
SCUOLA DI SCIENZE

Dipartimento di Chimica Industriale "Toso Montanari"

Corso di Laurea Magistrale in

Chimica Industriale

Classe LM-71 - Scienze e Tecnologie della Chimica Industriale

Nanoparticelle di platino supportate su idrossiapatite funzionalizzata

Tesi di laurea sperimentale

CANDIDATO

Viola ZAGONEL

RELATORE

Chiar.mo Prof. Maria Cristina CASSANI

CORRELATORE

Dott.ssa Elisa BOANINI

Anno Accademico 2016-2017

*A mio padre,
stella luminosa che illumina il mio cammino.*

SOMMARIO

CAPITOLO 1	9
Scopo della tesi	9
1. Introduzione	10
1.1 Calcio fosfati	11
1.1.1 L'idrossiapatite (HA)	14
1.2 Le nanoparticelle di platino	16
1.3 Polielettroliti	17
1.3.1 Polietilenimina (PEI)	18
1.3.2 Acido poliacrilico (PAA)	18
1.4 Tecniche di caratterizzazione	19
1.4.1 Diffrazione a raggi X (XRD)	19
1.4.2 Analisi di assorbimento atomico (AAS)	20
1.4.3 Microscopio a trasmissione elettronica (TEM)	21
1.4.4 Analisi termogravimetrica (TGA)	22
1.4.5 Il potenziale zeta (ζ)	23
1.6 Bibliografia	25
CAPITOLO 2	27
2. Nanoparticelle di platino supportate su HA e HA funzionalizzata con PEI	27
2.1 Risultati e discussione	28
2.1.1 Sintesi e caratterizzazione di HA e HA-PEI	28
2.1.2 Interazione Pt(II) con il substrato	31
2.1.3 Riduzione Pt(II) e formazione di nanoparticelle	37
2.1.4 Scale-up	42
2.1.5 Trattamento termico	43
2.1.6 Ulteriori prove	45
2.2 Parte sperimentale	47
2.2.1 Materiali	47
2.2.2 Strumentazione	47
2.2.3 Sintesi di HA e HA-PEI	48
2.2.4 Interazione Pt(II) con il substrato	49
2.2.5 Riduzione Pt(II) e formazione di nanoparticelle	51
2.2.6 Scale-up	51

2.2.7 Ulteriori prove	51
2.3 Conclusioni	52
CAPITOLO 3	57
3. Nanoparticelle di platino supportate su HA funzionalizzata con PAA	57
3.1 Risultati e discussione.....	58
3.1.1 Sintesi e caratterizzazione di HA-PAA.....	58
3.1.2 Interazione Pt(II) con il substrato	59
3.1.3 Riduzione Pt(II) e formazione nanoparticelle	62
3.1.4 Scale-up	63
3.2 Parte sperimentale	64
3.2.1 Materiali	64
3.2.2 Strumentazione	64
3.2.3 Sintesi di HA-PAA	64
3.2.4 Interazione Pt(II) con il substrato	65
3.2.5 Riduzione Pt(II) e formazione nanoparticelle	65
3.2.6 Scale-up	65
3.3 Conclusioni	66
CAPITOLO 4	69
4.1 Conclusioni	69
4.2 Sviluppi futuri	70

ABSTRACT

The purpose of this work is to synthesize a unique and clinically interesting material, used in the biomedical field as medical implants to repair and reconstruct damaged or diseased human hard tissues, such as bones or teeth. Hydroxyapatite ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, hereafter HA) is a calcium phosphate ceramic, which is chemically similar to bone mineral, and is widely used in medicine because of its biocompatibility and bioactivity properties. Hydroxyapatite is known for its capability to bind a wide variety of molecules or therapeutic agents such as proteins used in bone regeneration, drugs or ions. In this work, HA was synthesized and was studied the best method to support platinum nanoparticles on the surface (Pt_{NPs}); these metal nanoparticles have antitumor and antioxidant properties and for this reason they play an important role in chemotherapy. The goal of incorporating Pt_{NPs} into hydroxyapatite is to have a material that combines the bioactivity of HA with the antitumoral properties of metal nanoparticles. Several characterization methods were used, such as atomic absorption spectroscopy (AAS), thermogravimetric analysis (TGA), transmission electron microscopy (TEM), Zeta potential (ζ) and X-ray powder diffraction (XRD).

RIASSUNTO

L'idrossiapatite ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ o HA) è un materiale a base di calcio fosfato molto utilizzato in campo biomedico per sostituire o riparare ossa poiché la sua fase minerale è simile alla fase inorganica delle ossa e dei denti. Per questo motivo è un materiale biocompatibile che presenta caratteristiche bioattive e osteoinduttive. Le proprietà finali del materiale possono essere modificate supportando la superficie con diverse molecole, farmaci, proteine o ioni metallici. Queste molecole vengono rilasciate nel sito di impianto dell'HA favorendo la crescita ossea e stimolando specifiche risposte cellulari a livello molecolare grazie al rilascio delle molecole attive. In questo lavoro è stata sintetizzata l'HA tal quale e HA funzionalizzata con due diversi polielettroliti e successivamente è stato studiato il metodo migliore per supportare le nanoparticelle di platino sul substrato inorganico. Queste particelle metalliche donano al materiale delle proprietà antitumorali e antiossidanti che possono essere sfruttate in ambito biomedico per la lotta ai tumori ossei.

CAPITOLO 1

Scopo della tesi

Il lavoro sperimentale svolto presso il Dipartimento di Chimica “G. Ciamician” e il Dipartimento di Chimica Industriale “T. Montanari” ha avuto lo scopo di studiare e ottimizzare un metodo per supportare le nanoparticelle di platino (Pt_{NPs}) su idrossiapatite (HA) e HA funzionalizzata con polietilenimina e acido poliacrilico (abbreviati come PEI e PAA), due polielettroliti in grado di coordinare e stabilizzare le Pt_{NPs} sulla superficie dell'idrossiapatite, generando così un biomateriale in grado di rilasciare in maniera controllata nel sito di impianto del materiale, ioni metallici aventi proprietà antitumorali.

Come prima cosa è stata sintetizzata l'idrossiapatite e l'idrossiapatite funzionalizzata con il PEI e PAA (HA-PEI e HA-PAA), successivamente è stato studiato il metodo migliore per supportare il Pt(II) sulla superficie del substrato variando i seguenti parametri: il tempo di contatto con il substrato (1 h o 24 h o 48 h), il volume (5 ml o 2,5 ml o 0,5 ml), la concentrazione (0,01 M o 0,02 M) e il pH della soluzione di platino utilizzata (pH = 5 o pH = 10). Il materiale così ottenuto è stato sottoposto a riduzione con $NaBH_4$ in modo da generare le Pt_{NPs} .

Sia il materiale contenente gli ioni Pt(II) che quello contenente Pt_{NPs} sono stati caratterizzati con diverse tecniche complementari quali: diffrazione ai raggi X, analisi di assorbimento atomico, analisi termogravimetriche, caratterizzazione mediante microscopia TEM e del potenziale zeta.

1. Introduzione

Una delle aree di ricerca più interessanti e studiate della scienza dei materiali coinvolge molte applicazioni riguardanti la salute e la cura del corpo umano. Esempi di questo sono suture, cateteri, valvole cardiache, pacemaker, protesi mammarie, chiodi e viti utilizzati in ortopedia, materiali di riempimento dentale, nonché protesi per la sostituzione di tendini e legamenti o per riparare le ossa. Inoltre, negli ultimi decenni, l'invecchiamento della popolazione e l'aumento degli sport ad alto rischio, hanno portato ad un aumento delle malattie e delle fratture ossee, che devono essere trattate. Tuttavia, per essere accettati dall'organismo, questi impianti devono appartenere a una specifica classe di materiali, chiamati materiali biomedici o biomateriali.

In generale, i biomateriali sono divisi in quattro grandi gruppi: i biometalli (oro, titanio...), i biopolimeri (poliesteri), le bioceramiche e i biocompositi. Tutti questi materiali giocano un ruolo molto importante nella sostituzione e rigenerazione dei tessuti umani danneggiati.¹ Sono state date numerose definizioni al termine "biomateriale"; una di queste viene data dal dizionario di Williams sui biomateriali del 1999 secondo il quale un biomateriale è "*un materiale destinato ad interfacciarsi con sistemi biologici per valutare, trattare, aumentare o sostituire qualsiasi tessuto, organo o funzione del corpo*".² In ogni caso, un biomateriale è un materiale sintetico o naturale utilizzato per sostituire parti di un sistema vivente e per funzionare in intimo contatto con i tessuti vivi. La maggiore differenza tra un biomateriale e gli altri materiali è data dall'abilità dei biomateriali di rimanere in contatto con un ambiente biologico senza danneggiare i tessuti circostanti e senza danneggiarsi.¹

Il lavoro di tesi presentato si è focalizzato sulla sintesi e caratterizzazione di uno specifico tipo di biomateriale e più precisamente una bioceramica a base di calcio fosfato, ovvero l'idrossiapatite o HA con nanoparticelle di platino supportate sulla superficie.

Nel gruppo di ricerca in cui ho svolto il mio lavoro di tesi in passato è stato messo a punto un metodo semplice e a basso costo per funzionalizzare l'idrossiapatite con nanoparticelle metalliche aventi proprietà antibatteriche. Come mostrato in *Figura 1*, il metodo prevede l'utilizzo di PEI come agente riducente e stabilizzante delle Ag_{NPs} supportate su HA funzionalizzata con PAA. Il ruolo della PAA è quello di aumentare la carica negativa sulla HA e quindi favorire l'attrazione elettrostatica per l'Ag_{NPs}.³

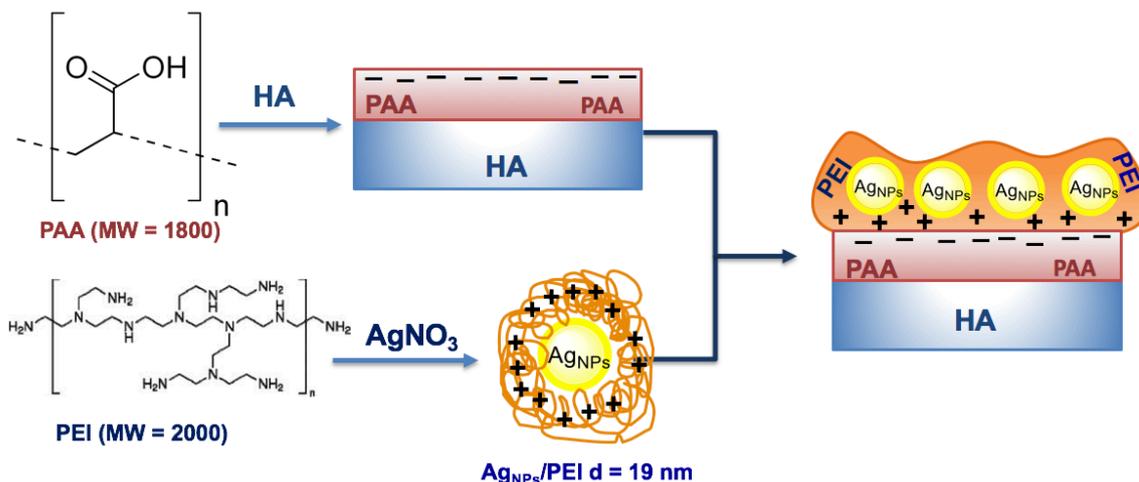


Figura 1 Schema di sintesi di HA-PAA con AgNPs.

Un altro studio è stato condotto sempre su HA che è stata funzionalizzata con una molecola caratterizzata da proprietà antitumorali, l'acido 9R-idrossistearico (9R-HSA) (Figura 2) prodotto dai semi del fiore *Dimorphotheca sinuata*. Questo acido regola la proliferazione delle cellule tumorali causando interferenze nel meccanismo della divisione cellulare. Lo scopo è quello di sintetizzare l'HA funzionalizzata generando così un materiale caratterizzato da proprietà antitumorali date da 9R-HSA.⁴

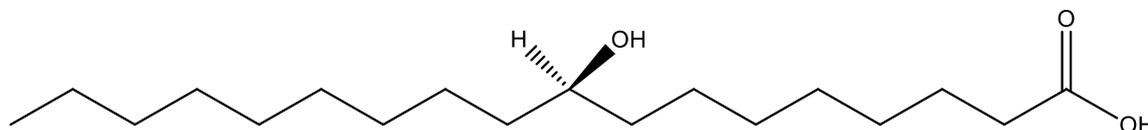


Figura 2 Acido 9R-idrossistearico (9R-HSA).

1.1 Calcio fosfati

I biomateriali a base di calcio fosfati sono classificati come delle bioceramiche e hanno diverse applicazioni in ambito ospedaliero. Le principali applicazioni biomediche attuali comprendono le sostituzioni di ginocchia, denti, tendini e legamenti, la ricostruzione maxillofaciale o vengono utilizzati come riempitivi delle ossa dopo la chirurgia tumorale. Altri studi esplorativi hanno dimostrato le potenziali applicazioni di questi materiali come *scaffold*, sistemi di rilascio controllato di farmaci, nonché trasportatori di fattori della crescita o vari tipi di cellule per scopi di ingegneria tissutale.

Grazie alla loro somiglianza chimica con la componente minerale delle ossa e denti, questi materiali sono ampiamente utilizzati come sostituti sintetici caratterizzati oltre che dalla non tossicità, anche dalla biocompatibilità e dalla bioattività. I calcio fosfati, essendo biocompatibili, non vengono riconosciuti dall'organismo come materiali estranei e per questo motivo non vengono rigettati dal corpo; presentando comportamenti bioattivi, vanno ad integrarsi con i tessuti viventi generando dei legami fisico-chimici tra le ossa e il materiale impiantato, determinando così l'osteointegrazione, ovvero l'incorporazione nel tessuto osseo vivente di un componente non vitale. D'altra parte i calcio fosfati sono conosciuti come materiali osteoconduttivi, in grado di favorire la crescita delle ossa agendo come supporti o *scaffold*, e come osteoinduttivi, materiali che hanno la capacità di stimolare le cellule preposte alla formazione dell'osso. Tuttavia le maggiori limitazioni nell'uso di questi materiali sono date dalle loro proprietà meccaniche, in quanto essi hanno una bassa resistenza meccanica e alta fragilità. Questo è dovuto al fatto che le caratteristiche di questi materiali dipendono dalla loro cristallinità, porosità e composizione. In generale, le proprietà meccaniche diminuiscono significativamente con l'aumentare del contenuto di fase amorfa, della microporosità e della dimensione dei grani, mentre l'alto grado di cristallinità, la bassa porosità e le piccole dimensioni dei grani portano ad una maggiore rigidità, maggiore forza e maggiore resistenza alla frattura.¹

Tutti i calcio fosfati, per definizione, sono costituiti da tre elementi chimici: il calcio (in stato di ossidazione +2), il fosforo (in stato di ossidazione +5) e l'ossigeno (in stato di ossidazione -2). Diverse combinazioni di ossidi di calcio e fosforo generano una grande varietà di calcio fosfati, che si distinguono grazie al tipo di ione fosfato: orto- (PO_4^{3-}), meta- (PO_3^-), pyro- ($\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$) e poli- ($(\text{PO}_3)_n^{n-}$).

I calcio fosfati più studiati sono gli ortofosfati, che sono poco solubili in acqua; tuttavia sono facilmente solubili in ambiente acido e insolubili in soluzioni alcaline.⁵ Il rapporto molare Ca/P e la solubilità sono valori utilizzati per distinguere i diversi ortofosfati di calcio come mostrato in *Tabella 1*.⁶

Tabella 1 Calcio fosfati, nome, abbreviazione, formula chimica, rapporto molare Ca/P e solubilità.

Nome	Abbreviazione	Formula chimica	Rapporto molare Ca/P	Solubilità a 37°C, -log (K _{ps})
Bruscite	DCPD	CaHPO ₄ ·2H ₂ O	1.00	6.73
Monetite	DCPA	CaHPO ₄	1.00	6,04
Ottacalcio fosfato	OCP	Ca ₈ (HPO ₄) ₂ (PO ₄) ₄ ·5H ₂ O	1.33	98.6
Calcio fosfato amorfo	ACP	Ca _x H _y (PO ₄) _z ·nH ₂ O	1.20-2.20	Non può essere misurato con precisione
α-tricalcio fosfato	α-TCP	α-Ca ₃ (PO ₄) ₂	1.50	28.5
β-tricalcio fosfato	β-TCP	β-Ca ₃ (PO ₄) ₂	1.50	29.6
Idrossiapatite	HA	Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ (OH) ₂	1.67	117.2
Fluoroapatite	FA	Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ F ₂	1.67	122.3

All'aumentare del rapporto Ca/P va ad aumentare la forza del materiale, fino ad un valore massimo riscontrato per valori di Ca/P ≈ 1.67 (relativo all'idrossiapatite stechiometrica), con una veloce diminuzione per rapporti di Ca/P > 1.67.¹

Tutte queste diverse forme di calcio fosfati appartengono alla famiglia di composti chiamati "apatiti". Questo termine descrive dei composti che hanno simile struttura chimica riconducibile ad un sistema esagonale, con gruppo spaziale di cella P6₃/m. I calcio fosfati sono stati ampiamente studiati e lo sono tuttora grazie alla loro biocompatibilità. L'idrossiapatite (HA) rimane il materiale bioceramico più studiato perché, oltre ad essere non tossico per l'organismo in cui viene impiantato, è anche biocompatibile e presenta caratteristiche bioattive.^{7,8}

1.1.1 L'idrossiapatite (HA)

L'idrossiapatite o HA è il biomateriale più utilizzato in campo biomedico per la preparazione di bioceramiche. Grazie alla sua natura chimica simile alla componente inorganica delle ossa e dei denti dona al materiale una buona biocompatibilità e delle proprietà bioattive con i tessuti vivi a contatto con il materiale, stimolando la rigenerazione del tessuto osseo. Per questo motivo, questo materiale ha suscitato notevole interesse nel corso degli ultimi decenni ed è diventato il materiale più importante e utilizzato per la costruzione di ossa artificiali o per la loro rigenerazione.⁹

La fase minerale inorganica che costituisce i tessuti calcificati, come ossa e denti, è un fosfato di calcio e può essere ricondotta alla struttura dell'idrossiapatite sintetica, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. Le apatiti biologiche differiscono dalla forma sintetica per diversi aspetti: infatti esse sono meno cristalline e meno stechiometriche, andando ad incorporare ioni estranei come Na^+ , K^+ etc..¹⁰

L'HA, oltre ad essere utilizzata per riparare o sostituire ossa, viene anche utilizzata come catalizzatore, in prodotti dell'industria farmaceutica o dei fertilizzanti, nei processi di trattamento dell'acqua ma anche come trasportatore di farmaci a rilascio controllato.^{11,12}

L'idrossiapatite cristallina appartiene alla famiglia delle calcio apatiti ($[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{X}_2]$, con $\text{X} = \text{OH}^-$, Cl^- o F^-) e presenta una struttura monoclina nel caso di HA stechiometriche mentre nel caso di HA non stechiometriche si ha una struttura esagonale.^{8,13} La forma più stabile risulta essere la fase monoclina (gruppo spaziale $P2_1/b$, parametri di cella $a = 9.4214$, $b = 2a$, $c = 6.8814$)¹⁴ nella quale file di ioni fosfato si trovano lungo l'asse a , con ioni calcio e idrossido localizzati tra i gruppi fosfato. Mentre la forma esagonale delle HA non stechiometriche (gruppo spaziale $P6_3/m$, parametri di cella $a = b = 9.4302$, $c = 6.8911$), forma trovata nelle apatiti biologiche, ha una struttura simile alla fase monoclina ma presenta delle colonne di ioni calcio e gruppi idrossido localizzati in canali paralleli. La sostituzione ionica può avvenire facilmente in questi canali: per questo motivo possono essere incorporati diversi sostituenti. Nell'HA esagonale, gli ioni idrossido sono più disordinati all'interno della colonna rispetto alla forma monoclina, puntando verso l'alto o verso il basso nella struttura. Questo favorisce la sostituzione di ioni o la mancanza degli stessi portando così a generare una HA che è raramente stechiometrica.⁶

La sostituzione di ioni estranei nel reticolo cristallino dei calcio fosfati e dell'idrossiapatite avviene frequentemente. Infatti l'alta stabilità e flessibilità della struttura delle apatiti permette una grande varietà di sostituzioni anioniche e cationiche. L'apatite può inglobare al posto degli ioni Ca^{2+} sia ioni bivalenti, come Sr^{2+} , Ba^{2+} , Cd^{2+} e Pb^{2+} che ioni monovalenti e trivalenti, come Na^+ , K^+ e Al^{3+} . Mentre ioni come VO_4^{3-} , AsO_4^{3-} , CO_3^{2-} e SiO_4^{4-} vanno a sostituirsi agli ioni PO_4^{3-} e al posto dello ione OH^- si possono trovare anioni F^- , Cl^- o Br^- . Le sostituzioni cationiche possono avvenire al 100%, come accade per Sr^{2+} , Cd^{2+} e Pb^{2+} , oppure in misura limitata come avviene per Zn^{2+} e Mg^{2+} che vanno ad inibire la cristallizzazione dell'HA.¹⁵

In letteratura sono stati riportati diversi metodi per la sintesi dei calcio fosfati, come reazioni allo stato solido, tecniche al plasma, processi idrotermici, cristallizzazione sol-gel o elettrodeposizione.^{11,16,17,18} Tuttavia il metodo che risulta essere più utilizzato è la precipitazione, nella quale avviene la reazione chimica tra gli ioni calcio e gli ioni fosfato mantenendo sotto controllo sia la temperatura che il pH della soluzione. Questa tecnica, industrialmente molto interessante, è una tecnica semplice, che utilizza materie prime relativamente poco costose, oltre al fatto che vengono utilizzate basse temperature di reazione (non superiori ai 100°C) e con bassi costi operativi. Andando a variare il metodo e le condizioni di sintesi possono essere modulate le proprietà chimiche, strutturali e morfologiche delle idrossiapatiti sintetiche.¹⁸

Le caratteristiche finali dell'HA, come la forza, la tossicità alle cellule, l'osseointegrazione, la biocompatibilità e la bioattività, dipendono fortemente dalla microstruttura dei cristalli di idrossiapatite, e principalmente dalla morfologia, dalla stechiometria, dalla struttura cristallografica e dalla purezza della fase. Infatti le proprietà meccaniche finali del materiale sono strettamente legate alla forma microscopica dei cristalli, alla loro dimensione e alla distribuzione delle dimensioni.¹⁹

Tuttavia le proprietà del materiale sintetizzato possono anche essere modificate e migliorate andando a funzionalizzare la superficie con diverse molecole, ioni metallici, proteine o farmaci, andando così ad inserire nello stesso materiale sia le proprietà di biocompatibilità e bioattività, dato dall'idrossiapatite, che la funzione specifica dell'agente funzionalizzato.⁴ L'idrossiapatite infatti è conosciuta per la sua capacità di legare una vasta varietà di molecole e agenti terapeutici in grado di agire sia come *scaffold* per la formazione di nuovi tessuti, sia per il rilascio nel tempo delle biomolecole funzionalizzate in precedenza. In questo modo l'HA può accrescere le proprietà di osseointegrazione e osteoinduzione ma può anche stimolare specifiche risposte cellulari a

livello molecolare grazie al rilascio delle molecole attive. L'assorbimento e il rilascio di queste biomolecole è fortemente influenzato non solo dalle proprietà chimiche delle molecole attive ma anche dalle caratteristiche chimico-strutturali dell'idrossiapatite.²⁰ La possibilità di rilasciare un farmaco o molecola direttamente nel sito di impianto rappresenta un notevole valore aggiunto per il materiale sintetizzato, favorendo così sia la crescita delle ossa che gli effetti dati dal farmaco.

