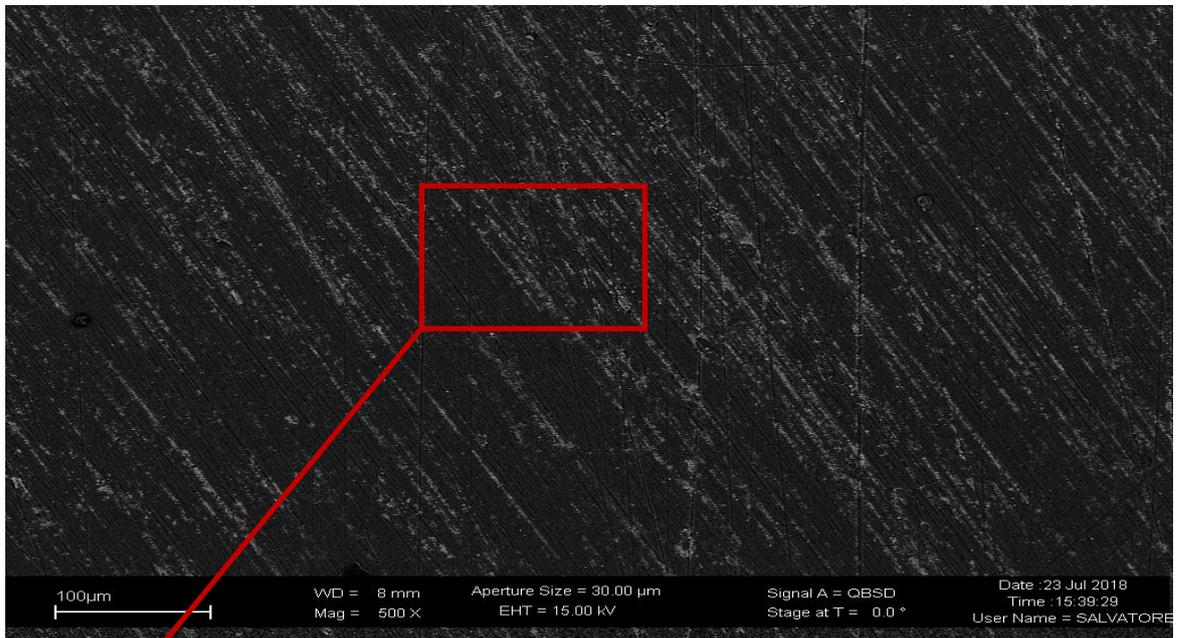


Figura 3.24 - Immagine FESEM con relativi ingrandimenti del campione SBA2-Ag - 0,03 M - 100 °C - 15 minuti, le seguenti immagini sono ottenute con la tecnica del backscattering

L'immagine 3.24 mostra le immagini SEM ottenuta in modalità backscattering del campione SBA2-Ag - 0,03 M - 100 °C - 15 minuti. Si può osservare la distribuzione delle particelle sulla superficie del campione.

Elemento	Weight %	STD	Atomic %	STD
Na	16,7	1,06	22,8	1,46
Al	1,1	0,16	1,2	0,18
Si	38,8	0,30	43,2	0,29
P	5,5	0,42	5,6	0,42
Ca	33,1	2,84	25,9	2,21
Ag	4,8	1,51	1,4	0,44

Tabella 3.10 - Composizionali EDS (media-STD) del campione 0,03 M - 100 °C - 15 minuti

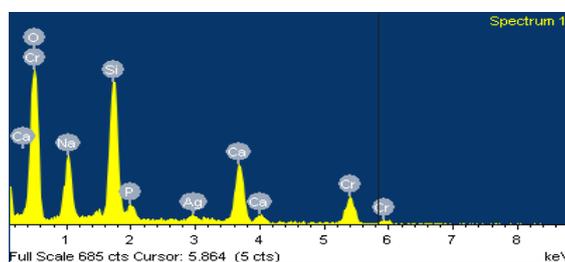


Figura 3.25 - Spettro EDS di area del campione SBA2-Ag - 0,03 M - 100 °C - 15 minuti

La tabella 3.10 mostra la media della analisi quantitative di area, mentre la figura 3.25 mostra lo spettro EDS. Come si evince dalle analisi effettuate la superficie del campione contiene quantitativi di Ag superiori agli altri casi a 15 minuti (circa 1,4% atomico) sotto forma di microparticelle.

Una volta acquisite tutte le immagini ed i dati EDS si è deciso, per semplificare il confronto, di rappresentare graficamente l'andamento dei parametri di interesse in funzione delle diverse condizioni testate. I parametri considerati sono:

- Concentrazione dell'argento (% atomica)
- Dimensione delle nanoparticelle d'argento

Questi vengono rappresentati in funzione della concentrazione molare della soluzione di argento iniziale, della temperatura e del tempo di reazione. In questo modo è possibile visualizzare più nel dettaglio le condizioni ideali che favoriscono la riduzione delle nanoparticelle.

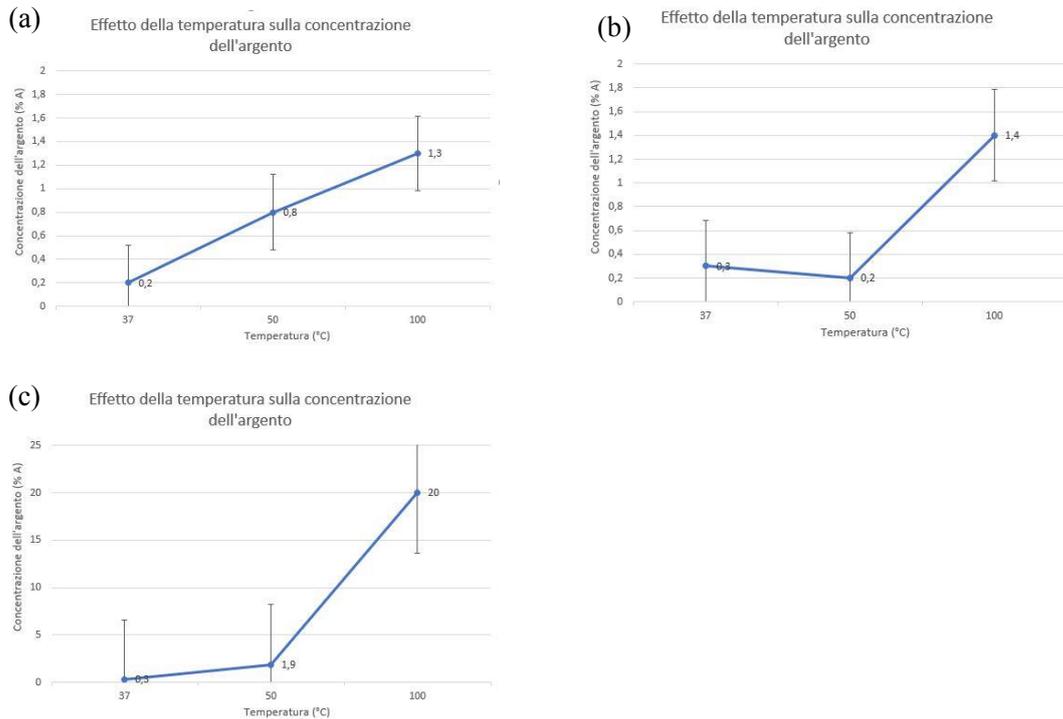


Figura 3.26 - Effetto della temperatura sulla concentrazione dell'argento (a) 0,03 M - 1h (b) 0,03 M - 15m (c) 0,3 M - 1h

Per quanto riguarda l'influenza della temperatura sulla concentrazione dell'argento, si nota come esiste un rapporto diretto tra l'aumento della temperatura e l'aumento della concentrazione dell'argento sui campioni; tale incremento è ovviamente più marcato nell'intervallo 50-100 °C rispetto all'intervallo 37-50 °C essendo la variazione di temperatura più estesa. Più nel dettaglio si nota nel caso 0,3 M (c) come l'aumento di temperatura porta a notevoli incrementi della concentrazione di argento rilevata mentre nei casi 0,03 M (a)(b) gli incrementi sono ridotti. Nel caso del campione 0.03 M - 15 minuti, la diminuzione della concentrazione a 50°C rientra nell'errore di misura dello strumento. Questo permette di comprendere il ruolo di primo piano della temperatura, parametro utile a regolare la concentrazione d'argento sul campione.

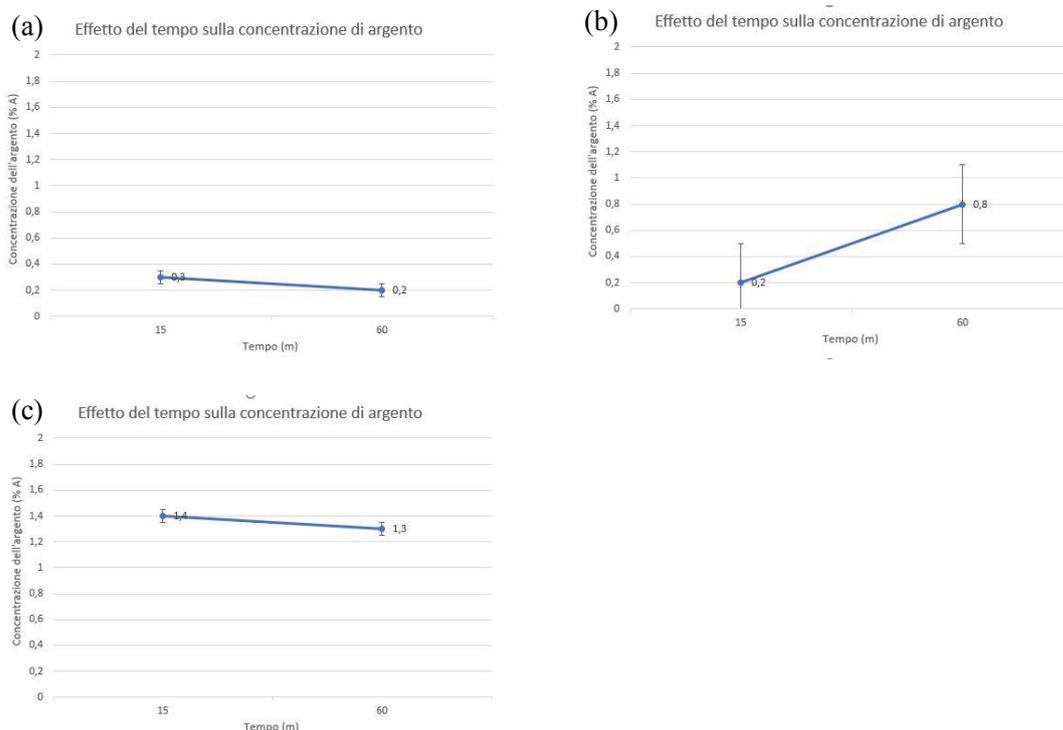


Figura 3.27 - Effetto del tempo sulla concentrazione dell'argento (a) 0,03 M - 37 °C (b) 0,03 M - 50 °C (c) 0,03 M - 100 °C

In questo caso si è valutato l'andamento della concentrazione dell'argento sui campioni in funzione del tempo di reazione; per quanto riguarda i campioni a 37 °C (a) si nota una variazione molto ridotta, confrontabile con l'errore di misura dello strumento (1%). Il comportamento è diverso a 50 °C (b) dove si osserva un aumento abbastanza marcato della concentrazione d'argento con l'aumentare del tempo di reazione: a 50 °C il tempo diventa un parametro rilevante. Per quanto riguarda il campione a 100 °C (c) non si notano nuovamente differenze significative fra i due tempi considerati; osserviamo nuovamente un leggero calo della concentrazione d'argento per il campione con il tempo di reazione più alta, ma si tratta sempre di valori molto ridotti. Possiamo quindi concludere che la concentrazione d'argento viene influenzata dal tempo di reazione, ma è comunque una dipendenza secondaria rispetto al contributo della temperatura.

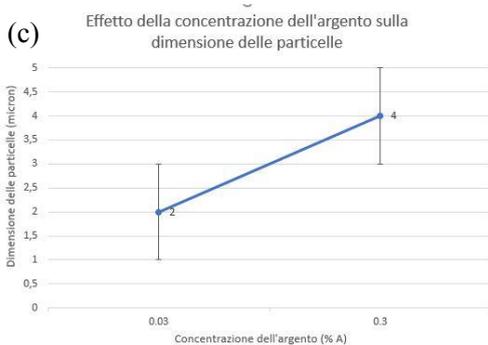
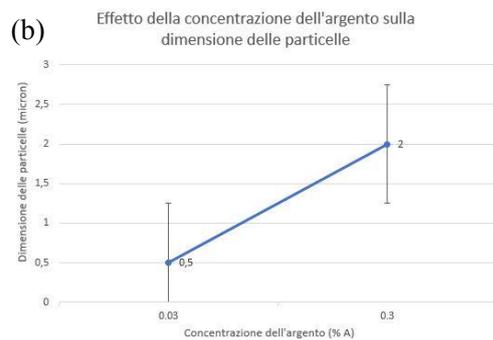
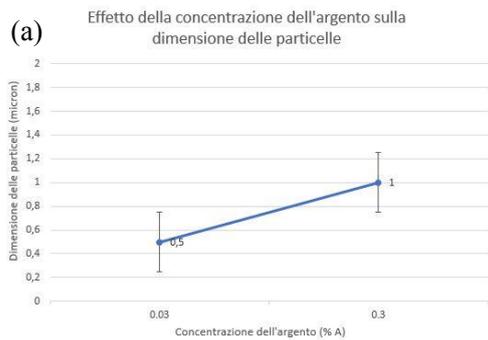
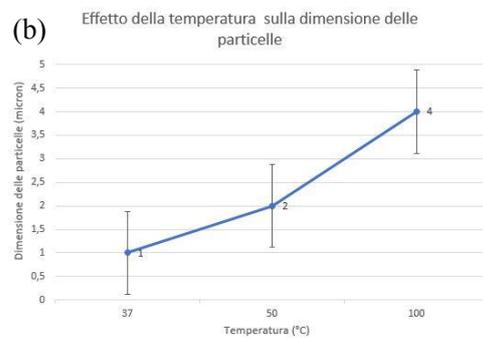
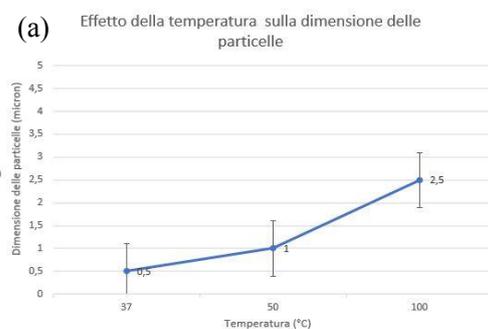


Figura 1.28 - Effetto della concentrazione dell'argento sulla dimensione delle particelle (a) 1h - 37 °C (b) 1h - 50 °C (c) 1h - 100 °C

In questo caso si è valutata l'influenza della concentrazione iniziale d'argento in soluzione sulla dimensione delle nanoparticelle. In tutti i campioni considerati si nota un aumento delle dimensioni delle particelle all'aumentare della concentrazione iniziale dell'argento in soluzione. L'aspetto interessante è, di nuovo, l'influenza della temperatura: osservando i valori si nota come per i campioni a 100°C (c) è possibile osservare un aumento decisamente più marcato della taglia delle nanoparticelle rispetto ai campioni trattati a 37 °C e 50 °C (a) (b) dove la crescita delle particelle è più controllata.



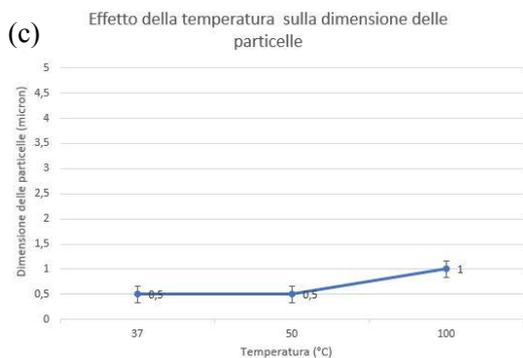
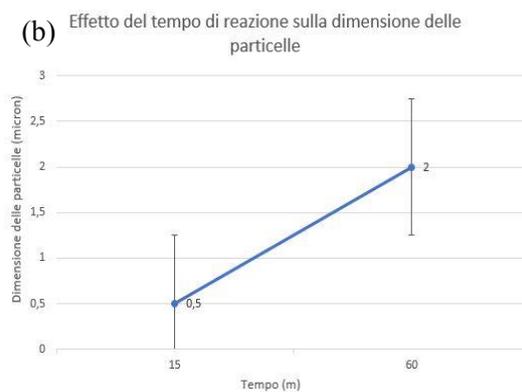
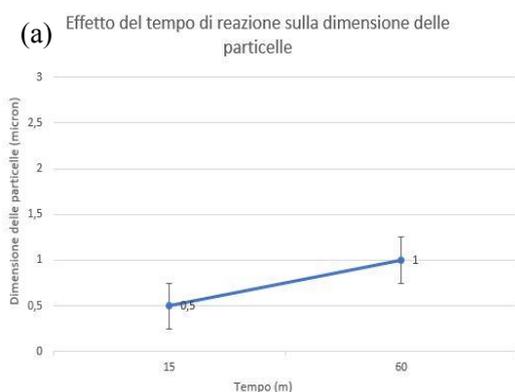


Figura 3.29 - Effetto della temperatura sulle dimensioni delle particelle (a) 0,03 M - 1h (b) 0,03 M - 15 m (c) 0,3 M - 1h

In questo confronto, dove viene rappresentata l'influenza della temperatura sulle dimensioni delle nanoparticelle, si nota che la temperatura è molto importante per regolare la dimensione delle particelle sintetizzate: aumentando la temperatura aumentano anche le dimensioni delle nanoparticelle ottenute. Si nota nuovamente come la differenza di temperatura 37- 50 °C non porta a cambiamenti significativi, mentre le dimensioni aumentano considerevolmente per i campioni fino a 100 °C, in particolare nel caso 0,3 M (c). A 15 minuti (b) si osserva una sostanziale indipendenza dalla temperatura; per tempi ridotti le nanoparticelle non hanno infatti il necessario tempo per crescere, a prescindere dalla temperatura considerata.



