



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
FIRENZE

Scuola di
Scienze Matematiche
Fisiche e Naturali

Corso di Laurea in
Chimica

Nanocompositi biodegradabili a base di polisaccaridi e nanoargille: preparazione, caratterizzazione e studio delle proprietà di rilascio.

Biodegradable nanocomposites based on polysaccharides and nanoclays: preparation, characterization and study of release properties.

Relatore

Piero Baglioni

Correlatore

Francesca Ridi

Candidato

Emanuele Grifoni

Sommario

1	Introduzione	1
1.1	Nanoscienze e materiali nanostrutturati	1
1.2	Sistemi ibridi nanocompositi	1
1.3	Halloysite Nanotubes.....	2
1.4	Idrogel.....	4
1.4.1	Acido ialuronico	5
1.4.2	Chitosano.....	6
1.5	Sistema immunitario e cellule dendritiche	7
1.6	Adiuvanti immunologici	9
1.7	Obiettivi.....	10
2	Parte sperimentale	11
2.1	Purificazione HNTs	11
2.2	Loading con sonde fluorescenti	13
2.3	Preparazione HNT + Chitosano.....	14
2.4	Sintesi HNT + APTMS	15
2.5	Sintesi HNT + GPTS	16
2.6	Sintesi HNT + Acido Ialuronico.....	17
2.6.1	HNT-APTMS + Acido Ialuronico.....	17
2.6.2	Sintesi HNT-GPTS + Acido Ialuronico.....	19
2.7	Prove di rilascio	19
2.8	Potenziale Zeta.....	21
3	Strumenti	22

3.1	Spettrofluorimetro.....	22
3.2	FTIR.....	22
3.3	DTG.....	23
3.4	SEM.....	23
3.5	TEM	23
3.6	BET	24
3.7	Potenziale Zeta.....	24
4	Reagenti	25
5	Risultati	27
5.1	Caratterizzazione HNT.....	27
5.1.1	DTG	27
5.1.2	FTIR	28
5.1.3	BET.....	29
5.1.4	SEM	31
5.2	Caratterizzazione HNT+Chitosano	31
5.2.1	DTG	31
5.2.2	FTIR	33
5.2.3	SEM.....	35
5.2.4	TEM	35
5.3	Caratterizzazione HNT+Ac. Ialuronico	36
5.3.1	Funzionalizzazione con APTMS.....	36
5.3.2	Funzionalizzazione con GPTS.....	41
5.3.3	SEM.....	45
5.3.4	TEM.....	46
5.4	Potenziale Zeta.....	47
5.5	Prove di rilascio	48

6	Strumenti	53
6.1	Termogravimetria.....	53
6.2	Microscopi elettronici	56
6.2.1	SEM - Scanning Electron Microscope.....	58
6.2.2	TEM - Transmission Electron Microscopy.....	62
6.3	Tecnica BET	65
6.4	ATR-FTIR - Attenuated Total Reflectance FTIR.....	66
6.5	Spettrofluorimetro.....	70
6.6	Potenziale Zeta.....	72
7	Conclusioni.....	75
	Bibliografia	79

1 Introduzione

1.1 Nanoscienze e materiali nanostrutturati

Vengono definiti materiali nanostrutturati tutti quei materiali solidi multifase dove una di esse ha almeno una delle tre dimensioni su scale dimensionali del nanometro o strutture aventi distanze nanometriche fra le fasi che lo compongono. Rientrano così nella definizione non solo tutti quegli oggetti con dimensioni effettivamente inferiori ai 100 nm, ma anche mezzi porosi, gel e tutti quei materiali che presentano discontinuità interne nelle loro proprietà chimico-fisiche.

Una nuova branca della scienza, che prende il nome di nanoscienze, studia la manipolazione e il controllo della materia su scala atomica, molecolare o di dimensione inferiore ai 100 nm.

A causa di numerosi fattori, quando le dimensioni di un materiale vengono ridotte nell'ordine di grandezza del nanometro si osserva un'alterazione nelle proprietà chimico-fisiche rispetto al materiale bulk. Materiali nanostrutturati mostrano proprietà ottiche, elettriche, meccaniche e chimiche del tutto uniche e queste peculiarità sono fonte d'interesse e d'investimento in ambito biomedico, elettronico ecc.

1.2 Sistemi ibridi nanocompositi

I più recenti studi sono incentrati sulla preparazione di nuovi materiali multifunzionali composti da un supporto (matrice) nel quale vengono disperse o legate covalentemente nanostrutture. La combinazione del sistema ibrido permette di stabilizzare le nanoparticelle rendendo più processabile il

prodotto, migliorare le proprietà meccaniche e chimico-fisiche della matrice e talvolta generare nuove proprietà non appartenenti a nessuno dei due sistemi di origine, ma dovute esclusivamente alla mutua interconnessione¹.

La funzionalizzazione di una nanoparticella permette di renderla reattiva con particolari siti, di modificarne l'affinità per un ambiente piuttosto che per un altro, di studiarne gli spostamenti all'interno di un organismo o di renderla biocompatibile.

1.3 Halloysite Nanotubes

I Nanotubi di Halloysite (HNTs), scoperti nel XVIII secolo dal geologo belga Omalius d'Halloy, sono un tipo di minerale naturale, di composizione chimica simile alla caolinite $[Al_2Si_2O_5(OH)_4]$ e con struttura prevalentemente tubolare. La struttura a strati di silicati a geometria tetraedrica e la geometria coordinativa ottaedrica dell'alluminio contenuto definiscono l'halloysite come un fillosilicato 1:1 diottaedrico in cui uno strato planare di silicati tetraedrici si alterna ad uno strato cationico con geometria ottaedrica legati insieme da ponti a ossigeno.

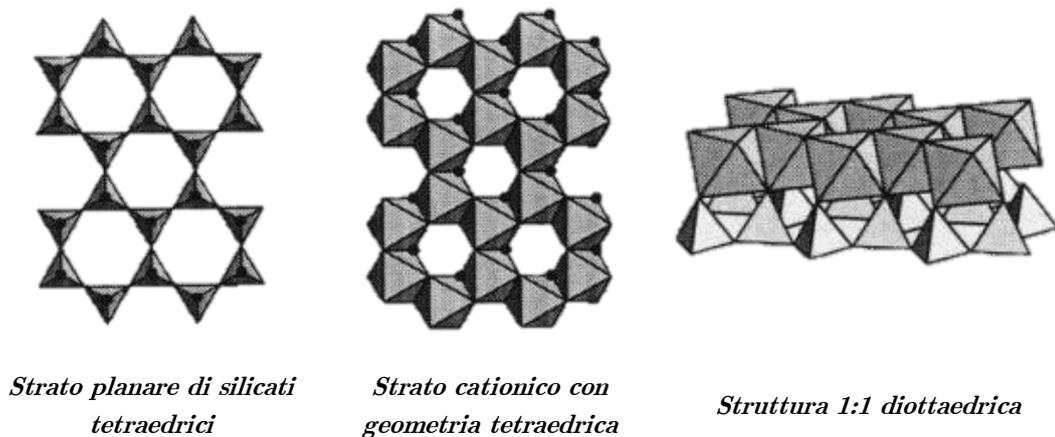


Figura 1.1: struttura dei fillosilicati

La sottile lamina formatasi tende infine ad arrotolarsi su se stessa esponendo sulla superficie esterna la parte silicatica e l'alluminio su quella interna². La presenza o meno di H₂O fra i vari strati permette di definirne la forma idrata [Al₂Si₂O₅(OH)₄]·2H₂O con interspazio fra i vari strati di 10Å e quella deidrata con interspazio di 7Å.

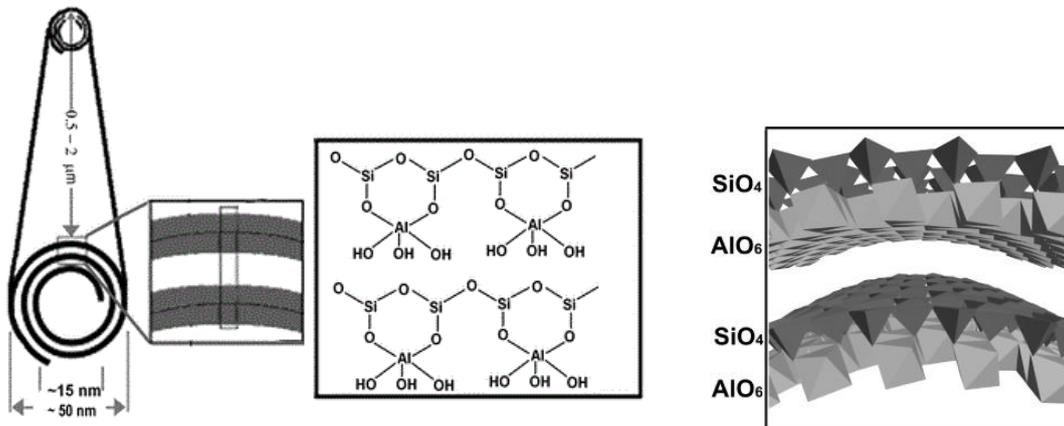


Figura 1.2: struttura tridimensionale e spazio interlamellare degli HNTs

Molti paesi come Cina, Francia, Belgio e Nuova Zelanda sono ricche di depositi di HNTs. Oltre ad essere abbondante ed economico, questo minerale presenta caratteristiche uniche come una cavità interna nanodimensionata, un elevato rapporto lunghezza-diametro e una concentrazione relativamente bassa di gruppi idrossilici sulla superficie esterna³.

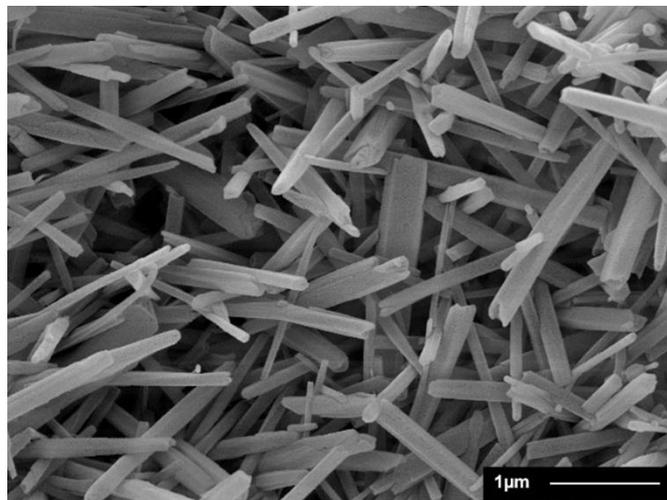


Figura 1.3: nanotubi di Halloysite

È emerso che l'aggiunta di HNTs in supporti, sia organici che non, conferisce alla matrice proprietà meccaniche incrementate come minor dilatazione termica, maggior resistenza all'usura e alla trazione. Inoltre la cavità interna del nanotubo può essere caricata con farmaci e altre sostanze e, sfruttando l'inerzia di diffusione dovuta alle strette dimensioni del lume, si osserva un profilo di rilascio lento e costante. La diversa composizione della superficie interna da quella esterna rende possibile sfruttare le diverse affinità di una sostanza per un ambiente piuttosto che un altro e controllare con più selettività dove essa andrà a collocarsi sulla nanostruttura. Per questo motivo le alloisiti trovano numerosi impieghi per rilascio controllato di sostanze, drug delivery e assorbimento irreversibile di inquinanti dall'ambiente².

A differenza di strutture analoghe, l'economicità degli HNTs li rende ottimi candidati come nanoreattori per la produzione industriale di nanoparticelle, nanowires e numerose altre nanostrutture.

Oltre alle proprietà dovute alla particolare geometria (cavità interna e struttura monodimensionale) recentemente gli HNTs sono stati impiegati come catalizzatori nei processi di cracking delle frazioni più pesanti del petrolio². Altri studi sull'attività catalitica di metalloporfirine incapsulate all'interno degli HNTs evidenziano una certa selettività per molte reazioni di ossidazione.

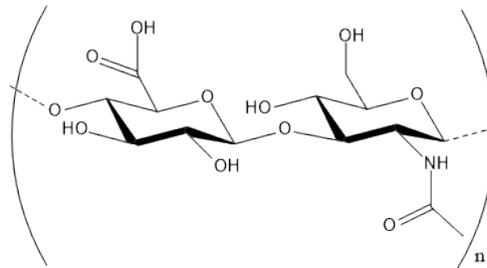
1.4 Idrogel

Un idrogel può essere definito come un network di catene polimeriche interconnesse fra loro, inglobanti acqua nelle cavità porose formatesi. Polimeri idrofilici naturali e sintetici sono spesso in grado di formare interazioni chimiche (legami covalenti) e fisiche (attrazioni elettrostatiche,

legami a idrogeno ecc.) sia con se stessi che con materiali vari eventualmente dispersi nel gel.

Di particolare interesse sono gli idrogel composti da polimeri naturali (ad esempio polisaccaridi) per la loro biodegradabilità e biocompatibilità.

1.4.1 Acido ialuronico

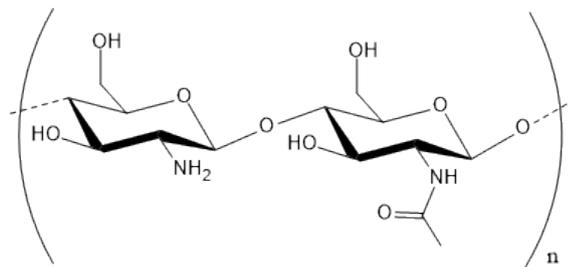


L'acido ialuronico (o ialuronato) è un polisaccaride naturale presente in tutti i tessuti del nostro corpo. E' formalmente un glicosamminoglicano (zucchero acido e amminozucchero) formato da unità disaccaridiche a loro volta costituite da residui di acido glucuronico e N-acetilglucosamina legati tra loro da legami glucosidici $\beta 1 \rightarrow 3$ e $\beta 1 \rightarrow 4$. A stabilizzarne la conformazione sono presenti numerosi legami a idrogeno intermolecolari. L'elevata solubilità dovuta alla protonazione dei gruppi ossidrilici conferiscono al polisaccaride un elevato grado di idratazione e solubilità in ambiente acquoso. Inoltre, dato il notevole peso molecolare medio spesso superiore ai 1000 kDa, soluzioni concentrate possono raggiungere elevate viscosità.