Questo biomateriale può essere considerato come un sistema di rilascio controllato di fattori biologicamente utili, in quanto rilascia nel sito dell'impianto ioni aventi specifiche funzioni nel metabolismo e nel rimodellamento osseo e nel trattamento di specifiche patologie. Quindi, non ci si riferisce solo a Ca^{2+} e a PO_4^{3-} , gli ioni fondamentali sostitutivi la fase minerale, ma anche a ioni secondari a cui sono riconosciute peculiari proprietà. La possibilità di rilasciare il farmaco, direttamente nel sito dell'impianto, rappresenta un notevole valore aggiunto per il sostituto osseo. A seconda delle indicazioni terapeutiche possono essere rilasciati in situ diversi tipi di agenti biologici, quali fattori di crescita ossea. In caso di patologie specifiche possono essere caricati farmaci specifici (es. antitumorali, antiosteoporotici, antibiotici, ecc.). La funzione di dispensatori in situ di farmaci o ioni per il trattamento di specifiche patologie risulta di estremo interesse, in quanto consente di evitare, o per lo meno limitare, somministrazioni farmacologiche per via orale che possono avere ripercussioni a livello sistemico.

1.2 Le nanoparticelle di platino

Nel corso degli ultimi anni, è aumentato l'interesse nello studio delle nanoparticelle metalliche in quanto esse presentano proprietà chimico-fisiche ben diverse dal materiale *bulk* e per questo motivo hanno diverse applicazioni in catalisi, biologia e ottica, nonché in campo biomedico come agenti terapeutici o di contrasto.²¹

Esistono due diversi metodi di sintesi delle nanoparticelle: il metodo *top down* e il metodo *bottom up*. Il primo metodo consiste nel ridurre il materiale *bulk* fino ad ottenere un materiale di dimensioni nanometriche. Questo processo è operabile mediante metodi termici o ad alta energia, attraverso metodi che utilizzano l'energia meccanica o la litografia ottica. Tuttavia il limite principale dei metodi *top-down* è il controllo della dimensione e della forma del materiale finale. Il metodo *bottom up* invece, prevede

l'aggregazione di atomi e molecole fino al raggiungimento delle dimensioni desiderate. Questo metodo sfrutta la riduzione chimica di precursori metallici per ottenere delle nanoparticelle. I processi di riduzione consistono di tre fasi: nucleazione, crescita ed aggregazione. L'ultima fase di aggregazione delle nanoparticelle deve essere evitata, normalmente attraverso l'impiego di agenti stabilizzanti, poiché essa porta alla formazione della fase massiva, termodinamicamente favorita, con conseguente perdita delle particolari proprietà associate alle nanoparticelle.²²

Le nanoparticelle metalliche hanno diverse applicazioni in numerosi campi, dalla chimica alla medicina, dall'elettronica alla biologia. Le loro proprietà dipendono fortemente dalla loro dimensione, forma, morfologia e dispersione. Il platino è un metallo nobile e composti di coordinazione del platino, come il complesso $\text{cis-[PtCl}_2(\text{NH}_3)_2]$ noto come cis-platino, sono da tempo utilizzati come agenti antitumorali, mentre le nanoparticelle di platino (Pt_{NPs}) sono impiegate in diversi ambiti quali *fuel cells*, catalizzatori,²³ nella rimozione di composti farmaceutici²⁴ e in campo biomedico.

Le applicazioni più interessanti riguardano il campo biomedico, infatti le Pt_{NPs} esercitano degli effetti citotossici sulle cellule tumorali, risultando così dei potenti anticancro inducendo l'apoptosi cellulare e bloccando il ciclo di riproduzione cellulare.²³ Oltre all'attività antitumorale queste nanoparticelle sono conosciute per la loro abilità nel rimuovere le specie reattive (superossido e perossido) agendo come delle superossido dismutase/catalase (SOD).²⁵ La capacità di mimare l'attività delle SOD/catalase favorisce la prevenzione di numerose patologie associate a stress ossidativi, come infiammazioni, arteriosclerosi e malattie neurodegenerative.²⁶

1.3 Polielettroliti

I polielettroliti sono delle macromolecole che si sciolgono in solventi polari come l'acqua e presentano un elevato numero di gruppi carichi, come il gruppo amminico o il gruppo carbossilico. Esistono due tipi di polielettroliti: quelli omogenei, i quali contengono un solo tipo di gruppo carico, e quelli che contengono sia gruppi carichi positivamente che negativamente, chiamati polianfoliti. Le proprietà di questi materiali sono l'eccellente solubilità in acqua e la grande abilità di legare macromolecole e superfici caricate con carica del segno opposto.²⁷

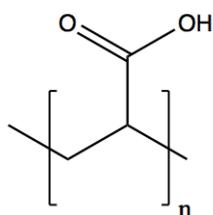


Figura 4 *Struttura acido poliacrilico o PAA.*

1.4 Tecniche di caratterizzazione

1.4.1 Diffrazione a raggi X (XRD)

La diffrazione ai raggi X (XRD) è una tecnica di analisi non distruttiva che permette di studiare la struttura della materia, sia questa cristallina che quella amorfa. In base al campione in esame si ha diffrazione su cristallo singolo (SC-XRD, *single crystal X-ray diffraction*) o diffrazione di polveri (XRPD, *X-ray powder diffraction*). Queste tecniche permettono di risalire ai parametri di cella del cristallo, alla sua struttura e al grado di cristallizzazione.

La diffrazione è un fenomeno di diffusione (o scattering) e interferenza generato dall'interazione dell'onda elettromagnetica (raggi X) con il reticolo cristallino. L'interazione dei raggi X con la materia avviene attraverso due processi di diffusione: lo scattering elastico alla base della diffrazione, dove i fotoni della radiazione incidente sul materiale vengono deviati in ogni direzione dello spazio senza perdita di energia. Essi costituiscono la radiazione scatterata con la stessa lunghezza d'onda della radiazione incidente. Mentre il secondo processo è lo scattering non-elastico dei fotoni, nel quale l'energia dei fotoni viene assorbita dagli atomi del cristallo aumentandone la temperatura.

Le condizioni di diffrazione dei raggi X sono state descritte nel 1912 da W.L.Bragg, il quale considerava la diffrazione come conseguenza della riflessione simultanea dei raggi X da parte di diverse famiglie di piani del reticolo cristallino che appartengono alla stessa famiglia.

L'effetto della diffrazione, ovvero l'interferenza costruttiva tra le onde elettromagnetiche che sono riflesse dai diversi piani reticolari del cristallo, è definito dalla legge di Bragg:

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

Secondo la quale considerando θ l'angolo tra il raggio incidente e la famiglia di piani, se la differenza di cammino tra le onde riflesse in D e B è uguale a $AB + BC = 2d \cdot \sin\theta$ ed è un multiplo intero della lunghezza d'onda λ della radiazione si ha interferenza costruttiva ovvero diffrazione, come mostrato in *Figura 5*.³¹

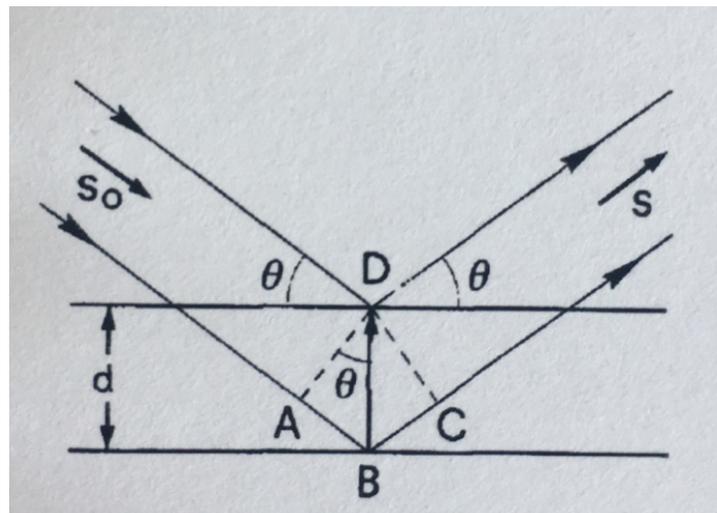


Figura 5 Riflessione di raggi X da parte di due piani reticolari dove d è la distanza interplanare tra essi.

Nel nostro caso l'analisi è stata condotta su polveri di HA e, poiché una polvere può essere considerata come un materiale policristallino, cioè costituito da piccoli cristalli disposti in tutte le possibili direzioni, si ha un gran numero di reticoli reciproci, tutti identici. Si va così a scannerizzare la polvere lungo un intervallo angolare che va da 10° a 60° in modo tale da ottenere tutti i possibili angoli di diffrazione generati dall'orientamento casuale dei cristalli nella polvere.

1.4.2 Analisi di assorbimento atomico (AAS)

La spettroscopia di assorbimento atomico (o Atomic Absorption Spectroscopy, AAS, in inglese) è una tecnica analitica quantitativa che permette di determinare specie inorganiche, in particolare i metalli in soluzione.

Si basa sull'assorbimento di una radiazione elettromagnetica, generata da una sorgente, da parte del campione atomizzato attraverso una fiamma. Infatti gli atomi di un

elemento possono assorbire la radiazione avente una lunghezza d'onda corrispondente all'energia necessaria per far sì che gli elettroni degli atomi possano passare dallo stato fondamentale allo stato eccitato.

Per determinare la quantità di un elemento si atomizza il campione attraverso una fiamma, si eccitano gli atomi con una radiazione di opportuna lunghezza d'onda e si misura la radiazione assorbita. L'assorbimento, che dipende dal numero di atomi nello stato fondamentale, è proporzionale alla popolazione di atomi presenti sul cammino ottico e quindi alla concentrazione dell'elemento nel campione.

Tale fenomeno è descritto dalla legge di Lambert-Beer:

$$A = \epsilon_{\lambda} l M$$

dove A è l'assorbanza, ϵ_{λ} è detto coefficiente di assorbimento molare e dipende dalla lunghezza d'onda di eccitazione, l è il cammino geometrico e M è la molarità della soluzione.

1.4.3 Microscopio a trasmissione elettronica (TEM)

Il microscopio a trasmissione elettronica permette di esaminare strutture su nanoscala, caratterizzate da dimensioni minori di 100 nm. Per questo motivo il TEM viene ampiamente utilizzato sia in campo biologico che della scienza dei materiali per studiare la struttura dei cristalli.³²

In questo microscopio il fascio di elettroni è generato da un filamento di tungsteno riscaldato, al quale viene applicato un basso voltaggio per estrarre gli elettroni che vengono successivamente accelerati da un alto voltaggio, la colonna del microscopio viene mantenuta sotto alto vuoto per evitare interferenze degli elettroni con le molecole di aria. Il fascio di elettroni così generato viene collimato da lenti elettromagnetiche in grado di modificare la traiettoria degli elettroni andando ad interagire con un campione. Gli elettroni ad alta energia vanno ad interagire con gli elettroni del campione generando diversi fenomeni come mostrato in *Figura 6*.

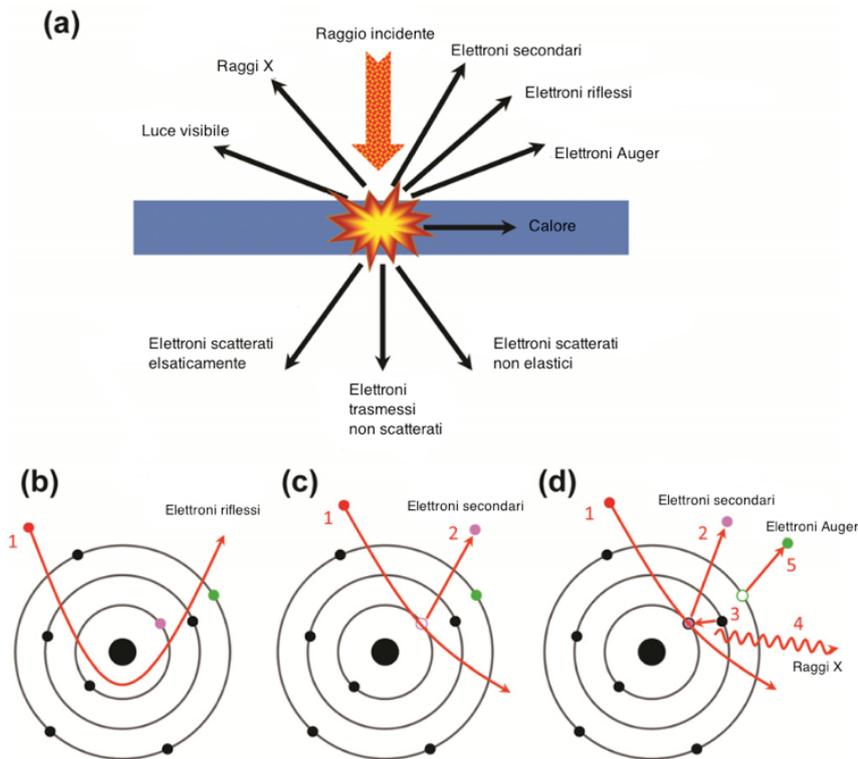


Figura 6 (a) Fenomeni generati dall'interazione degli elettroni con il campione; (b) fenomeno di riflessione; (c) elettroni secondari; (d) elettroni Auger e Raggi X. (adattata da *A Practical Guide to Transmission Electron Microscopy: Fundamentals* Zhiping Luo).

Il fenomeno che viene sfruttato dal TEM è la trasmissione degli elettroni, che vengono trasmessi dal campione raggiungono uno schermo fosforescente che converte l'informazione generata dagli elettroni in un'immagine visibile.³³

1.4.4 Analisi termogravimetrica (TGA)

L'analisi termogravimetrica è una analisi termica che studia le proprietà dei materiali al variare della temperatura. Le analisi termiche come la TGA o la DSC (calorimetria a scansione differenziale) permettono di conoscere le proprietà di molti materiali e sistemi reattivi, come l'entalpia, la capacità termica, la variazione di massa e il coefficiente di espansione termica. Le diverse analisi si differenziano tra loro in base alle diverse proprietà misurate.

La TGA misura i cambiamenti di peso al variare della temperatura, dando informazioni sulla variazione della composizione del campione e sulla sua stabilità termica.³⁴ Durante l'analisi il campione viene posto in un contenitore inerte di allumina che si trova sospeso al braccio della bilancia all'interno del forno, mantenuto sotto

atmosfera inerte di azoto. La misurazione della temperatura del campione viene effettuata con una piccola termocoppia posizionata il più vicino possibile al contenitore del campione per ottenere una misura accurata della temperatura.

1.4.5 Il potenziale zeta (ζ)

Le particelle o nanoparticelle disperse in acqua presentano una carica superficiale che influenza la redistribuzione degli ioni intorno alla particella stessa. Questa distribuzione comporta un aumento nello spazio della concentrazione di controioni, ovvero ioni di carica opposta a quella della particella, in prossimità della superficie. In particolare, lo strato liquido con gli ioni che circonda la particella è suddiviso in due zone: quella interna chiamata strato stazionario o di Stern, caratterizzata da ioni fortemente legati alla superficie della particella carica, e quella esterna o strato diffusivo, nella quale le interazioni sono più deboli. Queste zone così create costituiscono un doppio strato elettrico intorno a ciascuna particella. Quando una particella si muove, gli ioni più vicini alla particella si muovono con essa, mentre quelli più distanti no. Questo limite viene chiamato piano di taglio o *slipping plane. Poiché la carica intrinseca sulla superficie della particella è schermata dalle cariche dello strato stazionario, le interazioni fra particelle sono regolate dal potenziale presente alla superficie del piano di taglio, come mostrato in *Figura 7*. Questo potenziale è conosciuto come potenziale zeta.*

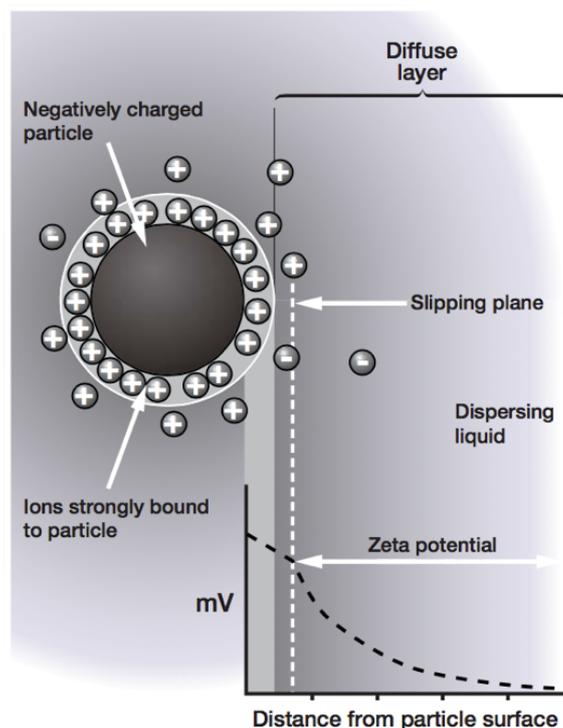


Figura 7 Potenziale zeta.