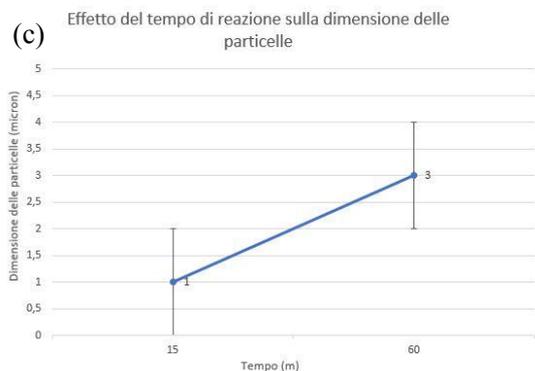


Figura 3.30 - Effetto del tempo sulla dimensione delle particelle (a) 0,03 M - 37 °C (b) 0,03 M - 50 °C (c) 0,03 M - 100 °C

In questo caso si analizza l'effetto del tempo di reazione sulla dimensione delle nanoparticelle. Si può notare come a 37 °C (a) esiste una relazione lineare tra il tempo di reazione e la taglia delle nanoparticelle risultanti; aumentando il tempo di reazione aumentano le dimensioni delle nanoparticelle. Diversa è la situazione a 50 °C (b) dove il tempo di reazione sembra non avere impatto significativo sulla taglia delle particelle.

In definitiva possiamo concludere che la temperatura riveste un ruolo importante nel regolare la taglia delle nanoparticelle e la concentrazione d'argento presente sul campione; si nota un aumento molto marcato di queste due caratteristiche per le reazioni condotte a 100 °C. Il tempo di reazione sembra essere anch'esso importante nel regolare la riduzione delle nanoparticelle, però sembra avere un ruolo di secondo piano rispetto la temperatura: a temperature elevate (100 °C) si ottengono infatti incrementi molto marcati di entrambe le caratteristiche considerate anche considerando tempi di reazioni molti diversi. Per le reazioni a 15 minuti si ottiene invece l'effetto opposto con la formazione di nanoparticelle simili in tutte le configurazioni di temperatura testate.

Per i campioni a 50 °C, ad entrambi i tempi studiati, osservando le immagini FESEM le nanoparticelle mostrano una distribuzione spaziale più omogenea ed una morfologia maggiormente controllata rispetto agli altri casi considerati. Come previsto si può notare inoltre che i valori della concentrazione dell'argento ricavati dai campioni trattati con una soluzione 0,03 M sono inferiori ai casi a 0,3 M: questo rappresenta un aspetto interessante, visto che siamo interessati anche a limitare l'eventuale citotossicità dell'argento.

In base a queste osservazioni abbiamo scelto come configurazioni per indagare la bioattività i due campioni a 50 °C:

- SBA2-Ag – 0,03 M – 50 °C – 15 m
- SBA2-Ag – 0,03 M – 50 °C – 1 h

3.2 Analisi UV- Vis

In questo lavoro di tesi è stata effettuata la spettrometria UV per analizzare le soluzioni in cui sono avvenute le reazioni al fine di valutare l'influenza del campione di vetro e ricercare la presenza di nanoparticelle disperse in soluzione.

Inizialmente abbiamo ricavato lo spettro UV-vis di una soluzione di PVA in acqua bidistillata, in modo da poter conoscere il contributo del PVA allo spettro.

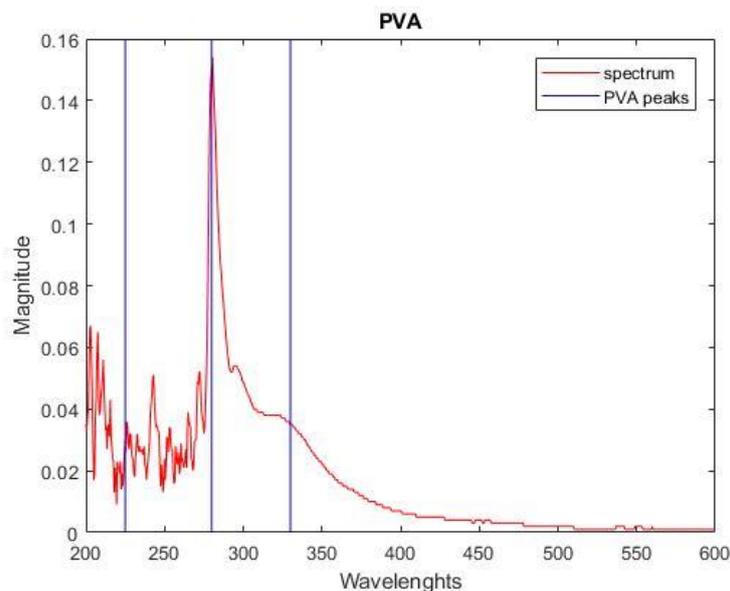


Figura 3.31 - Spettro UV-Vis di una soluzione di PVA disciolto in acqua bidistillata

La figura 3.31 mostra lo spettro UV-vis della soluzione di PVA: si possono osservare i picchi caratteristici a 225,280 e 330 nm³⁹.

Sono state quindi analizzate le soluzioni in cui è avvenuta la reazione: si è ricavato sia lo spettro UV-vis della soluzione in assenza del campione di vetro, sia lo spettro della soluzione in cui è stato immerso il campione.

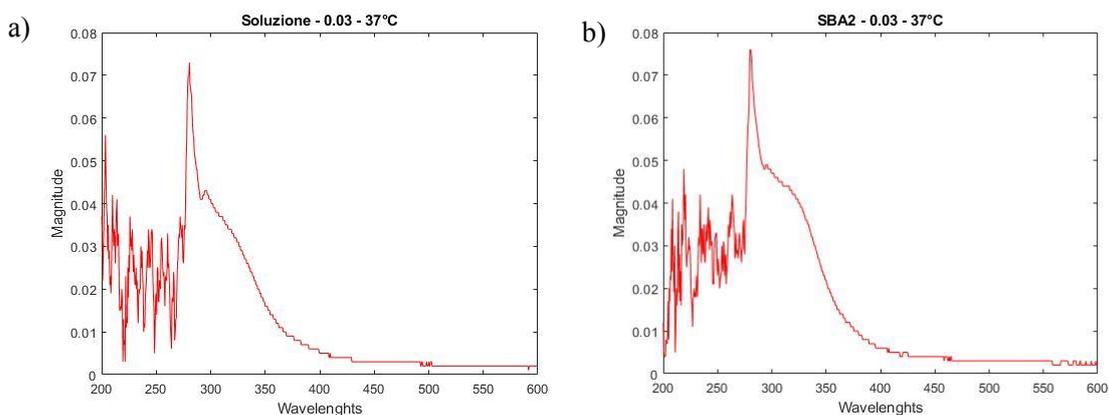


Figura 3.32 - Spettro UV-vis della soluzione in cui è avvenuta la reazione nel caso 0,03 M - 37 °C - 1h : (a) in assenza del campione ed (b) in presenza del campione di vetro

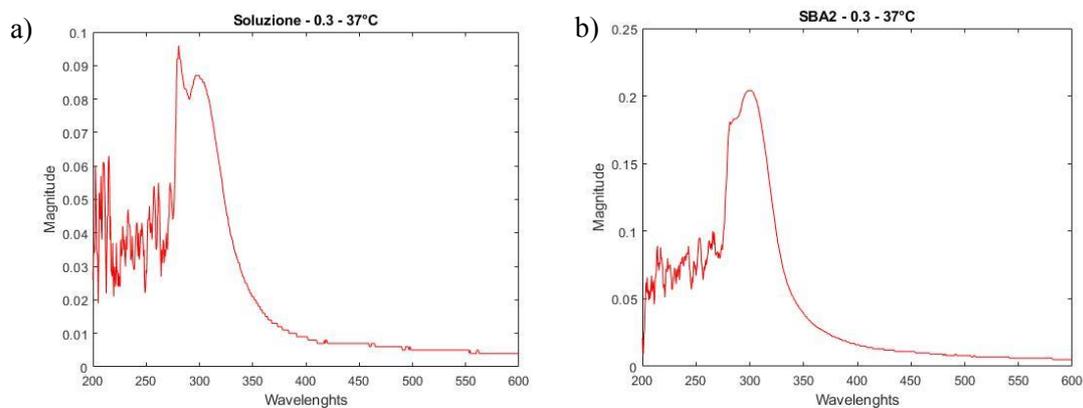


Figura 3.33 - Spettro UV-vis della soluzione in cui è avvenuta la reazione nel caso 0,3 M - 37 °C - 1h : (a) in assenza del campione ed (b) in presenza del campione di vetro

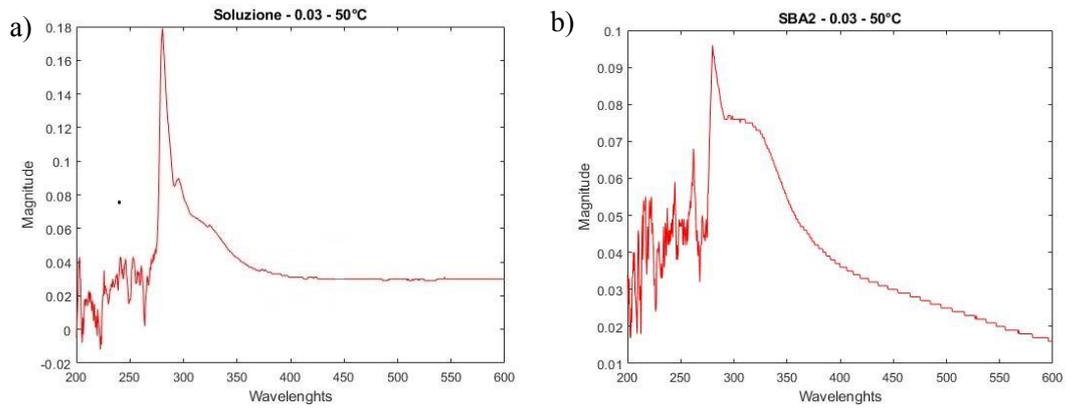


Figura 3.34 - Spettro UV-vis della soluzione in cui è avvenuta la reazione nel caso 0,03 M - 50 °C - 1 h : (a) in assenza del campione ed (b) in presenza del campione di vetro

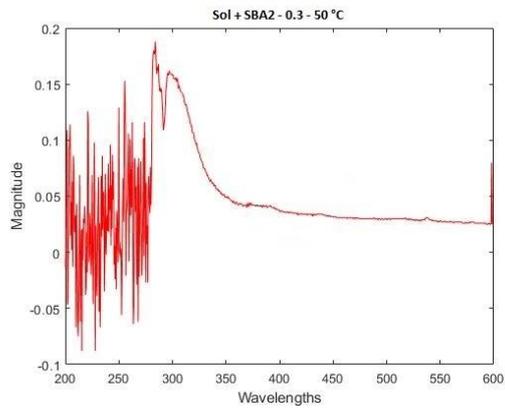


Figura 3.35- Spettro UV-vis della soluzione in cui è avvenuta la reazione nel caso 0,3 M - 50 °C - 1 h : in presenza del campione di vetro

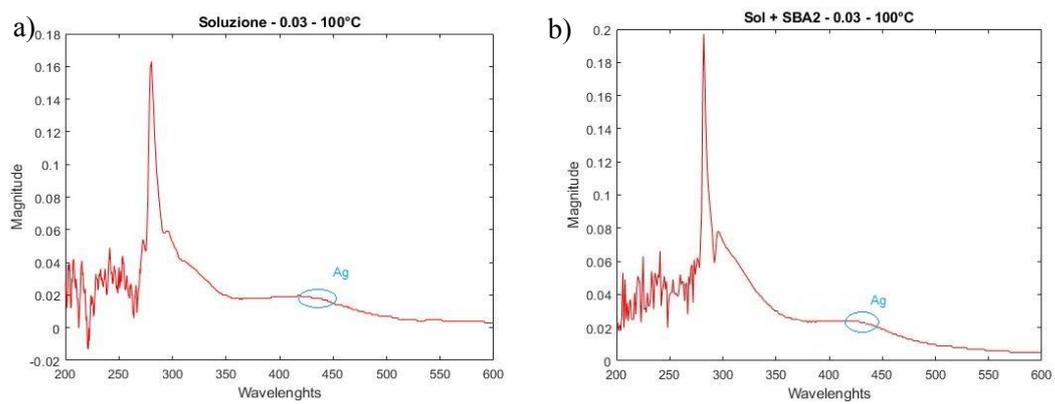


Figura 3.35- Spettro UV-vis della soluzione in cui è avvenuta la reazione nel caso 0,03 M - 100 °C - 1 h: (a) in assenza del campione ed (b) in presenza del campione di vetro

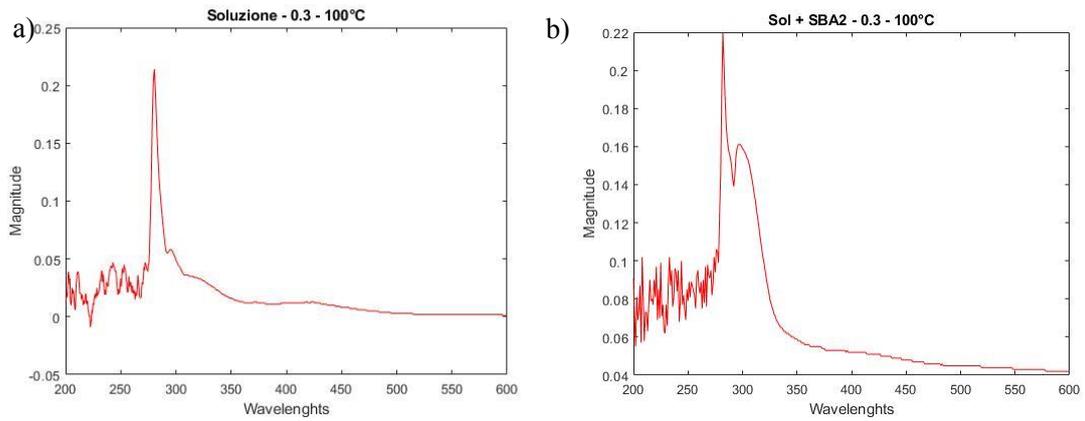


Figura 3.36 - Spettro UV-vis della soluzione in cui è avvenuta la reazione nel caso 0,3 M - 100 °C - 1 h: (a) in assenza del campione ed (b) in presenza del campione di vetro

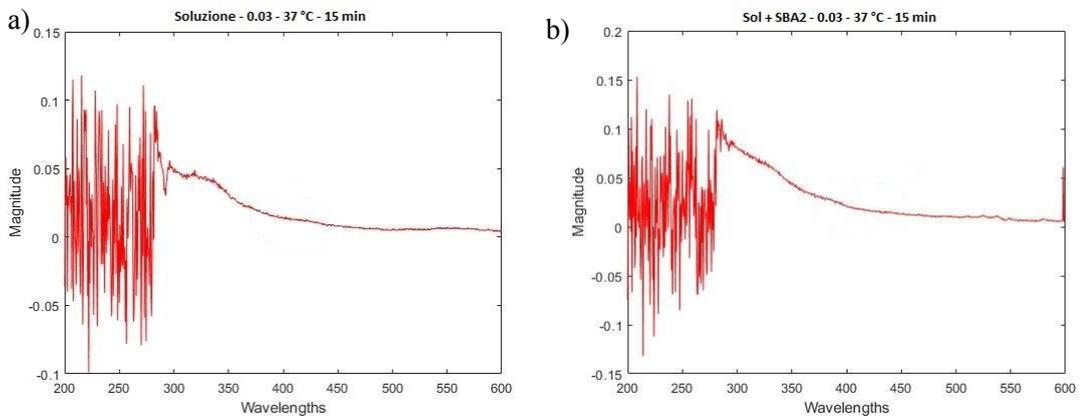


Figura 3.37 - Spettro UV-vis della soluzione in cui è avvenuta la reazione nel caso 0,03 M - 37 °C - 15 min: (a) in assenza del campione ed (b) in presenza del campione di vetro