L'acido ialuronico gioca ruoli fondamentali nei processi infiammatori, guarigione delle ferite, proliferazione cellulare, stabilizzazione della matrice cartilaginea e altri processi fisiologici. Particolarmente interessante è stato osservare come piccoli oligosaccaridi dovuti dalla frammentazione dell'acido ialuronico contribuiscano alla maturazione di cellule dendritiche a differenza

dello stesso polimero ad alto peso molecolare che non ha effetti su queste cellule del sistema immunitario⁴. Inoltre, data la sua elevata biocompatibilità, questo polisaccaride può essere impiegato per il drug delivery, tissue engineering e altri scopi nel settore biomedico senza incorrere in risposte “aggressive” del sistema immunitario.

1.4.2 Chitosano



Il chitosano è un polisaccaride lineare composto da D-glucosamina e N-acetil-D-glucosamina, collegati tramite legami $\beta(1-4)$. Si ottiene per parziale deacetilazione dei gruppi amminici della chitina per trattamento con soluzioni alcaline. La chitina viene estratta dall’esoscheletro dei crostacei ed è il secondo biopolimero per abbondanza in natura dopo la cellulosa.

Legami inter e intramolecolari conferiscono al gel una struttura fortemente regolare. È comunemente insolubile nella maggior parte dei solventi, ma in presenza di pH leggermente acidi (< 6) i gruppi amminici deacetilati vengono protonati conferendo alla catena non più neutra un’incrementata tendenza a solvatarsi.

Grazie alla sua alta biocompatibilità, biodegradabilità, capacità di assorbimento e non-antigenicità (capacità del sistema di non essere riconosciuto da un organismo come non-self), gel e supporti di chitosano sono spesso adottati in campo biomedico come in tissue engineering, drug delivery

e per la fabbricazione di nanocompositi organici-inorganici con substrati bioattivi.

Come già visto per altri sistemi, anche le proprietà chimico-fisiche del chitosano possono essere fortemente condizionate dalla presenza di materiale inorganico nanodimensionato disperso nella matrice stessa. Alcune ricerche mostrano come aggiunte dello 0.8% in peso di nanotubi a parete multipla di carbonio (MWCNTs) in una soluzione di chitosano portino un incremento della resistenza di tensione di quasi il 100% e la presenza di 0.1-0.3% in peso di grafene incrementino il modulo elastico di circa il 200%⁵.

1.5 Sistema immunitario e cellule dendritiche

Il sistema immunitario è un insieme di organi, tessuti e cellule circolanti in grado di difendere l'organismo da qualsiasi forma di attacco chimico, traumatico o infettivo alla sua integrità⁶.

Caratteristica peculiare del sistema immunitario è quella di riconoscere strutture sia endogene che esogene da preservare (self) da quelle nocive all'organismo (non-self) e di agire di conseguenza eliminandole.

Oltre ad un'immunità aspecifica (o innata), organismi evolutivamente più recenti possiedono un'ulteriore protezione specifica (o adattativa) in grado di garantire una protezione più mirata ed efficace. Potersi adattare dinamicamente alla variabilità di agenti patogeni garantisce una migliore capacità di discriminazione fra self e non-self, ma comporta il costo di una risposta più lenta e di processi maturativi di tipo epigenetico (modificazione nell'espressione fenotipica, senza alterazioni del genotipo) innescati solo in seguito ad una prima esposizione con l'antigene.

L'immunità specifica è regolata prevalentemente dalle cellule della linea linfoide (T e B) in grado di sviluppare una memoria di riconoscimento delle strutture antigeniche già maturate da precedenti aggressioni e capaci di "istruirsi" per adattarsi a riconoscere una combinazione di antigeni virtualmente infinita.

La risposta immunitaria parte dalle cellule APC (Antigen-Presenting Cell) che, catturando antigeni ed esponendoli sulla membrana esterna, si spostano dai tessuti periferici fino al sistema linfatico innescando la risposta dei linfociti T-helper che a loro volta si attiveranno per eliminare la minaccia. Di queste cellule le più importanti sono quelle dendritiche in quanto specializzate nell'attivazione dei T-helper naive (vergini) piuttosto che di macrofagi e linfociti B in grado di esporre l'antigene prevalentemente a T-helper già attivati⁷.

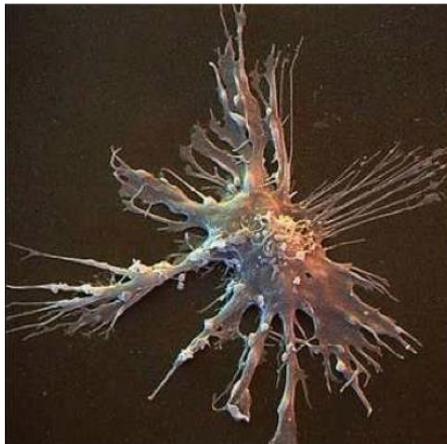


Figura 1.4: cellula dendritica

Un sistema di vaccinazione, detto anche di "immunizzazione attiva", garantisce un'interazione fra il sistema immunitario di un individuo e un antigene contro cui si necessita la produzione di anticorpi. Opportuni dosaggi o modifiche all'antigene sono in grado di assicurare una relativa inibizione dell'agente patogeno assicurando tuttavia una risposta immunitaria più che

sufficiente ad acquisire la memoria dell'attacco e garantendo una velocità di risposta più rapida per le esposizioni successive.

1.6 Adjuvanti immunologici

Un adiuvante immunologico è una sostanza che, pur non presentando proprietà antigeniche, è in grado di stimolare il sistema immunitario e di aumentarne la risposta a un vaccino.

Caratteristiche fondamentali di un adiuvante immunitario devono essere l'abbondanza del prodotto, l'economicità, possibilmente di origine naturale, biodegradabile o quantomeno biocompatibile.

Gli adiuvanti sono definiti solo per la loro funzione e non per il loro meccanismo d'azione, la particolare struttura o composizione chimica. Per meglio classificarli sono stati divisi in sottogruppi in base a come operano all'interno dell'organismo e come provocano la risposta immunitaria. Le due principali classi sono i 'delivery systems' e 'immune potentiators', i primi trasportano fisicamente gli antigeni alle cellule immunitarie garantendo una minor dispersione del vaccino, i secondi hanno un effetto diretto sulle cellule immunitarie⁸. Tuttavia questo metodo di classificazione è ormai superato e spesso gli adiuvanti immunitari rientrano in entrambi i gruppi. La classificazione più recente divide gli adiuvanti per generazioni.

Gli adiuvanti di prima generazione sono solitamente dispersioni particolose in grado di legare o incapsulare gli antigeni, evitarne la dispersione, prolungarne la persistenza nel sito dell'iniezione e indurre una lieve infiammazione locale in modo da richiamare le cellule del sistema immunitario. Rientrano fra questi adiuvanti microemulsioni (w/o) e aggregati di allume [$\text{KAl}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$] scoperti e usati già dagli anni '20.

Gli adiuvanti di seconda generazione sono stati introdotti nei primi anni '70 in seguito alla scoperta di componenti sintetiche in grado di stimolare la risposta immunitaria. Nati da molecole organiche o piccole catene di RNA aggiunte a microemulsioni, il loro impiego si diffuse in seguito alla combinazione con gli adiuvanti di prima generazione. L'unione delle due generazioni ha garantito al prodotto tutte le proprietà richieste per un adiuvante immunitario e sono tutt'oggi presenti all'interno dei nostri vaccini.

Siamo ancora lontani dallo sviluppo di una terza generazione di adiuvanti, ma le ultime ricerche sembrano indirizzare sull'uso di microparticelle polimeriche per drug delivery. Nonostante la vasta gamma di tecnologie e materiali disponibili, i limiti imposti dalla sicurezza per la salute rendono la ricerca di nuovi adiuvanti lenta e complessa.

1.7 Obiettivi

In questo lavoro di tesi ci proponiamo di sintetizzare e caratterizzare una struttura bionanocomposita che presenti proprietà di adiuvante immunologico e allo stesso tempo in grado di trasportare e rilasciare nel tempo una sonda modello di un farmaco. In particolare vorremmo sviluppare un sistema in grado di garantire un controllo più efficiente sulle proprietà di rilascio e poter stabilire una correlazione fra carica e quantità di polisaccaride legato rispetto al suo profilo di rilascio.

2 Parte sperimentale

2.1 Purificazione HNTs

Data l'elevata concentrazione di impurezze presenti nel campione originale di nanotubi di alloisite, si è ritenuto necessario purificare almeno grossolanamente il campione allontanando gli aggregati e le impurezze più piccole.

I primi tentativi si sono incentrati su filtrazioni utilizzando membrane Millipore con pori di 3 e 5 μm , ma dimensioni e quantità del campione trattato non hanno permesso una filtrazione efficace.

Un secondo approccio è stato affrontato utilizzando un polimero policarbossilato, che agisce da disperdente, in grado di garantire una miglior separazione fra gli aggregati del campione e conseguentemente un'incrementata stabilità in sospensione delle impurezze più piccole. Il campione presentava un precipitato arricchito di nanotubi e impoverito di impurezze, sospese in modo stabile nella soluzione di disperdente. Questo metodo di purificazione ha garantito un'ottima separazione fra gli aggregati e i nostri nanotubi di alloisite, ma l'impossibilità di rimuovere ogni traccia di superfluidificante ha reso gli HNTs così trattati dannosi per la struttura di gel polisaccaridici (figura 2.1) e, nel caso di un possibile utilizzo in presenza di cellule, presumibilmente anche per le strutture fosfolipidiche di membrane cellulari.

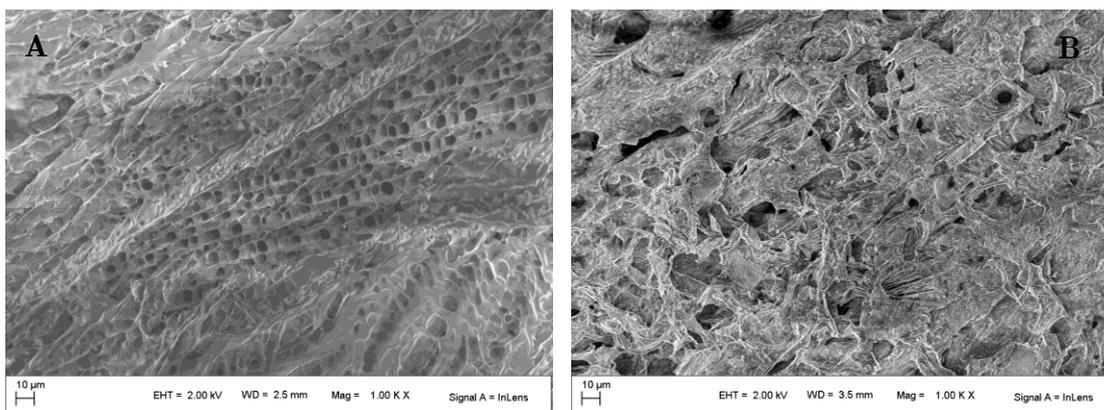


Figura 2.1: Gel di chitosano puro (A) e con HNT purificati con un disperdente (B)

Non potendo avvalerci di superfluidificanti si è provveduto ad agitare nel modo più vigoroso possibile la nostra sospensione con l'aiuto di un comune frullatore domestico seguita da una centrifugazione a bassissimi giri (500 rpm). La procedura è stata ripetuta per diversi cicli e di volta in volta il liquido surnatante (ricco di aggregati) veniva rimosso e reintegrato con acqua milliQ. Le immagini SEM hanno evidenziato come gli aggregati più piccoli fossero i più stabili in sospensione e in grado di precipitare solo in seguito a centrifugazioni molto energiche (figura 2.2).