Se viene applicato un campo elettrico nel mezzo ove sono disperse le particelle cariche, esse migreranno verso il polo di carica opposta rispetto alla carica risultante sulla superficie della particella. Questo effetto viene definito elettroforesi e la velocità delle particelle dipende da:

- Intensità del campo elettrico applicato
- Costante dielettrica del mezzo
- Viscosità del mezzo
- Potenziale zeta

La velocità della particella viene comunemente riferita alla sua mobilità elettroforetica. La misura di questa mobilità viene effettuata in una cella con due elettrodi ai quali viene applicato un campo elettrico. La velocità di movimento delle particelle verso gli elettrodi di carica opposta viene misurata da un raggio laser. La variazione di intensità del segnale diffuso dal campione è proporzionale alla velocità delle particelle. Una volta determinata la velocità delle particelle è possibile determinare il potenziale zeta che rappresenta il potenziale attribuito alla particella dovuto alla carica di quest'ultima. Questo potenziale può essere usato per conoscere la carica superficiale della particella, fattore che permette di determinare la stabilità di una soluzione colloidale.³⁵

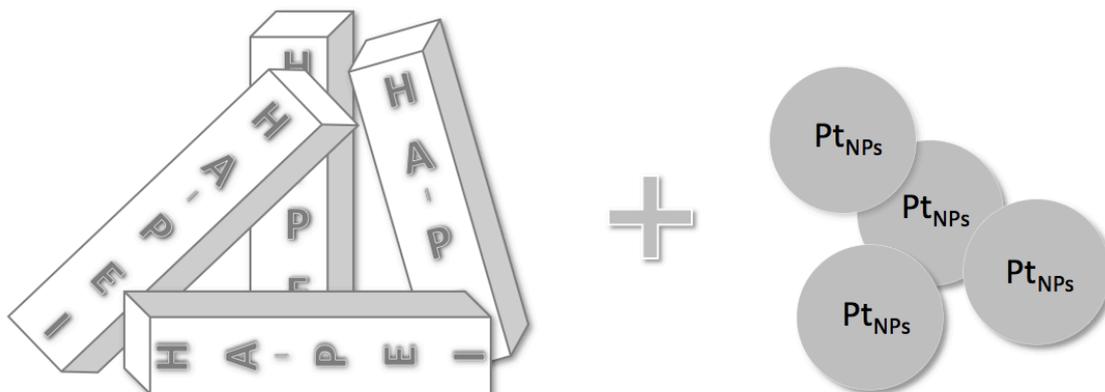
1.6 Bibliografia

- [1] S. V Dorozhkin, "Calcium Orthophosphates as Bioceramics: State of the Art" *J. Funct. Biomater.*, vol 1, pp. 22–107, 2010.
- [2] D. F. Williams, "The Williams Dictionary of Biomaterials" Liverpool University Press, 1999.
- [3] E. Boanini, P. Torricelli, M. C. Cassani, G. A. Gentilomi, B. Ballarin, K. Rubini, F. Bonvicini and A. Bigi, "Cationic-anionic polyelectrolyte interaction as a tool to graft silver nanoparticles on hydroxyapatite crystals and prevent cytotoxicity" *RSC Adv.*, vol. 4, pp.645-652, 2014.
- [4] E. Boanini, P. Torricelli, C. Boga, G. Micheletti, M. C. Cassani, M. Fini and A. Bigi, "(9R)-9-Hydroxystearate-Functionalized Hydroxyapatite as Antiproliferative and Cytotoxic Agent toward Osteosarcoma Cells" *Langmuir.*, vol. 32, pp. 188-194, 2016.
- [5] S. V. Dorozhkin, "Calcium orthophosphates" *J. Mater. Sci.*, vol. 42, pp. 1061–1095, 2007.
- [6] L. Wang and G. H. Nancollas, "Calcium orthophosphates: Crystallization and Dissolution" *Chem. Rev.*, vol. 108, no. 11, pp. 4628–4669, 2008.
- [7] P. N. Kumta, C. Sfeir, D. Lee, D. Olton and D. Choi, "Nanostructured calcium phosphates for biomedical applications: novel synthesis and characterization" *Acta Biomater.*, vol. 1, pp. 65–83, 2005.
- [8] Th. Leventouri, "Synthetic and biological hydroxyapatites: Crystal structure questions" *Biomaterials*, vol. 27, pp. 3339–3342, 2006.
- [9] P. Ptáček, "Apatites and their Synthetic Analogues - Synthesis, Structure, Properties and Applications" *InTech*, 2016.
- [10] A. Bigi, E. Boanini, M. Gazzano and A. Kojdecki, "Microstructural investigation of hydroxyapatite – polyelectrolyte composites" *J. Mater. Chem.*, vol. 14, pp. 274–279, 2004.
- [11] S. Koutsopoulos, "Synthesis and characterization of hydroxyapatite crystals: A review study on the analytical methods" *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 62, no. 4, pp. 600-612, 2002.
- [12] Q. J. He and Z. L. Huang, "Template-directed growth and characterization of flowerlike porous carbonated hydroxyapatite spheres" *Cryst. Res. Technol.*, vol. 42, no. 5, pp. 460–465, 2007.
- [13] M. Corno, C. Busco, B. Civalleri and P. Ugliengo, "Periodic ab initio study of structural and vibrational features of hexagonal hydroxyapatite" *Phys. Chem. Chem. Phys.*, vol. 8, pp. 2464–2472, 2006.
- [14] J.C. Elliott, "Structure and Chemistry of the Apatites and Other Calcium Orthophosphates" Elsevier, 1982.
- [15] E. Boanini, M. Gazzano and A. Bigi, "Ionic substitutions in calcium phosphates synthesized at low temperature" *Acta Biomater.*, vol. 6, no. 6, pp. 1882–1894, 2010.
- [16] A. K. Nayak, "Hydroxyapatite synthesis methodologies: An overview" *Int. J. ChemTech. Res.*, vol. 2, no. 2, pp. 903–907, 2010.
- [17] K. Agrawal, G. Singh, D. Puri and S. Prakash, "Synthesis and Characterization of Hydroxyapatite Powder by Sol-Gel Method for Biomedical Application" *J. Miner. Mater. Char. Eng.*, vol. 10, no. 8, pp. 727–734, 2011.
- [18] M. P. Ferraz, F. J. Monteiro and C. M. Manuel, "Hydroxyapatite nanoparticles: A review of preparation methodologies," *J. Appl. Biomaert. Biomech.*, vol 2, no. 2, pp. 74–80, 2004.

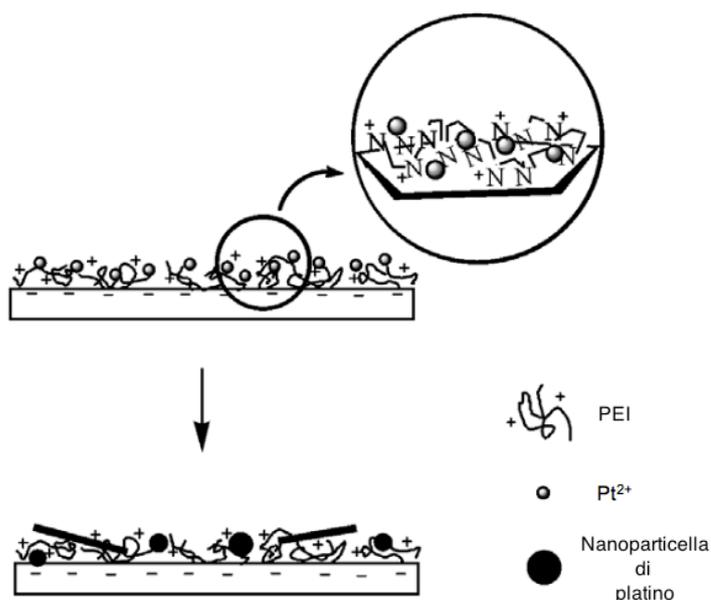
- [19] M. Sadat-Shojai, M. Khorasani, E. Dinpanah-Khoshdargi and A. Jamshidi, "Synthesis methods for nanosized hydroxyapatite with diverse structures" *Acta Biomater.*, vol. 9, no. 8, pp. 7591–7621, 2013.
- [20] M. Iafisco, B. Palazzo, M. Marchetti, N. Margiotta, R. Ostuni, G. Natile, M. Morpurgo, V. Gandin, C. Marzano and N. Roveri, "Smart delivery of antitumoral platinum complexes from biomimetic hydroxyapatite nanocrystals" *J. Mater. Chem.*, vol. 19, no. 44, p. 8385-8392, 2009.
- [21] Y. Bendale, V. Bendale and S. Paul, "Evaluation of cytotoxic activity of platinum nanoparticles against normal and cancer cells and its anticancer potential through induction of apoptosis" *Integr. Med. Res.*, pp. 4–11, 2017.
- [22] A. Roucoux, J. Schulz and H. Patin, "Reduced Transition Metal Colloids: A Novel Family of Reusable Catalysts?" *Chem. Rev.*, vol. 102, no. 10, pp. 3757-3778, 2002.
- [23] K. Tahir, S. Nazir, A. Ahmad, B. Li, A. Ullah Khan, Z. U. H. Khan, F. Ullah Khan, Q. Ullah Khan, A. Khan and A. Ur Rahman, "Facile and green synthesis of phytochemicals capped platinum nanoparticles and in vitro their superior antibacterial activity," *J. Photoch. Photobi., B: Biology*, vol. 166, pp. 246–251, 2017.
- [24] M. Martins, C. Mourato, S. Sanches, J. P. Noronha, M. T. Barreto Crespo and I. A. C. Pereira, "Biogenic platinum and palladium nanoparticles as new catalysts for the removal of pharmaceutical compounds," *Water Research*, vol. 108, pp. 160–168, 2017.
- [25] Y. Yoshihisa, Q. Zhao, M. A. Hassan, Z. Wei, Y. Miyamoto, T. Kondo, and T. Shimizu, "SOD / catalase mimetic platinum nanoparticles inhibit heat-induced apoptosis in human lymphoma U937 and HH cells," *Free Radical Research*, vol. 45, no. 3, pp. 326-335, 2011
- [26] K. Hikosaka, J. Kim, M. Kajita, A. Kanayama and Y. Miyamoto, "Platinum nanoparticles have an activity similar to mitochondrial NADH: ubiquinone oxidoreductase," *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 66, pp. 195–200, 2008.
- [27] J. Lyklema, "Fundamentals of Interface and Colloid Science: Soft Colloids" vol. 5, Elsevier, 2005.
- [28] C. Chen and P. Kuo, "Gold nanoparticles prepared using polyethylenimine adsorbed onto montmorillonite," *J. Coll. Inter. Scie.*, vol. 293, pp. 101–107, 2006.
- [29] X. Wang, Q. Liu, J. Liu, R. Chen, H. Zhang, R. Li, Z. Li and J. Wang, "3D self-assembly polyethyleneimine modified graphene oxide hydrogel for the extraction of uranium from aqueous solution." *Applied Surface Science*, vol. 426, pp. 1063-1074, 2017.
- [30] T. Wen, F. Qu, N. B. Li, and H. Q. Luo, "A facile, sensitive and rapid spectrophotometric method for copper (II) ion detection in aqueous media using polyethyleneimine," *Arab. J. Chem.*, vol. 10, pp. 1680–S1685, 2017.
- [31] C. Giacobozzo, H. L. Monaco, D. Viterbo, F. Scordari, G. Gilli, G. Zanotti and M. Catti, "Fundamentals of Crystallography", Oxford University Press, 2011.
- [32] C. Y. Tang and Z. Yang, "Transmission Electron Microscopy (TEM)" no. March, 2017.
- [33] Z. Luo, "A Practical Guide to Transmission Electron Microscopy Fundamentals", Momentum Press, 2015.
- [34] I. P. Borovinskaya, A. A. Gromov, E. A. Levashov, Y. M. Maksimov, A. S. Mukasyan, A. S. Rogachev "Concise Encyclopedia of Self-Propagating High-Temperature Synthesis: History, Theory, Technology, and Products" Elsevier, 2017.
- [35] Malvern Instruments Ltd. "Zetasizer nano series user manual", 2013.

CAPITOLO 2

2. Nanoparticelle di platino supportate su HA e HA funzionalizzata con PEI



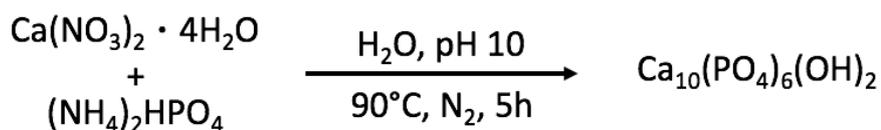
In questo capitolo viene riportato il lavoro di ricerca nel quale si è preparato il substrato di idrossiapatite tal quale e idrossiapatite funzionalizzata con la polietilenimina (HA-PEI). Successivamente si è studiato il metodo migliore per la supportazione del Pt(II) sul substrato e la sua riduzione a Pt(0) per ottenere delle nanoparticelle stabilizzate e ancorate alla superficie del supporto inorganico.



2.1 Risultati e discussione

2.1.1 Sintesi e caratterizzazione di HA e HA-PEI

La sintesi di idrossiapatite è riportata nello *Schema 1*. La reazione è stata effettuata mettendo in agitazione una soluzione di $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ a contatto per 5 ore con una soluzione di $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ a pH 10 e alla temperatura di 90 °C, in atmosfera inerte di azoto.



Schema 1 Sintesi HA.

Dopo essiccazione si ottiene una polvere bianca che viene setacciata per dare una granulometria di 40 μm (*Figura 8*) che è stata caratterizzata mediante diffrazione a raggi X (XRD) confrontando gli spettri acquisiti con il database ICDD (PDF 9-432). Come mostrato in *Figura 9*, il diffrattogramma del campione sintetizzato è perfettamente sovrapponibile con lo spettro del database a dimostrazione che la struttura cristallina dei campioni preparati è identica alla struttura cristallina dell'idrossiapatite con cella cristallina esagonale.



Figura 8 Polvere di HA.

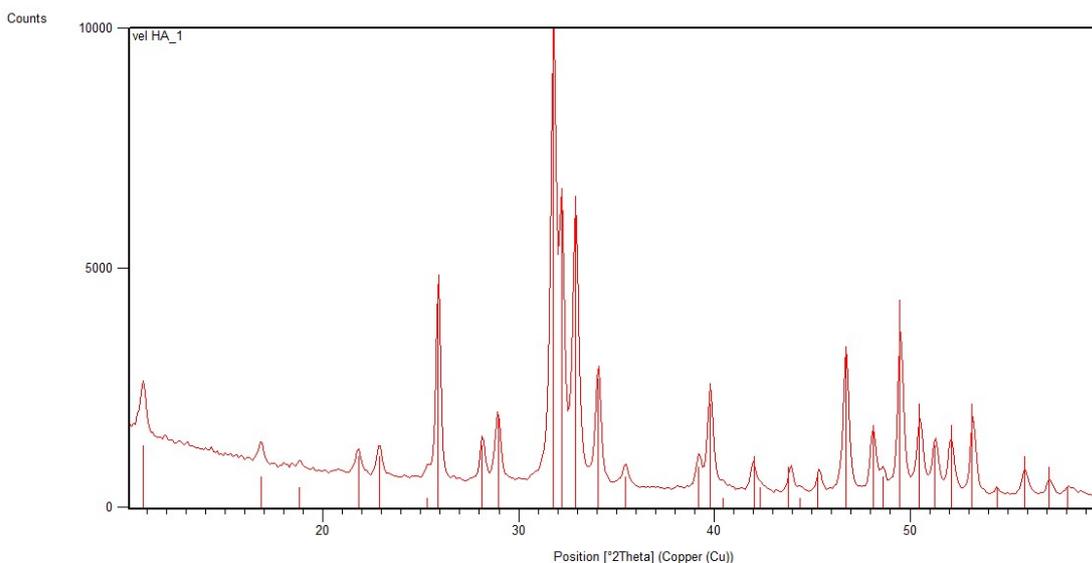


Figura 9 *Diffattogramma dell'HA sintetizzata comparato con il PDF 9-432.*

Per quanto riguarda la sintesi di idrossiapatite funzionalizzata con il PEI (HA-PEI), oltre alla soluzione di $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ e di $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ viene aggiunto nell'ambiente di reazione anche il PEI che va ad adsorbirsi sulla superficie dei cristalli di HA. La polvere ottenuta è stata caratterizzata attraverso l'analisi ai raggi X. I diffrattogrammi acquisiti per HA-PEI sono stati comparati con quelli presenti nel database 9-432 e con quelli dell'HA sintetizzato. In *Figura 10* si può notare come l'unica fase presente sia idrossiapatite e che il PEI non faccia variare la fase del materiale sintetizzato. Tuttavia la presenza di PEI nel pallone di reazione fa aumentare la cristallinità del materiale, come indicato dalla diminuzione della larghezza dei picchi nel diffrattogramma.

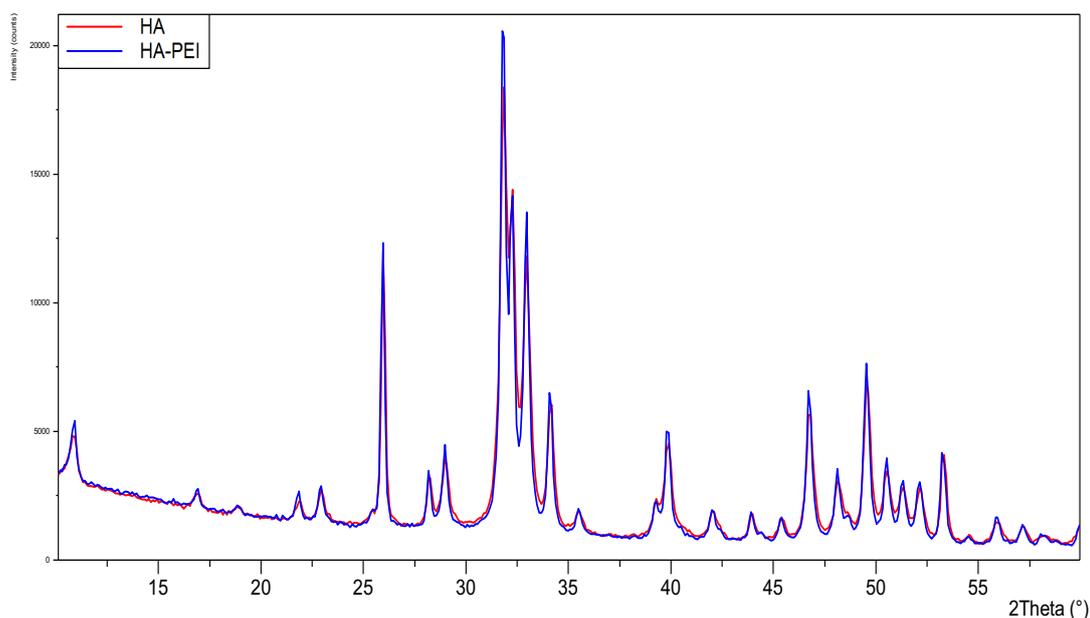


Figura 10 *Confronto diffrattogrammi HA e HA-PEI.*

Oltre alle analisi XRD i campioni HA-PEI sono stati caratterizzati mediante analisi TGA per determinare la quantità di PEI che si assorbe sul substrato come mostrato nel termogramma (*Figura 11*), che mostra una percentuale di PEI assorbito del 5.7%.

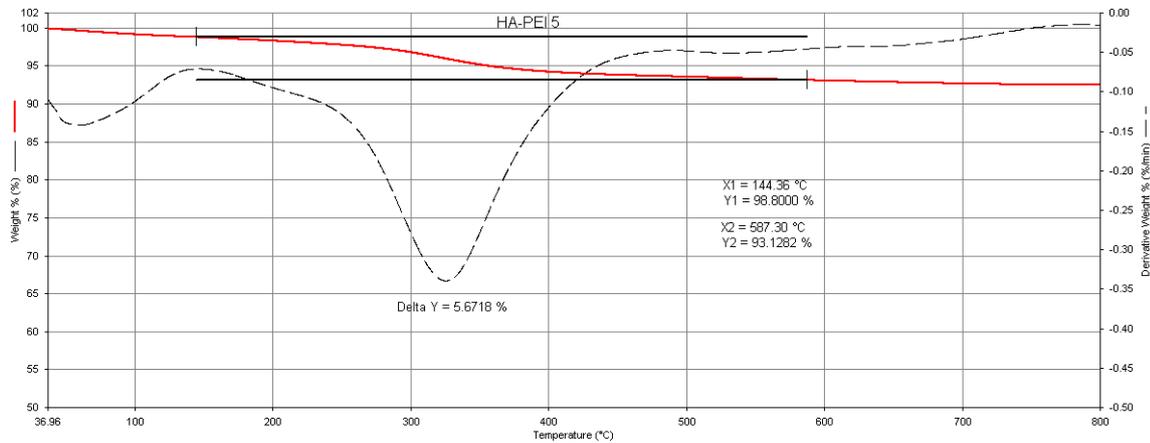


Figura 11 Termogramma campione HA-PEI.

La funzionalizzazione del PEI sul substrato di HA fa sì che vi sia un aumento del potenziale zeta che vira verso valori positivi, infatti il potenziale zeta dell'HA è di -11.5 mV mentre si raggiungono valori di 4.8 mV per HA-PEI, valore che aumenta in presenza di platino non ridotto fino ad un massimo di 20.1 mV.

2.1.2 Interazione Pt(II) con il substrato

È stato studiato il metodo migliore per supportare i precursori di Pt(II) sul substrato andando a variare diversi parametri. I parametri variati sono:

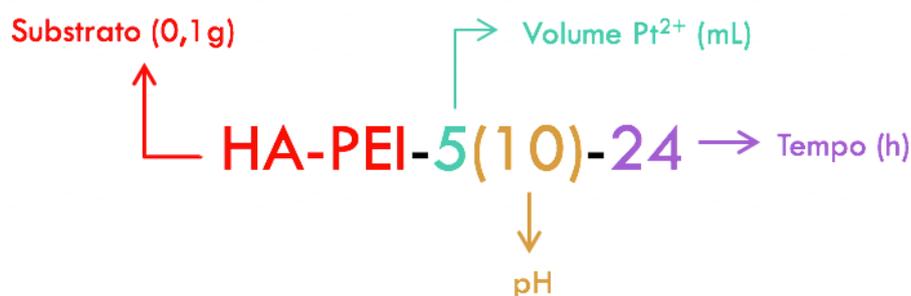
- substrato: 0,1 g di HA o HA-PEI;
- tempo di contatto tra substrato e soluzione di Pt(II): 1 h o 24 h;
- pH soluzione iniziale di Pt(II): pH 5 (spontaneo) o pH 10;
- volume di soluzione di Pt(II): 5, 2.5 o 0.5 ml;
- concentrazione della soluzione di Pt(II): 0.01 M o 0.02 M.

Dalla variazione di questi parametri sono state definite diverse serie come riportate nella *Tabella 2*.

Tabella 2 Riassunto delle diverse serie con i parametri variati.

SERIE	SUBSTRATO	VOLUME (mL)	pH	SOLUZIONE	CONC. (M)	Tempo (h)
PRIMA	HA	5-2,5-0,5	10	Pt ²⁺ + PEI	0,01	1-24
SECONDA	HA-PEI	5-2,5-0,5	5	Pt ²⁺	0,01–0,02	1-24
TERZA	HA	5-2,5-0,5	10	Pt ²⁺	0,01–0,02	1-24
QUARTA	HA-PEI	5-2,5-0,5	10	Pt ²⁺	0,01–0,02	1-24
QUINTA	HA	5-2,5-0,5	10	Pt ²⁺ (corretto a pH =10) + PEI	0,01–0,02	1-24

I nomi dei diversi campioni sintetizzati riportano i diversi parametri come riportato di seguito:



Di seguito sono riportati le procedure seguite nelle diverse serie e i risultati ottenuti.