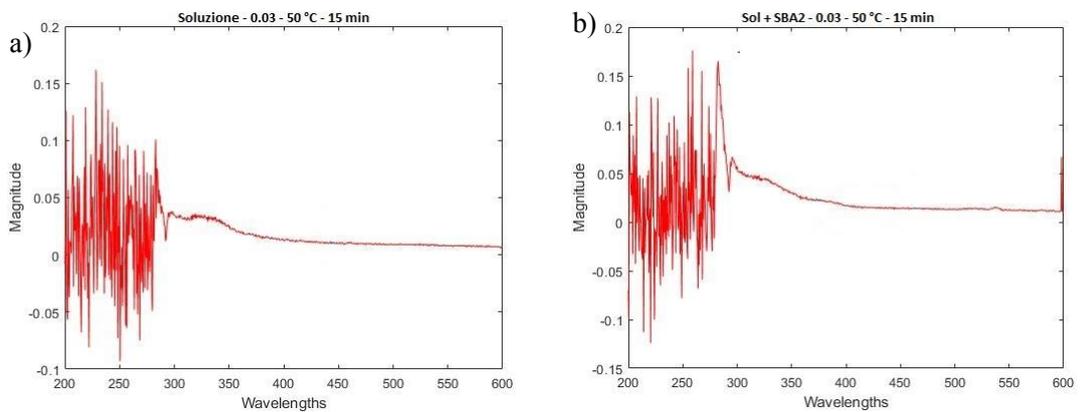


Figura 3.38 - Spettro UV-vis della soluzione in cui è avvenuta la reazione nel caso 0,03 M - 50 °C - 15 min: (a) in assenza del campione ed (b) in presenza del campione di vetro

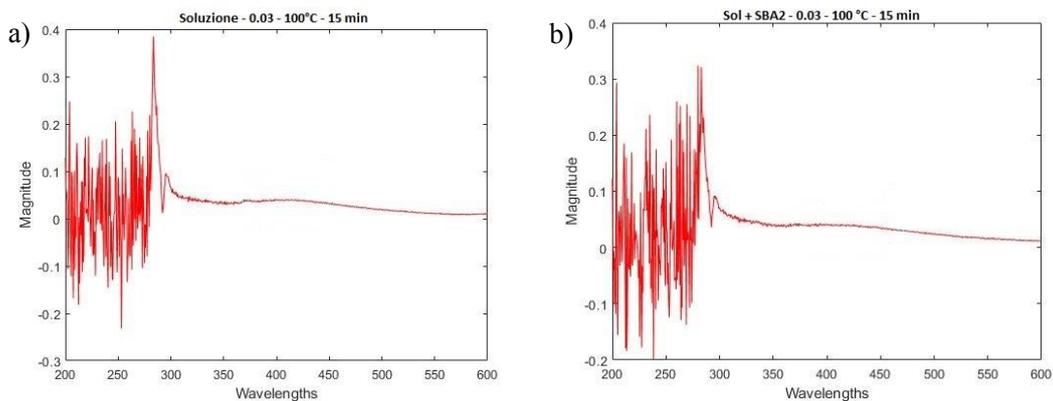


Figura 3.39 - Spettro UV-vis della soluzione in cui è avvenuta la reazione nel caso 0,03 M - 100 °C - 15 m: (a) in assenza del campione ed (b) in presenza del campione di vetro

Dallo studio degli spettri ricavati si nota come non sono presenti picchi relativi alle nanoparticelle di argento, solamente per i campioni trattati a 100 °C si può però notare la presenza di una “spalla” intorno ad un intervallo compreso tra 420 e 430 nm che possiamo supporre appartenere alle nanoparticelle d’argento.

Dai risultati ottenuti, si può quindi affermare che in soluzione non sono presenti (o sono presenti in ridotte quantità nel caso dei campioni trattati a 100 °C) nanoparticelle d’argento; si può quindi ipotizzare che le nanoparticelle sono ridotte sulla superficie del vetro e che il vetro riveste un ruolo attivo nel processo di riduzione.

3.3 Analisi UV- Vis campioni massivi

Un’ ulteriore analisi possibile per valutare la formazione delle nanoparticelle d’argento è la spettroscopia UV-Vis sui campioni SBA2-Ag. Sono di seguito presentati gli spettri ottenuti analizzando i campioni massivi di vetro in seguito ai trattamenti effettuati.

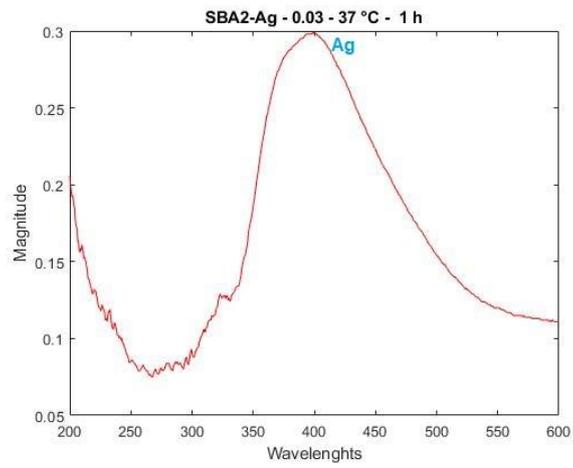


Figura 3.40 - Spettro UV- vis del campione SBA2- Ag - 0,03 M - 37 °C - 1h

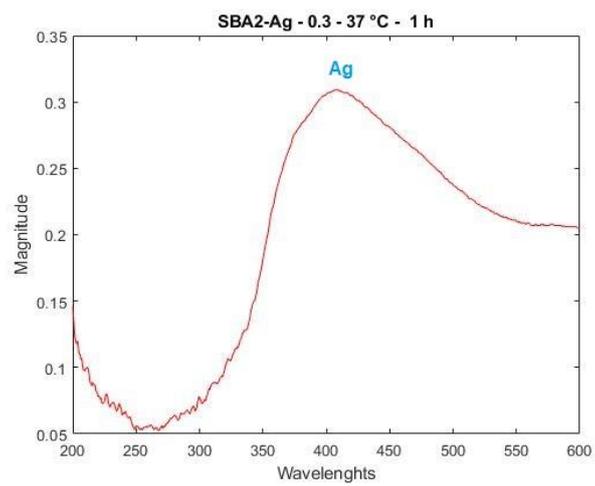


Figura 3.41 - Spettro UV- vis del campione SBA2- Ag - 0,3 M - 37 °C - 1h

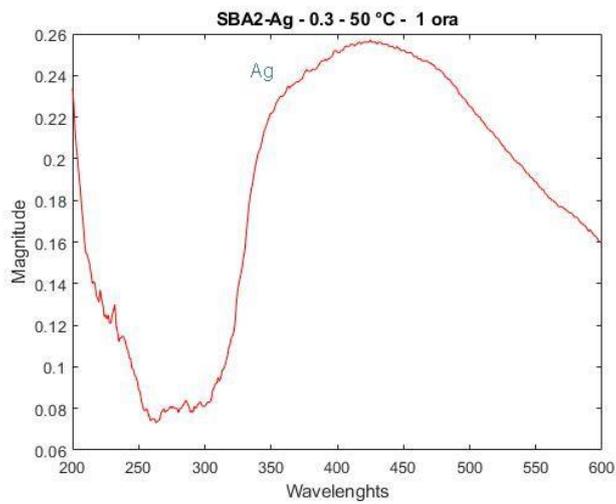


Figura 3.42- Spettro UV- vis del campione SBA2- Ag - 0,3 M - 50 °C - 1h

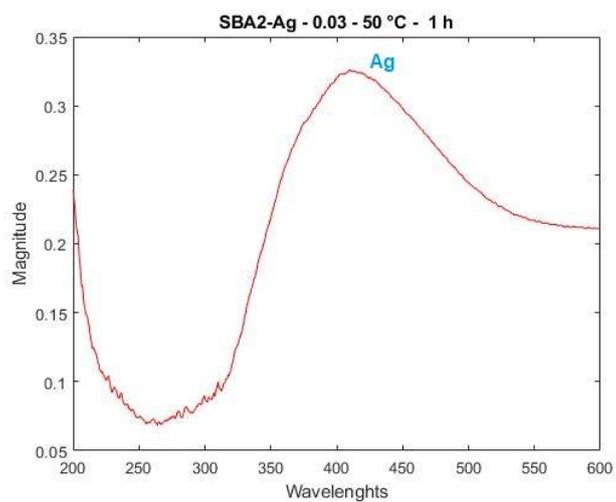


Figura 3.43 - Spettro UV- vis del campione SBA2- Ag - 0,03 M - 50 °C - 1h

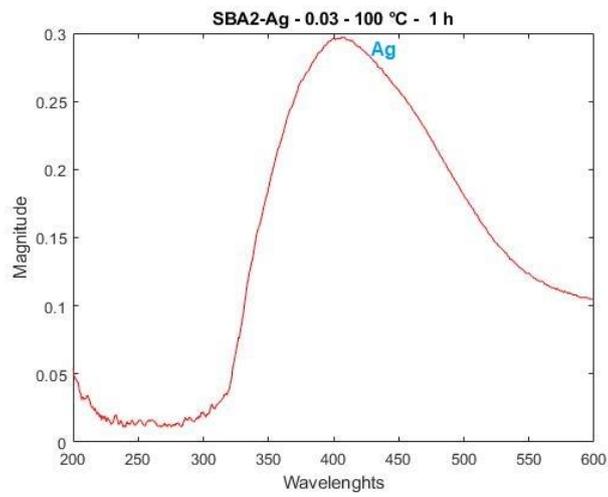


Figura 3.44 - Spettro UV- vis del campione SBA2- Ag - 0,03 M - 100 °C - 1h

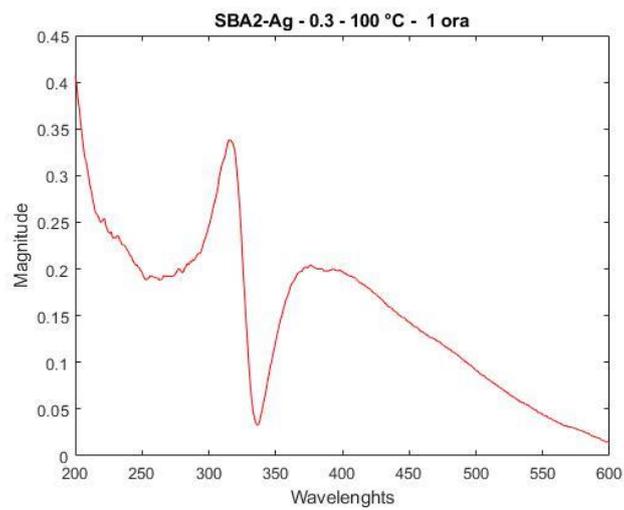


Figura 3.45 - Spettro UV- vis del campione SBA2- Ag - 0,3 M - 100 °C - 1h

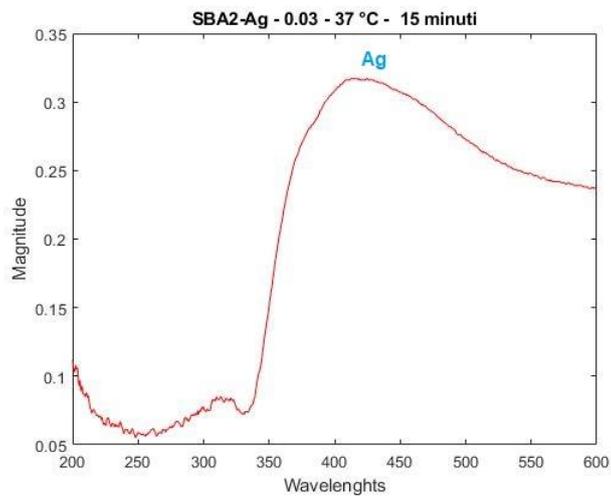


Figura 3.46 - Spettro UV- vis del campione SBA2- Ag - 0,03 M - 37 °C - 15 minuti

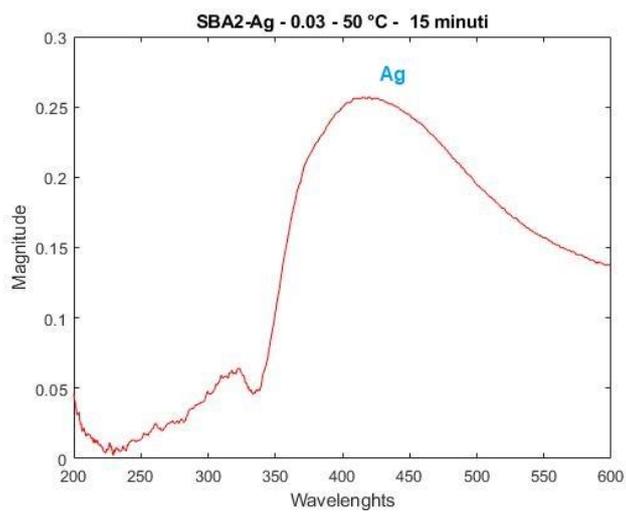


Figura 3.47 - Spettro UV- vis del campione SBA2- Ag - 0,03 M - 50 °C - 15 minuti

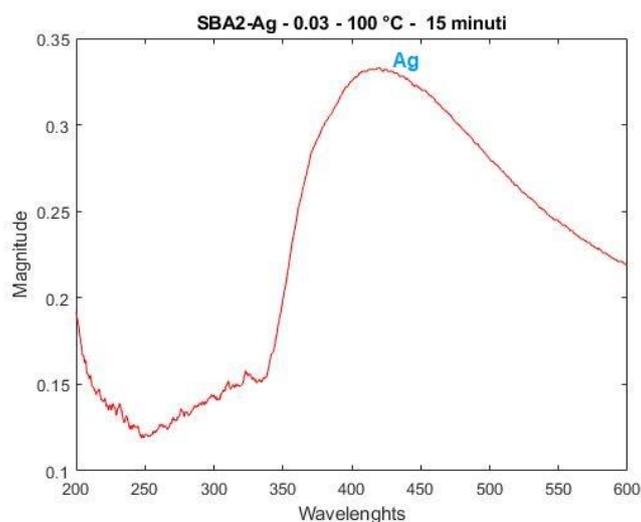


Figura 3.48 - Spettro UV- vis del campione SBA2- Ag - 0,03 M - 100 °C - 15 minuti

Negli spettri di figure 3.40-3.48 per tutti i campioni considerati si osserva un picco situato nel range 420 - 430 nm, che se confrontato con i valori disponibili in letteratura² corrisponde con la lunghezza d'onda caratteristica delle nanoparticelle d'argento². Questi risultati confermano l'effettiva riduzione delle nanoparticelle di argento sulla superficie del vetro.

3.4 Analisi raggi X

In questo lavoro di tesi le analisi a raggi x sono state utilizzate per valutare la riduzione delle nanoparticelle sulla superficie del vetro

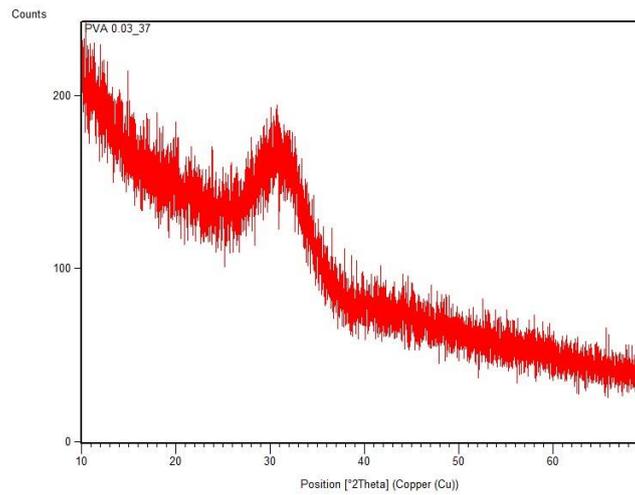


Figura 3.49 - Analisi XRD del campione SBA2-Ag - 0,03 M - 37 °C - 1 ora

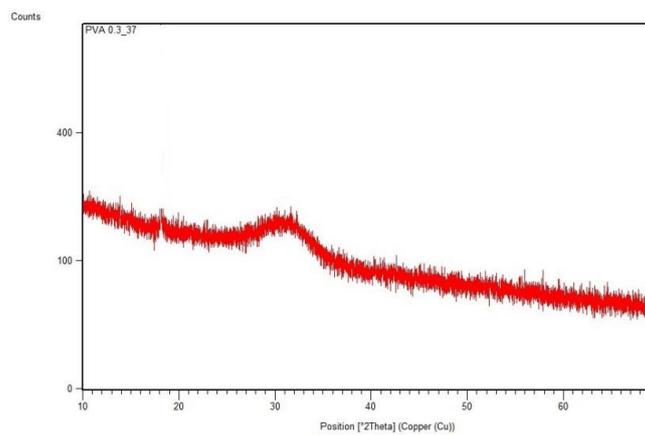


Figura 3.50 - Analisi XRD del campione SBA2-Ag - 0,3 M - 37 °C - 1 ora

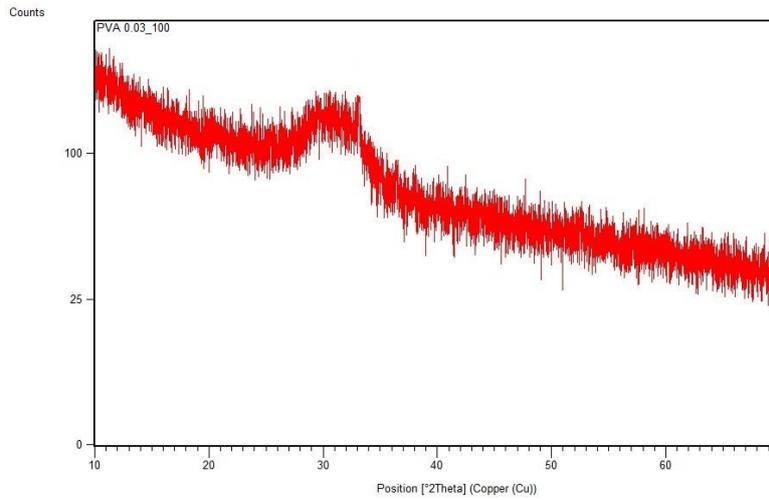


Figura 3.51 - Analisi XRD del campione SBA2-Ag - 0,03 M - 100 °C - 1 ora

Tutti i campioni considerati mostrano il comportamento classico del vetro, caratterizzato dalla presenza di un alone amorfo. Non si notano fasi cristalline significative.