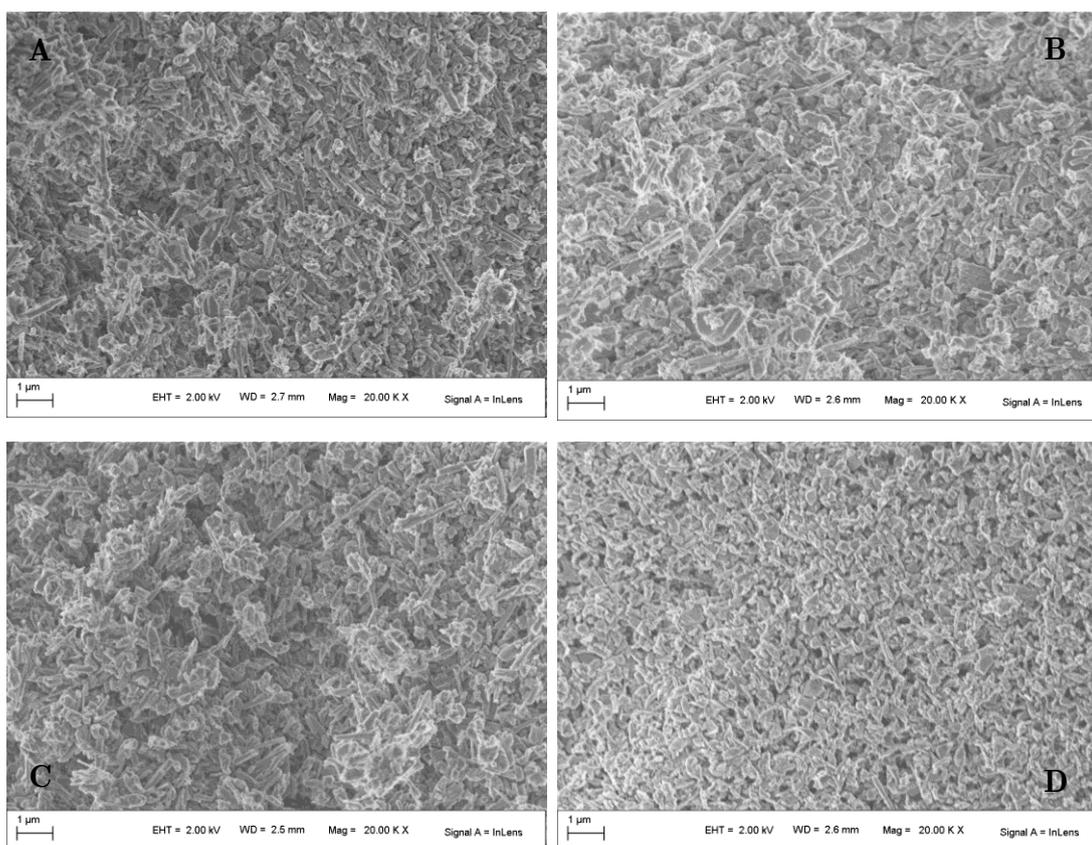


Figura 2.2: Immagini SEM di HNTs precipitati a 1500 rpm (A), 2000 rpm (B), 3000 rpm (C) e 3500 rpm (D)

In particolare 20 g di HNTs sono stati sospesi in 200 mL di acqua milliQ in modo da avere una sospensione al 10% in peso. Si è trattato la sospensione ottenuta con un frullatore domestico per 10 cicli di 2 minuti ciascuno. Il tutto è stato ridiluito di 5 volte in volume così da avere una sospensione al 2% in peso e abbiamo centrifugato a 500 rpm per 15 minuti. Il liquido surnatante, ricco di aggregati, è stato infine allontanato e il precipitato essiccato in stufa.

2.2 Loading con sonde fluorescenti

Per testare le proprietà di rilascio delle nostre nanostrutture abbiamo usato come sistemi modello due sonde fluorescenti molto simili fra loro per struttura, ma con carica opposta. Per la sonda di carica negativa abbiamo usato Carbossifluoresceina e per quella positiva Rodamina 110 (figura 2.3).

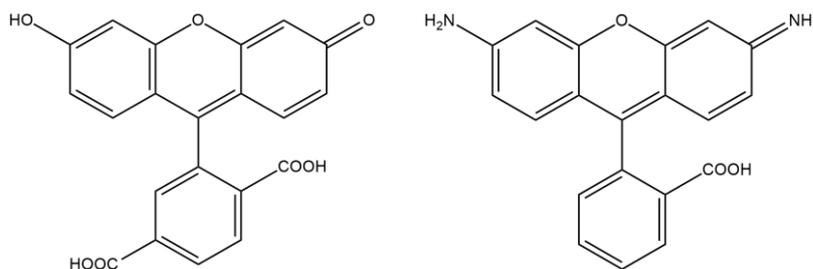


Figura 2.3: Carbossifluoresceina (sinistra) e Rodamina 110 (destra)

È stata preparata una soluzione 10 mg/L per ciascuna delle due sonde. In 100 mL di soluzione sono stati dispersi 1 g di HNT in modo da avere una sospensione all'1% in peso. Per il loading delle sonde fluorescenti sono state messe sotto agitazione e sottovuoto per 30 minuti le due sospensioni. Si nota da subito e in modo evidente un'energica formazione di bolle (fizzing) dovuta alla fuoriuscita di aria intrappolata all'interno delle cavità degli HNT che provoca inevitabilmente un'introduzione forzata di soluzione (e quindi di sonda) all'interno dei nanotubi. Abbiamo in fine centrifugato a 10 000 rpm per 10 minuti le due sospensioni e raccolto e seccato in stufa i due precipitati.

2.3 Preparazione HNT + Chitosano

Per la preparazione di questo composito si è sfruttato l'affinità di carica fra i due materiali. Infatti mentre il chitosano assume parziale carica positiva protonandosi, la superficie dell'allosite è carica negativamente. In questo modo si viene ad avere un'interazione di tipo elettrostatico sufficientemente forte da assicurare una quantità di polisaccaride "legato" più che accettabile.

In particolare abbiamo sospeso 100 mg di HNT e 100 mg di chitosano in 10 mL di acqua milliQ e tenuto il tutto sotto vorticoso agitazione. Si acidifica a $\text{pH} \approx 5$ con acido acetico in modo da protonare il polisaccaride e agevolarne

la solvatazione. La soluzione gelifica in pochi secondi creando una sospensione omogenea di HNT in chitosano.

Si centrifuga la sospensione così ottenuta (10 000 rpm per 10 minuti) in modo da allontanare il polisaccaride in eccesso e poter recuperare i nanotubi di alloisite con il chitosano strettamente fisisorbito sulla superficie.

Si può notare come la quantità di polisaccaride fisisorbita rimanga costante e riproducibile anche variando i tempi di reazione e il pH della soluzione.

2.4 Sintesi HNT + APTMS

Il primo step per la sintesi del nostro nanocomposito con Acido Ialuronico consiste nella funzionalizzazione dei nanotubi di alloisite con APTMS, (3-aminopropyl)-trimethoxysilane, in modo da poter sfruttare l'ammina esposta all'estremità per la formazione di un legame ammidico con il gruppo carbossilico presente sul polisaccaride (figura 2.4).

Si considera l'area superficiale del silano di 0.5 nm^2 per molecola come riportato in letteratura⁹ e utilizziamo il dato sperimentale ricavato dalla BET di $28 \text{ m}^2/\text{g}$ per l'area superficiale dei nanotubi di alloisite. Infine approssimando l'area superficiale esterna del tubo circa uguale a quella interna lavoriamo considerando di funzionalizzare una superficie di $14 \text{ m}^2/\text{g}$.

Volendo funzionalizzare il 20, 50 e 100% della superficie esterna di 2 g di HNT, i nanotubi sono stati sospesi in 20 mL di etanolo alcalinizzato con ammoniaca ($\text{pH} \approx 9$). Alle sospensioni, mantenute per tutto il tempo della reazione a temperatura ambiente e in agitazione con ancorina magnetica, vengono aggiunti rispettivamente circa 4, 11 e 22 μL di APTMS. Dopo 24 h

le reazioni vengono interrotte, la sospensioni centrifugate e i precipitati lavati con acqua milliQ e il tutto seccato in stufa.

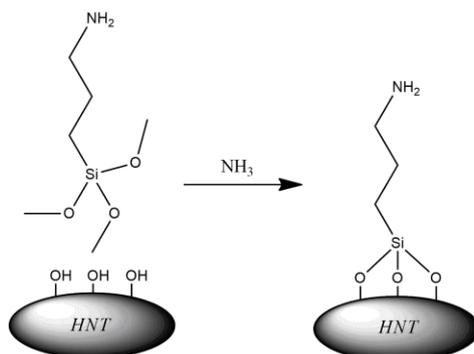


Figura 2.4: schema di reazione HNT + APTMS

I prodotti ottenuti sono stati caratterizzati allo FTIR-ATR e all'analisi elementare.

2.5 Sintesi HNT + GPTS

Analogamente a quanto fatto per la funzionalizzazione con APTMS, abbiamo sfruttato la forte tendenza dei silani a formare nuovi legami covalenti Si-O-Si con i silanoli già presenti sulla superficie delle alloisiti e rendere disponibili nuovi gruppi reattivi in grado di legarsi e fare da ponte con i nostri polisaccaridi.

Il GPTS, (3-glicidossipropyl)trimetoxysilane, presenta su una delle due estremità un epossido che, grazie alla forte tensione angolare dell'anello a 3 termini, è particolarmente reattivo per reazioni di sostituzione nucleofila. Tuttavia la forte reattività di questo tipo di agente funzionalizzante è anche il suo problema principale in quanto anche nucleofili deboli come l'acqua, se presenti nel solvente o nell'ambiente di reazione, possono far aprire l'anello annullando così la reattività del gruppo funzionale.

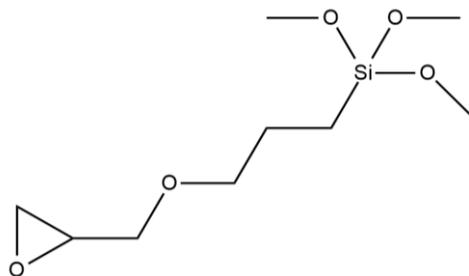


Figura 2.5: (3-glicidossipropil)trimetossilane

In particolare lavorando con 500 mg di HNT e volendo funzionalizzare il 100% della superficie esterna, con le stesse assunzioni fatte per la funzionalizzazione con APTMS, si sospende i nanotubi di alioisite in 20 mL di toluene e, aggiungendo 10 μ L di GPTS, si mette il tutto a reflusso per 6 h. Al termine della reazione si raccolgono gli HNT funzionalizzati filtrando e lavando con toluene, etanolo e acqua milliQ.

2.6 Sintesi HNT + Acido Ialuronico

Per la preparazione del composito con acido ialuronico, non potendoci avvalere di un'interazione di tipo elettrostatico, si è dovuto ricorrere ad una funzionalizzazione covalente fra polisaccaride e superficie dei nanotubi.

2.6.1 HNT-APTMS + Acido Ialuronico

Avendo già provveduto alla funzionalizzazione degli HNT con APTMS, lo step successivo ha previsto la formazione di un legame covalente fra l'azoto dell'ammina primaria esposta sulla superficie del nanotubo e il carbossile dell'acido ialuronico per mezzo di una carbodiimide. L'aggiunta di sulfo-NHS, più solubile in acqua dell'equivalente prodotto non solfonato, garantisce una miglior stabilità dell'estere attivato che altrimenti andrebbe rapidamente incontro ad idrolisi (figura 2.6).

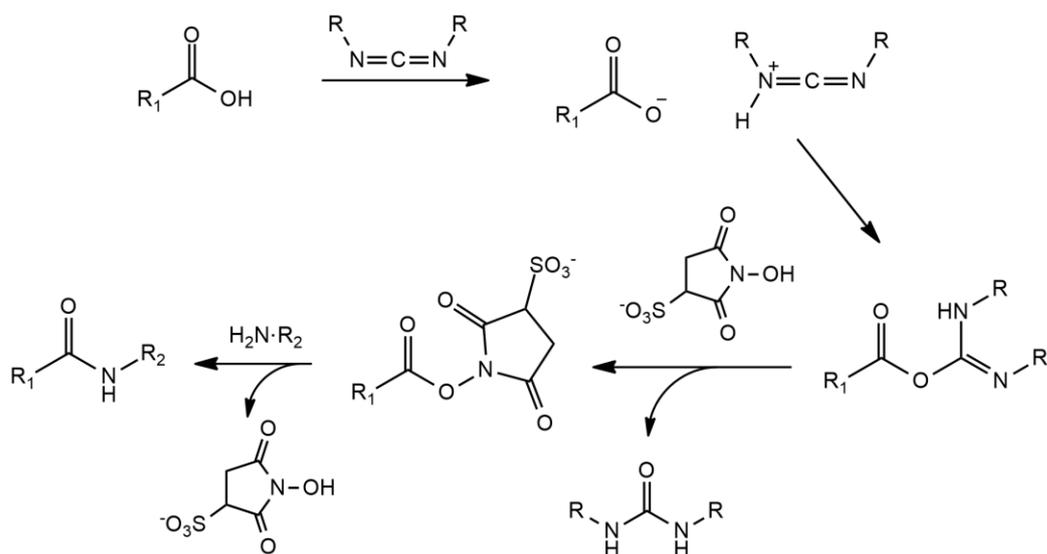


Figura 2.6: reazione di formazione di un legame ammidico con EDC e sulfo-NHS

Si è iniziato attivando i gruppi carbossili di una soluzione all'1% di acido ialuronico (in MES buffer a $\text{pH} \approx 6$) con EDC, 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide, e sulfo-NHS in quantità stechiometriche e tenuta sotto agitazione per 30 minuti a temperatura ambiente. Viene alzato il pH con l'aggiunta di 20 μL di PBS buffer ($\text{pH} \approx 7.4$) e in fine vengono aggiunti 250 mg di HNT (campione con superficie funzionalizzata al 100% con APTMS) e tenuto il tutto sotto agitazione per 20 h (figura 2.7).

Analogamente a quanto fatto per l'altro composito, si centrifuga (10 000 rpm per 10 minuti) la sospensione in modo da allontanare il polisaccaride in eccesso e poter recuperare i nanotubi di alloisite con l'acido ialuronico legato covalentemente sulla superficie.

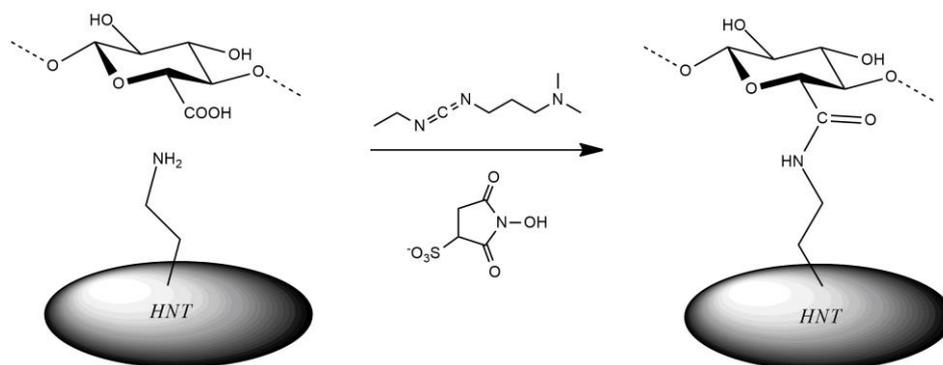


Figura 2.7: schema di reazione APTMS-HNT + Acido Ialuronico

2.6.2 Sintesi HNT-GPTS + Acido Ialuronico

Per legare covalentemente l'acido ialuronico con le alloisiti funzionalizzate con GPTS sfruttiamo la reattività spontanea degli epossidi verso i gruppi ossidrilici nucleofili del carboidrato (figura 8).