PRIMA SERIE

- substrato: HA
- soluzione: K_2PtCl_4 + PEI
- pH: 10

Nella PRIMA SERIE l'idea iniziale è stata quella di aggiungere una soluzione di Pt(II)-PEI alla HA. Tuttavia si è osservato che per aggiunta di una soluzione acquosa 0.5 M di PEI ad una soluzione 0.05 M di K_2PtCl_4 , la soluzione inizialmente limpida di Pt(II) (*Figura 12a*) diventa rapidamente torbida per dare un precipitato giallo insolubile che rimane tale fino a pH ca 6 (*Figura 12b*). Un'ulteriore abbassamento del pH non è stato possibile perché avrebbe portato alla dissoluzione dell'idrossiapatite.

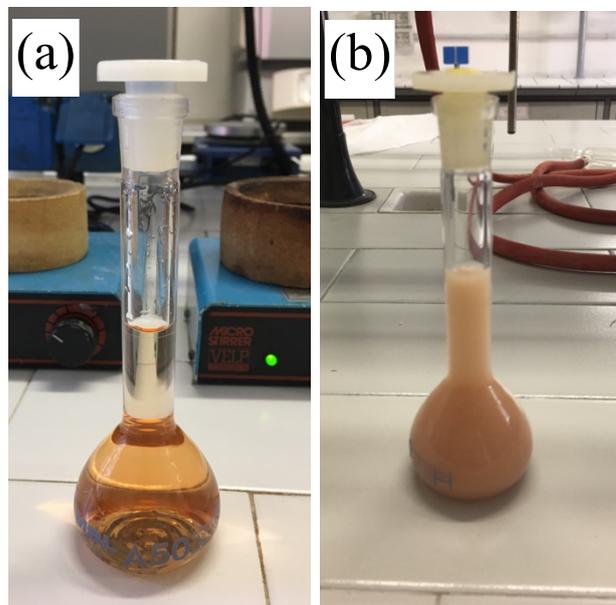


Figura 12 (a) Soluzione di K_2PtCl_4 0,05 M; (b) Pt(II) dopo aggiunta di PEI.

Per questo motivo e visto che i campioni preparati con questa soluzione risultano essere non filtrabili, si è deciso di abbandonare questa serie e di non condurre nessuna caratterizzazione su questi campioni.

SECONDA SERIE

- substrato: HA-PEI
- soluzione: K_2PtCl_4
- pH: 5

Abbiamo quindi cambiato strategia sintetica e fatto reagire una soluzione di K_2PtCl_4 0,01 M al pH spontaneo di ca. 5 con HA-PEI per 1 h e 24 h. Dopo filtrazione ed essiccamento a 37 °C, i campioni sono stati caratterizzati mediante analisi XRD. Dai diffrattogrammi acquisiti non si notano variazioni nei picchi rispetto ai campioni relativi della HA-PEI (*Figura 13*). Questo indica che la presenza di Pt(II) non modifica la struttura cristallina del substrato.

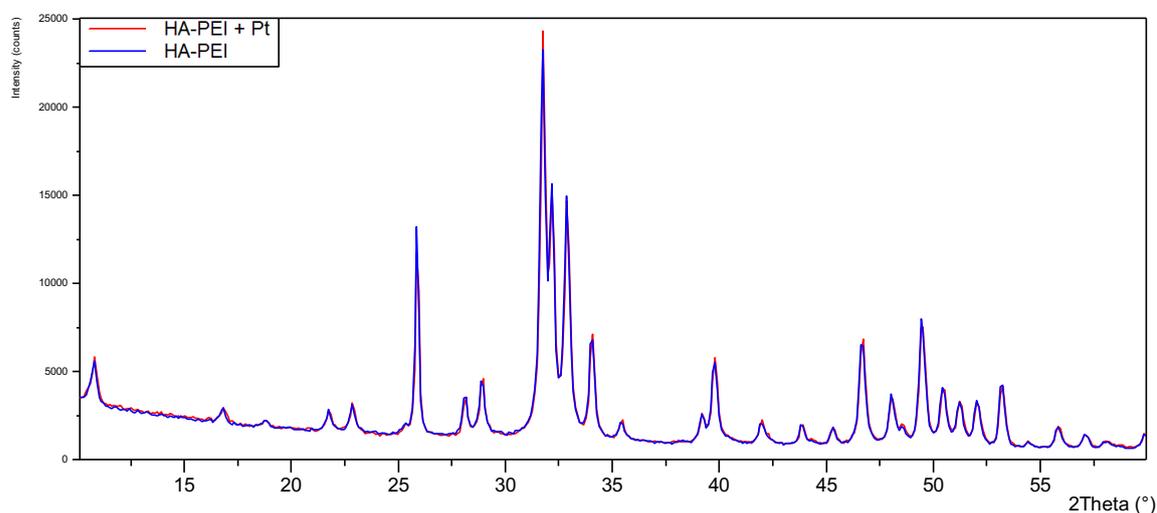


Figura 13 Confronto diffrattogrammi HA-PEI (blu) e HA-PEI-Pt (rosso).

La quantità di platino contenuta nei diversi campioni è stata determinata attraverso misure di assorbimento atomico. Da questa analisi (*Tabella 3*) si osserva come la quantità di Pt(II) supportata dipende dalla quantità iniziale di Pt(II) aggiunta all'HA-PEI ma non dipende dal tempo di contatto, infatti la quantità di Pt(II) dopo 24 h è uguale ai campioni lasciati a contatto con la soluzione di Pt(II) per 1 h.

Tabella 3 Concentrazione di Pt(II) nei campioni della SECONDA SERIE.

CAMPIONE	Pt(II) 0,01M (wt%)	Pt(II) 0,02M (wt%)
HA-PEI-2,5-1	1,8 ± 0,1	3,5 ± 0,3
HA-PEI-2,5-24	2,6 ± 0,2	
HA-PEI-5-1	3,1 ± 0,5	
HA-PEI-5-24	3,1 ± 0,4	

TERZA SERIE

- substrato: HA
- soluzione: K_2PtCl_4
- pH: 10

In questa serie il pH della la soluzione di K_2PtCl_4 0,01 M è stato modificato per aggiunta di ammoniaca e portato a pH 10. La soluzione così preparata è sta aggiunta ad HA non modificata con il PEI.

Le polveri HA-Pt(II) risultano di colore bianco mentre, contrariamente a quanto osservato per la SECODNA SERIE, sia la soluzione di Pt(II) di partenza che il filtrato dopo reazione con HA, dopo 24 h presentano un precipitato di colore nero (*Figura 14*) dovuto alla riduzione spontanea di Pt(II) a Pt(0) a pH 10.



Figura 14 (sinistra) Polvere di HA-Pt(II); (centro) soluzione di Pt(II); (destra) filtrato.

Le polveri sono stati caratterizzati attraverso analisi ai raggi X: anche in questo caso non si notano variazione nei picchi dei diffrattogrammi acquisiti. Oltre alla caratterizzazione XRD i campioni di questa serie sono stati analizzati attraverso l'assorbimento atomico per determinare la quantità di platino presente (*Tabella 4*).

Tabella 4 Concentrazione Pt(II) nei campioni della TERZA SERIE.

CAMPIONE	Pt(II) 0,01M (wt%)	Pt(II) 0,02M (wt%)
HA-2,5(10)-1	0,2 ± 0,2	
HA-2,5(10)-24	2,1 ± 0,2	
HA-5(10)-1	0,2 ± 0,4	0,7 ± 0,1
HA-5(10)-24	1,1 ± 0,3	4,5 ± 0,3

Contrariamente a quanto osservato per la SECONDA SERIE, in questo caso si nota una notevole differenza tra la quantità di Pt(II) assorbita nei campioni da 1 h rispetto a quelli da 24 h. Questo perché l'assorbimento del platino è legato solo al tempo di contatto tra la soluzione di platino e l'idrossiapatite e di conseguenza all'aumentare del tempo di contatto aumenta anche il contenuto di platino assorbito sui campioni.

QUARTA SERIE

- substrato: HA-PEI
- soluzione: K_2PtCl_4
- pH: 10

Questa serie è analoga alla SECONDA SERIE con l'unica differenza che la soluzione di K_2PtCl_4 0,01 M è stata portata a pH 10 prima di essere messa a contatto con HA-PEI. Anche per questa serie i campioni preparati sono stati analizzati ai raggi X e attraverso analisi di assorbimento atomico. Le percentuali di platino dei diversi campioni sono riportati nella *Tabella 5* riportata di seguito.

Tabella 5 Concentrazione platino(II) campioni della QUARTA SERIE.

CAMPIONE	Pt(II) 0,01M (wt%)	Pt(II) 0,02M (wt%)
HA-PEI-2,5(10)-1	1,9 ± 0,1	
HA-PEI-2,5(10)-24	2,3 ± 0,2	
HA-PEI-5(10)-1	2,4 ± 0,4	3,0 ± 0,3
HA-PEI-5(10)-24	1,7 ± 0,3	

Come riportato per la SECONDA SERIE si osserva come la quantità di Pt(II) supportata dipende dalla quantità iniziale di Pt(II) aggiunta all'HA-PEI ma non dipende dal tempo di contatto.

QUINTA SERIE

- substrato: HA
- soluzione: K_2PtCl_4 + PEI
- pH: 10

Per questa serie sono state utilizzate due tipi di soluzioni: la *soluzione 1* è stata preparata aggiungendo ad una soluzione acquosa di K_2PtCl_4 a pH 10, il PEI tal quale (50 wt%) in modo da avere un rapporto $K_2PtCl_4:PEI = 1:10$ e una concentrazione finale 0,01 M di Pt(II); la *soluzione 2* è stata preparata aggiungendo ad una soluzione di K_2PtCl_4 a pH 10, una soluzione acquosa di PEI (1 wt%) in modo da avere una concentrazione finale di Pt(II) 0,005 M e un rapporto $K_2PtCl_4:PEI = 1:10$. Queste soluzioni presentano lo stesso problema della soluzione della PRIMA SERIE, ovvero che una volta aggiunto il PEI alla soluzione di platino, questa da limpida diventa opaca con un precipitato giallo insolubile, come si può notare nella *Figura 15*.



Figura 15 Soluzioni di Pt(II)+PEI.

Si è deciso di preparare comunque i campioni che sono stati analizzati sia attraverso i raggi X che attraverso l'assorbimento atomico. Le percentuali di platino ottenute sono riportate nella *Tabella 6*. Come si può osservare in questo caso, vi è una notevole differenza del contenuto di platino in funzione della soluzione di Pt(II) preparata (*soluzione 1 o soluzione 2*). Si nota anche che variando la concentrazione della soluzione di Pt(II) non fa variare la quantità di Pt(II) supportata sui campioni.

Tabella 6 Concentrazione Pt(II) campioni della QUINTA SERIE.

CAMPIONE	SOLUZIONE	Pt(II) 0,01M (wt%)
HA-2,5(10)-1	1	1,7 ± 0,2
HA-2,5(10)-1	2	0,8 ± 0,2
HA-5(10)-1	1	2,4 ± 0,3
HA-5(10)-1	2	0,6 ± 0,3

2.1.3 Riduzione Pt(II) e formazione di nanoparticelle

Lo scopo di questa seconda parte del lavoro è stato quello di ridurre il Pt(II) presente sulla superficie della HA e HA-PEI per formare delle nanoparticelle ancorate sul substrato. Visti i risultati discussi nel paragrafo precedente nessuna riduzione è stata eseguita sulla PRIMA SERIE e QUINTA SERIE.

La riduzione del Pt(II) a Pt(0) è stata eseguita aggiungendo un eccesso di NaBH_4 ad una sospensione di HA-Pt(II) o HA-PEI-Pt(II) a temperatura ambiente. Nel giro di pochi istanti il colore della sospensione vira, da un colore bianco-rosato (a seconda del contenuto di Pt(II)) a nero come mostrato in *Figura 16*.

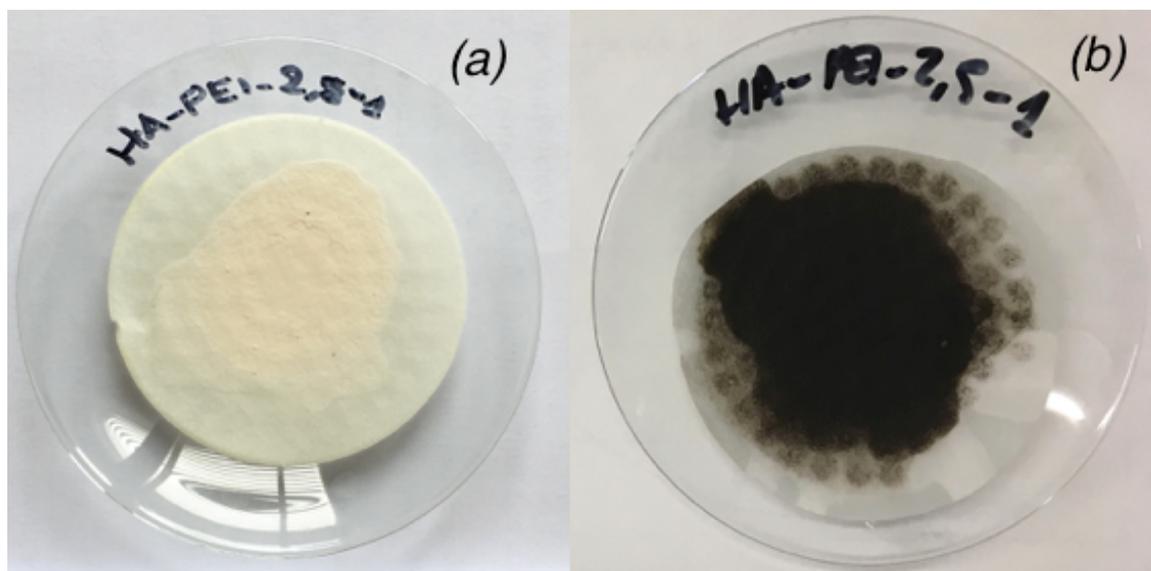


Figura 16 (a) Campione di HA-PEI-Pt(II); (b) campione di HA-PEI-Pt(0) dopo riduzione con NaBH_4 (b).

Per verificare che l'agente riducente non andasse a modificare la struttura cristallina dell'HA, i campioni ridotti sono stati analizzati tramite XRD. I diffrattogrammi acquisiti (*Figura 17*) non presentano variazioni nei picchi, cosa che indica che non vi sono variazioni nella fase del campione dopo riduzione con NaBH₄.

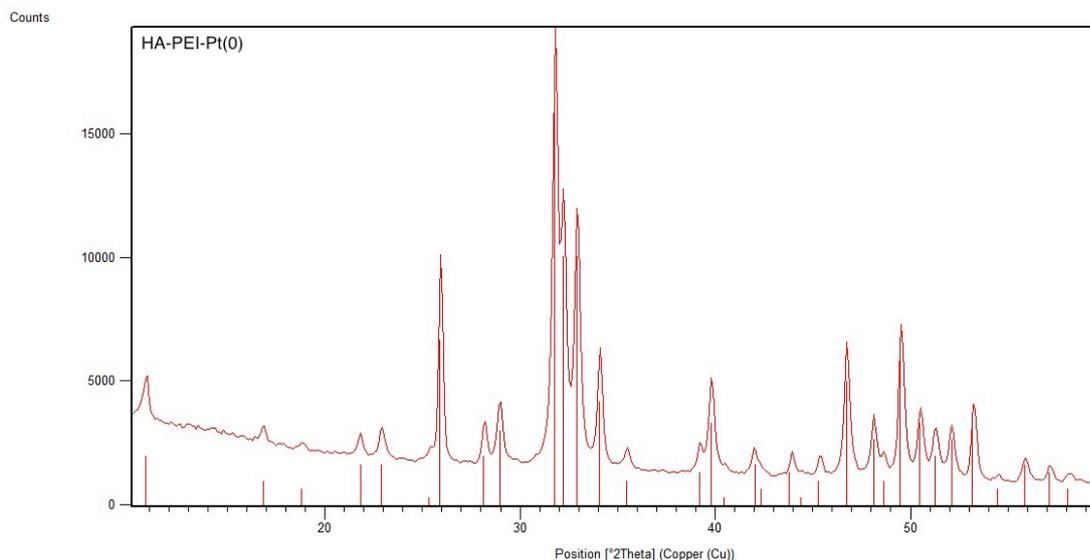


Figura 17 Diffrattogramma dell'HA-PEI-Pt(0) sintetizzata comparato con il PDF 9-432.

Di seguito sono riportati i risultati relativi alla reazione di riduzione per la SECONDA, TERZA e QUARTA SERIE.

SECONDA SERIE. Dopo la riduzione con NaBH₄ i campioni sono stati analizzati con l'analisi di assorbimento atomico per determinare la quantità di Pt_{NPs} supportate sulla superficie del substrato. Da questa analisi si nota una diminuzione nella concentrazione di platino che non supera il 2 wt% rispetto ai materiali non ridotti (*Tabella 7*). Per confronto sono nuovamente riportati anche i corrispondenti valori di Pt(II).

Tabella 7 Concentrazione Pt(II) e Pt(0) campioni della SECONDA SERIE.

CAMPIONE non ridotto	Pt(II) 0,01M (wt%)	Pt(II) 0,02M (wt%)	CAMPIONE ridotto	Pt(0) 0,01M (wt%)	Pt(0) 0,02M (wt%)
HA-PEI-2,5-1	1,8 ± 0,1		HA-PEI-2,5-1	1,7 ± 0,2	
HA-PEI-2,5-24	2,6 ± 0,2		HA-PEI-2,5-24	1,4 ± 0,2	
HA-PEI-5-1	3,1 ± 0,5	3,5 ± 0,3	HA-PEI-5-1	1,7 ± 0,2	2,8 ± 0,2
HA-PEI-5-24	3,1 ± 0,4		HA-PEI-5-24	3,8 ± 0,3	

Per verificare che le Pt_{NPs} siano supportate sulla superficie, il campione HA-PEI-2,5-24 è stato caratterizzato mediante microscopia TEM.

Le immagini a due diversi ingrandimenti (*Figura 18a e 18b*) mostrano la presenza di particelle scure di grandezza diversa attribuibili a Pt_{NPs} . Queste nanoparticelle metalliche sono localizzate sulla superficie e hanno dimensioni di circa 5 nm.

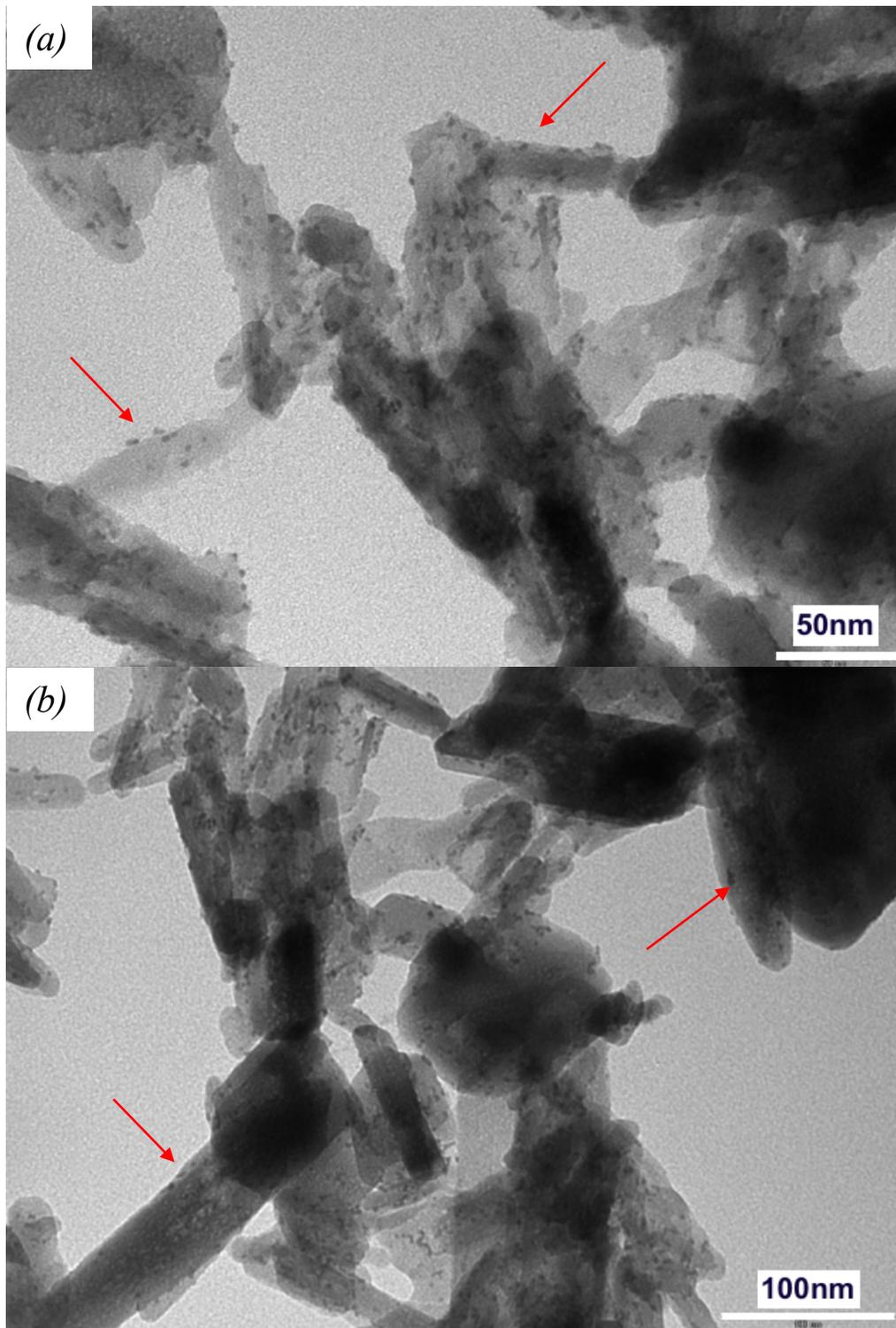


Figura 18 Immagini TEM del campione HA-PEI con Pt_{NPs} a due diversi ingrandimenti.