Unica eccezione è il campione SBA2-Ag – 0,3 M - 100 °C – 1 ora, il cui spettro (figure 3.52 e 3.53) evidenzia la presenza dei picchi di argento metallico e di fosfato d’argento

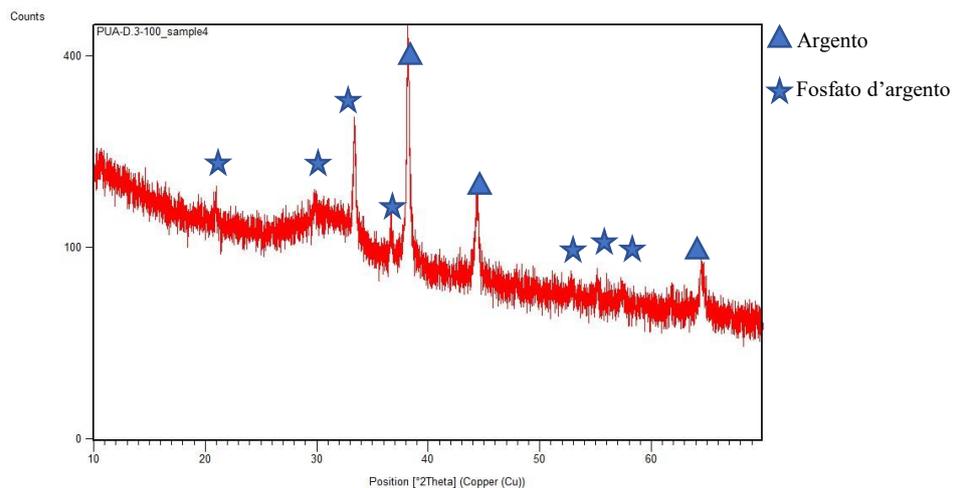


Figura 3.52 - Analisi XRD del campione SBA2-Ag - 0,3 M - 100 °C - 1 ora

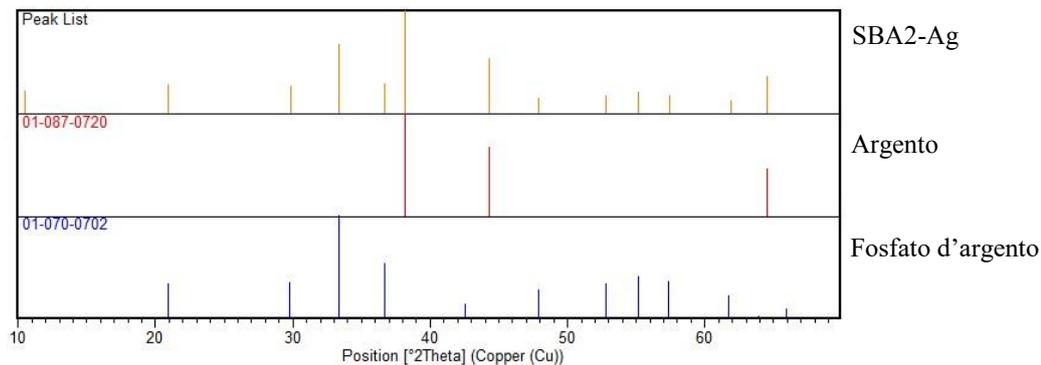


Figura 3.53 - Picchi del campione SBA2-Ag - 0,3 M - 100 °C - 1 ora e confronto con l'argento metallico

Le analisi XRD confermano quanto ipotizzato: il campione in esame presenta argento metallico in superficie.

Siccome dalla analisi morfologico-composizionali sono state evidenziate micro-nanoparticelle di argento su tutti i campioni, i vetri trattati sono stati nuovamente analizzati utilizzando i raggi X con angoli di incidenza radenti per ottenere una analisi superficiale più accurata dei campioni.

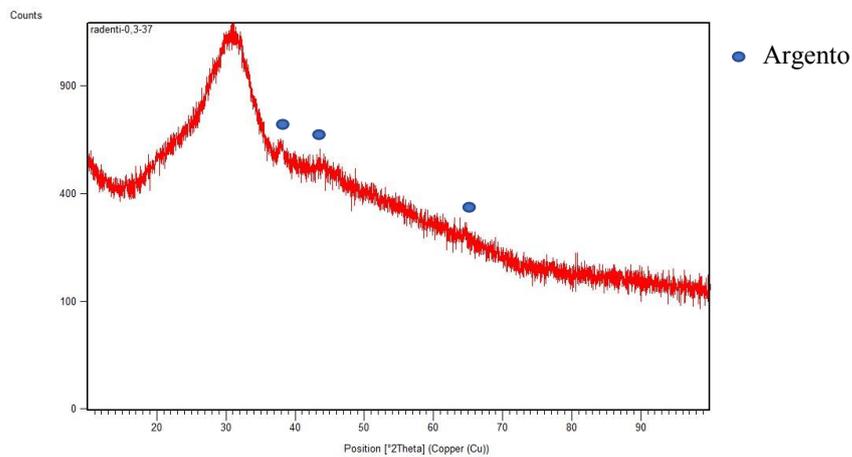


Figura 3.54 - Analisi GI-XD del campione SBA2-Ag - 0,3 M - 37 °C - 1 ora

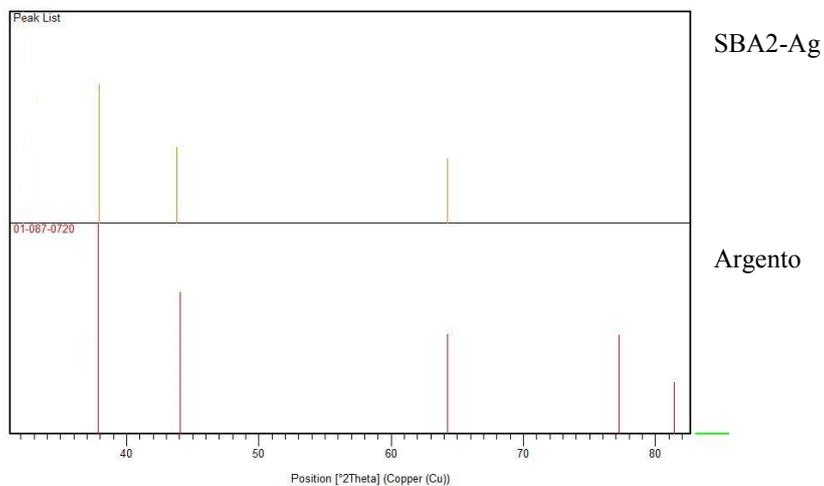


Figura 3.55 - Picchi del campione SBA2-Ag - 0,3 M - 37 °C - 1 ora e confronto con l'argento metallico

Le analisi XRD ad incidenza radente finora effettuate ci permettono di osservare la presenza di argento metallico anche sui campioni che inizialmente ci avevano dato risultati negativi. Possiamo quindi confermare la corretta riduzione delle nanoparticelle sulla superficie dei campioni di vetro.

3.5 Bioattività *in vitro*

Per valutare la bioattività *in vitro* sono i campioni di SBA2-Ag sono stati immersi in SBF. In particolare abbiamo valutato la bioattività a 1 giorno, 3 giorni, 7 giorni e 14 giorni misurando il pH della soluzione ad intervalli regolari. Per ogni prova abbiamo preparato 3 campioni per ciascuna delle due composizioni scelte numerandoli con un codice alfanumerico la cui corrispondenza è riportata in tabella 3.11

Tempo	14 giorni	7 giorni	3 giorni	1 giorno
15 minuti	A1 – A2 – A3	C1 – C2 – C3	E1 – E2 – E3	G1 – G2 – G3
1 ora	B1 – B2 – B3	D1 – D2 – D3	F1 – F2 – F3	H1 – H2 – H3

Tabella 3.11 - Numerazione dei campioni per le prove di bioattività in SBF

Di seguito è rappresentato l'andamento del pH in funzione del tempo, l'andamento generale è coerente con quanto previsto: dopo un iniziale aumento dovuto al rilascio di ioni provenienti dal vetro in soluzione il pH tende nuovamente a scendere fino a stabilizzarsi intorno ad un valore poco superiore del valore iniziale. Questo a causa dello strato di idrossiapatite che si forma sulla superficie del vetro che limita il rilascio ionico.

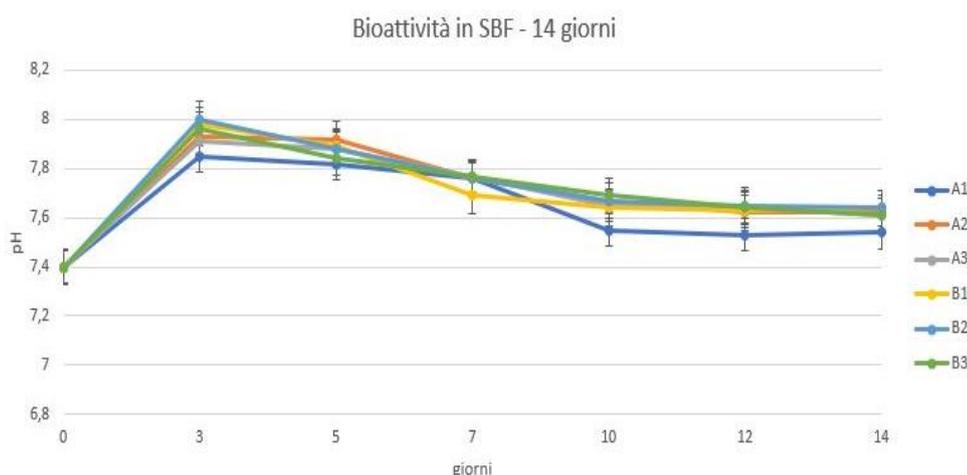


Figura 3.56 - Bioattività in SBF: andamento del pH a 14 giorni (campioni A 15 minuti, campioni B 1 ora)

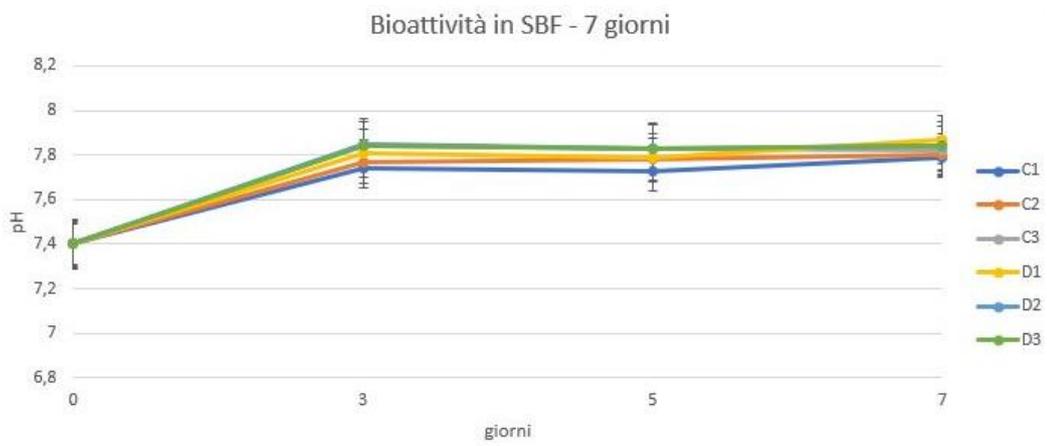


Figura 3.57- Bioattività in SBF: andamento del pH a 7 giorni (campioni C 15 minuti, campioni D 1 ora)

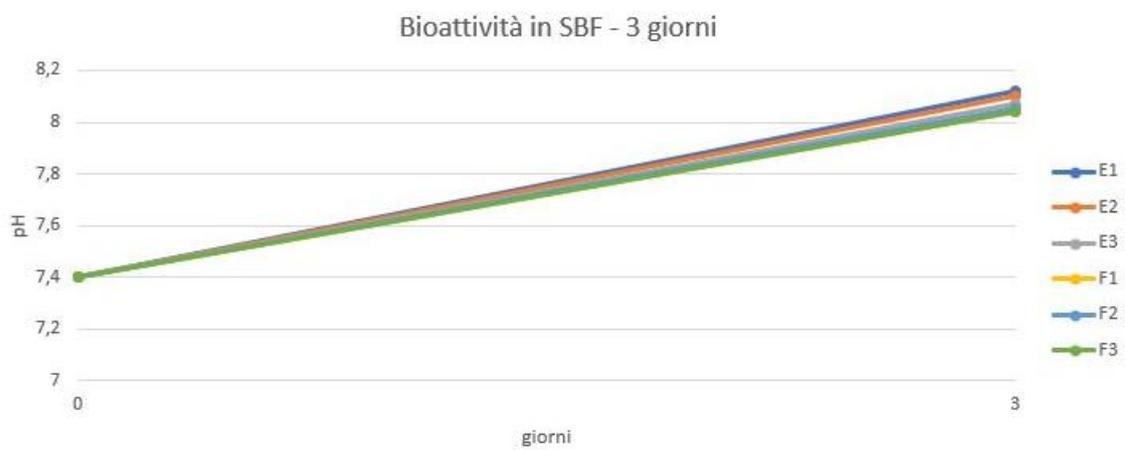


Figura 3.58 - Bioattività in SBF: andamento del pH a 3 giorni (campioni E 15 minuti, campioni F 1 ora)

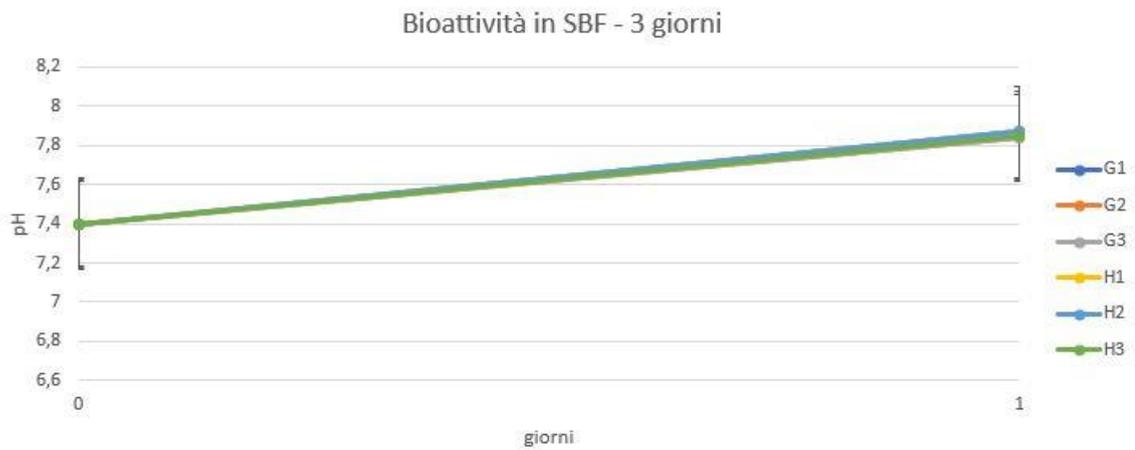


Figura 3.59 - Bioattività in SBF: andamento del pH ad un giorno (campioni G 15 minuti, campioni H 1 ora)

Al termine delle prove i campioni sono stati sciacquati delicatamente in acqua bi-distillata e lasciati ad asciugare a temperatura ambiente; successivamente sono stati, metallizzati e sottoposti alle analisi FESEM-EDS per studiare la formazione dello strato di idrossiapatite. Di seguito sono riportati i risultati di tali analisi, per ogni campione sono presentate le immagini FESEM del campione corredate da alcuni ingrandimenti, sono inoltre presenti i risultati delle analisi EDS condotte sulla superficie insieme agli spettri che indicano la composizione di alcuni punti di interesse.