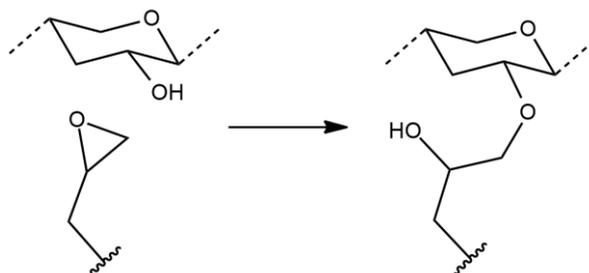


Figura 2.8: reazione di un epossido con un polisaccaride

Per riprodurre il sistema già realizzato con HNT-APTMS + Ac. Ialuronico, montiamo una reazione mantenendo le condizioni più simili possibile (soluzione 1% di polisaccaride e rapporto 1:1 con HNT). Poiché l'acido ialuronico è insolubile sia in toluene che etanolo, per ridurre la possibilità che tutto il nostro epossido si idrolizzi con l'acqua del solvente, dopo aver eseguito alcune prove di solubilità, abbiamo montato in parallelo un'altra reazione nella quale l'acqua pura utilizzata come solvente è stata sostituita da una miscela etanolo-acqua in rapporto 2:1. Dopo aver mantenuto le sospensioni in agitazione e a temperatura ambiente per 6 h si è centrifugato a 10 000 rpm per 10 minuti, eliminato il polisaccaride in eccesso non reagito e liofilizzato il precipitato.

2.7 Prove di rilascio

Per misurare le proprietà di rilascio dei nostri nanocompositi abbiamo posto una quantità nota di composito con sonda in acqua milliQ e tenuto costantemente il tutto sotto agitazione. A intervalli di tempo regolari sono

stati prelevate piccole aliquote di soluzione e reintegrato di volta in volta il volume estratto con acqua. Su ciascun campione è stato fatto uno spettro di fluorescenza così da poter osservare l'andamento della sonda rilasciata in funzione del tempo.

Sono stati messi a confronto 6 sistemi diversi, 3 per la nostra sonda modello di carica positiva e 3 per quella di carica negativa. In particolare abbiamo studiato le proprietà di rilascio degli HNT tal quali, HNT + Chitosano e HNT + Ac. Ialuronico. Per ciascun sistema abbiamo sospeso 10 mg di composito, caricato con le rispettive sonde, in 5 mL di acqua milliQ e mantenuto il tutto sotto costante agitazione per l'intera durata dei prelievi. Ad ogni prelievo di 50 μ L seguiva un reintegro di un pari volume di acquaⁱ.

Il primo prelievo è stato fatto al tempo zero seguito da 12 prelievi ogni mezz'ora per le prime 6 ore, ogni ora fino alla 24esima ora ed in fine ogni 4 ore fino al raggiungimento delle 48 ore (figura 2.9).

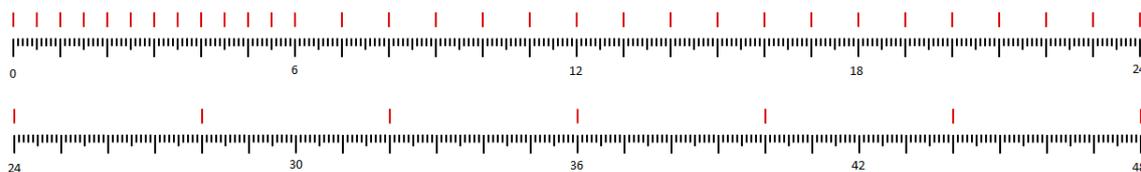


Figura 2.9: schema temporale dei prelievi sulle 48h.

ⁱ il tempo di reazione necessario alla funzionalizzazione provoca inevitabilmente la perdita di una parte di sonda del sistema. Per rendere meglio confrontabili i vari sistemi fra loro e poiché la preparazione del composito deve necessariamente essere successiva al loading degli HNT, abbiamo tenuto in acqua per un tempo equivalente anche quegli HNT che non necessitavano di ulteriori lavorazioni.

Tutte le frazioni prelevate sono state diluite 1:4 con acqua milliQ e analizzate allo spettrofluorimetro. Per ogni scansione abbiamo ottenuto una curva con intensità proporzionale alla concentrazione di fluoroforo e, prendendo l'intensità alla lunghezza d'onda che presenta il massimo di emissione, ci siamo ricavati l'andamento del rilascio in funzione del tempo.

2.8 Potenziale Zeta

Per le misure di Potenziale Zeta abbiamo sospeso circa 5 mg di composto in 2 mL di acqua milliQ. Dopo aver stabilizzato la sospensione con l'aiuto di un agitatore vortex e un bagno a ultrasuoni abbiamo prelevato circa 1.5 mL di prodotto, messo nell'apposita cuvetta ed eseguito la misura.

3 Strumenti

3.1 Spettrofluorimetro

Per effettuare gli spettri di fluorescenza è stato usato uno spettrofluorimetro PERKIN ELMER LS 50 B con lampada allo Xeno e detector LC-240 FL.

In particolare abbiamo adottato le seguenti condizioni operative.

Rodamina 110: Slits 5/5 - Resp 5
 λ di eccitazione a 480 nm
Scansione da 500 a 650 nm
 λ_{\max} di emissione a 519 nm

Carbossifluoresceina: Slits 10/10 - Resp 10
 λ di eccitazione a 460 nm
Scansione da 480 a 650 nm
 λ_{\max} di emissione a 514 nm

3.2 FTIR

Per gli spettri nell'infrarosso abbiamo usato abbiamo usato un IR a trasformata di Fourier NEXUS 870 Thermo Nicolet con sorgente IR operante nell'intervallo dei numeri d'onda compresi 4000 e 400 cm^{-1} . Lo strumento è equipaggiato con un detector MCT (Mercury, Cadmium, Telluride) raffreddato ad azoto liquido. Per il campionamento è stata usata la tecnica di ATR (Attenuated Total Reflectance).

Queste le condizioni operative:

Numero di scansioni: 128

Risoluzione: 2 cm^{-1}

Scansione da 4000 a 650 cm^{-1}

3.3 DTG

Le analisi termogravimetriche sono state effettuate con un SDT Q600 della TA Instruments (Philadelphia, USA). I campioni sono stati posti in pan di allumina e analizzati in flusso di azoto (100 mL/min) con il seguente programma: rampa da temperatura ambiente a $1000 \text{ }^\circ\text{C}$ a $10 \text{ }^\circ\text{C/min}$.

3.4 SEM

Le misure al SEM sono state condotte su campioni disidratati e non metallizzati ad un FE-SEM (Field Emission Scanning Electron Microscope) SIGMA (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Germany), usando un fascio di elettroni accelerati ad 2 kV e il detector di elettroni primari (In Lens).

I campioni sono stati liofilizzati e depositi su dei portacampioni (stub) di alluminio, ricoperti di uno scotch biadesivo conduttivo a base di grafite.

3.5 TEM

Per la misura al TEM i nanotubi funzionalizzati sono stati dispersi in acqua milliQ con il supporto di un bagno a ultrasuoni. Una goccia di questa sospensione è stata depositata su un elettrodo a reticolo da TEM e fatta asciugare per 24h.

Le misure sono state effettuate con un TEM Phillips CM12 con elettroni accelerati a 100 kV .

3.6 BET

Per le misure dell'area superficiale e del volume dei pori abbiamo usato un analizzatore Beckman-Coulter SA 3100.

3.7 Potenziale Zeta

Le misure per il potenziale Zeta sono state eseguite con uno strumento Zeta PALS (Phase Analysis Light Scattering), Zeta Potential Analyser, Brookhaven Instruments Corporation, Holtsville, NY. Le analisi sono state effettuate a temperatura ambiente e per ogni campione sono stati raccolte 5 misure di cui i valori riportati ne sono la media aritmetica. Più precisamente, le misure sono state effettuate tramite il sistema ZetaPALS.

4 Reagenti

- **HNTs ultrafine**

NZCC - New Zeland and China Clays
Sp. Grav: 2,55 g/cm³
Surface area: 28 m²/g circa

- **Ialuronato di Sodio**

Altergon Italia SRL
CAS: 9067-32-7
MW: 100 kDa

- **Chitosano**

Sigma-Aldrich Corporation
CAS: 9012-76-4
MW: 1.8 kDa
Visc. 800 000 cps

- **APTMS - (3-Aminopropyl)trimethoxysilane**

Sigma-Aldrich Corporation
CAS: 13822-56-5
MW: 179.29
Dens: 1.027 g/cm³
Pur: 97%

- **Rodamina 110**

Sigma-Aldrich Corporation
CAS: 13558-31-1
MW: 366.80
Pur: 99%

- **Carbossifluoresceina**

Sigma-Aldrich Corporation
CAS: 72088-94-9
MW: 376.32
Pur: 95%

- **GPTS – (3-Glycidoxypropyl)trimethoxysilane**

abcr GmbH & Co. KG
CAS: 2530-83-8
MW: 236,38 g/mol
Dens: 1,070 g/cm³

Pur: 98%

- **EDC - N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride**

Sigma-Aldrich Corporation

CAS: 25952-53-8

MW: 191.7 g/mol

Lavoriamo con una soluzione di 57.58 mg in 2 mL MES buffer (0.3 mmol)

- **Sulfo-NHS**

Sigma-Aldrich Corporation

CAS: 106627-54-7

MW: 217.13 g/mol

Pur: 98%

Lavoriamo con una soluzione di 63.34 mg in 2 mL di MES buffer (0.3 mmol)

- **MES monoidrato**

Sigma-Aldrich Corporation

CAS: 145224-94-8

MW: 213.25 g/mol

Pur: 99.5%

Lavoriamo con una soluzione di 503.62 mg in 50 mL H₂O (50 mM)

pH \approx 6 (misurato con cartina tornasole)

- **PBS buffer**

Sale	Conc. [mg/L]
NaCl	813.3
KCl	20.36
Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O	142.4
KH ₂ PO ₄	31.32
pH	7.4

5 Risultati

5.1 Caratterizzazione HNT

5.1.1 DTG

La curva di decomposizione chimica delle alloisiti è caratterizzata da due picchi. Il primo fra i 50 e i 150°C dovuto alla perdita di acqua assorbita sulla superficie e fra gli strati interlamellari. Il secondo fra i 400 e i 600°C dovuto alla deidrossilazione e sinterizzazione del composto con successiva perdita di H_2O^3 . La perdita di peso totale causata dalla rampa di temperatura è superiore al 15%

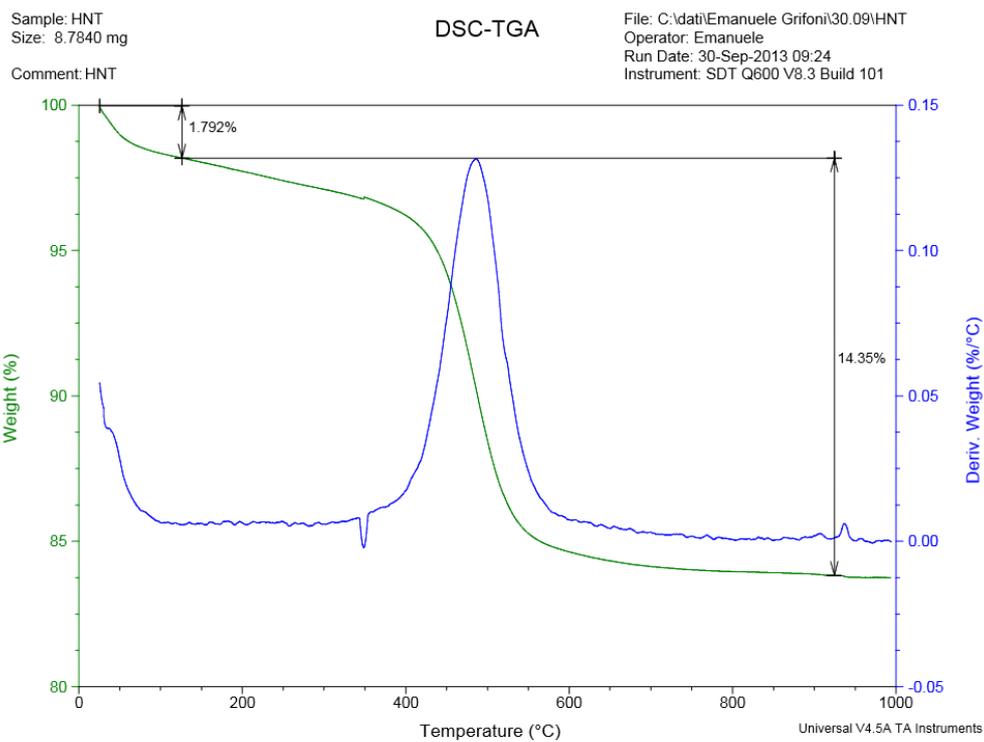


Figura 5.1: termogramma HNT

5.1.2 FTIR

Lo spettro FTIR dei nanotubi di alloisite mostra due picchi a 3695 e 3620 cm^{-1} dovuti allo stretching Al_2O dove ciascun atomo di ossigeno è a ponte fra due atomi di alluminio. A 920 cm^{-1} troviamo il bending Al_2O e intorno a 1000 cm^{-1} il picco corrispondente bending Si-O^5 .