TERZA SERIE. I campioni di questa serie sono stati ridotti e analizzati all'assorbimento atomico (Tabella 8). Da notare che in questo caso i campioni da 1 h non sono stati ridotti in quanto presentavano un contenuto di platino molto basso.

Tabella 8 Concentrazione Pt(0) campioni della TERZA SERIE.

CAMPIONE	Pt(0) 0,01M (wt%)	Pt(0) 0,02M (wt%)
HA-2,5(10)-1		
HA-2,5(10)-24	2,0 ± 0,2	
HA-5(10)-1		0,5 ± 0,2
HA-5(10)-24	1,6 ± 1,8	4,3 ± 0,3

Anche in questi campioni, a seguito dell'aggiunta dell'agente riducente, il loro colore vira velocemente da una colorazione bianco-rosato a nero (Figura 19).

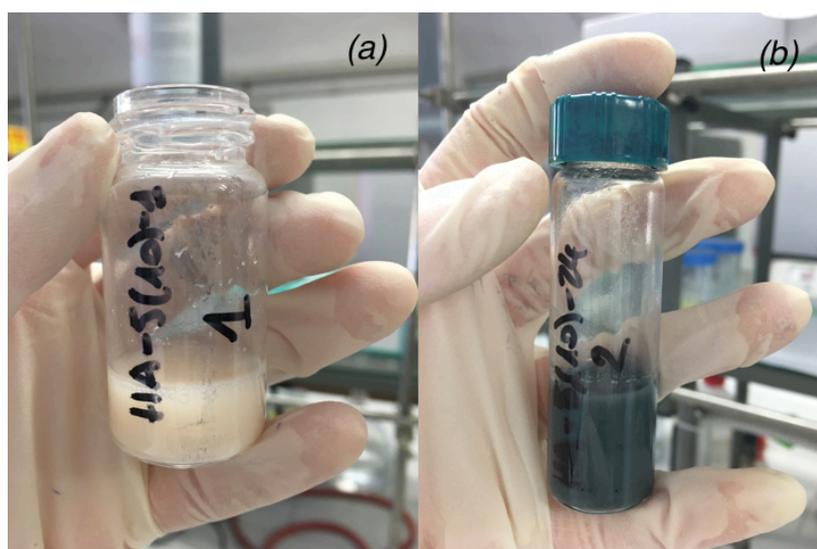


Figura 19 (a) Campione di HA non ridotto con NaBH_4 ; (b) campione dopo riduzione.

Il campione HA-2,5(10)-24 è stato analizzato mediante TEM per verificare la presenza delle Pt_{NPs} supportate sulla superficie. Dalle immagini ottenute a due diversi ingrandimenti (Figura 20a e 20b) si nota che le dimensioni delle nanoparticelle di platino sono le stesse rispetto al campione della SECONDA SERIE, cioè dimensioni di circa 5 μm , cosa che indica che le dimensioni non sono in funzione del supporto. Si nota anche che la supportazione delle NPs non va a variare la morfologia del substrato e che le

particelle metalliche sono localizzate sulla superficie del supporto e non sono libere nell'ambiente.

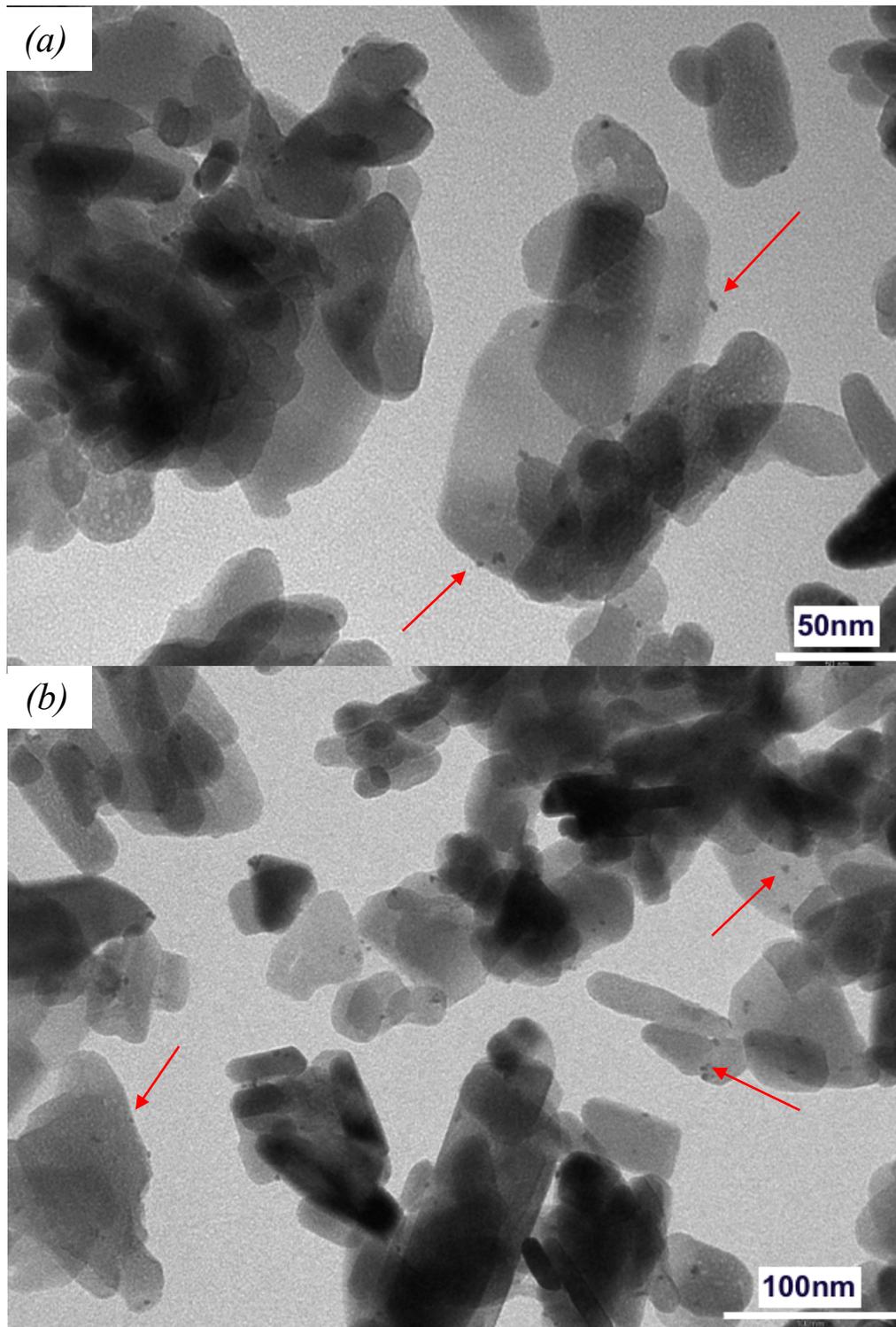


Figura 20 Immagini TEM campione HA con Pt_{NPs} a due diversi ingrandimenti.

QUARTA SERIE. I campioni preparati sono stati ridotti e è stata determinata la quantità di platino presente attraverso l'assorbimento atomico (*Tabella 9*).

Tabella 9 Concentrazione Pt(0) campioni della *QUARTA SERIE*.

CAMPIONE	Pt(0) 0,01M (wt%)	Pt(0) 0,02M (wt%)
HA-PEI-2,5(10)-1	1,5 ± 0,2	
HA-PEI-2,5(10)-24	1,5 ± 0,2	
HA-PEI-5(10)-1	1,7 ± 0,2	2,5 ± 0,1
HA-PEI-5(10)-24	1,5 ± 0,2	

Dall'analisi non si notano variazioni nella concentrazione delle Pt_{NPs} tra i diversi campioni con concentrazione di 0,01 M, mentre vi è un aumento nella quantità di platino nel campione con concentrazione doppia.

2.1.4 Scale-up

Questi campioni sono stati preparati seguendo il metodo utilizzato per i campioni della *SECONDA SERIE* usando 0,5 g di substrato anziché 0,1 g.

- substrato: 0.5 g HA-PEI
- soluzione: K₂PtCl₄ 0,01 M e 0,02 M
- pH: 5

Lo scopo è stato quello di verificare se vi sono delle variazioni nella supportazione delle Pt_{NPs}, utilizzando dei campioni che contengono una quantità maggiore di substrato e anche verificare la riproducibilità dei dati.

Sono stati preparati i campioni di scale-up (non ridotti e ridotti) e, come descritto nei paragrafi precedenti sono stati analizzati mediante assorbimento atomico. Per quanto riguarda la verifica della riproducibilità ogni tipologia di campione è stato preparato tre volte in tempi diversi e ogni volta stato preparato in doppio riducendo uno solo dei due. I valori medi ottenuti sono riportati nella *Tabella 10*.

Tabella 10 Concentrazione Pt(II) e Pt(0) campioni di SCALE-UP e potenziale zeta

CAMPIONE non ridotto	ζ (mV)	Pt(II) wt%	CAMPIONE ridotto	ζ (mV)	Pt(II) wt%
5HA-PEI-2,5(0,01)-1	20.1	1,7 ± 0,2	5HA-PEI-2,5(0,01)-1	3.06	1,7 ± 0,2
5HA-PEI-5(0,01)-1	16.1	1,5 ± 0,2	5HA-PEI-5(0,01)-1	6.72	1,6 ± 0,2
5HA-PEI-5(0,02)-1	16.3	1,6 ± 0,2	5HA-PEI-5(0,02)-1	-1.67	1,5 ± 0,2

Il campione 5HA-PEI-2,5(0,01)-1 è stato successivamente ripreparato in 8 batch diversi e la media dei valori di Pt(0) wt% ottenuta pari a $1,9 \pm 0,2$ è risultata coerente con i valori riportata in tabella a riprova della estrema riproducibilità del metodo.

Inoltre sempre in *Tabella 10* sono anche riportati i valori di potenziale zeta che mostrano una significativa diminuzione di questo parametro passando da Pt(II) a Pt(0).

2.1.5 Trattamento termico

Dalle analisi ai raggi X condotte su diversi campioni non è mai stato possibile distinguere i picchi relativi al Pt_{NPs}; per questo motivo il campione di scale-up 5HA-PEI-2,5(0,01)-24 è stato sottoposto a trattamento termico a 700 °C per 4 h. Lo scopo di questo trattamento è di indurre un'agglomerazione delle Pt_{NPs} in modo tale da rendere i picchi più intensi e più facili da individuare nel diffrattogramma.

In *Figura 21* il diffrattogramma di questo campione è stato sovrapposto a quello non trattato termicamente (già riportato di *Figura 17* di pag. 38). Inoltre sono anche riportati i segnali relativi alla struttura cristallina dell'idrossiapatite esagonale (PDF 9-432, linee verticali nere) e quelli relativi al platino metallico (PDF 87-646, linee verticali verdi). Dal confronto dei due diffrattogrammi si può notare che dopo il trattamento termico i picchi a 39,8 2 θ e a 46,3 2 θ sono più intensi e visibili rispetto a quanto osservato nel caso del campione HA-PEI-Pt(0) non trattato termicamente.

Questo campione è stato analizzato al TEM (*Figura 22*). Le immagini mostrano delle nanoparticelle di dimensioni di ca. 30 nm, dimensioni maggiori rispetto al campione non trattato termicamente con Pt_{NPs} di 5 nm circa, a conferma dell'avvenuta sinterizzazione delle particelle grazie alle alte temperature.

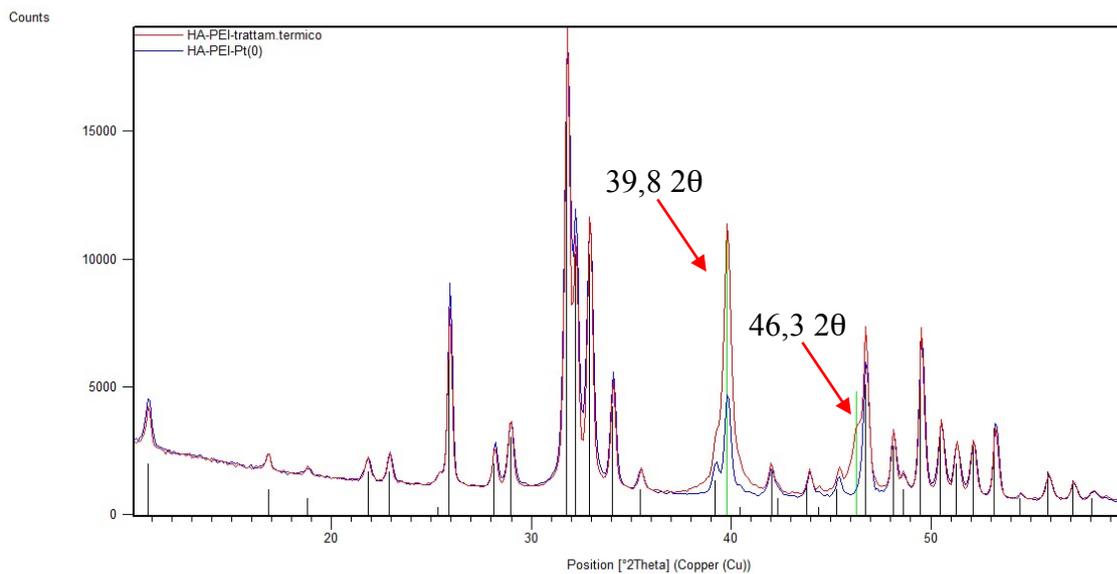


Figura 21 *Diffattogrammi di HA-PEI-Pt(0) prima (in blu) e dopo trattamento termico (in rosso) comparato con PDF 9-432 (HA, linee verticali nere) e PDF 87-646 (Pt(0), linee verticali verdi).*

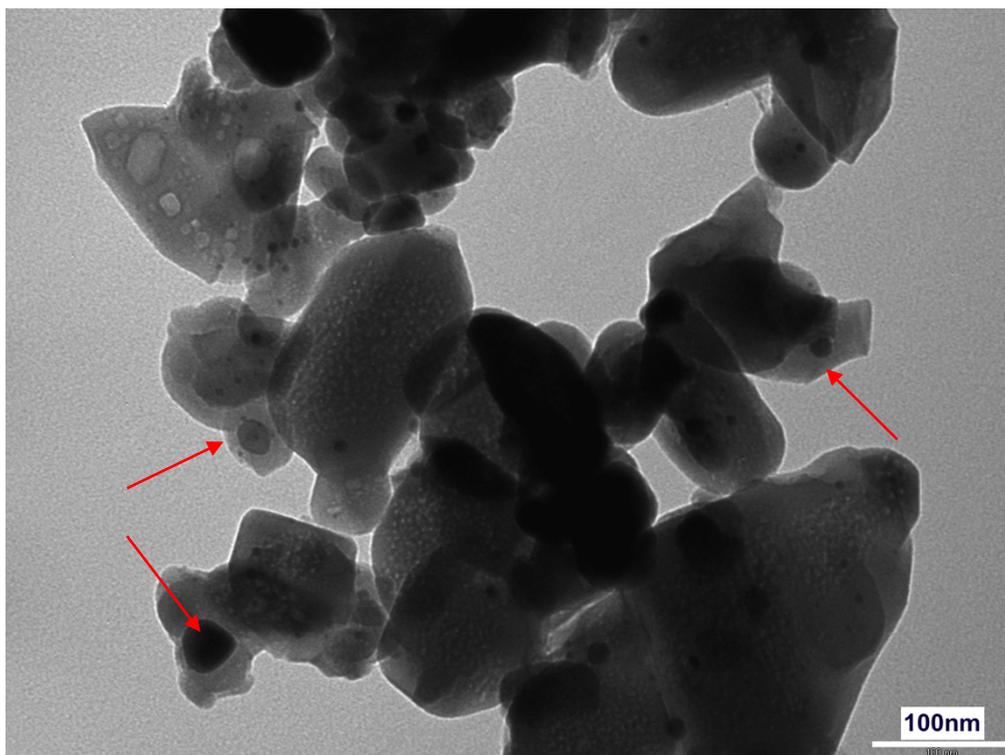


Figura 22 *Immagine TEM campione HA-PEI trattato termicamente.*

2.1.6 Ulteriori prove

Sono stati preparati altri campioni seguendo il metodo della SECONDA SERIE utilizzando però un substrato di sola HA con granulometria di 125 μm rispetto ai campioni della SECONDA SERIE da 40 μm . Questi campioni sono stati analizzati mediante analisi di assorbimento atomico per determinare la quantità di platino assorbita sui campioni. I risultati ottenuti sono riportati nella *Tabella 11*.

Tabella 11 Concentrazione Pt(II) e Pt(0) campioni con granulometria di 125 μm .

CAMPIONE	Pt(II) 0,01M (wt%)	Pt(II) 0,02M (wt%)	Pt(0) 0,01M (wt%)	Pt(0) 0,02M (wt%)
HA-2,5-1	0,2 \pm 0,2		0,2 \pm 0,2	
HA-2,5-24	1,8 \pm 0,2		1,5 \pm 0,2	
HA-5-1	0,3 \pm 0,2	0,4 \pm 0,2	0,6 \pm 0,2	0,3 \pm 0,2
HA-5-24	2,4 \pm 0,2	2,3 \pm 0,2	1,6 \pm 0,2	1,8 \pm 0,2

Da questa analisi si può notare come vi sia una netta differenza tra i campioni da 1 h rispetto a quelli di 24 h. Questo perché l'assorbimento di platino, vista l'assenza di PEI in grado di legare e stabilizzare le nanoparticelle, è strettamente legata al tempo di contatto tra la soluzione di platino e il substrato; maggiore è il tempo di contatto maggiore sarà la quantità di platino presente sul campione.

Sempre su HA con granulometria di 125 μm si è successivamente assorbito il PEI e i campioni ottenuti sono stati analizzati con analisi termogravimetriche per determinare la quantità di PEI assorbita sulla superficie. Dai termogrammi (*Figura 23*) si evince che la quantità di PEI in grado di assorbirsi è attorno al 3-4 %, quindi leggermente inferiore a quanto osservato per i campioni in cui il PEI è stato inserito durante la sintesi della HA come descritto nel paragrafo 2.1.1 (circa 5-6 %).

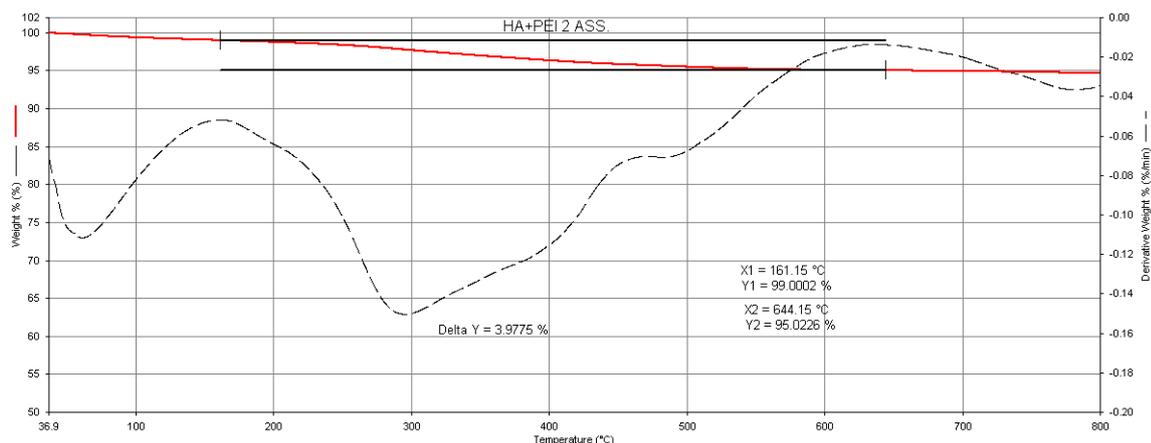


Figura 23 Termogramma campione HA-PEI 125 μm .

L'idrossiapatite funzionalizzata in seguito con il PEI è stata utilizzata per preparare dei campioni per l'assorbimento del platino e successiva riduzione. In *Tabella 12* è riportata la quantità di platino presente su tutti i campioni.

Tabella 12 Contenuto di platino nei campioni di HA da 125 μm con PEI assorbito

CAMPIONE	Pt(II) 0,01M (wt%)	Pt(II) 0,02M (wt%)	Pt(0) 0,01M (wt%)	Pt(0) 0,02M (wt%)
HA-PEI-2,5-1	1,6 \pm 0,2		0,6 \pm 0,2	
HA-PEI-5-1	1,4 \pm 0,2	1,9 \pm 0,2	0,5 \pm 0,2	0,5 \pm 0,2

Da questa analisi si nota che vi è una netta diminuzione della quantità di platino tra i campioni ridotti e quelli non ridotti, mentre non si notano variazioni consistenti tra i campioni con concentrazione di 0,01 M rispetto a quelli di concentrazione doppia.