1 giorno

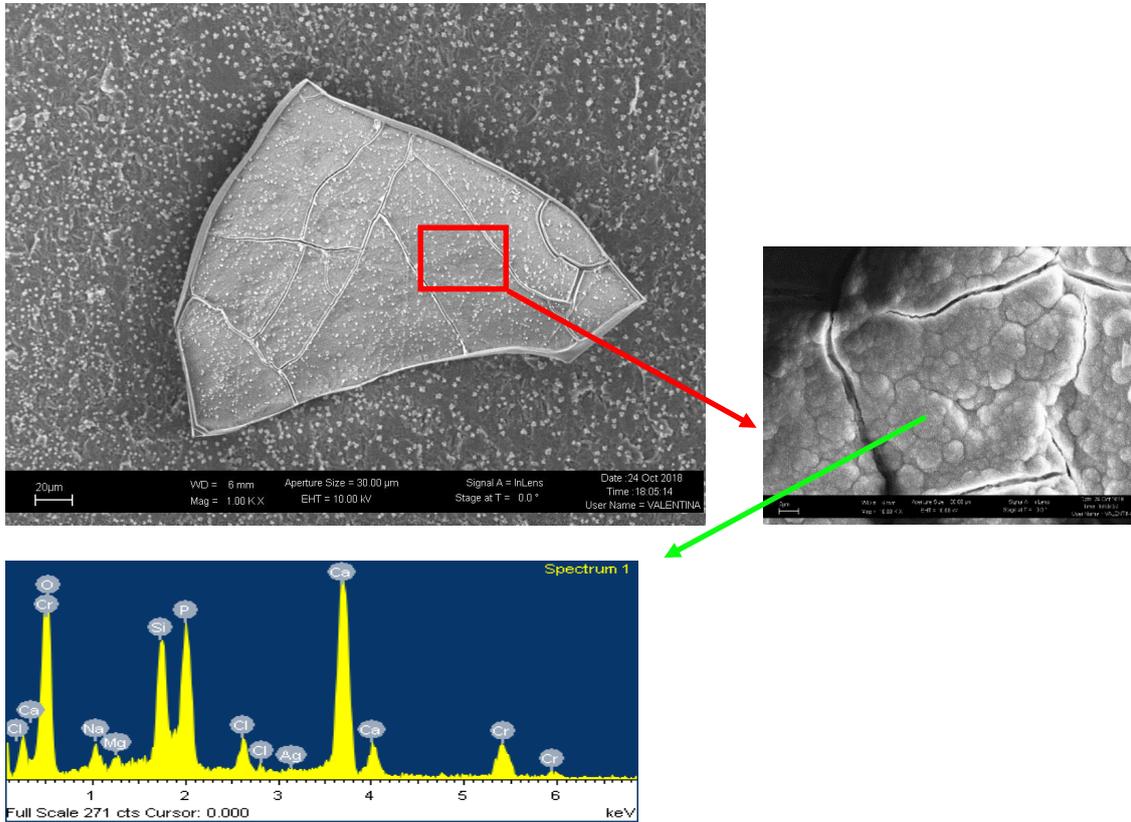


Figura 3.60 - Immagine FESEM con ingrandimento e relativa analisi EDS locale del campione SBA2-Ag – 0.03 M – 50 °C - 15 minuti immerso in SBF per 1 giorno

La figura 3.57 mostra le immagini SEM ed il relativo spettro EDS locale ottenute dal campione SBA2-Ag – 0.03 M – 50 °C - 15 minuti immerso in SBF per 1 giorno. Si evidenzia la presenza di uno strato ricco in Ca e P distribuito su tutta la superficie con la tipica morfologia dell'idrossiapatite.

Elemento	Weight%	STD	Atomic%	STD
Na	3,5	0,30	5,3	0,49
Si	21,2	6,35	26,0	7,53
P	20,5	1,57	22,9	1,94
Ca	52,1	6,05	44,9	5,60
Ag	2,7	1,61	0,9	0,51

Tabella 3.12 - Analisi EDS di area (media e STD) del campione SBA2 - Ag - 15 minuti immerso in SBF per 1 giorno

La tabella 3.12 mostra la media delle analisi quantitative effettuate. L'analisi composizionale evidenzia un elevato quantitativo di Ca e P principali componenti dell'idrossiapatite e la presenza di Na destinato ad essere rilasciato in soluzione con il progredire del meccanismo di bioattività.

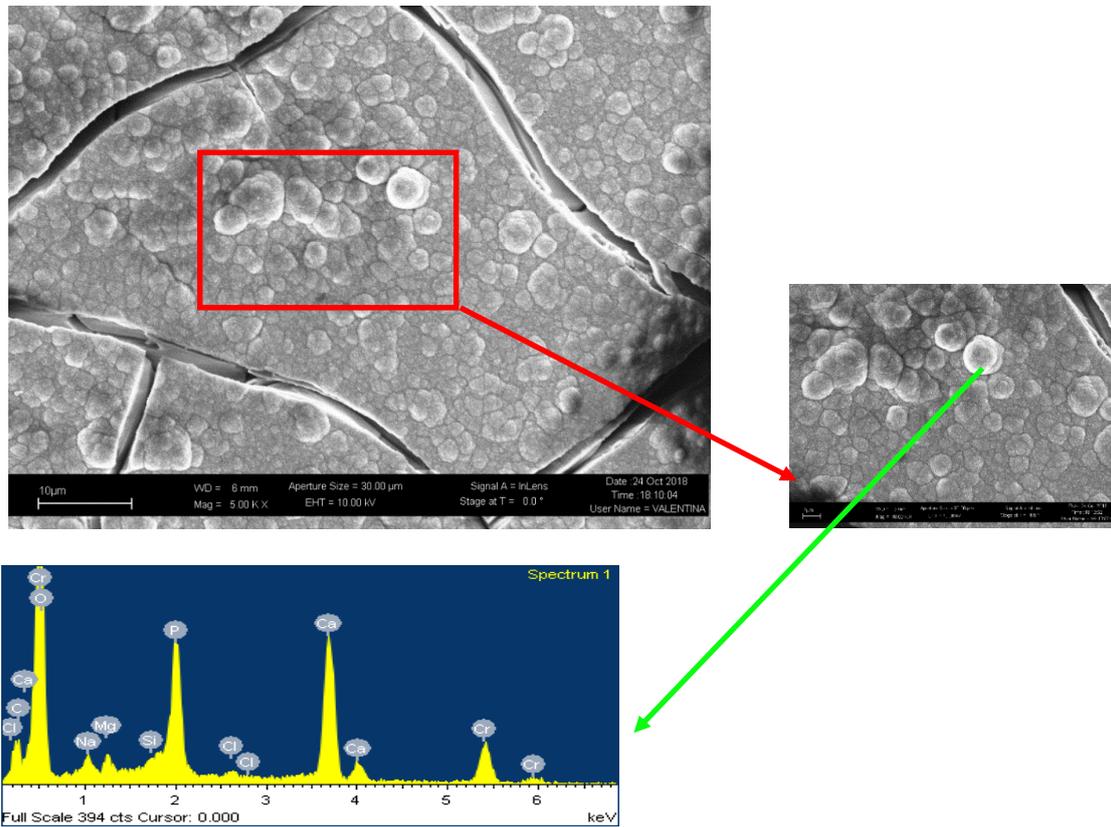


Figura 3.61 - Immagine FESEM con ingrandimento e relativa analisi EDS locale del campione SBA2-Ag – 1 ora immerso in SBF per 1 giorno

La figura 3.58 mostra le immagini SEM ed il relativo spettro EDS locale ottenute dal campione SBA2-Ag – 0.03 M – 50 °C – 1 ora immerso in SBF per 1 giorno. Si evidenzia la presenza di uno strato ricco in Ca e P distribuito su tutta la superficie con la tipica morfologia dell'idrossiapatite. Non si notano picchi appartenenti all'argento.

Elemento	Weight%	STD	Atomic%	STD
Na	5,3	1,03	8,1	1,41
Si	4,3	1,26	5,4	1,53
P	29,8	2,41	33,8	2,26
Ca	59,6	2,13	52,3	2,82
Ag	1,0	1,69	0,3	0,57

Tabella 3.13 - Analisi EDS d'area (media e STD) del campione SBA2 - Ag - 1 ora immerso in SBF per 1 giorno

La tabella 3.13 mostra la media delle analisi quantitative effettuate. L'analisi composizionale evidenzia un elevato quantitativo di Ca e P principali componenti dell'idrossiapatite e la presenza di Na destinato ad essere rilasciato in soluzione con il progredire del meccanismo di bioattività. I valori riscontrati sono ovviamente più alti del campione a 15 minuti visto le differenti composizioni superficiali di partenza.

3 giorni

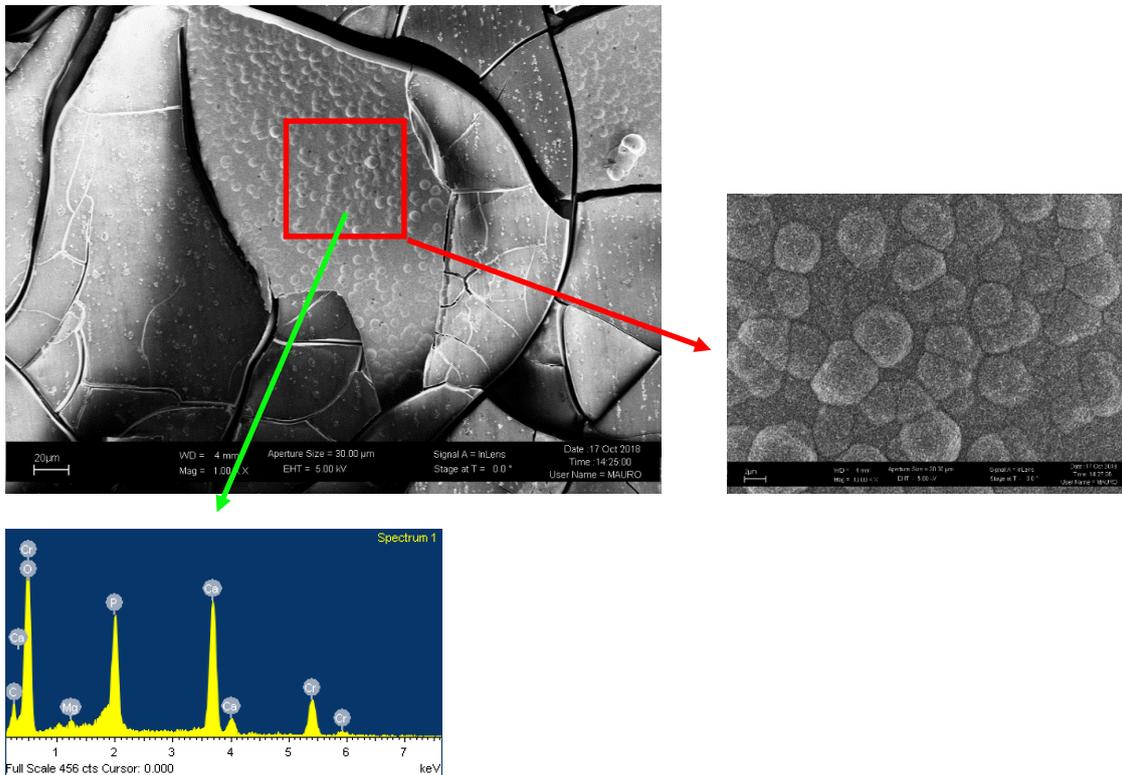


Figura 3.62 - Immagine FESEM con ingrandimento e relativa analisi EDS locale del campione SBA2-Ag - 15 minuti immerso in SBF per 3 giorni

La figura 3.59 mostra le immagini SEM ed il relativo spettro EDS locale ottenute dal campione SBA2-Ag – 0.03 M – 50 °C – 15 minuti immerso in SBF per 3 giorni. Si evidenzia la presenza di uno strato ricco in Ca e P distribuito su tutta la superficie con la tipica morfologia dell'idrossiapatite. Non si vedono picchi relativi all'argento.

Elemento	Weight%	STD	Atomic%	STD
Na	1,4	0,60	2,1	0,83
Mg	2,7	0,23	3,7	0,23
Si	26,3	8,27	30,7	9,04
P	24,9	2,11	26,6	3,00
Ca	44,7	6,68	37,0	6,61
Ag	0,0	0,00	0,0	0,00

Tabella 3.14 - Analisi EDS di area (media e STD) del campione SBA2 - Ag - 15 minuti immerso in SBF per 3 giorni

La tabella 3.14 mostra la media delle analisi quantitative effettuate. Si può notare, coerentemente con quanto atteso un aumento dei valori di Ca e P se confrontati con i valori rilevati dopo 1 giorno. Analogamente si osserva una diminuzione dei valori del sodio, che viene lentamente rilasciato in soluzione. L'argento risulta totalmente assente in superficie.

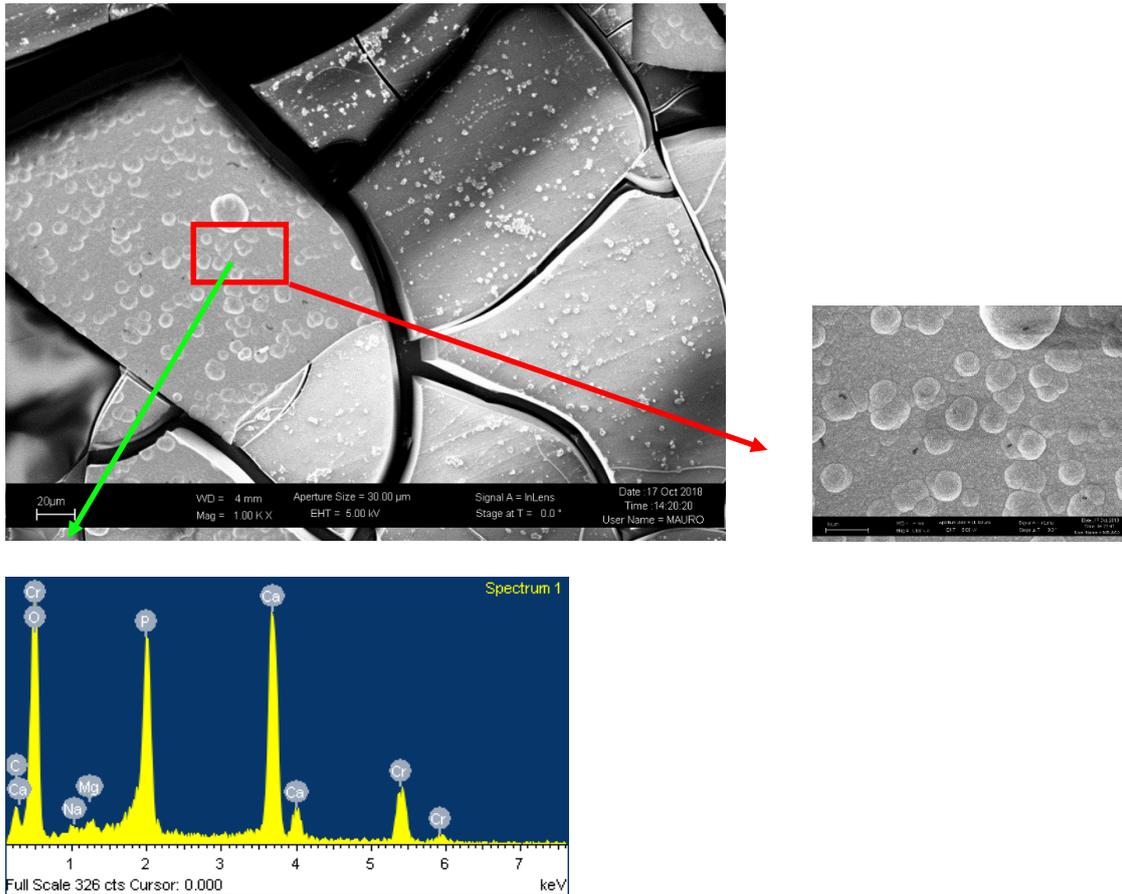


Figura 3.63 - Immagine FESEM con ingrandimento e relativa analisi EDS locale del campione SBA2-Ag - 1 ora immerso in SBF per 3 giorni

La figura 3.60 mostra le immagini SEM ed il relativo spettro EDS locale ottenute dal campione SBA2-Ag – 0.03 M – 50 °C – 1 ora immerso in SBF per 3 giorni. Si evidenzia la presenza di uno strato ricco in Ca e P distribuito su tutta la superficie con la tipica morfologia dell'idrossiapatite. Non si notano picchi appartenenti all'argento.