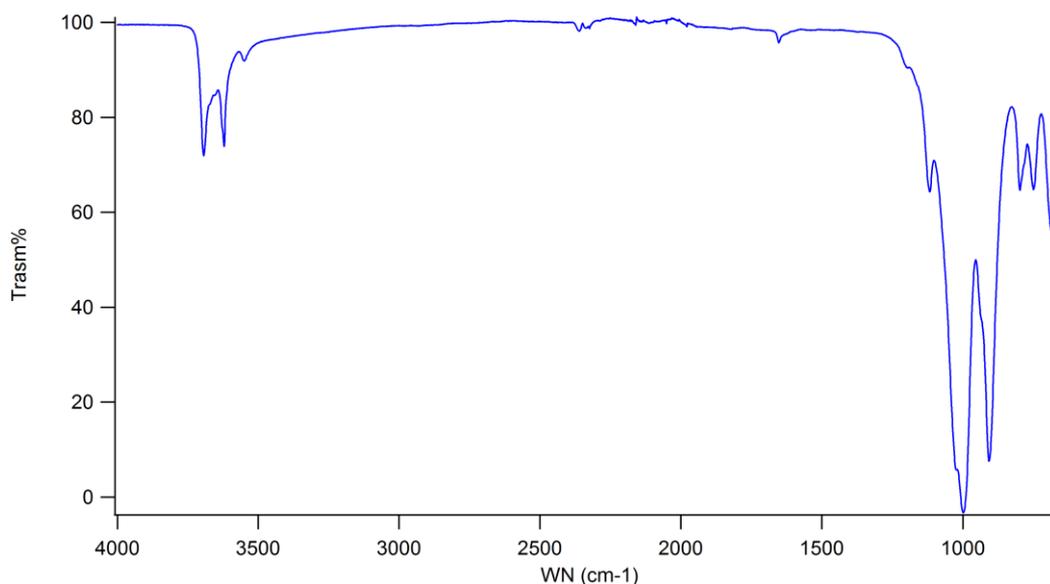


Figura 5.2: spettro IR di HNT

5.1.3 BET

Dall'analisi alla BET ricaviamo un'area superficiale di $28.0 \text{ m}^2/\text{g}$, un volume totale dei pori di 0.16 mL/g e che oltre il 60% del volume dei pori è costituito da cavità con diametro compreso fra 20 e 80 nm. In particolare osserviamo che dal grafico delle distribuzioni dei pori (figura 5.4) si possono distinguere due gaussiane: la prima, molto stretta e piccata intorno ai 20 nm, è attribuibile alle cavità interne dei nanotubi mentre la seconda, più slargata e con il massimo spostato verso dimensioni maggiori, è causata dagli spazi interstiziali fra i vari nanotubi.

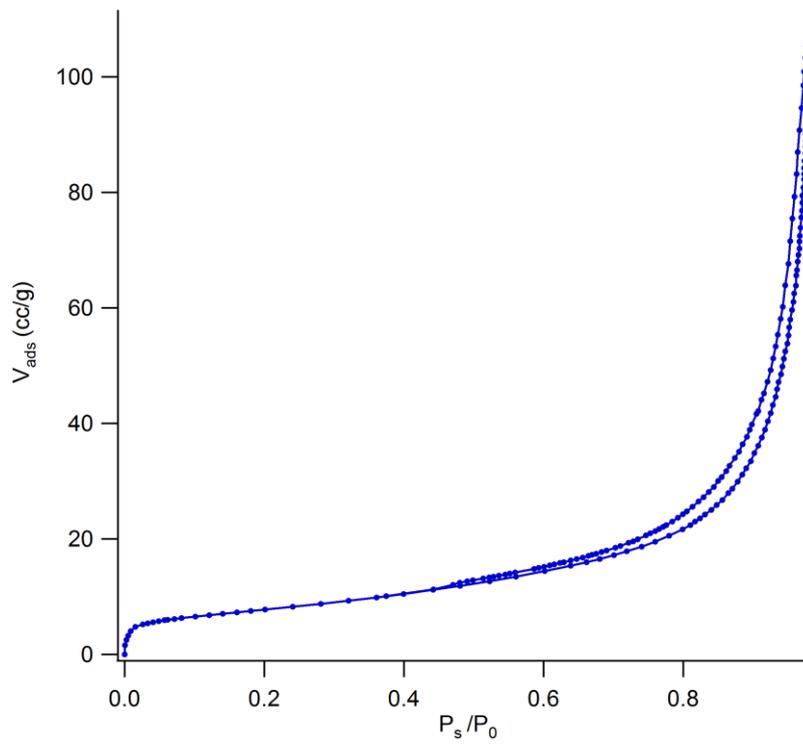


Figura 5.3: curva di isteresi BET

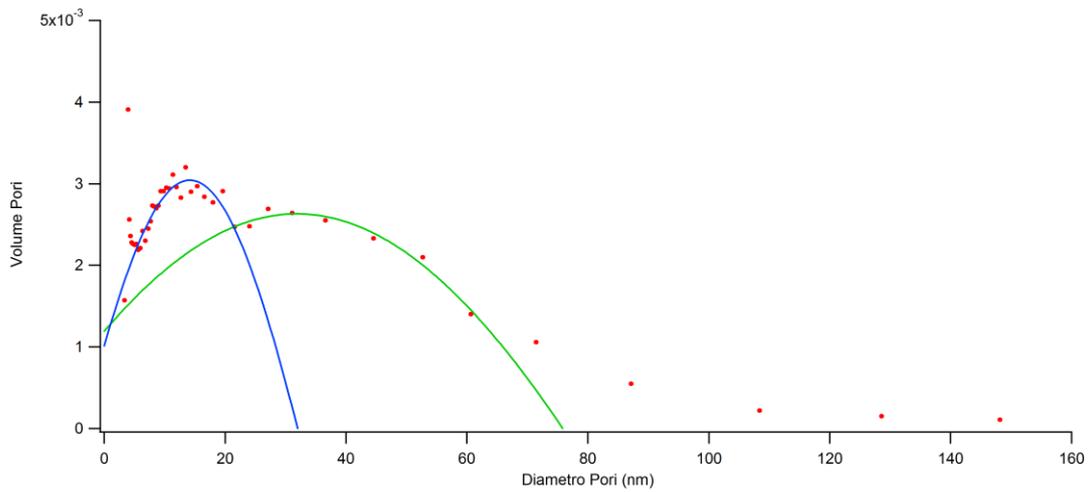


Figura 5.4: distribuzione del volume dei pori

5.1.4 SEM

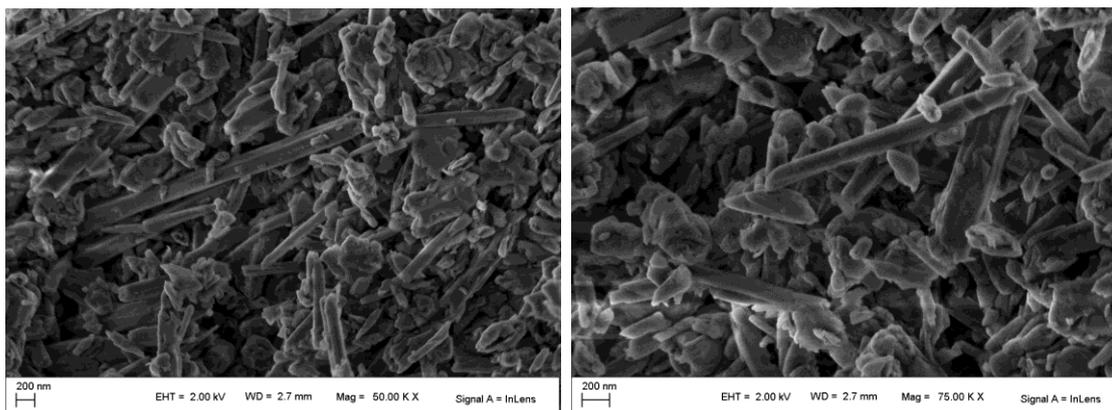


Figura 5.5: immagini SEM di HNT

Dalle immagini SEM di un campione di HNT si può osservare sia la forma monodimensionale della nanostruttura sia la struttura interna cava. Nonostante un blando processo di purificazione, si osserva anche la presenza di impurezze e frammenti di silice.

5.2 Caratterizzazione HNT+Chitosano

5.2.1 DTG

Per stimare la percentuale in peso di polisaccaride trattenuto sulla superficie degli HNT abbiamo usato tecniche termogravimetriche. Si può notare come il rapporto fra il peso della componente organica, da quella inorganica si mantenga costante anche variando le condizioni di pH.

Le ammine del chitosano protonandosi caricano positivamente il polisaccaride. Considerando anche la parziale carica negativa della superficie esterna delle alloisiti, si viene a creare un'interazione di tipo elettrostatico relativamente forte e sufficiente a "legare" una quantità costante e riproducibile di polisaccaride. Dalla DTG (figura 5.6 e 5.7) si nota come la

percentuale in peso di chitosano (considerando il peso del composto anidroⁱⁱ)
sia di circa il 6% in peso in entrambe le condizioni operative.

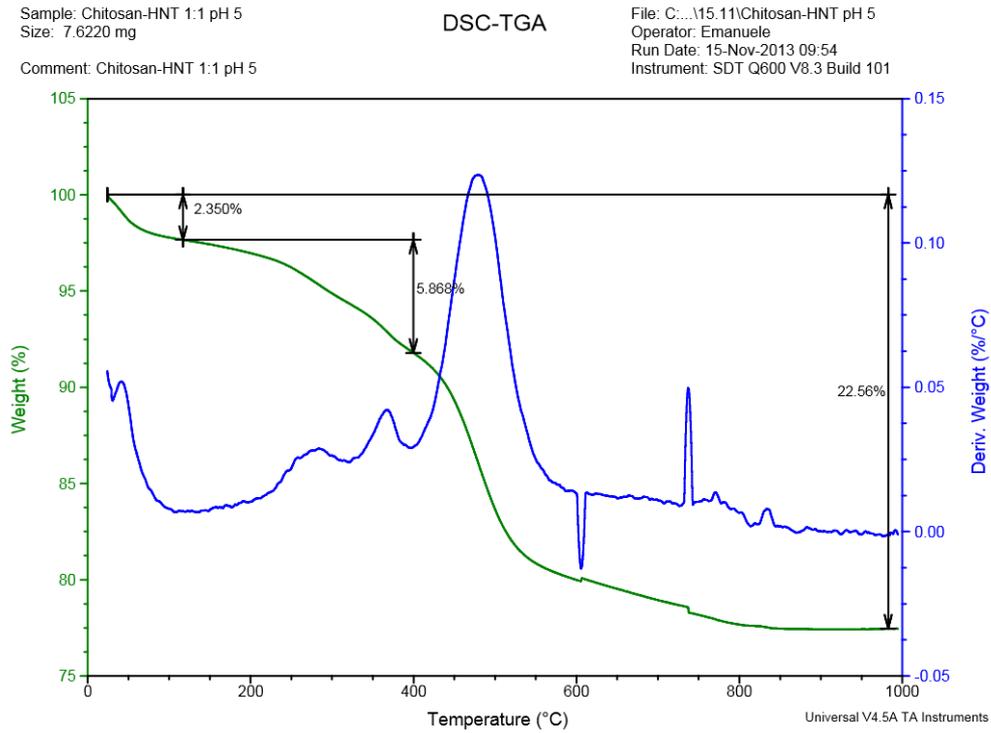


Figura 5.6: DTG HNT+Chitosano a pH 5

ⁱⁱ $Peso\ NC\ anidro = P_{tot}(1 - \%H_2O)$ $\%CHIT\ corr. = \frac{\%CHIT}{1 - \%H_2O} * 100$

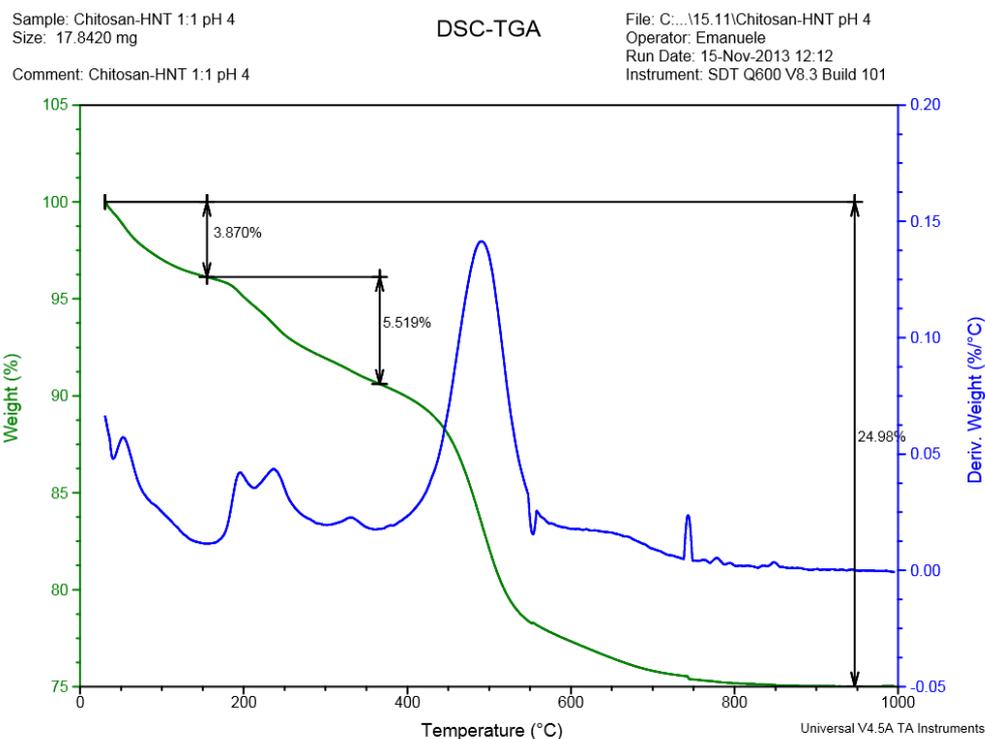


Figura 5.7: DTG HNT+Chitosano a pH 4

Campione	Peso NC (mg)	% Chitosano corr.
HNT + Chitosano (pH 5)	7.6	6.0
HNT + Chitosano (pH 5)	17.8	5.7

5.2.2 FTIR

Lo spettro IR del composito con chitosano non fornisce alcuna informazione o evidenza di un'effettiva interazione fra polisaccaride e HNT. Nel composito ibrido è tuttavia possibile rilevare sia i picchi tipici delle alloisiti sia quelli della componente organica. Si notano infatti due segnali intorno a 1400 cm^{-1} , attribuibili al chitosano, ad indicare la sua effettiva presenza nel composito.