Un altro campione di HA da 125 μm è stato sinterizzato in stufa a 900 ° per 6 h e successivamente funzionalizzato con il PEI. Prima di essere utilizzato è stato analizzato mediante analisi termogravimetriche per verificare la presenza di PEI assorbita sulla superficie del substrato. Da questa analisi tuttavia non risulta essersi assorbito nessun contenuto di PEI, per questo motivo questo campione non è stato utilizzato per ulteriori prove di assorbimento del platino.

Anche un altro calcio fosfato, il β -tricalciofosfato (abbreviato β -TCP, *Tabella 1 Cap. 1*) è stato sintetizzato e successivamente utilizzato per funzionalizzarlo con il PEI, prima di utilizzarlo per l'assorbimento del platino è stato analizzato tramite la TGA.

Dall'analisi termogravimetrica non si osserva la presenza di PEI sul campione. Visto l'assenza di PEI anche questo campione non è stato utilizzato.

2.2 Parte sperimentale

2.2.1 Materiali

Per la sintesi di idrossiapatite e idrossiapatite funzionalizzata con il PEI sono stati utilizzati i seguenti reagenti: calcio nitrato tetraidrato $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (>99%, M.W. 236,15 g/mol, CAS 134677-34-6, 31218 Sigma Aldrich); diammonio idrogeno fosfato $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (>98%, M.W. 132,06 g/mol, CAS 7783-28-0, 215996 Sigma Aldrich); ammoniaca NH_3 (28.0-30.0 wt%, CAS 1336-21-6, 221228 Sigma Aldrich); PEI (50% w/w, $M_w \sim 2000$, CAS 9002-98-6, n.408700 Aldrich).

Per la sintesi di nanoparticelle di platino sono stati utilizzati i seguenti reagenti: potassio tetracloro platinato K_2PtCl_4 (98%, M.W. 415,11 g/mol, STREM-Chemicals); sodioboroidruro NaBH_4 (99%, CAS 16940-66-2 Sigma-Aldrich).

Per le analisi di assorbimento atomico è stato utilizzato lo standard di platino per AAS 1000 mg/L HCl (5% w/w, n.47037 Sigma-Aldrich); acido nitrico HNO_3 (67%, M.W. 63,01 g/mol, Normatom).

Tutte le sintesi e caratterizzazioni sono state condotte in acqua Milli-Q (~18,5 $\text{M}\Omega \cdot \text{cm}$). Tutti i reagenti sono stati utilizzati tal quale senza ulteriori purificazioni.

2.2.2 Strumentazione

Le analisi di diffrazione a raggi X (XRD) sono state ottenute attraverso lo strumento PANalytical X'PERT Pro equipaggiato con un rivelatore X'Celerator e utilizzando come sorgente un tubo di Cu ($\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$, 40 mA, 40kV). Sono state utilizzate le slitte DS (divergent slit) $\frac{1}{2}$ e ASS (anti-scatter slit) $\frac{1}{2}$, il range per 2θ è stato misurato da 10° a 60° con step di $0,1^\circ$ e tempo per step di ~100". Le analisi sono puramente qualitative e i

diffattogrammi ottenuti sono stati comparati al database ICDD (International Center for Diffraction Data)¹.

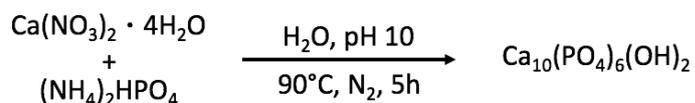
La quantità di platino presente nei campioni è stata determinata attraverso analisi di assorbimento atomico (AAS) con lo spettrometro THERMO iCE 3000 Series Atomic Absorption Spectrofotometer, fiamma di aria-acetilene (1 L/minuto), lampada di platino con lunghezza d'onda di $\lambda = 266.0$ nm. I campioni sono stati preparati aggiungendo ca. 5 mg di polvere in 25 ml di HNO₃ 0.5 M. La retta di calibrazione è stata preparata con 5 standard (2, 4, 6, 8, 10 ppm).

Le immagini al microscopio elettronico a trasmissione (TEM) sono state ottenute attraverso lo strumento Philips CM 100 operante a 80 kV. Una piccola aliquota di campione è stata dispersa in etanolo e sonicata per 30 s. Una goccia di campione è stata depositata su una griglia di rame e lasciato asciugare in aria.

Le analisi termogravimetriche sono state effettuate attraverso lo strumento Perkin Elmer TGA-7. Il riscaldamento è stato effettuato in un crogiolo di platino, ad una velocità di 10 °C/minuto da 40°C a 800°C.

Il potenziale zeta è stato misurato utilizzando lo strumento Malvern Zetasizer Nano series Nano SZ. I campioni sono stati preparati sospendendo 5 mg di polvere in 50 ml di acqua e sonicati per 4 minuti.

2.2.3 Sintesi di HA e HA-PEI



La sintesi di idrossiapatite è stata seguita una procedura già riportata in letteratura.¹⁰ In un pallone a tre colli con condensatore, vengono aggiunti 50 ml di Ca(NO₃)₂ · 4H₂O 1.08 M (12.752 g in acqua decarbonata), riscaldati a 90 °C, agitati con agitatore magnetico e pH aggiustato a 10 con NH₄OH, sotto azoto. Una volta raggiunta la temperatura viene fatta gocciolare per 20 minuti una soluzione di 50 ml di (NH₄)₂HPO₄ 0,65 M (4,292 g in

¹ PDF 9-432 e PDF 87-646

acqua decarbonata, precedentemente sciolti in un matraccio) e una volta finito si ricontrolla il pH. Il precipitato che si forma viene mantenuto sotto agitazione e sotto azoto per 5 ore a 90 °C, controllando periodicamente sia la temperatura che il pH della soluzione, andando ad aggiustarli se necessario. Successivamente viene raffreddato sotto azoto e poi centrifugato a 10000 rpm per 10 minuti e lavato per 3 volte con acqua distillata priva di CO₂. Il prodotto viene lasciato seccare a 37 °C per almeno 24 ore.

La funzionalizzazione di HA con il PEI è stata ottenuta aggiungendo alla soluzione di calcio il PEI 4 M (31,85 ml) e seguendo la procedura precedentemente descritta.

Tutti i campioni sintetizzati sono stati setacciati con setaccio con maglie di diametro di $\phi=0.040$ mm.

L'acqua decarbonata è stata preparata riscaldando 2 L di acqua distillata in un pallone con un condensatore e sotto azoto per 1 ora. Successivamente viene raffreddata sempre sotto azoto in un bagno di ghiaccio e immagazzinata in bottiglie di vetro precedentemente purificate con azoto.

2.2.4 Interazione Pt(II) con il substrato

La preparazione della soluzione di platino necessaria per la supportazione del platino sulla superficie del substrato varia da serie a serie. Infatti sono state preparate diversi tipi di soluzione per le diverse serie:

- PRIMA SERIE: soluzione di K₂PtCl₄ e PEI a pH naturale di ca. 5;
- SECONDA SERIE: soluzione di solo K₂PtCl₄ a pH naturale di ca. 5;
- TERZA SERIE: soluzione di solo K₂PtCl₄ a pH corretto con una soluzione acquosa di ammoniaca al 28 wt% a 10;
- QUARTA SERIE: soluzione di solo K₂PtCl₄ a pH corretto con una soluzione acquosa di ammoniaca al 28 wt% a 10;
- QUINTA SERIE: soluzione di K₂PtCl₄ e PEI a pH corretto con una soluzione acquosa di ammoniaca al 28 wt% a 10.

Tutti i campioni sono stati preparati pesando 0.1 g di substrato (HA o HA-PEI) e aggiungendo 5 ml o 2.5 ml o 0.5 ml della soluzione di platino preparata e successivamente portando a 5 ml con acqua. I diversi campioni sono stati messi in

agitazione magnetica per 1 h o 24 h, successivamente filtrati e lavati con acqua e lasciati asciugare in incubatore a 37 °C per almeno 24 ore.

PRIMA SERIE. Preparati 50 ml di soluzione madre di K_2PtCl_4 0,05 M e PEI 1800 con rapporto 10:1 e portata a volume con acqua. Successivamente 10 ml di soluzione madre sono stati diluiti in 50 ml di acqua, questa soluzione è stata aggiunta ai diversi campioni di 0.1 g di HA in quantità di 5 ml, 2.5 ml e 0.5 ml rispettivamente e aggiunta acqua per portare tutti i campioni allo stesso volume di soluzione di 5 ml.

SECONDA SERIE. In questa serie la soluzione contiene solo platino, è stata preparata direttamente la soluzione di 20 ml K_2PtCl_4 0,01 M e portato a volume con acqua. Il pH naturale della soluzione misurato è di 5.15. Oltre alla soluzione di K_2PtCl_4 0,01 M è stata preparata anche la soluzione 0,02 M. I campioni sono stati preparati aggiungendo a 0.1 g di HA-PEI 5 ml, 2.5 ml e 0,5 ml di soluzione e aggiunti 2.5 ml o 4.5 ml di acqua nei due campioni con minor volume di soluzione per avere tutti i campioni con lo stesso volume di soluzione, ovvero 5 ml.

TERZA SERIE. Il pH della soluzione di 20 ml di K_2PtCl_4 0,01 M è stato portato a 10 con NH_3 conc. e questa soluzione è stata utilizzata tal quale per preparare i campioni contenenti 0.1 g di HA.

QUARTA SERIE. La soluzione utilizzata per questa serie è una soluzione di 20 ml di K_2PtCl_4 0,01 M alla quale è stato corretto il pH con NH_3 conc. e portato a pH 10.

QUINTA SERIE. Per questa serie sono state preparate due diverse soluzioni contenenti sempre platino e PEI ma sono state preparate in modo differente. La prima soluzione di 50 ml di K_2PtCl_4 0,05 M è stata preparata aggiungendo 40 ml di acqua al K_2PtCl_4 , successivamente il pH è stato portato a 10 con NH_3 conc. e poi è stato aggiunto il PEI e portato la soluzione a volume con acqua, PEI in rapporto 1:10 rispetto al K_2PtCl_4 . Successivamente questa soluzione è stata diluita per ottenere una soluzione di K_2PtCl_4 0,01 M. La seconda soluzione è stata preparata aggiungendo alla soluzione di K_2PtCl_4 0,01 M a pH 10, una soluzione di PEI sciolto in acqua, sempre in rapporto 1:10.

2.2.5 Riduzione Pt(II) e formazione di nanoparticelle

La riduzione dei precursori di Pt(II) per ottenere le Pt_{NPS} è stata eseguita aggiungendo al campione da ridurre 5 ml di una soluzione NaBH₄ preparata pesando ca. 0.05 g di NaBH₄ in 20 mL in acqua in largo eccesso, mantenendola in agitazione con agitatore magnetico per 30 minuti. Successivamente il campione viene filtrato su imbuto buckner e lavato con acqua, infine essiccato a 37 °C per almeno 24 ore.

2.2.6 Scale-up

I campioni di scale-up sono stati preparati seguendo il metodo utilizzato per i campioni della SECONDA SERIE, pesando 0.5 g di substrato di HA-PEI e utilizzando la soluzione di K₂PtCl₄ di concentrazione 0.01 M o 0.02 M. Per quanto riguarda la supportazione del platino sul substrato ai campioni sono stati aggiunti 25 ml o 12.5 ml di soluzione di platino (aggiunti a quest'ultimo 12.5 ml di acqua per ottenere lo stesso volume di soluzione del campione da 25 ml) e posti in agitazione magnetica per 1 h o 24 h in base al campione da preparare. I campioni poi sono stati filtrati e lavati con acqua e posti in incubatore a 37 °C per almeno 24 ore.

Per la riduzione del platino i campioni sono stati messi in agitazione con 5 ml di acqua, successivamente viene aggiunta una soluzione acquosa di 20 ml di NaBH₄ in eccesso e ridotti sotto agitazione per 30'. Successivamente il campione viene filtrato su imbuto buckner e lavato con acqua, infine essiccato a 37 °C per almeno 24 ore.

Ad un campione di scale-up è stato eseguito un trattamento termico a 700 °C per 4 h.

2.2.7 Ulteriori prove

Sono state preparate varie sintesi di HA come spiegato nel punto 2.2.3, tutte setacciate con un setaccio da 125 µm e rimossa la polvere con diametro minore di 40 µm.

La polvere con granulometria da 125 µm è stata utilizzata per preparare ulteriori campioni: una parte è stata utilizzata per preparare dei campioni ai quali sono stati fatti assorbire dei precursori di platino e successivamente ridotti per ottenere delle nanoparticelle, seguendo sempre il metodo utilizzato per preparare i campioni della SECONDA SERIE; un'altra parte è stata utilizzata per andare ad assorbire il PEI sul

substrato pesando 0.5 g di polvere di HA messa in agitazione con 16.8 ml di H₂O e 3.2 ml di PEI per 4 h, successivamente centrifugati e lavati con acqua e essiccati a 37 °C per una notte.

Sono stati sinterizzati circa 6 g di polvere di HA in stufa a 900 °C per 6 h e lasciata raffreddare a temperatura ambiente. Successivamente si è andato ad assorbire il PEI sulla polvere sinterizzata, mettendo in agitazione una soluzione di 20 ml composta da 16.8 ml di acqua e 3.2 ml di PEI per 4 h, successivamente centrifugata e lavata con acqua e essiccati a 37 °C per 24 h.

È stato sintetizzato un diverso calcio fosfato il β -TCP (β -Ca₃(PO₄)₂) pesando 11.121 g di CaCO₃ e 38.242 g di DCPD (CaHPO₄• 2H₂O) mescolando le due polveri in un mortaio e successivamente posti in stufa a 1000 °C per 5 h. Un campione da 0.5 g è stato messo in contatto per 24 h con una soluzione acquosa di 20 ml di PEI, composta da 16.8 ml di acqua e 3.2 ml di PEI, in modo tale da assorbirlo sulla superficie.

2.3 Conclusioni

La supportazione di Pt_{NPs} sul substrato di HA o HA-PEI è avvenuta con successo anche se, dalle caratterizzazioni effettuate sui materiali sintetizzati, si può notare che sia le caratteristiche del substrato che quelle della soluzione iniziale di Pt(II) influenzano l'assorbimento delle Pt_{NPs}.

Tutte le prove effettuate indicano quanto segue:

- 1) La SECONDA SERIE in cui una soluzione di Pt(II) a pH spontaneo di ca. 5 viene supportata su HA-PEI rappresenta il metodo di preparazione più semplice ed efficace e che porta a valori di contenuto di platino altamente riproducibili. I valori della QUARTA SERIE, simile alla SECONDA SERIE ma che si differenzia per il pH della soluzione di Pt(II), risultano essere comparabili ai valori della SECONDA SERIE. Tuttavia è stato deciso che per semplicità sarebbe stato seguito il metodo che non comporta una modifica del pH.
- 2) I risultati della TERZA SERIE, in cui si è usato HA non modificata a pH 10 sono caratterizzati da una minore quantità del contenuto di platino supportato rispetto a quanto osservato per HA-PEI mentre la QUINTA SERIE si distingue per la erraticità e scarsa riproducibilità dei risultati.

In tutte le serie si può notare che la concentrazione di platino nei campioni ridotti è minore rispetto agli stessi campioni che non sono stati ridotti con NaBH_4 . Nel *Grafico 1* viene riportato un esempio relativo ai dati della QUARTA SERIE comparando i valori dei campioni non ridotti e quelli ridotti.

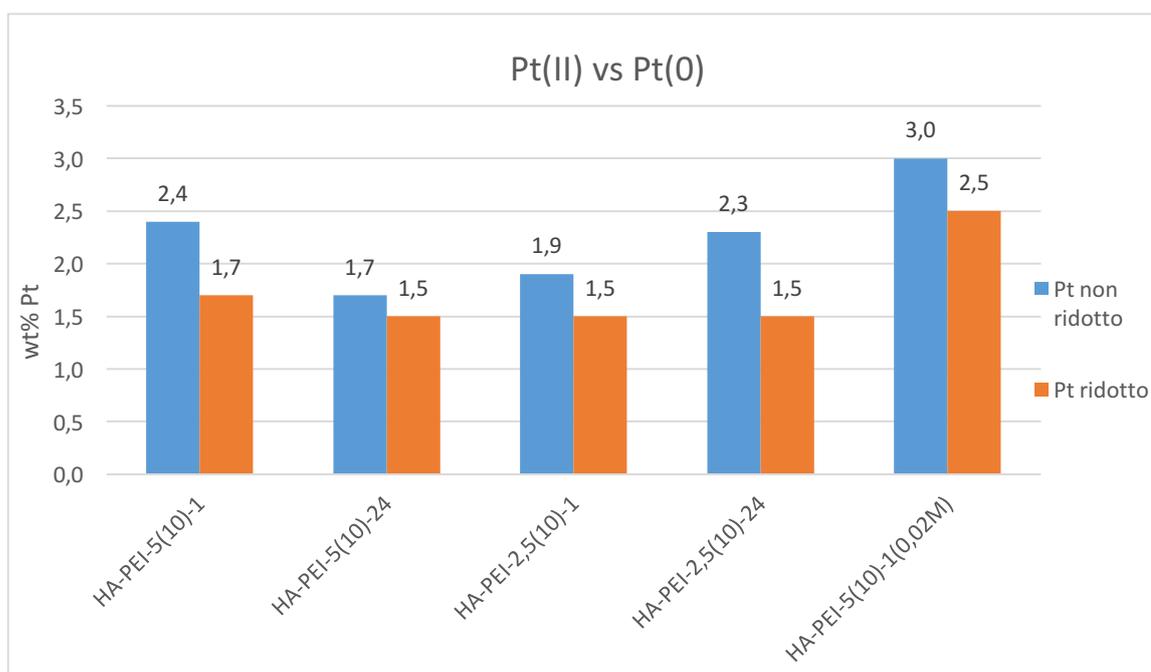


Grafico 1 Valori di Pt(II) e Pt(0) nei campioni della QUARTA SERIE.

Dalle analisi effettuate su tutti i campioni delle diverse serie si nota un andamento simile confrontando i campioni preparati con una concentrazione di platino di 0.01 M rispetto ai campioni preparati con concentrazione doppia di 0.02 M. Nel *Grafico 2* sono stati comparati i campioni della SECONDA SERIE a diversa concentrazione, il quale mostra un aumento del contenuto di platino aumentando la concentrazione della soluzione di K_2PtCl_4 utilizzata per preparare i campioni.

Mentre nel *Grafico 3* si nota una notevole dipendenza dal tempo di reazione della concentrazione di platino, per i campioni della TERZA SERIE i quali presentano un substrato di HA senza PEI.

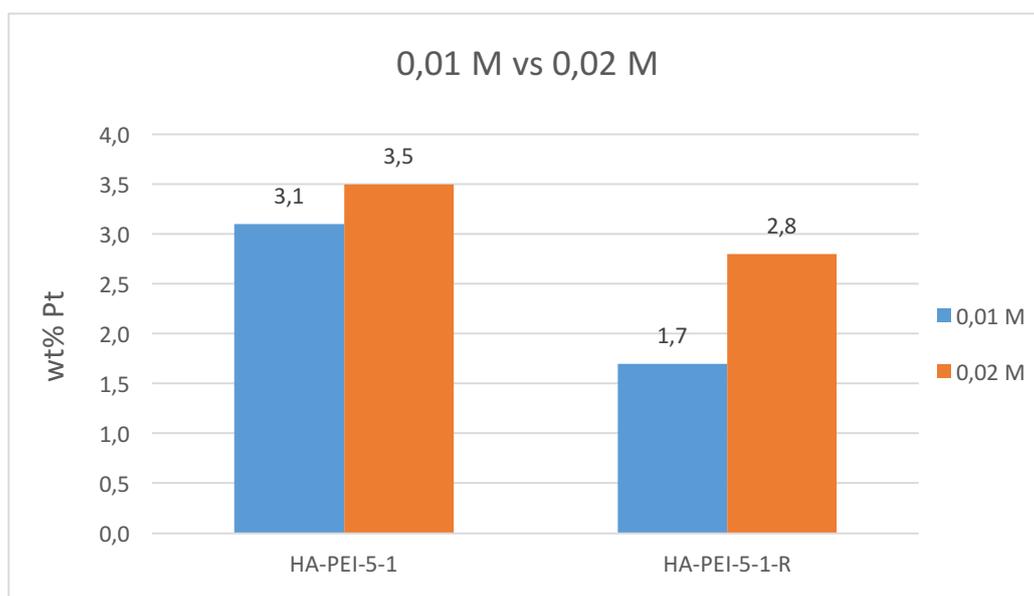


Grafico 2 Valori di Pt(II) e Pt(0) nei campioni della SECONDA SERIE a concentrazione 0.01 M e 0.02 M.