Elemento	Weight%	STD	Atomic%	STD
Na	1,3	0,39	1,9	0,53
Mg	2,0	0,30	2,8	0,39
Si	29,0	2,66	34,3	2,74
P	22,0	1,20	23,6	1,58
Ca	45,0	1,73	37,3	1,88
Ag	0,5	0,50	0,2	0,15

Tabella 3.15 - Analisi EDS di area (media e STD) del campione SBA2 - Ag - 1 ora immerso in SBF per 3 giorni

La tabella 3.15 mostra la media delle analisi quantitative effettuate. Si può notare, come già osservato per il campione a 15 minuti, un aumento dei valori di Ca e P se confrontati con i valori rilevati dopo 1 giorno. Analogamente si osserva una diminuzione dei valori del sodio, che viene lentamente rilasciato in soluzione. I valori dell'argento oscillano poco sopra lo zero.

7 giorni

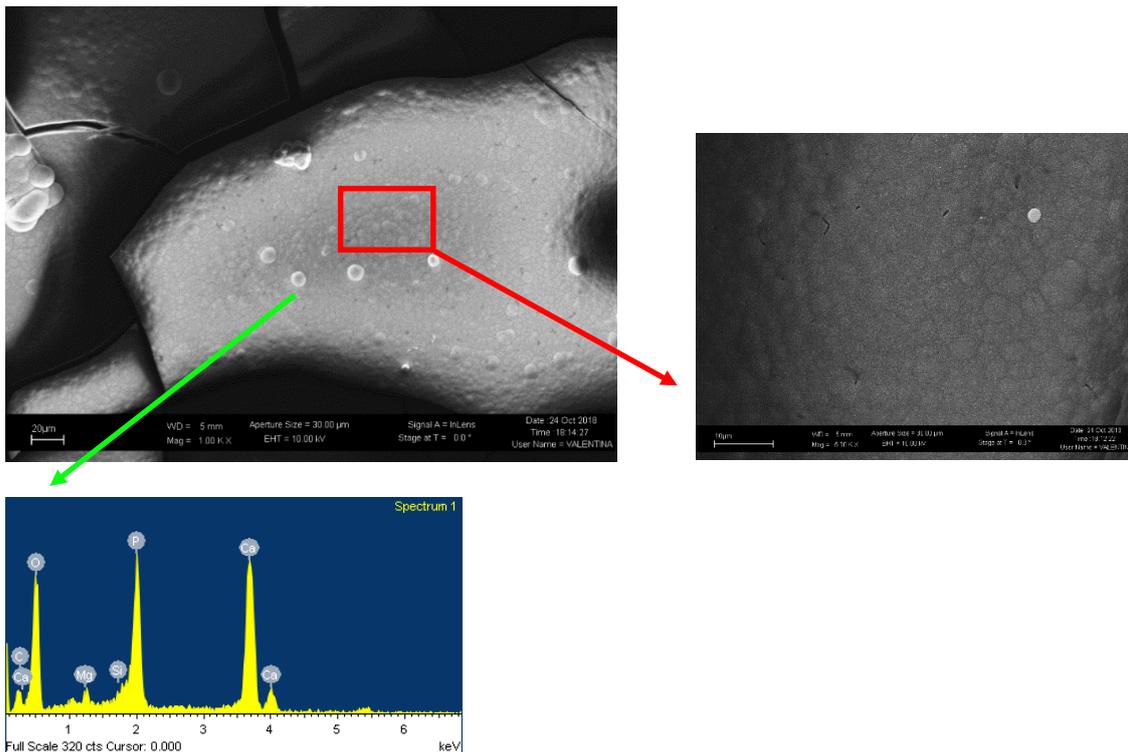


Figura 3.64 - Immagine FESEM con ingrandimento e relativa analisi EDS locale del campione SBA2-Ag - 15 minuti immerso in SBF per 7 giorni

1 mostra le immagini SEM ed il relativo spettro EDS locale ottenute dal campione SBA2-Ag – 0.03 M – 50 °C – 15 minuti immerso in SBF per 7 giorni. Si evidenzia la presenza di uno strato ricco in Ca e P distribuito su tutta la superficie con la tipica morfologia dell'idrossiapatite. Non si notano picchi appartenenti all'argento.

Elemento	Weight%	STD	Atomic%	STD
Na	1,8	0,45	2,8	0,71
Si	1,1	0,47	1,4	0,60
P	29,3	0,56	34,4	0,66
Ca	67,5	1,84	61,3	1,68
Ag	0,4	0,75	0,1	0,25

Tabella 3.16 - Analisi EDS di area (media e STD) del campione SBA2 - Ag - 15 minuti immerso in SBF per 7 giorni

La tabella 3.16 mostra la media delle analisi quantitative effettuate. Si può notare un ulteriore incremento dei valori di Ca e P se confrontati con i valori rilevati dopo 3 giorni. Analogamente si osserva lo stabilizzarsi dei valori del sodio che qui assume valori confrontabili con la precedente rilevazione.

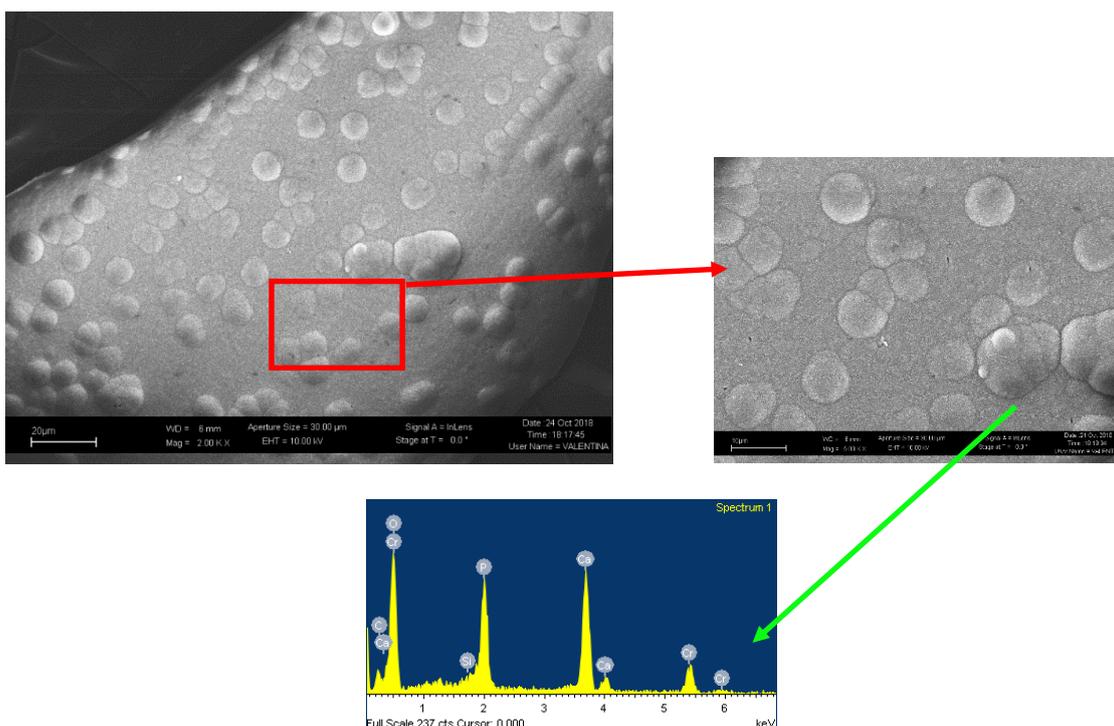


Figura 3.65 - Immagine FESEM con ingrandimento e relativa analisi EDS locale del campione SBA2-Ag - 1 ora immerso in SBF per 7 giorni

La figura 3.62 mostra le immagini SEM ed il relativo spettro EDS locale ottenute dal campione SBA2-Ag – 0.03 M – 50 °C – 1 ora immerso in SBF per 7 giorni. Si evidenzia la presenza di uno

strato ricco in Ca e P distribuito su tutta la superficie con la tipica morfologia dell'idrossiapatite. Non si notano picchi appartenenti all'argento.

Elemento	Weight%	STD	Atomic%	STD
Na	2,5	0,25	3,9	0,38
Si	0,3	0,49	0,4	0,63
P	29,9	0,02	34,9	0,10
Ca	67,3	0,76	60,7	0,91
Ag	0,0	0,00	0,0	0,00

Tabella 3.17 - Analisi EDS di area (media e STD) del campione SBA2 - Ag - 1 ora immerso in SBF per 7 giorni

La tabella 3.17 mostra la media delle analisi quantitative effettuate. Si può notare un ulteriore incremento dei valori di Ca e P se confrontati con i valori rilevati dopo 3 giorni. Si osserva inoltre un aumento dei valori del sodio che raggiunge (% atomica) il 3,9 %.

14 giorni

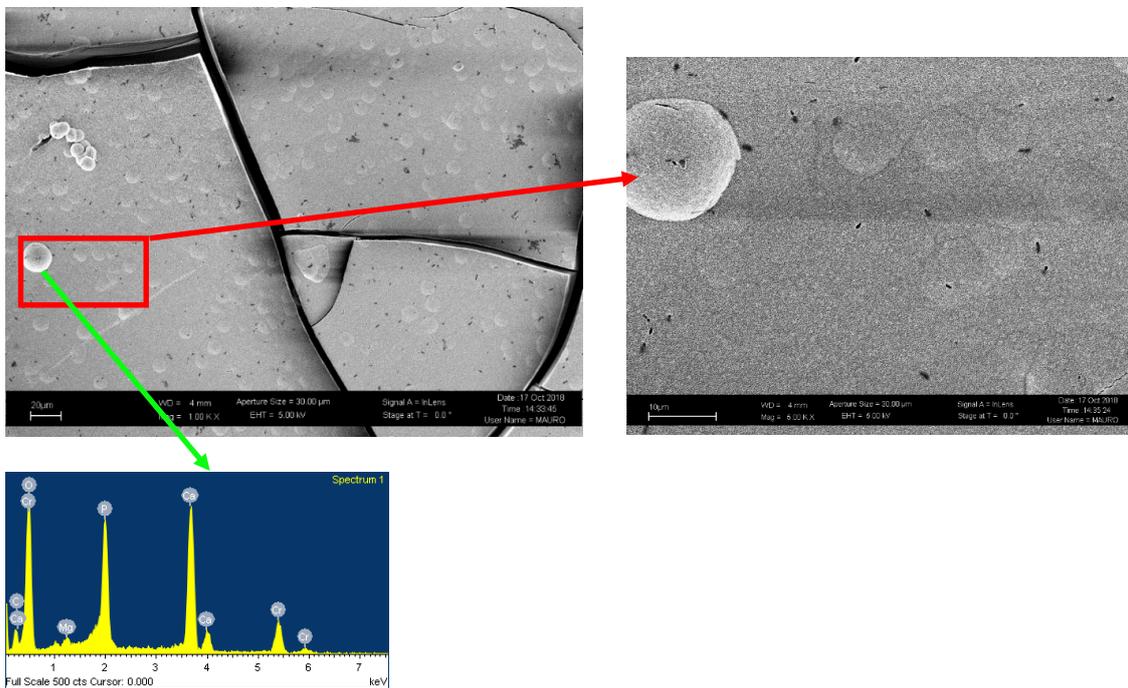


Figura 3.66 - Immagine FESEM con ingrandimento e relativa analisi EDS locale del campione SBA2-Ag - 15 minuti immerso in SBF per 14 giorni

La figura 3.63 mostra le immagini SEM ed il relativo spettro EDS locale ottenute dal campione SBA2-Ag – 0.03 M – 50 °C – 15 minuti immerso in SBF per 14 giorni. Si evidenzia la presenza di uno strato ricco in Ca e P distribuito su tutta la superficie con la tipica morfologia dell'idrossiapatite. Non si notano picchi appartenenti all'argento.

Elemento	Weight%	STD	Atomic%	STD
Na	1,6	0,15	2,4	0,23
Mg	2,0	0,42	2,9	0,62
Si	0,4	0,09	0,4	0,12
P	28,8	0,76	33,5	0,76
Ca	67,4	1,14	60,7	1,28
Ag	0,0	0,00	0,0	0,00

Tabella 3.18 - Analisi EDS di area (media e STD) del campione SBA2 - Ag - 15 minuti immerso in SBF per 14 giorni

L'analisi composizionale presente in tabella 3.18 evidenzia un elevato quantitativo di Ca e P, i valori sono confrontabili con quelli misurati a 7 giorni. La presenza di Mg, che spesso sostituisce parzialmente il Ca nell'idrossiapatite, mentre il Na risulta leggermente calato rispetto alla precedente osservazione assestandosi intorno al 2,4 %. Non sono presenti tracce trascurabili di argento.

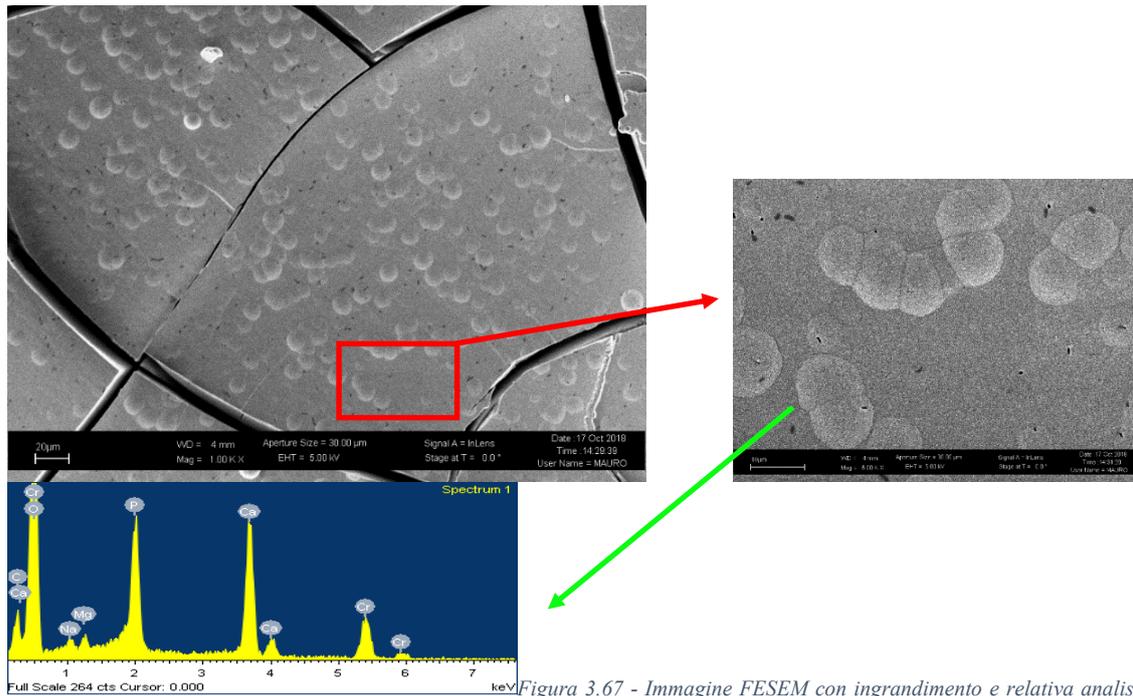


Figura 3.67 - Immagine FESEM con ingrandimento e relativa analisi EDS locale del campione SBA2-Ag - 1 ora immerso in SBF per 14 giorni

La figura 3.69 mostra le immagini SEM ed il relativo spettro EDS locale ottenute dal campione SBA2-Ag – 0.03 M – 50 °C – 1 ora immerso in SBF per 14 giorni. Si evidenzia la presenza di uno strato ricco in Ca e P distribuito su tutta la superficie con la tipica morfologia dell'idrossiapatite. Non si notano picchi appartenenti all'argento.

Elemento	Weight%	STD	Atomic%	STD
Na	1,5	0,31	2,4	0,47
Mg	2,0	0,46	3,0	0,67
Si	0,6	0,29	0,8	0,36
P	30,1	0,35	34,9	0,45
Ca	65,5	0,97	58,8	0,95
Ag	0,2	0,40	0,1	0,13

Tabella 3.19 - Analisi EDS di area (media e STD) del campione SBA2 - Ag - 1 ora immerso in SBF per 14 giorni

L'analisi composizionale evidenzia un elevato quantitativo di Ca e P, confrontabili con i dati ricavati dalla precedente rilevazione la presenza di Mg, che spesso sostituisce parzialmente il Ca

nell'idrossiapatite, mentre il Na risulta leggermente calato rispetto alla precedente osservazione assestandosi intorno al 2,4 %. Sono presenti tracce trascurabili di argento.

Tutti i campioni considerati mostrano quindi la presenza di idrossiapatite sulla superficie; nei dati ricavati dalle analisi EDS si notano elevati quantitativi di Ca e P. La presenza delle nanoparticelle di Ag non modifica quindi la capacità del vetro di indurre la precipitazione di idrossiapatite.