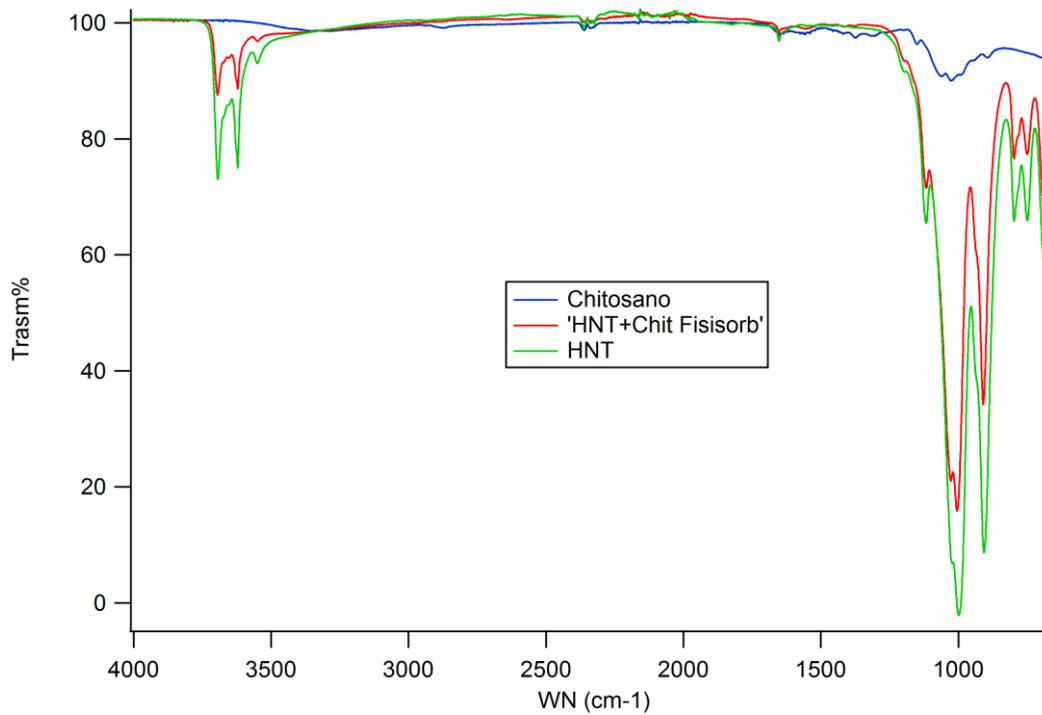


Figura 5.8: confronto spettro FTIR HNT - Chitosano - HNT/Chitosano

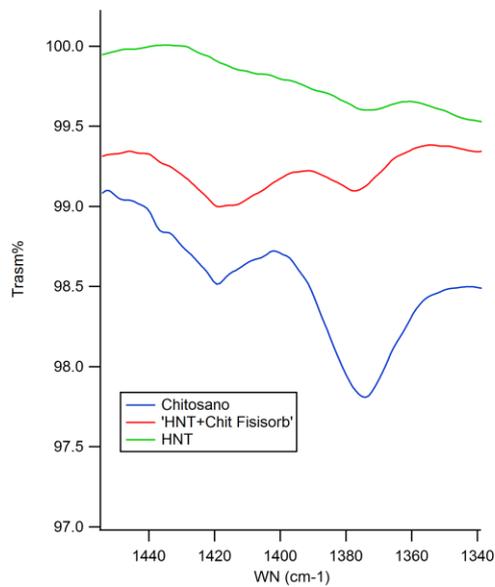


Figura 5.9: ingrandimento spettro FTIR HNT - Chitosano - HNT/Chitosano

5.2.3 SEM

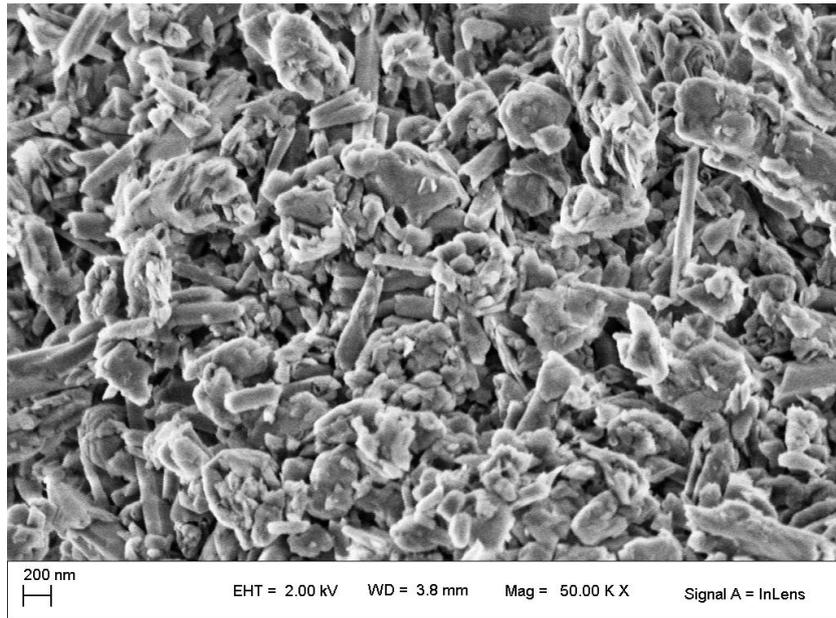


Figura 5.10: Immagine SEM HNT + Chitosano

Dalle immagini del SEM non sembrano esserci modifiche morfologiche o alterazioni strutturali in seguito al fisisorbimento del chitosano sui nanotubi di alloisite.

5.2.4 TEM

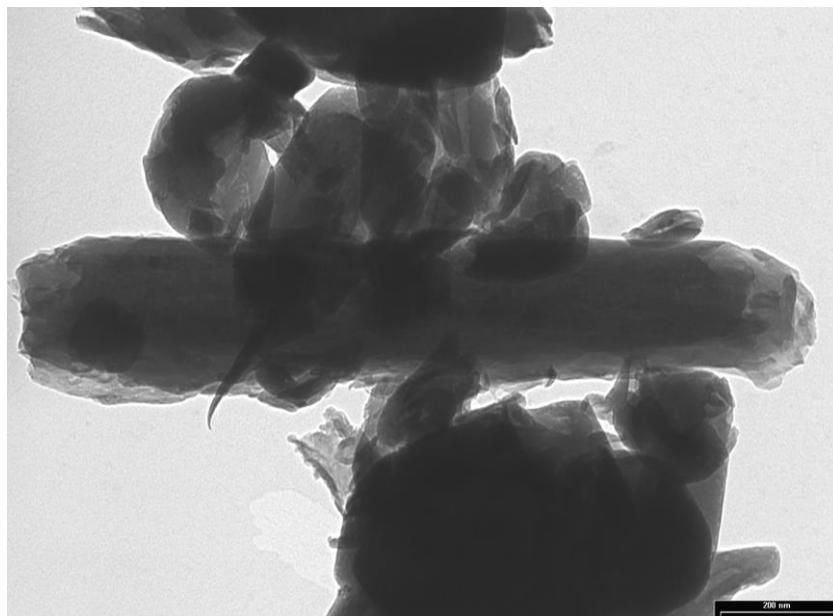


Figura 5.11: Immagini TEM HNT + Chitosano

A differenza delle immagini SEM, il microscopio elettronico a trasmissione ci permette di distinguere molto nettamente la componente organica del polisaccaride da quella inorganica delle alloisiti. L'immagine mostra una ricopertura totale e sufficientemente omogenea rivestire completamente il nanotubo.

5.3 Caratterizzazione HNT+Ac. Ialuronico

5.3.1 Funzionalizzazione con APTMS

5.3.1.1 Analisi Elementare

	N%	C%	H%
HNT	0.00	0.09	1.70
HNT+APTMS 20%	0.06	0.27	1.38
HNT+APTMS 50%	0.09	0.39	1.71
HNT+APTMS 100%	0.14	0.59	1.73

Dall'analisi elementare delle nostre HNT funzionalizzate con APTMS si osserva l'andamento progressivo della concentrazione in peso di azoto: assente nel campione non funzionalizzato e presente in quantità sempre maggiori all'aumentare della superficie funzionalizzata in accordo con le stime previste.

5.3.1.2 DTG

Ripetendo quanto fatto per HNT + Chitosano, abbiamo effettuato misure termogravimetriche per stimare la quantità di acido ialuronico legata covalentemente alla superficie delle alloisiti.

Per valutare l'effetto della funzionalizzazione abbiamo confrontato il composito trattato con APTMS + EDC, e quindi con la presenza di

un'effettiva funzionalizzazione covalente, con un sistema analogo senza carbodiimide che presenta solo effetti di fisisorbimento. Ogni sistema è stato studiato prima e dopo di un ulteriore lavaggio