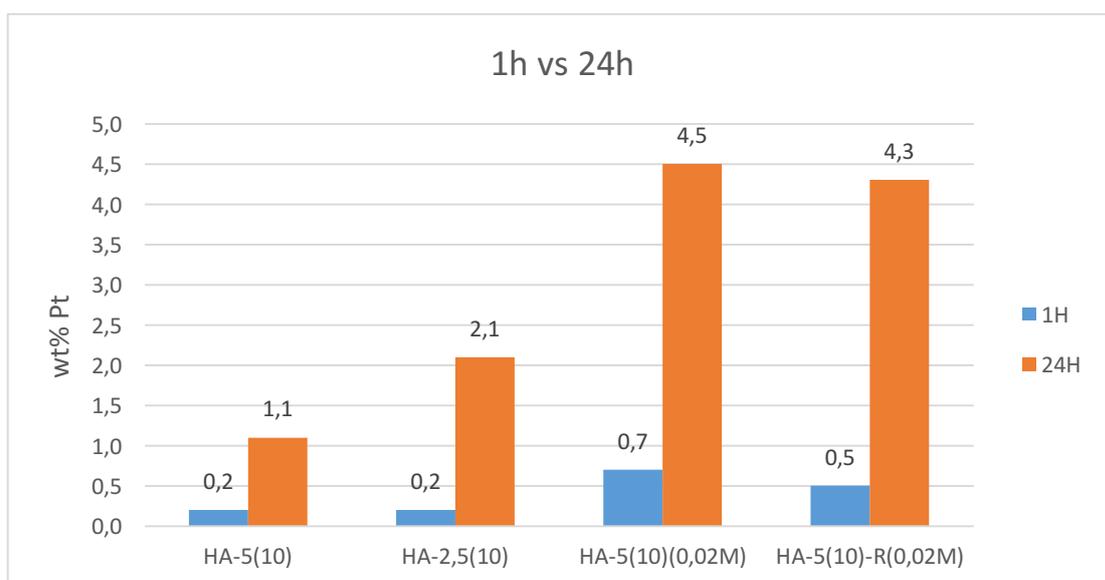


Grafico 3 Valori di Pt(II) e Pt(0) nei campioni della TERZA SERIE da 1 h e 24 h.

L'analisi ai raggi X mostra che, in presenza di PEI, l'idrossiapatite sintetizzata diventa più cristallina provocando così un restringimento dei picchi nei diffrattogrammi acquisiti. Il contenuto di PEI funzionalizzato sulla superficie è stato determinato attraverso analisi termogravimetriche, le quali riportano una concentrazione di PEI intorno al 5-6%.

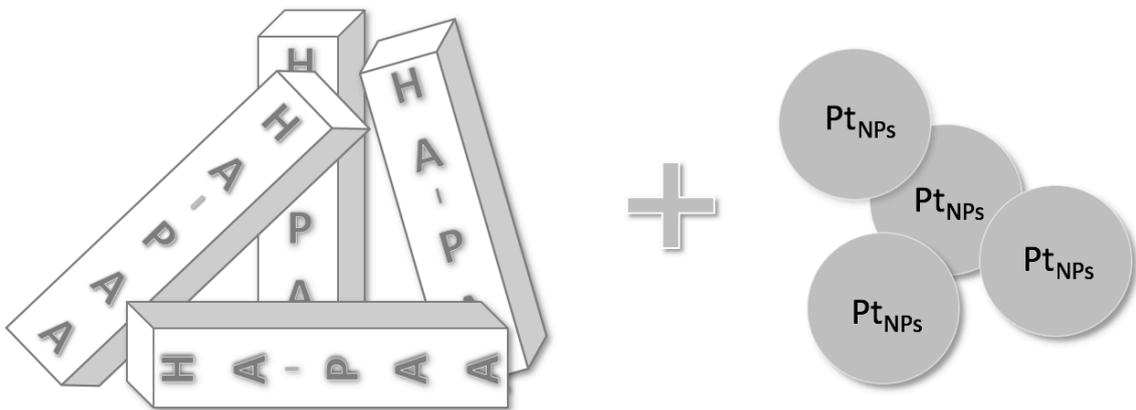
La presenza di PEI e quindi di gruppi amminici sul substrato favorisce la "cattura" dei precursori di platino e la stabilizzazione delle nanoparticelle (NPs) facendo aumentare il contenuto di platino supportato sulla superficie.

Le immagini TEM mostrano che le nanoparticelle metalliche sono sferiche ma si uniscono per formare delle catene e che sono ancorate sulla superficie e non sono libere nell'ambiente. Confrontando le immagini ottenute dal campione della SECONDA SERIE e quello della TERZA SERIE si nota che le dimensioni di circa 5 nm delle Pt_{NPs} sono le stesse e che non variano in funzione del substrato. Si può notare anche che la supportazione delle NPs di platino non modifica la morfologia dei cristalli ma che i cristalli di HA funzionalizzata con il PEI sono meno definiti e più sottili rispetto ai cristalli di HA tal quale.

Tuttavia anche se, sia attraverso l'assorbimento atomico che attraverso le immagini TEM, è stato possibile determinare la presenza di platino supportato sulla superficie, dall'analisi ai raggi X questo non risulta. Questo perché i picchi relativi al platino risultano nascosti dai picchi dell'HA. Solo dopo trattamento termico del campione, con conseguente sinterizzazione delle nanoparticelle e aumento delle loro dimensioni da ca. 5 nm a ca. 30 nm, i picchi del platino diventano più intensi e visibili.

CAPITOLO 3

3. Nanoparticelle di platino supportate su HA funzionalizzata con PAA



In questo capitolo vengono illustrate le diverse fasi di lavoro, i materiali, i processi e le diverse tecniche utilizzate per realizzare e caratterizzare i prodotti dati dalla supportazione di nanoparticelle di platino su un substrato di idrossiapatite funzionalizzata con acido poliacrilico (abbreviato in PAA), *Figura 24*.

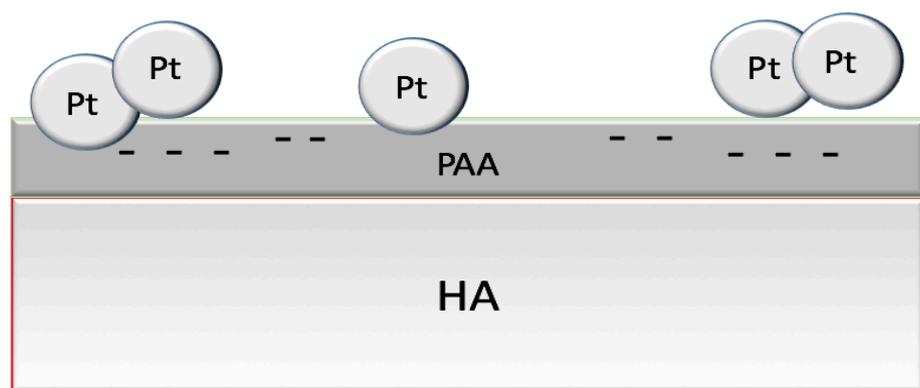
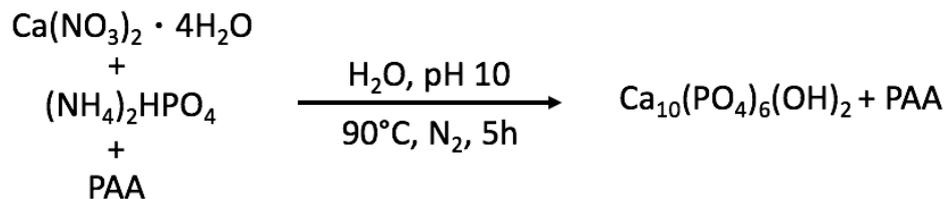


Figura 24 Substrato di HA funzionalizzato con PAA e Pt_{NPs} supportate sulla superficie.

3.1 Risultati e discussione

3.1.1 Sintesi e caratterizzazione di HA-PAA

La sintesi di idrossiapatite funzionalizzata con acido poliacrilico (HA-PAA) è riportata nello *Schema 2*. La reazione è stata effettuata mettendo in agitazione una soluzione di $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ a contatto per 5 ore con una soluzione di $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ a pH 10 e alla temperatura di $90\text{ }^\circ\text{C}$, in atmosfera inerte di azoto e aggiungendo nel pallone di reazione l'acido poliacrilico (PAA).



Schema 2 Sintesi HA-PAA

La quantità di PAA funzionalizzata sulla superficie è stata determinata attraverso l'analisi termogravimetrica (*Figura 25*), nella quale risulta che la PAA assorbita sul substrato è del 7,3 wt%.

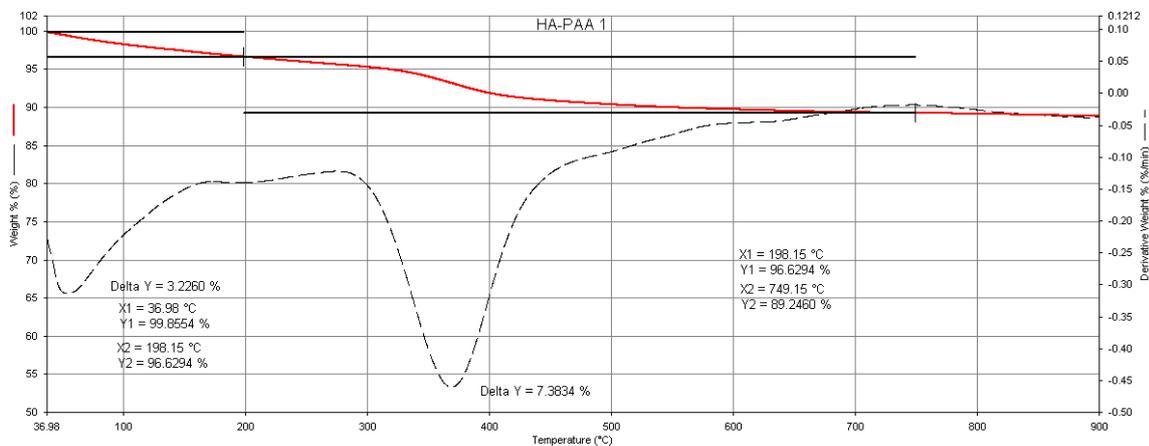


Figura 25 Termogramma campione HA-PAA.

Il campione è stato analizzato tramite diffrazione ai raggi X per verificare che non vi siano state variazioni nella struttura cristallina dell'HA funzionalizzata con la PAA (*Figura 26*). Dal diffrattogramma acquisito, comparato con il PDF 9-432 relativo all'idrossiapatite, si nota che la funzionalizzazione con PAA non porta a variazioni nella struttura cristallina dell'HA.

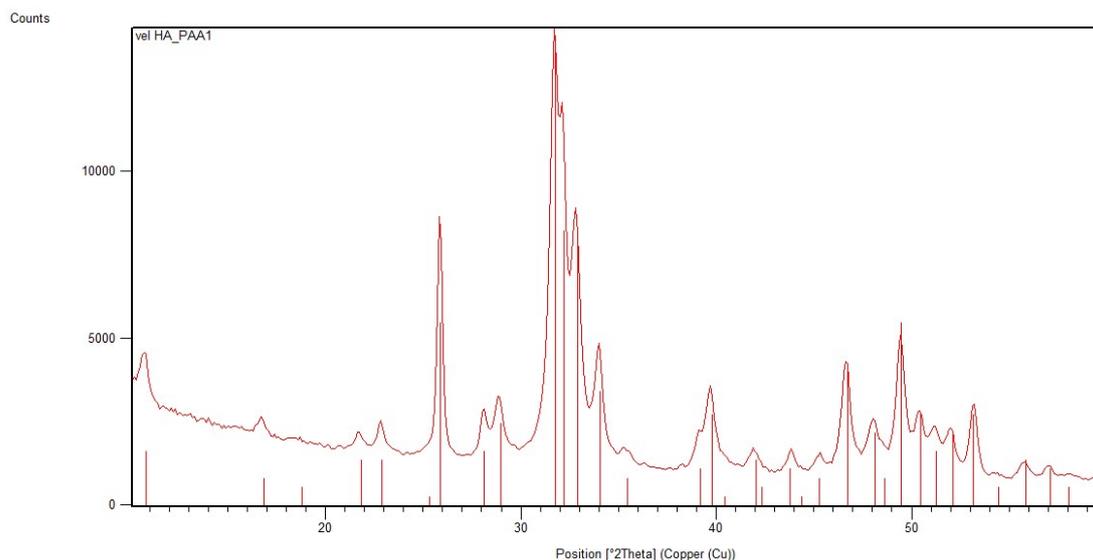


Figura 26 Diffrattogramma campione HA-PAA comparato con PDF 9-432.

La presenza di PAA sulla superficie dell'idrossiapatite varia la carica superficiale, inducendo una diminuzione del potenziale zeta che va da -11.5 mV dell'idrossiapatite tal quale, fino ai -25.4 mV dell'HA-PAA. La presenza di questa carica negativa sulla superficie favorisce l'interazione con i precursori di Pt(II) carichi positivamente.

3.1.2 Interazione Pt(II) con il substrato

Visti i risultati ottenuti nel caso del PEI, la supportazione del Pt(II) su HA-PAA è stata eseguita mettendo in contatto una soluzione 0,01 M o 0,02 M di K_2PtCl_4 e il substrato inorganico (0,1 g di HA-PAA) per 1 h, 24 h o 48 h per poter studiare come varia il contenuto di platino assorbito alla variazione del tempo e della concentrazione.

I campioni, lasciati in agitazione per 1 h e successivamente filtrati, si presentano come una polvere bianca mentre il liquido filtrato presenta una colorazione simile alla soluzione iniziale di K_2PtCl_4 (*Figura 27*); cosa che fa ipotizzare una bassa

concentrazione di platino assorbita sulla superficie e quindi che il tempo di contatto sia stato, in questo caso, troppo breve.

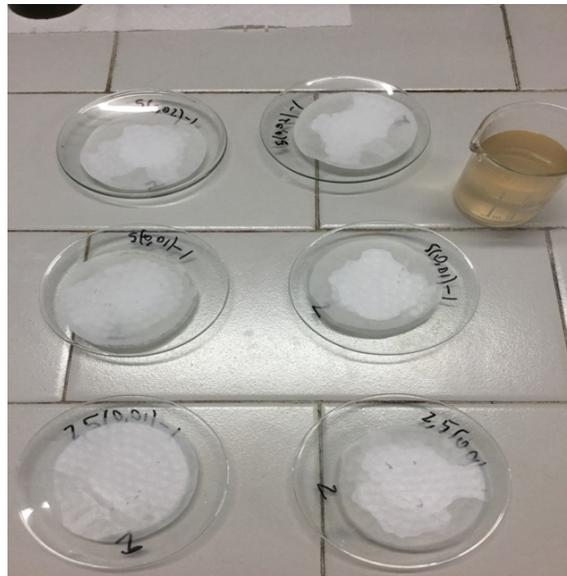


Figura 27 Campioni di HA-PAA lasciati in contatto con la soluzione di Pt(II) per 1 h.

Questo non accade per i campioni da 24 h e 48 h, i quali presentano una colorazione scura (*Figura 28*) segno evidente della presenza di platino sui campioni.

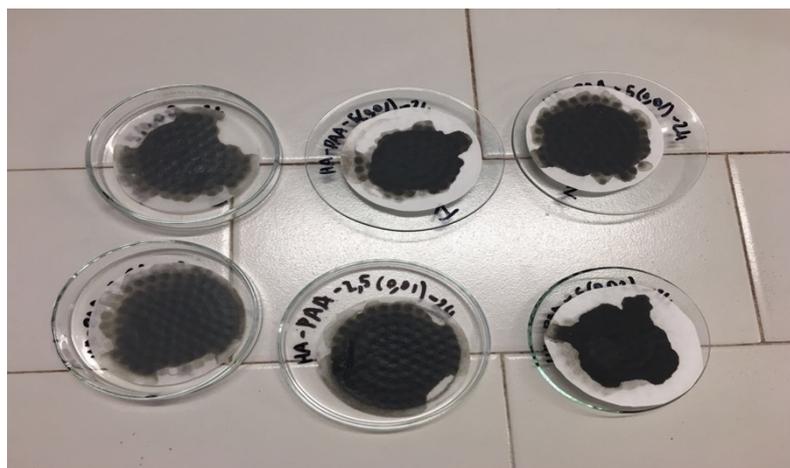


Figura 28 Campioni di HA-PAA lasciati in contatto con la soluzione di Pt(II) per 24 h.

I campioni preparati sono stati caratterizzati mediante analisi XRD; dai diffrattogrammi acquisiti non si notano variazioni nei picchi rispetto ai campioni relativi HA-PAA (Figura 29). Questo indica che la presenza di platino non modifica la fase cristallina del substrato.

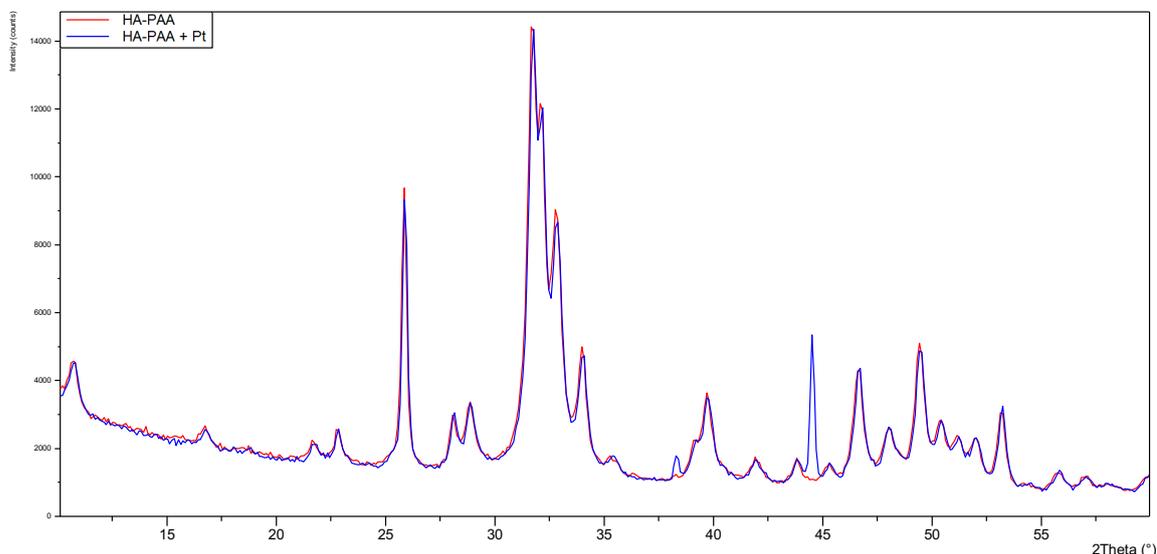


Figura 29 Confronto diffrattogramma HA-PAA e HA-PAA-Pt(II).

La quantità di Pt(II) presente nei campioni è stata determinata mediante analisi di assorbimento atomico (Tabella 13).

Tabella 13 Percentuale di Pt(II) presente nei diversi campioni di HA-PAA.

CAMPIONE	Pt(II) 0,01M (wt%)	Pt(II) 0,02M (wt%)
HA-PAA-2,5-1	0,1 ± 0,3	
HA-PAA-2,5-24	1,6 ± 0,2	
HA-PAA-2,5-48	1,6 ± 0,2	
HA-PAA-5-1	0,1 ± 0,2	0,2 ± 0,2
HA-PAA-5-24	1,7 ± 0,2	1,6 ± 0,2
HA-PAA-5-48	1,7 ± 0,2	1,8 ± 0,2

Questa analisi conferma come i campioni da 1 h abbiano un contenuto di platino molto basso mentre non si notano notevoli differenza tra i campioni da 24 h e 48 h così come per i campioni con concentrazione doppia rispetto ai campioni da 0,01 M.

3.1.3 Riduzione Pt(II) e formazione nanoparticelle

Come descritto nel capitolo 2, la riduzione è stata effettuata attraverso una soluzione di NaBH_4 . I campioni di HA-PAA da 1 h, dopo riduzione, si presentano di colore bianco a ulteriore conferma della scarsa quantità di Pt(II) presente (*Figura 30*).



Figura 30 Campioni HA-PAA-Pt(0) da 1 h.

Al contrario, i campioni ridotti da 24 h e 48 h risultano di colore nero (*Figura 31*).

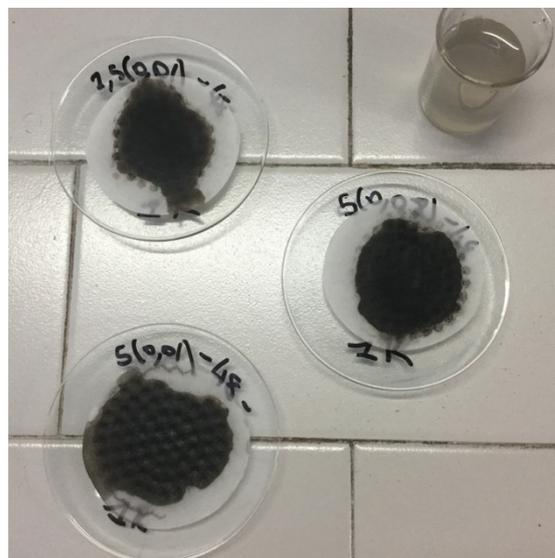


Figura 31 Campioni HA-PAA-Pt(0) da 48 h.

La quantità di Pt(0) presente nei diversi campioni è riportata in *Tabella 14*.

Tabella 14 Percentuale Pt(0) presente nei diversi campioni di HA-PAA

CAMPIONE	Pt(0) 0,01M (wt%)	Pt(0) 0,02M (wt%)
HA-PAA-2,5-1	0,3 ± 0,2	
HA-PAA-2,5-24	0,9 ± 0,2	
HA-PAA-2,5-48	0,9 ± 0,2	
HA-PAA-5-1	0,2 ± 0,2	0,2 ± 0,2
HA-PAA-5-24	1,0 ± 0,2	1,2 ± 0,2
HA-PAA-5-48	1,5 ± 0,2	1,7 ± 0,2

Anche nei campioni ridotti, come quelli non ridotti, si può notare che la quantità di platino assorbita sui campioni è legata al tempo di contatto tra la soluzione di platino e il substrato, ma che dopo le 24 h raggiunge un *plateau* e non vi è differenza tra i campioni da 24 h e quelli da 48 h.