In particolare riveste un ruolo importante il rapporto calcio/fosforo⁴⁰, questo rapporto, che nell'idrossiapatite naturale è pari a 1.7, assume valori leggermente più alti nel caso di idrossiapatite formata in vitro. Il rapporto calcio/fosforo regola le proprietà meccaniche dell'apatite, è quindi importante ottenere valori comparabili a quelli dell'apatite naturale per mantenere inalterate le proprietà meccaniche dell'apatite. Nelle tabelle seguenti (3.20 – 3.21) sono riportati i valori del rapporto calcio/fosforo per i campioni considerati:

1 h	1 giorno	3 giorni	7 giorni	14 giorni
Ca/P	1,55	1,57	1,74	1,68

Tabella 3.20 - Rapporto Ca/P per i campioni trattati per 1 ora

15 minuti	1 giorno	3 giorni	7 giorni	14 giorni
Ca/P	1,96	1,39	1,78	1,81

Tabella 3.21 - Rapporto Ca/P per i campioni trattati per 15 minuti

I valori registrati non differiscono molto da quelli dell'idrossiapatite fisiologica.

Le figure 3.68 - 3.69 evidenziano gli andamenti di sodio, calcio e fosforo durante i 14 giorni di immersione in SBF.

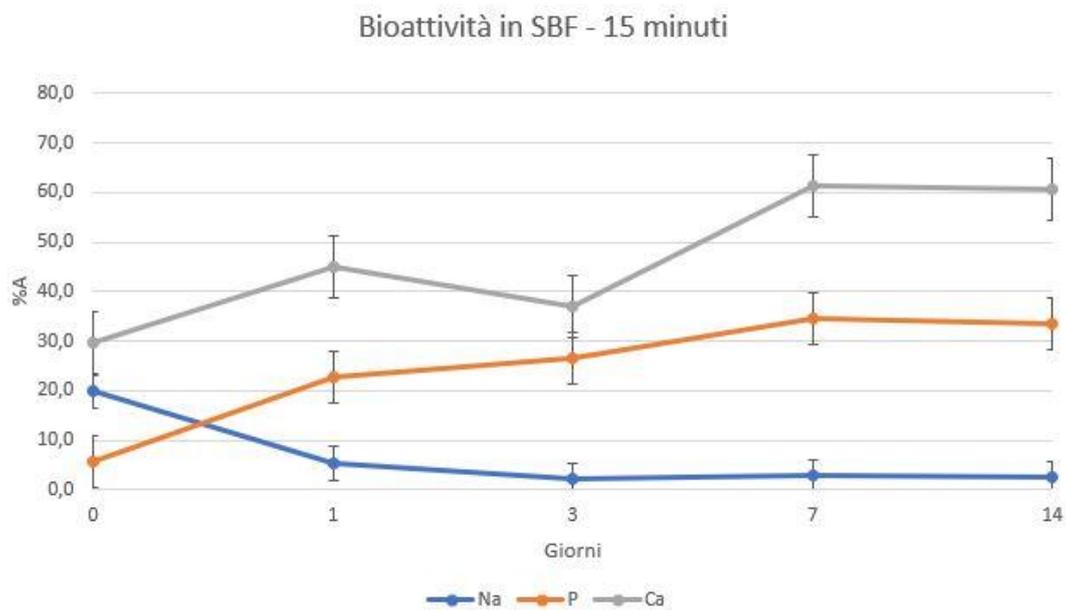


Figura 3.68 - Bioattività in SBF: andamento di sodio, calcio e fosforo per i campioni a 15 minuti

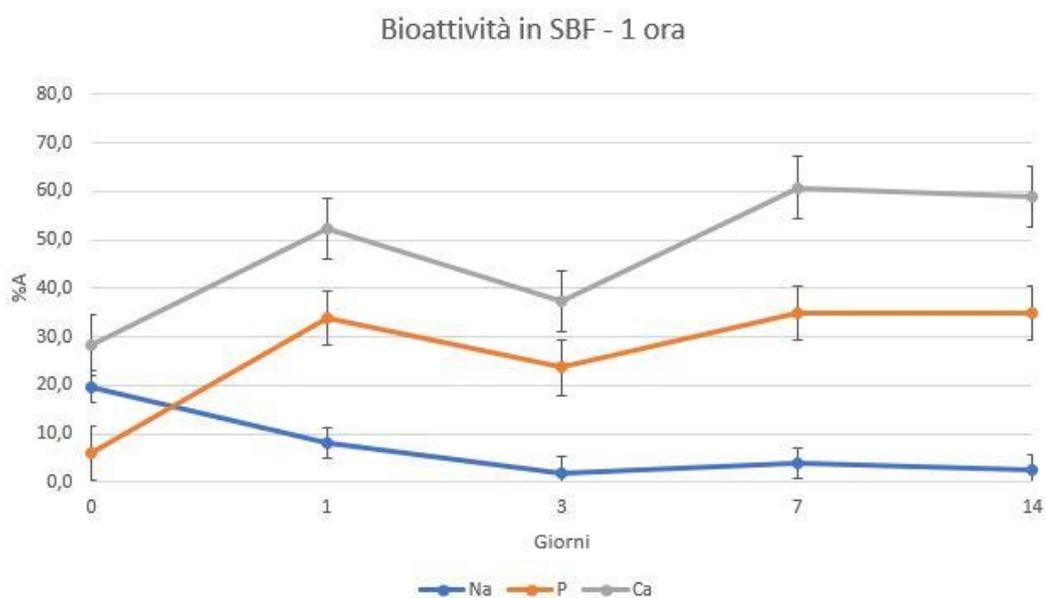


Figura 3.69 - Bioattività in SBF: andamento di sodio, calcio e fosforo per i campioni a 1 ora

Possiamo notare come i grafici, per entrambi i tempi considerati, mostrano un andamento simile. Il tempo 0 indica i valori (% atomiche) di sodio, calcio e fosforo rilevati sul campione prima dell'immersione in SBF mentre i valori successivi indicano i valori registrati dalle analisi EDS al

termine delle prove di bioattività. Per quanto riguarda il sodio si nota un andamento decrescente dei valori dovuto al rilascio ionico da parte del vetro secondo il meccanismo di bioattività proposto. I valori di calcio e fosforo invece tendono ad aumentare con il passare del tempo, in maniera consona a quanto atteso, confermando la precipitazione di fosfati di calcio sulla superficie dei campioni.

3.5.1 Analisi a raggi X – post SBF

I campioni immersi in SBF sono stati analizzati anche tramite analisi XRD con il fine di ricercare i picchi dovuti all'idrossiapatite per monitorarne l'evoluzione. Di seguito sono presentati i risultati di tali analisi.

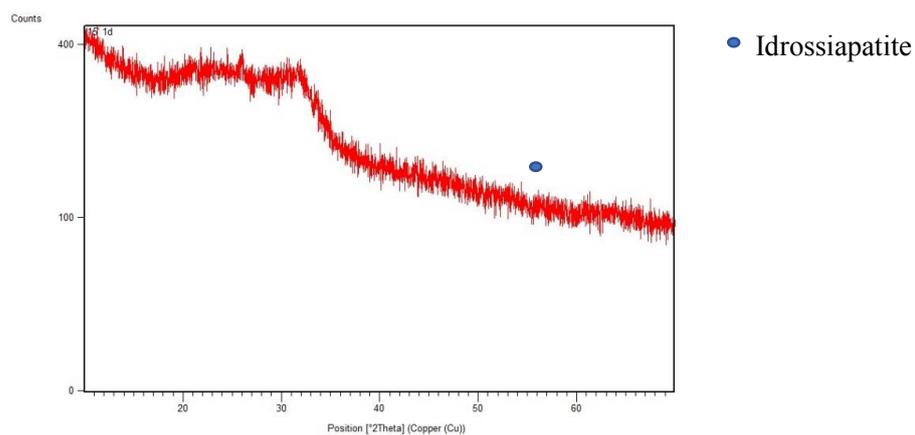


Figura 3.70 - Analisi XRD dei campioni SBA2- Ag - 0,03 M - 50 °C - 15 minuti immersi in SBF per 1 giorno

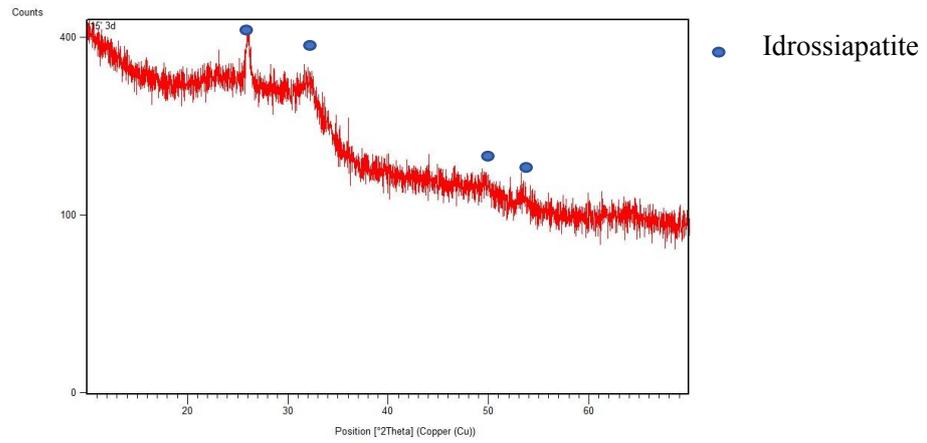


Figura 3.31 - Analisi XRD dei campioni SBA2- Ag - 0,03 M - 50 °C - 15 minuti immersi in SBF per 3 giorni

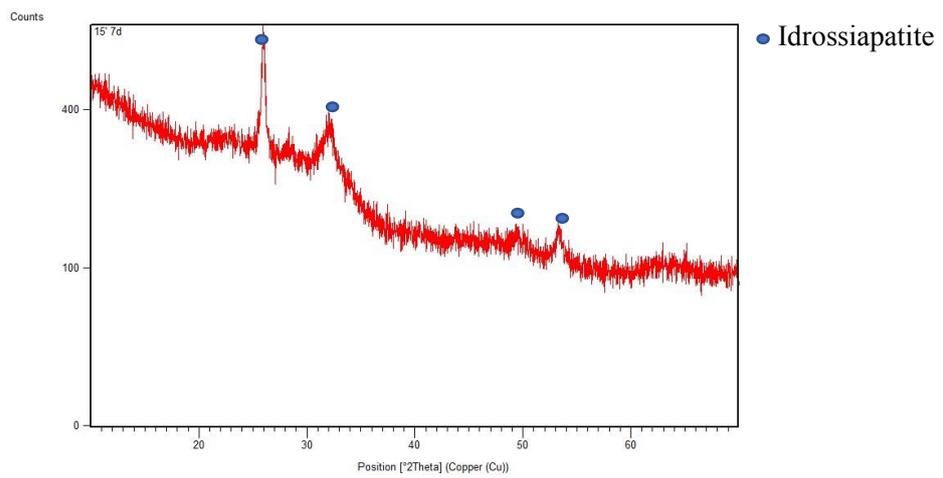


Figura 3.72 - Analisi XRD dei campioni SBA2- Ag - 0,03 M - 50 °C - 15 minuti immersi in SBF per 7 giorni

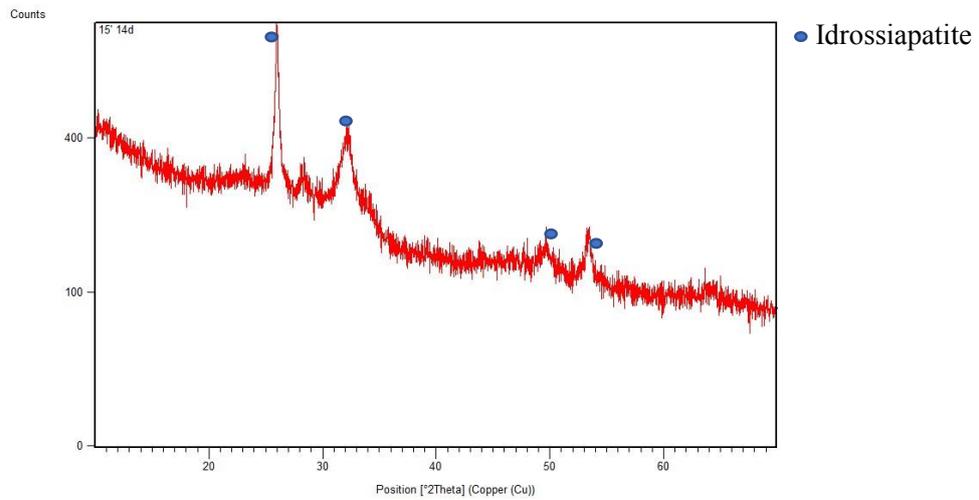


Figura 3.73 - Analisi XRD dei campioni SBA2- Ag - 0,03 M - 50 °C - 15 minuti immersi in SBF per 14 giorni

Osservando le immagini 3.67 – 3.70 si nota la presenza dei picchi caratteristici dell'idrossiapatite (26.2°, 32.1°, 49.6°, 53.6°) che evolvono aumentando di intensità con il progredire del tempo di immersione in SBF. Analizzando tali picchi si nota che essi corrispondono con quelli dell'idrossiapatite cristallina, confermando quanto precedentemente osservato dalle immagini FESEM.

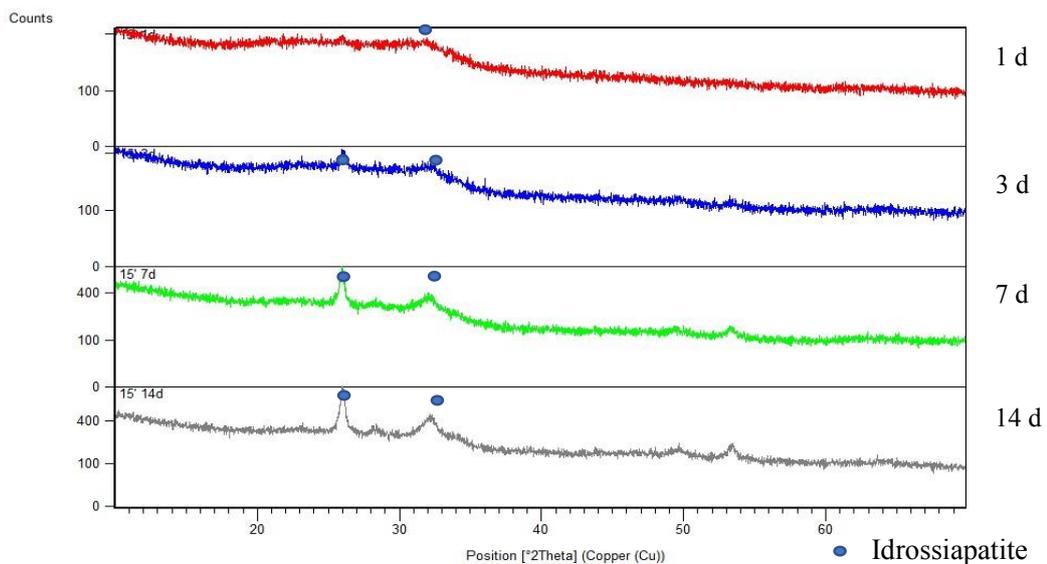


Figura 3.74- Analisi XRD dei campioni SBA2- Ag - 0,03 M - 50 °C – 15 minuti: evoluzione dello spettro in funzione del tempo di immersione in SBF

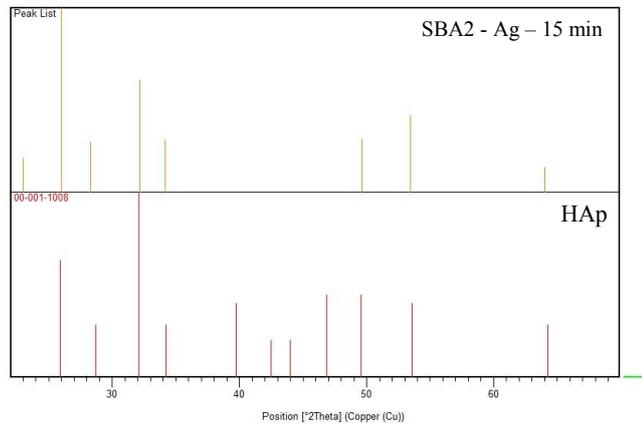


Figura 3.75 - Picchi presenti nello spettro XRD: confronto con i picchi dell'idrossiapatite cristallina

In maniera analoga le stesse analisi sono condotte sui campioni trattati per un'ora

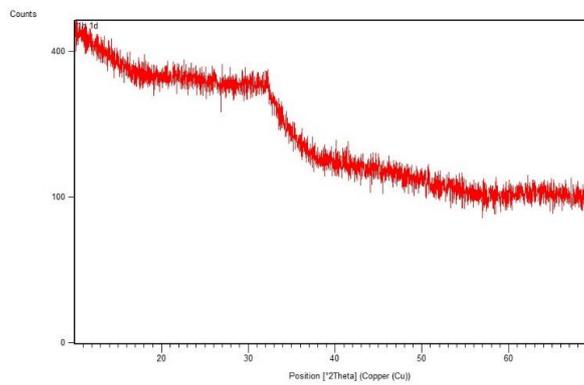


Figura 3.76 - Analisi XRD dei campioni SBA2- Ag - 0,03 M - 50 °C - 1 ora immersi in SBF per 1 giorno