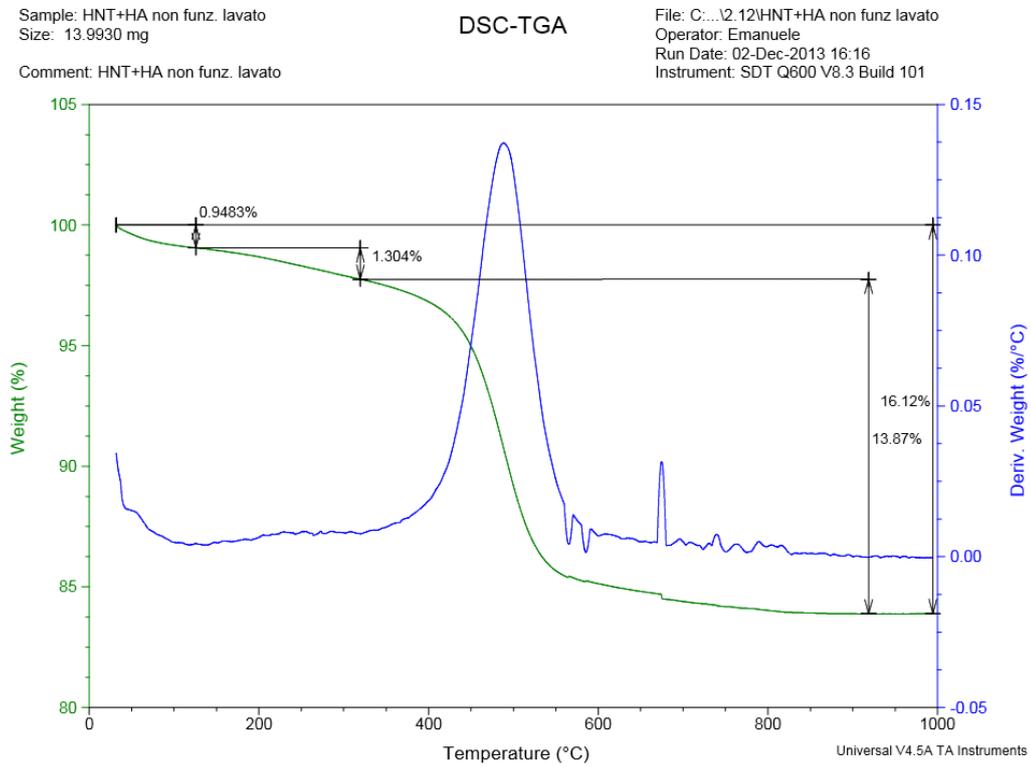


Figura 5.12: HNT+HA fisisorbito e lavato

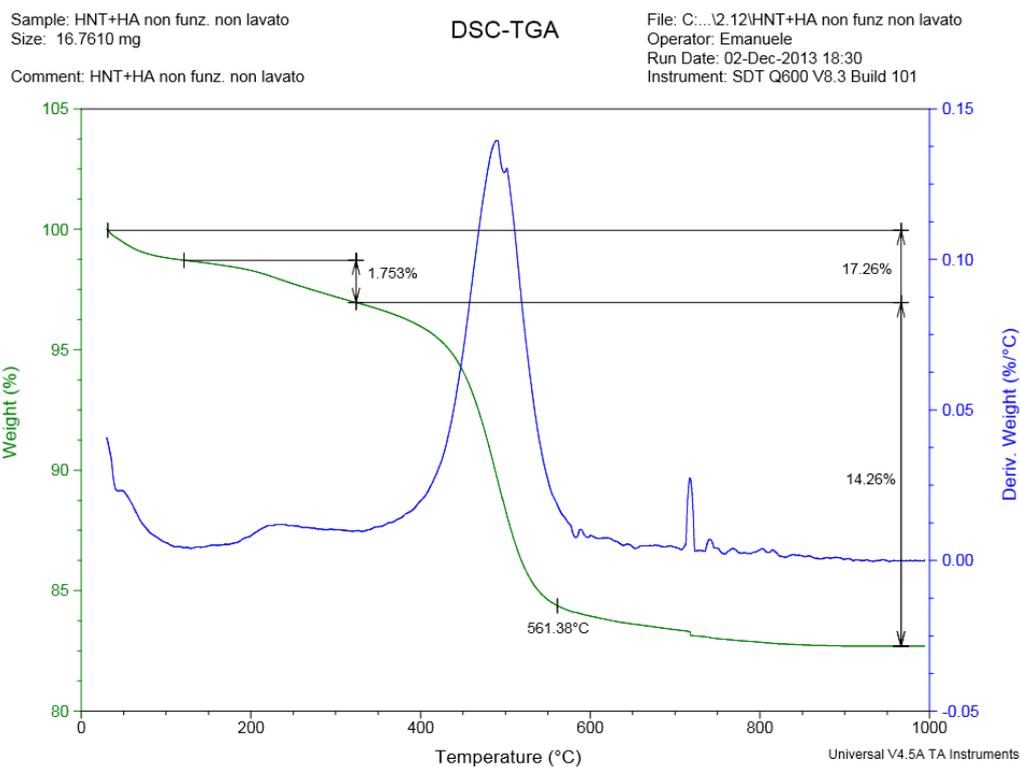


Figura 5.13: HNT+HA fisisorbito e non lavato

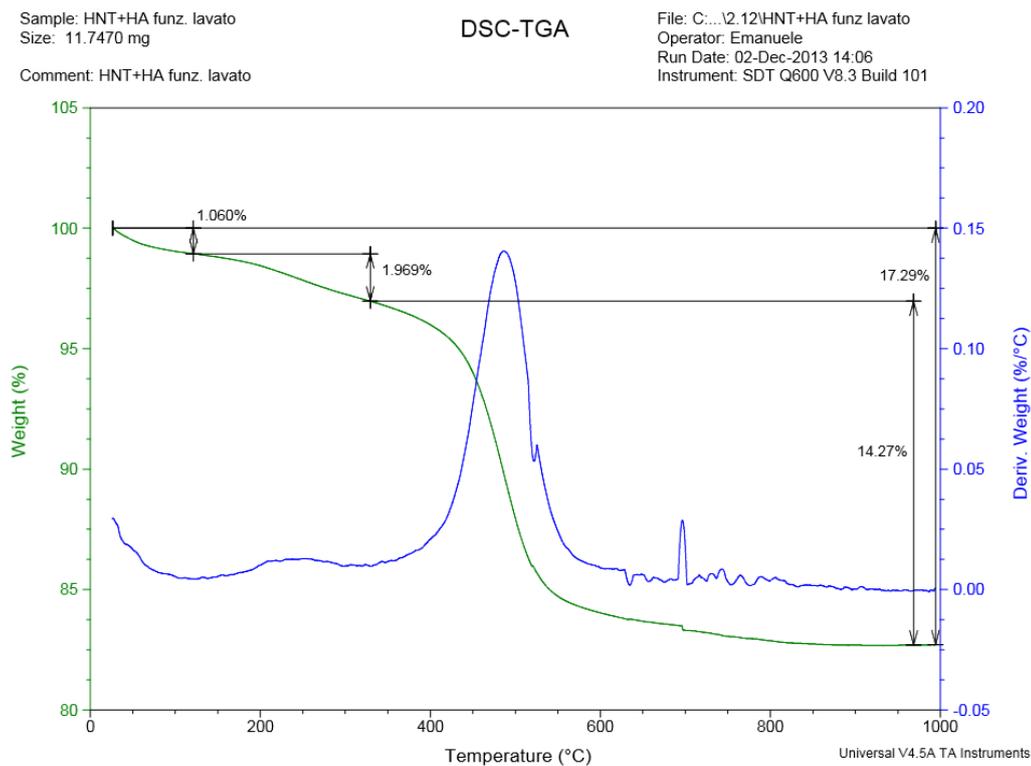


Figura 5.14: HNT+ APTMS+HA funzionalizzato e lavato

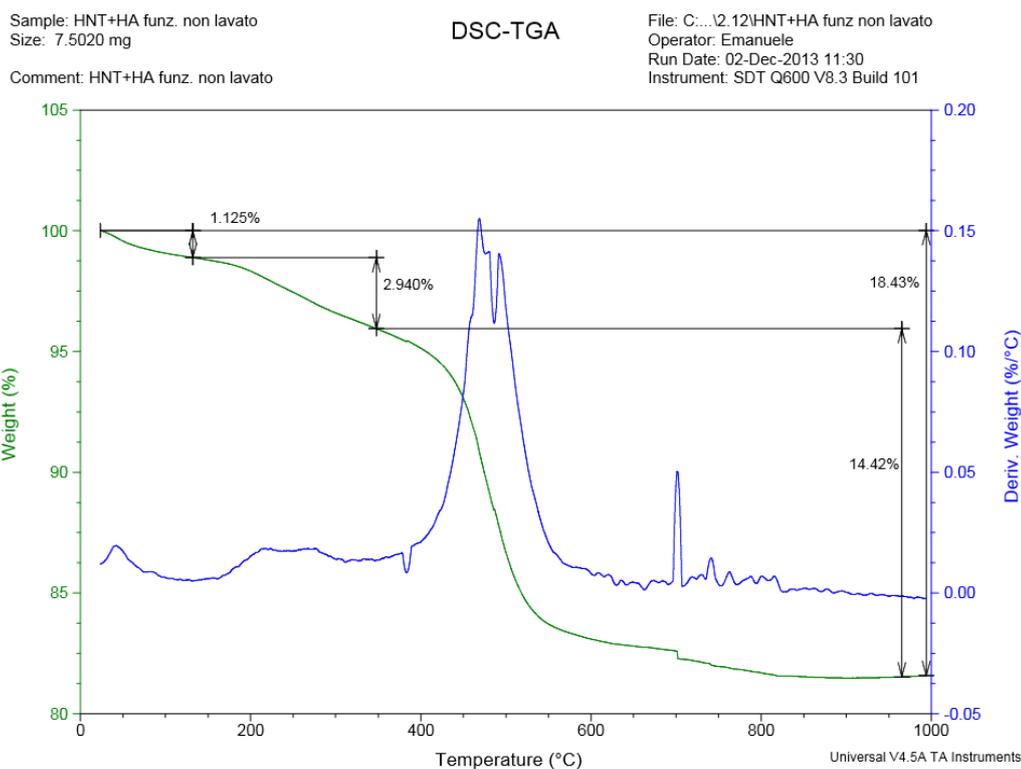


Figura 5.15: HNT+ APTMS+HA funzionalizzato e non lavato

Campione	% Ac. Ialuron. corretta
HNT+HA fisorbito e lavato	1.32%
HNT+HA fisorbito e non lavato	1.78%
HNT+APTMS+HA funz. e lavato	2.00%
HNT+APTMS+HA funz. e non lavato	2.97%

Si vede chiaramente come il lavaggio porti via una parte del polisaccaride trattenuto, ma ancor più significativo è l'effetto della funzionalizzazione. Infatti studiando i corrispettivi composti lavati si osserva un incremento di acido ialuronico di circa il 50% dove presente una funzionalizzazione di tipo covalente.

5.3.1.3 FTIR

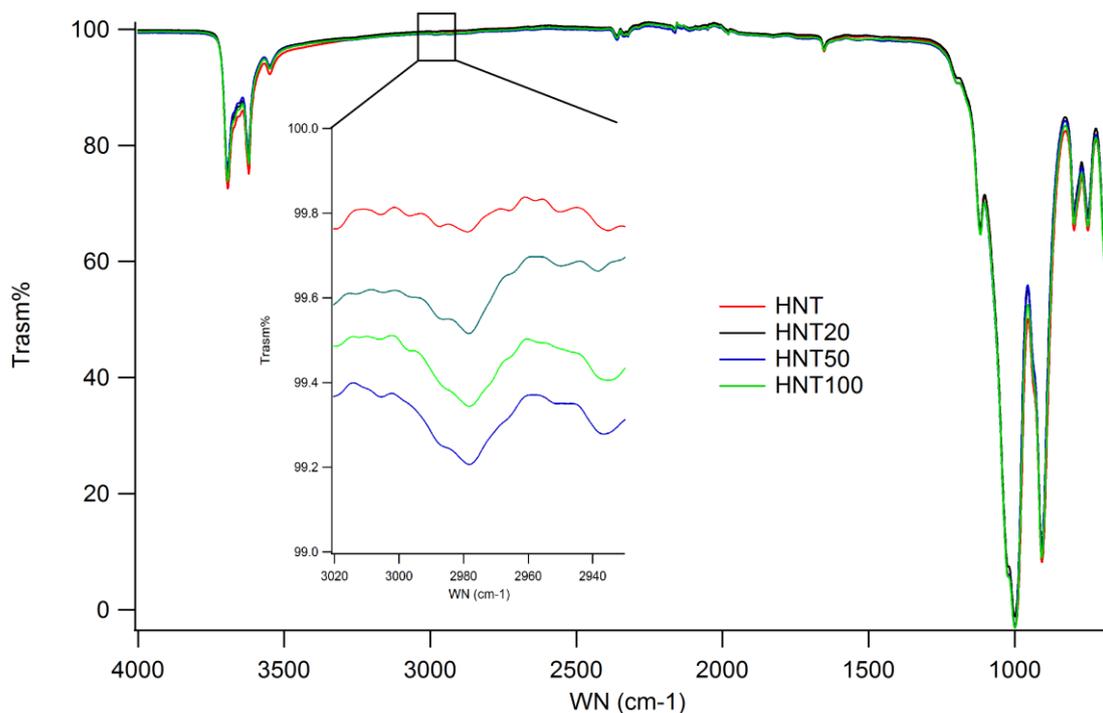


Figura 5.16: Spettro IR di HNT funzionalizzati con APTMS al 20, 50 e 100% della superficie

Data la bassissima concentrazione di azoto presente nel campione ($< 0.08\%$ in peso) non è stato possibile distinguere né lo stretching né il bending N-H dell'ammina primaria. Tuttavia dallo spettro IR si nota un significativo segnale intorno ai 2900 cm^{-1} corrispondente ai C-H stretching del gruppo propile dell'APTMS. Si vede dallo spettro come il picco sia appena accennato nelle HNT non funzionalizzate (dovuto ad impurezze organiche) a differenza degli altri tre campioni modificati con APTMS che presentano picchi molto più pronunciati.

Dallo spettro FTIR non si nota alcuno shift o cambio di intensità fra il campione con il polisaccaride fisisorbito sulla superficie e quello legato covalentemente. Il picco del legame C=O ammidico a 1650 cm^{-1} , formatosi durante la reazione di funzionalizzazione, non dà alcun segnale distinguibile

probabilmente a causa della bassissima concentrazione di azoto presente sulla superficie degli HNT.

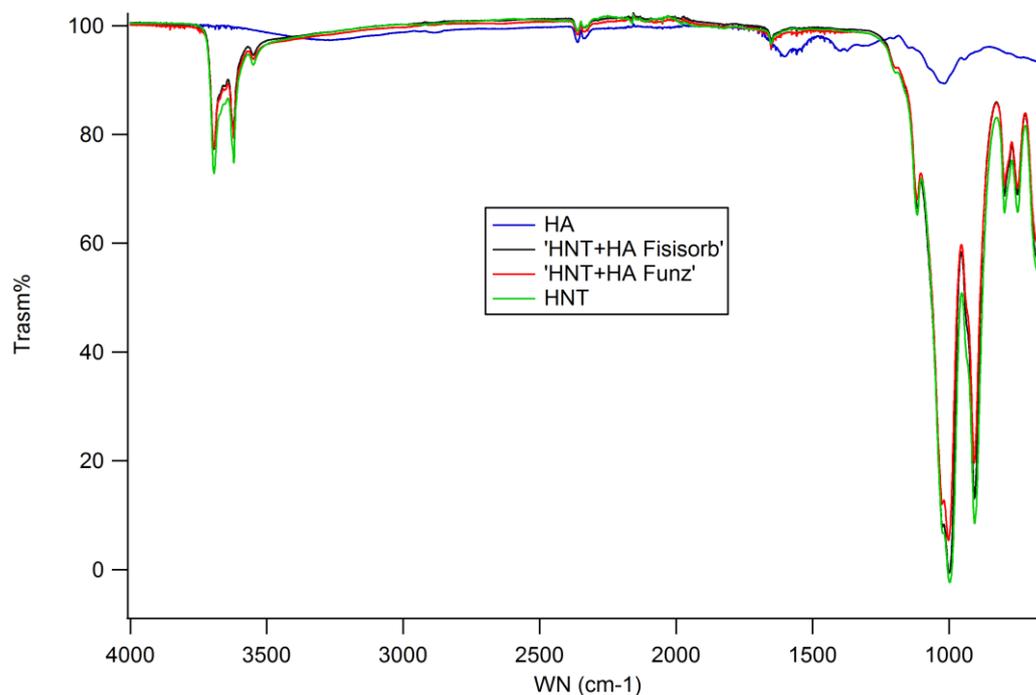


Figura 5.17: confronto spettro FTIR HNT - Ac. Ialur. - HNT/Ac. Ialur. (fisisorb) - HNT/Ac. Ialur. (funz)

5.3.2 Funzionalizzazione con GPTS

5.3.2.1 DTG

Abbiamo eseguito le stesse misure termogravimetriche verificando una reazione di funzionalizzazione alternativa con l'uso di GPTS. Come nel caso precedente, ogni sistema è stato studiato prima e dopo di un ulteriore lavaggio. Di seguito i dati ottenuti.