3.1.4 Scale-up

I campioni di scale-up sono stati preparati pesando 0,5 g di substrato di HA-PAA. In *Tabella 15* sono riportati e confrontati i valori di concentrazione di platino prima e dopo la riduzione.

Tabella 15 Percentuale di Pt(II) e Pt(0) nei campioni di scale-up.

CAMPIONE	Pt(II) (wt%)	Pt(0) (wt%)
5HA-PAA-2,5(0,01)-24	1,3 ± 0,3	1,3 ± 0,3
5HA-PAA-5(0,01)-24	1,7 ± 0,3	1,4 ± 0,3
5HA-PAA-5(0,02)-24	1,7 ± 0,2	1,6 ± 0,3
5HA-PAA-2,5(0,01)-48	1,5 ± 0,3	1,5 ± 0,3
5HA-PAA-5(0,01)-48	1,7 ± 0,3	1,6 ± 0,3
5HA-PAA-5(0,02)-48	1,7 ± 0,3	1,6 ± 0,3

Dall'analisi si può notare, in linea con quanto già osservato in precedenza, una leggera diminuzione della quantità di platino nei campioni ridotti rispetto ai campioni non ridotti,

mentre non si notano variazioni tra i campioni da 24 h e quelli da 48 h, nonché nei campioni con concentrazione 0,02 M.

È stato inoltre determinato il potenziale zeta sui campioni di scale-up da 24 h e i valori ottenuti sono riportati nella *Tabella 16*. Come atteso i campioni contenenti Pt(0) risultano avere un potenziale zeta più negativo.

Tabella 16 Valori di potenziale zeta dei campioni di HA-PAA.

CAMPIONE non ridotto	ζ (mV)	CAMPIONE ridotto	ζ (mV)
5HA-PAA-2,5(0,01)-24	-12.3	5HA-PAA-2,5(0,01)-24	-23.3
5HA-PAA-5(0,01)-24	-13.1	5HA-PAA-5(0,01)-24	-17.9
5HA-PAA-5(0,02)-24	-13.0	5HA-PAA-5(0,02)-24	-19.9

3.2 Parte sperimentale

3.2.1 Materiali

I materiali utilizzati per la sintesi di HA, per la sintesi di Pt_{NPs} e per le analisi di assorbimento atomico sono gli stessi riportati nel Capitolo 2, paragrafo 2.2.1 *Materiali*.

Per la sintesi di HA-PAA è stato utilizzato PAA ($M_w \sim 1800$, CAS 9003-01-4, 323667 Sigma Aldrich).

3.2.2 Strumentazione

È stata utilizzata la stessa strumentazione con le stesse caratteristiche riportate nel Capitolo 2, paragrafo 2.2.2 *Strumentazione*.

3.2.3 Sintesi di HA-PAA

La sintesi di idrossiapatite è stata seguita una procedura già nota in letteratura.¹⁰

In un pallone a tre colli con condensatore, vengono aggiunti 50 ml di Ca(NO₃)₂ • 4H₂O 1.08 M (12.752 g in acqua decarbonata), riscaldati a 90 °C, agitati con agitatore magnetico e pH aggiustato a 10 con NH₄OH, sotto azoto. Una volta raggiunta la temperatura viene fatta gocciolare per 20 minuti una soluzione di 50 ml di (NH₄)₂HPO₄ 0,65 M e PAA 50 mM (4,292 g in acqua decarbonata e 0,3606 g rispettivamente,

precedentemente sciolti in un matraccio con acqua) e una volta finito si ricontra il pH. Il precipitato che si forma viene mantenuto sotto agitazione e sotto azoto per 5 ore a 90 °C, controllando periodicamente sia la temperatura che il pH della soluzione, andando ad aggiustarli se necessario. Successivamente viene raffreddato sotto azoto e poi centrifugato a 10000 rpm per 10 minuti e lavato per 3 volte con acqua distillata priva di CO₂. Il prodotto viene lasciato seccare a 37 °C per almeno 24 ore. Tutti i campioni sintetizzati sono stati setacciati con setaccio con maglie di diametro di $\phi=0.040$ mm.

3.2.4 Interazione Pt(II) con il substrato

Il metodo seguito per la supportazione del platino sul substrato è il metodo utilizzato nel Capitolo 2 per preparare i campioni della SECONDA SERIE, ovvero 0,1 g di substrato vengono messi in contatto con una soluzione di K₂PtCl₄ 0,01 M o 0,02 M (5 ml o 2,5 ml) e posto sotto agitazione magnetica per 1 h, 24 h o 48 h, successivamente il campione viene filtrato e lavato con acqua e infine essiccato a 37 °C per almeno una notte.

3.2.5 Riduzione Pt(II) e formazione nanoparticelle

La riduzione dei precursori di Pt(II) per ottenere delle Pt_{NPS} è stata eseguita aggiungendo al campione da ridurre 5 ml di una soluzione NaBH₄ in acqua in largo eccesso, mantenendola in agitazione con agitatore magnetico per 30 minuti. Successivamente il campione viene filtrato e lavato con acqua, infine essiccato a 37 °C per almeno 24 ore.

3.2.6 Scale-up

I campioni di scale-up sono stati preparati seguendo il metodo utilizzato per i campioni della seconda serie, pesando 0.5 g di substrato di HA-PAA e utilizzando la soluzione di platino di concentrazione 0.01 M o 0.02 M. Per quanto riguarda la supportazione del platino sul substrato ai campioni sono stati aggiunti 25 ml o 12.5 ml di soluzione di platino (aggiunti a quest'ultimo 12.5 ml di acqua per ottenere lo stesso volume di soluzione del campione da 25 ml) e posti in agitazione magnetica per 1 h, 24 h o 48 h in

base al campione da preparare. I campioni poi sono stati filtrati e lavati con acqua e posti in incubatore a 37 °C per almeno 24 ore.

Per la riduzione del platino i campioni sono stati messi in agitazione con 5 ml di acqua, successivamente viene aggiunta una soluzione acquosa di 20 ml di NaBH₄ in eccesso e ridotti sotto agitazione per 30'. Successivamente il campione viene filtrato e lavato con acqua, infine essiccato a 37 °C per almeno 24 ore.

3.3 Conclusioni

L'acido poliacrilico (PAA) riduce la cristallinità e le dimensioni dei cristalli di HA ma non modifica i parametri di cella. Il suo assorbimento su idrossiapatite è facile e irreversibile ed è dato da forze elettrostatiche e/o da legami a idrogeno con essa. Il contenuto di PAA sul substrato, come determinato dalle analisi termogravimetriche, si attesta intorno ad un 7-8 wt%.

La quantità di platino è variabile in funzione del tempo di contatto tra la soluzione di platino e il substrato ma il contenuto di platino non supera il 2 wt%, come mostrato nel *Grafico 4* e *Grafico 5*.

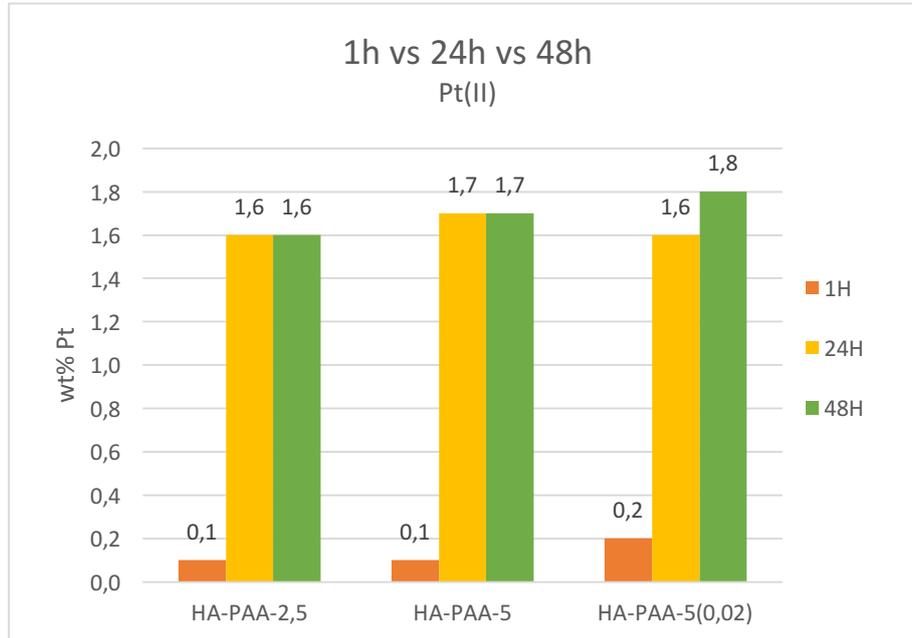


Grafico 4 Confronto valori di Pt(II) nei campioni HA-PAA variando il tempo di contatto.

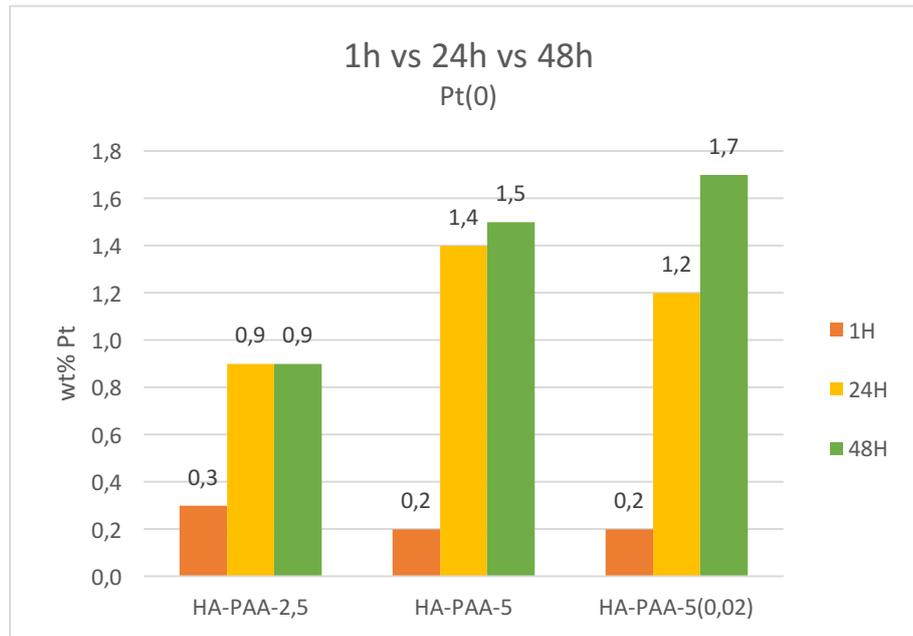


Grafico 5 Confronto valori di Pt(0) nei campioni HA-PAA variando il tempo di contatto.

Questi grafici mostrano come vi sia una netta differenza nel contenuto di platino tra i campioni da 1 h rispetto ai campioni da 24 h e 48 h, ma che non vi sono notevoli variazioni tra i campioni da 24 h e 48 h, indicando che già dopo 24 h si raggiunge un massimo di supportazione del platino e che aumentando il tempo di contatto tra la soluzione di platino e il substrato non se ne aumenta la quantità in grado di essere supportata.

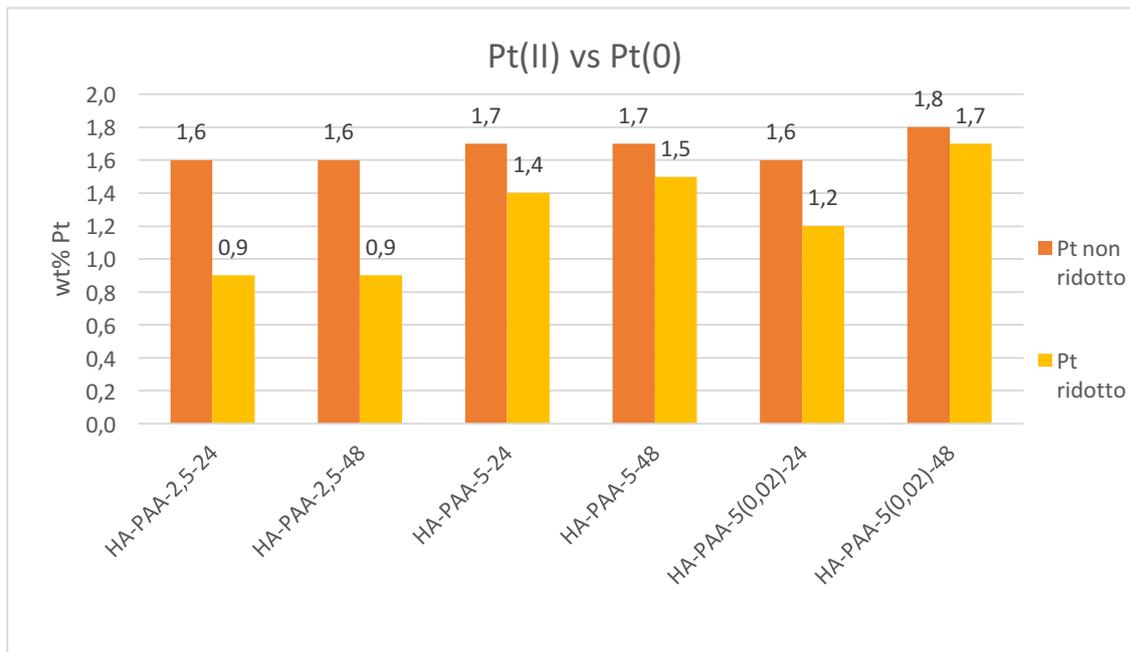


Grafico 6 Valori di Pt(II) e Pt(0) nei campioni HA-PAA da 24h e 48h.

Il *Grafico 6* mostra la variazione di contenuto tra i campioni non ridotti e ridotti, mettendo in evidenza che i campioni trattati con NaBH_4 per la riduzione del Pt(II) in Pt_{NPs} , presentano una diminuzione di concentrazione di platino probabilmente dovuta alla perdita di platino in soluzione durante il trattamento con l'agente riducente.

Anche i campioni di SCALE-UP mostrano gli stessi andamenti riportati nelle considerazioni sopra. Infatti nel *Grafico 7* si nota una leggera diminuzione del contenuto di platino nei campioni ridotti e che tra i campioni da 24 h e 48 h non vi sono grandi differenze.

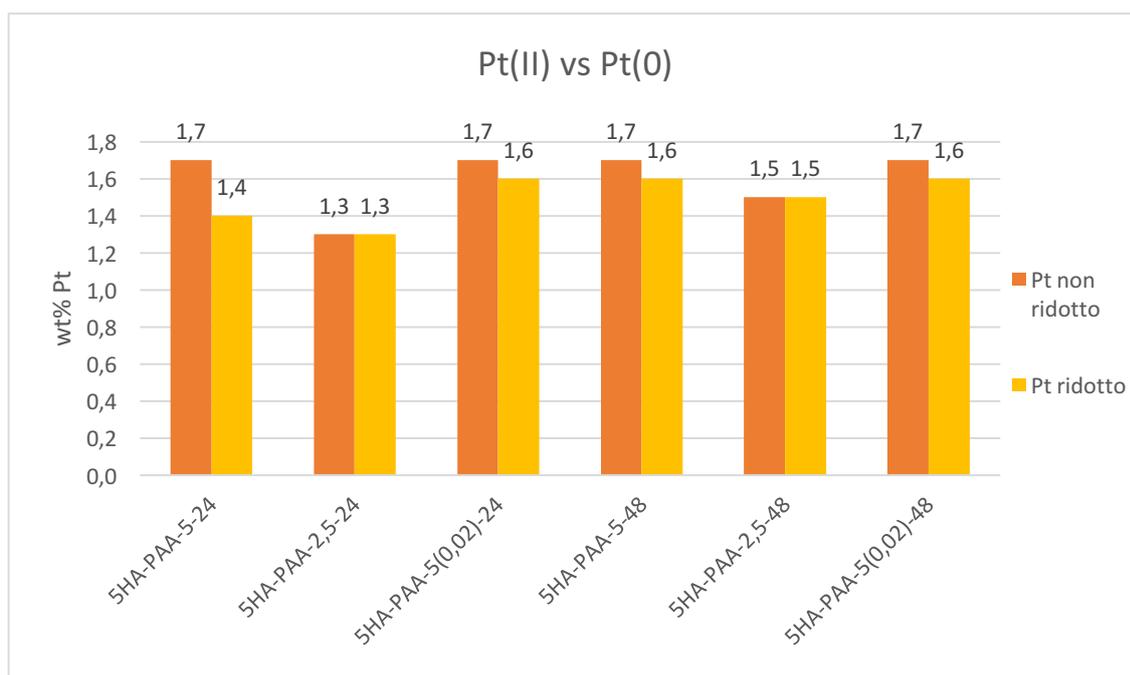


Grafico 7 Valori di Pt(II) e Pt(0) nei campioni di SCALE-UP di HA-PAA

CAPITOLO 4

4.1 Conclusioni

Lo scopo di questo lavoro di tesi è stato quello di sintetizzare un nuovo biomateriale a base di calcio fosfati, utile alla realizzazione di dispositivi per la sostituzione e rigenerazione ossea

La ricerca si è focalizzata sullo studio di un materiale biomimetico, ovvero in grado di emulare e riprodurre la composizione e la morfologia del tessuto osseo naturale, che possa presentare sia proprietà biocompatibili e bioattive, date dall'idrossiapatite, ma anche proprietà antitumorali e antiossidanti delle nanoparticelle di platino (Pt_{NPs}).

I risultati di questo studio mostrano che è possibile supportare le Pt_{NPs} su idrossiapatite funzionalizzata sia con PEI che con PAA con un contenuto di platino che si aggira attorno a 1.5-2.0 wt%. Si nota che i campioni di HA-PEI, grazie alla presenza di gruppi amminici che legano i precursori di Pt(II), presentano già valori di Pt(II) massimi dopo 1 h di contatto tra la soluzione di Pt(II) e il substrato a differenza dei campioni di HA-PAA che sono necessarie 24 h per ottenere le stesse percentuali; ciò è dovuto alla presenza di gruppi amminici che favoriscono la cattura delle Pt_{NPs} .

Per questo motivo il metodo migliore di supportazione risulta essere il metodo che prevede come substrato di HA funzionalizzata con PEI e la soluzione di platino a pH spontaneo di ca. 5 (SECONDA SERIE).

Il contenuto di PEI sulla superficie del substrato è minore rispetto alla PAA funzionalizzata, perché il PEI interagisce con l'HA attraverso i gruppi fosfato che sono più ingombranti e meno esposti sulla superficie, mentre la PAA interagisce elettrostaticamente con la superficie e ciò permette una maggiore funzionalizzazione sul substrato di idrossiapatite.

4.2 Sviluppi futuri

Oltre che per lo scopo biomedico questo materiale può essere utilizzato in altri ambiti, come quello industriale. Per questo motivo, per valutare l'impiego di questo materiale anche in campo industriale, e più precisamente come catalizzatore, è stata avviata una collaborazione con il Prof. Fabrizio Cavani e la Dr.ssa Rita Mazzoni con lo scopo di testare l'attività catalitica del platino supportato su HA nella reazione di trasformazione di etanolo in butanolo. Questa reazione, nota con il nome di reazione di Guerbet, è di grande interesse in quanto consente la trasformazione di un derivato delle biomasse, quale l'etanolo, in un alcol a catena più lunga che presenta migliori proprietà per l'utilizzo come combustibile da autotrazione o come *building block* in chimica fine. In letteratura^{2,3} sono stati utilizzati diversi catalizzatori eterogenei per catalizzare questa reazione e vi sono alcuni esempi di catalizzatori contenenti platino^{4,5} che hanno dimostrato di essere attivi nella trasformazione di etanolo in alcoli superiori. Il problema principale di questa reazione è però rappresentato dalle basse rese e selettività che necessitano un miglioramento per aumentare l'efficienza e rendere il processo conveniente a livello industriale.

Risultati preliminari dimostrano una attività del materiale sintetizzato scarsa se confrontata con i dati riportati in letteratura, ma con una buona selettività (sebbene corrispondente per ora a conversioni di pochi punti percentuali). Obiettivo futuro sarà quindi quello di variare i parametri di reazione quali carico catalitico, temperatura, pressione e tipo di base impiegata con il principale obiettivo di mantenere costante la selettività incrementando la resa di reazione.

² D. Gabriëls, W. Yesid Hernández, B. Sels, P. Van Der Voort and A. Verberckmoes "Review of catalytic systems and thermodynamics for the Guerbet condensation reaction and challenges for biomass valorization" *Catal. Sci. Technol.*, vol. 5, pp. 3876–3902, 2015.

³ Q. Zhang, J. Dong, Y. Liu, Y. Wang and Y. Cao "Towards a green bulk-scale biobutanol from bioethanol upgrading" *Journal of Energy Chemistry*, vol. 25, pp. 907–910, 2016.

⁴ T. Riittonen, E. Toukoniitti, D. K. Madhani, A.-R. Leino, K. Kordas, M. Szabo, A. Sapi, K. Arve, J. Wärnå and J.-P. Mikkola "One-Pot Liquid-Phase Catalytic Conversion of Ethanol to 1-Butanol over Aluminium Oxide—The Effect of the Active Metal on the Selectivity" *Catalysts*, vol. 2, pp. 68-84, 2012.

⁵ Pruett, O. Lavelle, Young, D. Alexander, Duncan, C. Boggus, Mozeleski and E. John, 1988, Patent number EP 0299720A2.