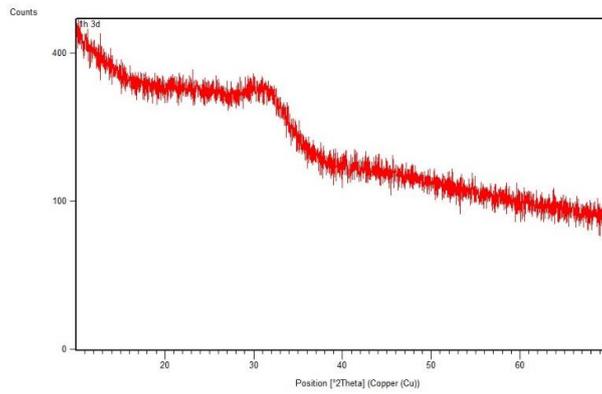


Figura 3.77 - Analisi XRD dei campioni SBA2- Ag - 0,03 M - 50 °C – 1 ora immersi in SBF per 3 giorni

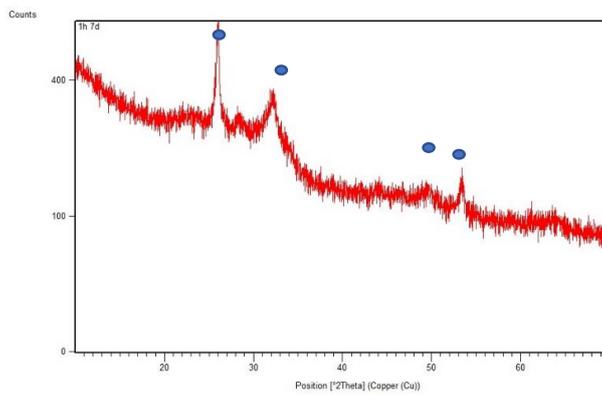


Figura 3.78 - Analisi XRD dei campioni SBA2- Ag - 0,03 M - 50 °C – 1 ora immersi in SBF per 7 giorni

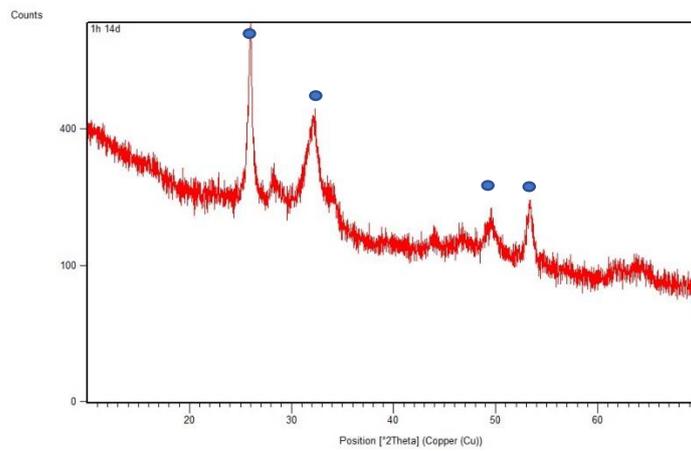


Figura 3.79 - Analisi XRD dei campioni SBA2- Ag - 0,03 M - 50 °C – 1 ora immersi in SBF per 14 giorni

Anche in questo caso gli spettri risultanti (figure 3.73 – 3.76) mostrano alcuni picchi caratteristici che corrispondono con quelli dell'idrossiapatite cristallina; si evidenzia inoltre nuovamente un aumento dell'intensità degli stessi con il passare del tempo di immersione in SBF.

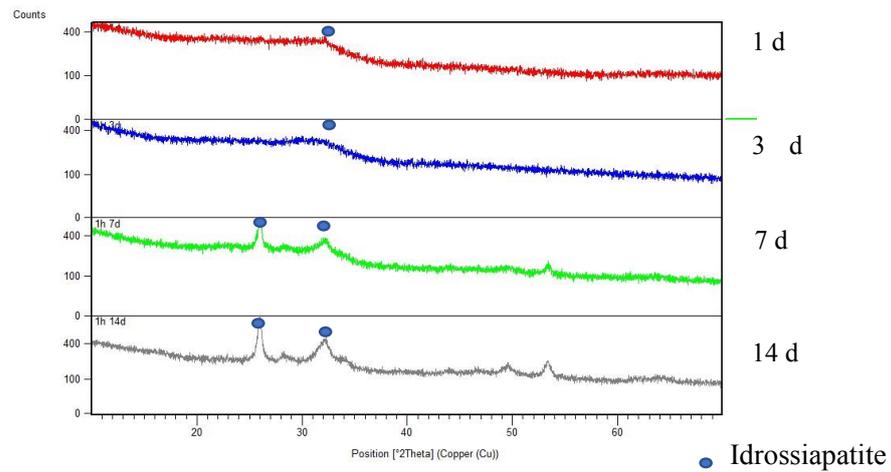


Figura 3.80- Analisi XRD dei campioni SBA2- Ag - 0,03 M - 50 °C - 1 ora: evoluzione dello spettro in funzione del tempo di immersione in SBF

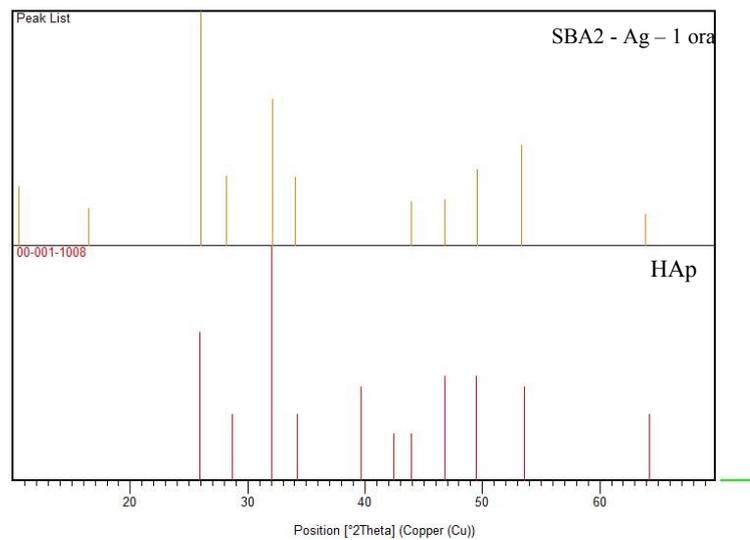


Figura 3.81 - Picchi presenti nello spettro XRD: confronto con quelli dell'idrossiapatite cristallina.

3.6 Considerazioni e conclusioni finali

Possiamo riassumere quanto emerso dalle analisi effettuate.

Le immagini FESEM mostrano la presenza di micro-nanoparticelle di Ag su tutti i campioni considerati formati in seguito al trattamento con il PVA. Le analisi EDS considerate ci permettono di osservare come il tempo di reazione e la temperatura a cui avviene la reazione rappresentino i parametri che vanno controllati accuratamente per regolare il processo: aumentando temperatura e tempo di reazione, infatti, si nota un aumento delle dimensioni delle particelle e della concentrazione di argento in superficie.

Tramite i risultati delle analisi UV-vis abbiamo compreso il ruolo attivo dello SBA2 nel promuovere la riduzione delle nanoparticelle: non si osservano infatti nanoparticelle d'argento disperse in soluzione in assenza del campione di vetro. Le nanoparticelle d'argento risultano inoltre adsorbite alla superficie del vetro bioattivo come dimostrato dalle analisi XRD condotte con angoli di incidenza radenti e come si può ipotizzare dall'osservazione degli spettri UV-vis dove, nelle prove in presenza del campione di SBA2-Ag, non si osservano nanoparticelle disperse in soluzione.

Per quanto riguarda i test di bioattività, tutti i campioni considerati mostrano la formazione di uno strato di idrossiapatite già dopo il primo giorno di immersione in SBF; le analisi XRD mostrano i picchi corrispondenti a quelli dell'idrossiapatite cristallina e che tali picchi aumentano di intensità con il passare del tempo. Possiamo quindi concludere che la presenza dell'argento non modifica la bioattività dello SBA2.

Possiamo concludere affermando che la strategia scelta in questo lavoro di tesi sembra poter rappresentare una soluzione promettente per ridurre nanoparticelle di argento in modo selettivo sulla superficie di un vetro bioattivo a base silice, con lo scopo di conferire un comportamento antibatterico; sono in corso i test di citocompatibilità ed antibattericità i cui risultati permetteranno di valutare se la quantità di argento presente sui campioni sia adatta all'applicazione *in vivo* e sia in grado di combattere efficacemente la carica batterica.

Bibliografia

1. Maathuis PGM, Bulstra SK, van der Mei HC, van Horn JR, Busscher HJ. Biomaterial-associated surgery and infection - a review of the literature. *Biomater Mod Med Groningen Perspect.* 2008;119-138. doi:10.1142/9789812709578_0007
2. SAGITHA P, SARADA K, MURALEEDHARAN K. One-pot synthesis of poly vinyl alcohol (PVA) supported silver nanoparticles and its efficiency in catalytic reduction of methylene blue. *Trans Nonferrous Met Soc China (English Ed.* 2016;26(10):2693-2700. doi:10.1016/S1003-6326(16)64397-2
3. Verné E. 10 - Materiali per la Bioingegneria - Vetri bioattivi. 2017.
4. Clement JL, Jarrett PS. Antibacterial Silver. 1869;(13):467-482. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2364932/pdf/MBD-01-467.pdf>.
5. Verné E. 1- Materiali per la Bioingegneria - Proprietà biologiche 1. 2017.
6. Verné E. 2- Materiali per la Bioingegneria - Proprietà biologiche 2. 2017.
7. Enciclopedia Treccani.
8. Baldi G. Corso di scienza e tecnologia dei vetri. http://spazioinwind.libero.it/giovann_baldi/.
9. W.Smith JH. *Scienza e Tecnologia Dei Materiali.*; 2012.
10. Santo LD. Sviluppi recenti di rafforzamento del vetro attraverso scambio ionico. *Tesi di Laurea Trienn Ing Mecc e Meccatronica.*
11. Vetreria Murano Arte s.r.l.
12. No Title. <https://ceramics.org/ceramic-tech-today/biomaterials/hench-to-receive-toledo-glass-ceramic-award>.
13. Baino F, Hamzehlou S, Kargozar S. Bioactive Glasses: Where Are We and Where Are We Going? *J Funct Biomater.* 2018;9(1):25.
14. Řehořek L, Chlup Z, Meng D, Yunos DM, Boccaccini AR, Dlouhý I. Response of 45S5 Bioglass® foams to tensile loading. *Ceram Int.* 2013;39(7):8015-8020.

15. Mouriño V, Cattalini JP, Boccaccini AR. Metallic ions as therapeutic agents in tissue engineering scaffolds: An overview of their biological applications and strategies for new developments. *J R Soc Interface*. 2012;9(68):401-419.
16. Verne E, Ferraris S, Miola M, et al. Synthesis and characterisation of bioactive and antibacterial glass-ceramic Part 2-plasma spray coatings on metallic substrates. *Adv Appl Ceram*. 2008;107(5):245-253.
17. Feng QL, Wu J, Chen GQ, Cui FZ, Kim TN, Kim JO. A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on Escherichia coli and Staphylococcus aureus. *J Biomed Mater Res*. 2000;52(4):662-668.
18. Ferraris S, Miola M, Cochis A, et al. In situ reduction of antibacterial silver ions to metallic silver nanoparticles on bioactive glasses functionalized with polyphenols. *Appl Surf Sci*. 2017;396:461-470.
19. Konop M, Damps T, Misicka A, Rudnicka L. Certain Aspects of Silver and Silver Nanoparticles in Wound Care : A Minireview. 2016;2016.
20. Rai M, Yadav A, Gade A. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnol Adv*. 2009;27(1):76-83. doi:10.1016/j.biotechadv.2008.09.002
21. Kim JS, Kuk E, Yu KN, et al. Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med*. 2007;3(1):95-101.
22. El-Zahry MR, Mahmoud A, Refaat IH, Mohamed HA, Bohlmann H, Lendl B. Antibacterial effect of various shapes of silver nanoparticles monitored by SERS. *Talanta*. 2015;138:183-189. doi:10.1016/j.talanta.2015.02.022
23. Dakal TC, Kumar A, Majumdar RS, Yadav V. Mechanistic basis of antimicrobial actions of silver nanoparticles. *Front Microbiol*. 2016;7(NOV):1-17.
24. Verné E, Miola M, Vitale Brovarone C, et al. Surface silver-doping of biocompatible glass to induce antibacterial properties. Part I: Massive glass. *J Mater Sci Mater Med*. 2009;20(3):733-740.
25. Verné E, Di Nunzio S, Bosetti M, et al. Surface characterization of silver-doped bioactive glass. *Biomaterials*. 2005;26(25):5111-5119.
26. Wilkinson HN, Iveson S, Catherall P, Hardman MJ. A novel silver bioactive glass elicits antimicrobial efficacy against Pseudomonas aeruginosa and Staphylococcus aureus in an ex

- vivo skin wound biofilm model. *Front Microbiol.* 2018;9(JUL):1-16.
27. Chen Y, Karvonen L, Säynätjoki A, Ye C, Tervonen A, Honkanen S. Ag nanoparticles embedded in glass by two-step ion exchange and their SERS application. *Opt Mater Express.* 2011;1(2):164.
 28. Wang L, Hu C, Shao L. The antimicrobial activity of nanoparticles: present situation and prospects for the future. *Int J Nanomedicine.* 2017;12:1227-1249.
 29. Taglietti A, Arciola CR, D'Agostino A, et al. Antibiofilm activity of a monolayer of silver nanoparticles anchored to an amino-silanized glass surface. *Biomaterials.* 2014;35(6):1779-1788.
 30. Muppalaneni srinath. Polyvinyl Alcohol in Medicine and Pharmacy: A Perspective. *J Dev Drugs.* 2013;02(03):1-5.
 31. To PS. Chapter 7: Basics of X-ray Diffraction. *Solutions.* 1999:1-25. <http://epswww.unm.edu/xrd/xrdbasics.pdf>.
 32. Ottica M. La cristallografia a raggi-X.
 33. Dutta P. GRAZING INCIDENCE X-RAY DIFFRACTION Dutta, P. Dept. of Physics & Astronomy, Northwestern University, Evanston, IL 60208-3112 USA. :1-21. <http://vader.phys.northwestern.edu/currsci.pdf>.
 34. Billah A. INVESTIGATION OF MULTIFERROIC AND PHOTOCATALYTIC PROPERTIES OF Li DOPED BiFeO₃ NANOPARTICLES By. 2017;(July):1-131.
 35. Reddy S lakshmi, Endo T, Simones G silv. reddy claudia. Basic UV / Visible Spectrophotometry. *Protocol.* 2012:6.
 36. Savelli F, Bruno O. Spettroscopia UV-Visibile. *Anal Chim Farm.* 2005;(1994):261-279.
 37. Metodi spettroscopici I metodi spettroscopici sono tecniche sperimentali basate sull'interazione tra energia e materia per la determinazione di Metodi spettroscopici.
 38. Kokubo T, Takadama H. How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity? *Biomaterials.* 2006;27(15):2907-2915.
 39. Haas HC, Husek H, Taylor LD. the Ultraviolet Absorption Spectrum of Polyvinyl Alcohol. *J Polym Sci Part a.* 1963;1:1215-1226.
 40. Ramesh S, Tan CY, Hamdi M, Sopyan I, Teng WD. The influence of Ca/P ratio on the

properties of hydroxyapatite bioceramics. 2007;6423(03):64233A.

Ringraziamenti

Vorrei ringraziare tutto il DISAT: la prof. Vernè che mi ha permesso di fare la tesi in dipartimento, Marta che mi ha aiutato e seguito fino alla fine di questo lavoro e tutti quelli che lavorano nei laboratori di biomateriali, senza i loro preziosi consigli non sarei mai riuscito a fare tutto quanto.

Ringrazio la mia splendida famiglia che mi ha supportato (e sopportato) pazientemente in questi anni di studio, credendo sempre in me e spronandomi a non mollare mai. Fonte di sostegno e di coraggio, i miei genitori mi hanno trasmesso la passione per lo studio e la voglia di raggiungere questo traguardo. Senza mia madre e mio padre, non avrei avuto la possibilità di studiare e di scrivere questo elaborato.

Un ringraziamento speciale va ai miei amici Riccardo, Marco e Paolo: nonostante le distanze e gli impegni siamo sempre riusciti a trovarci per passare un po' di tempo insieme con una birra in compagnia davanti alla partita, un calcetto organizzato all'ultimo secondo o anche semplicemente per un caffè. Siete stati veramente fantastici ed avete reso indimenticabili i momenti di pausa dallo studio passati insieme.

Ringrazio Valeria, che mi ha sopportato durante tutto il tempo, aiutandomi nei momenti difficili e ascoltando pazientemente i miei sfoghi: arrivare alla fine di questo percorso non è stato facile ma se ci sono riuscito il merito è anche un po' tuo.