Sample: HNT+GPTS+HA+H2O lavato
Size: 16.2250 mg
Method: Ramp
Comment: HNT+GPTS+HA+H2O lavato

DSC-TGA

File: C:\...12.03\HNT+GPTS+HA+H2O lavato
Operator: Emanuele
Run Date: 12-Mar-2014 17:09
Instrument: SDT Q600 V8.3 Build 101

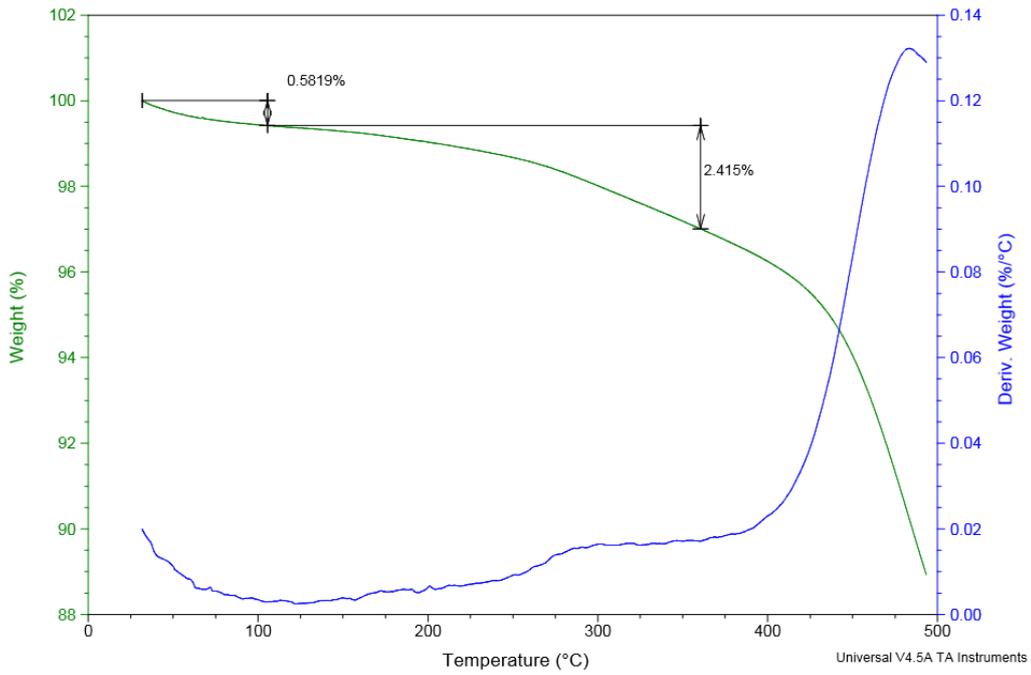


Figura 5.18: HNT+GPTS+HA in H₂O lavato

Sample: HNT+GPTS+HA+H2O
Size: 16.1370 mg
Method: Ramp
Comment: HNT+GPTS+HA+H2O

DSC-TGA

File: C:\...12.03\HNT+GPTS+HA+H2O
Operator: Emanuele
Run Date: 12-Mar-2014 14:24
Instrument: SDT Q600 V8.3 Build 101

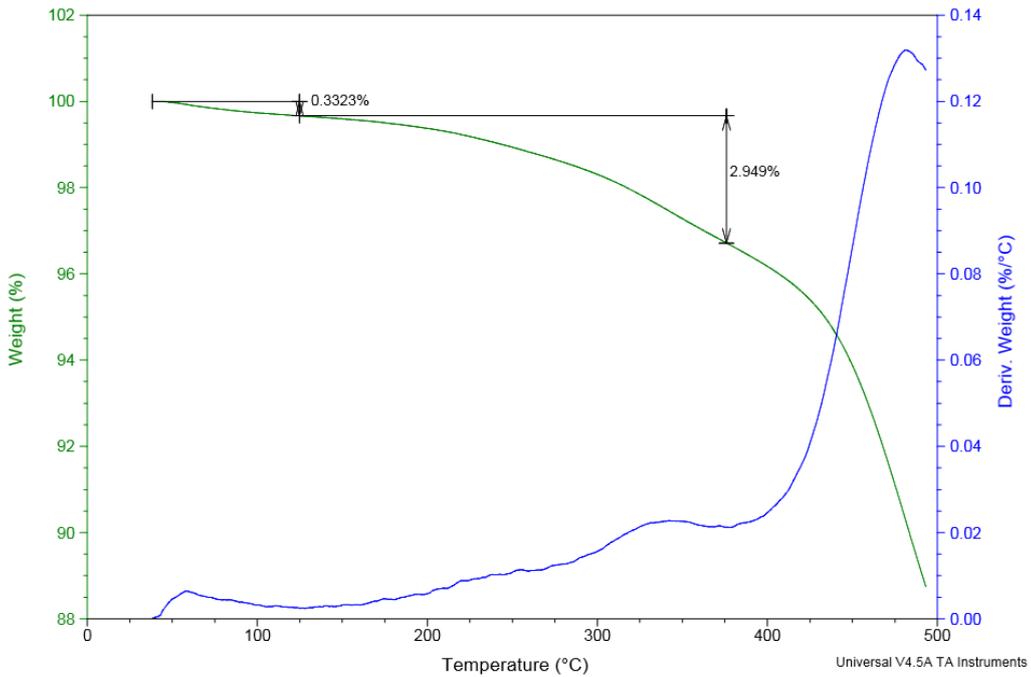


Figura 5.19: HNT+GPTS+HA in H₂O non lavato

Sample: HNT+GPTS+HA+EtOH lavato
Size: 10.6840 mg
Method: Ramp
Comment: HNT+GPTS+HA+EtOH lavato

DSC-TGA

File: C:\...12.03\HNT+GPTS+HA+EtOH lavato
Operator: Emanuele
Run Date: 12-Mar-2014 15:41
Instrument: SDT Q600 V8.3 Build 101

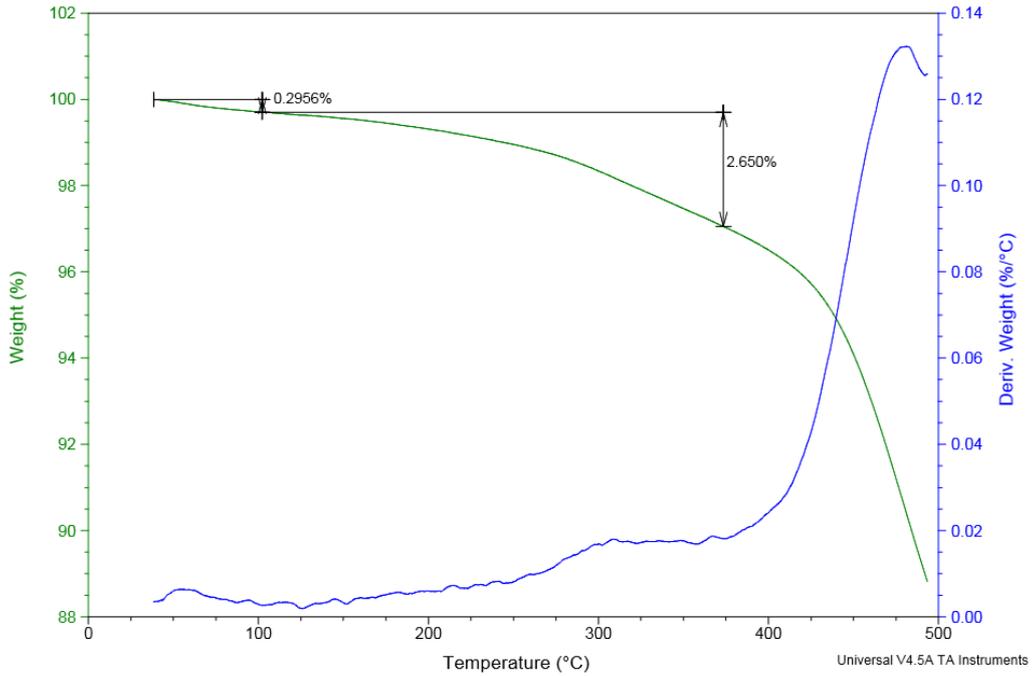


Figura 5.20: HNT+GPTS+HA in EtOH/H₂O 2:1 lavato

Sample: HNT+GPTS+HA
Size: 20.1150 mg
Method: Ramp
Comment: HNT+GPTS+HA

DSC-TGA

File: C:\...Emanuele.Grifoni\12.03\HNT+GPTS+HA
Operator: Emanuele
Run Date: 12-Mar-2014 12:47
Instrument: SDT Q600 V8.3 Build 101

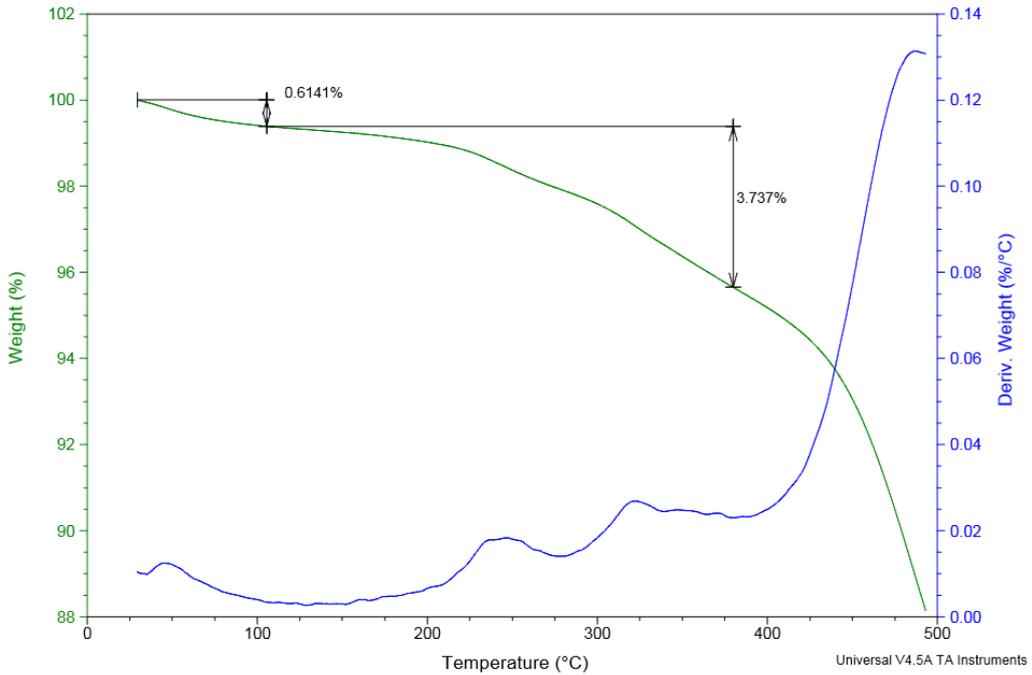


Figura 5.21: HNT+GPTS+HA in EtOH/H₂O 2:1 non lavato

Campione	% Ac. Ialur. corretta
HNT+GPTS+HA in H ₂ O lavato	2.43
HNT+GPTS+HA in H ₂ O non lavato	2.96
HNT+GPTS+HA in EtOH/H ₂ O 2:1 lavato	2.66
HNT+GPTS+HA in EtOH/H ₂ O 2:1 non lavato	3.76

Anche in questo caso la progressione di polisaccaride trattenuto è evidente. Al confronto con il primo metodo di funzionalizzazione si nota una quantità di acido ialuronico trattenuto più alta. Inoltre, in accordo con le previsioni iniziali, si osserva un aumento della resa al diminuire della concentrazione di acqua nel solvente. La nucleofilicità dell'acqua è sufficientemente forte da far aprire l'anello epossidico privandolo così di tutta la sua reattività. Lavorare in alte concentrazioni di acqua favorisce inevitabilmente la reazione competitiva con il solvente a scapito della funzionalizzazione con il polisaccaride. Purtroppo siamo stati costretti a mantenere una quota minima di acqua in quanto essa resta il miglior solvente per l'acido ialuronico.

5.3.2.2 FTIR

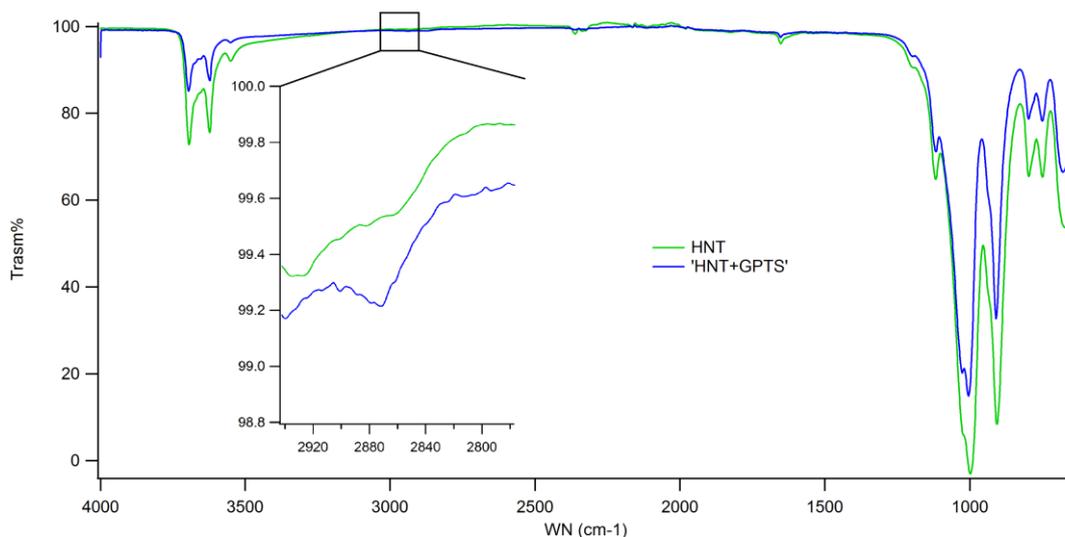


Figura 5.23: Spettro IR di HNT funzionalizzati con GPTS

Come quanto già visto per l'APTMS, il numero di anelli epossidici presenti sulla superficie del campione non è sufficientemente alto da generare un segnale significativo. Infatti non si riesce a distinguere alcun picco né a 1280 cm^{-1} dovuto allo stretching simmetrico dell'anello epossidico (“breathing”) né a 950 cm^{-1} dovuto allo stretching antisimmetrico. E' invece ben distinguibile un picco intorno ai 2900 cm^{-1} dovuto ai C-H stretching della catena carboniosa.

5.3.3 SEM

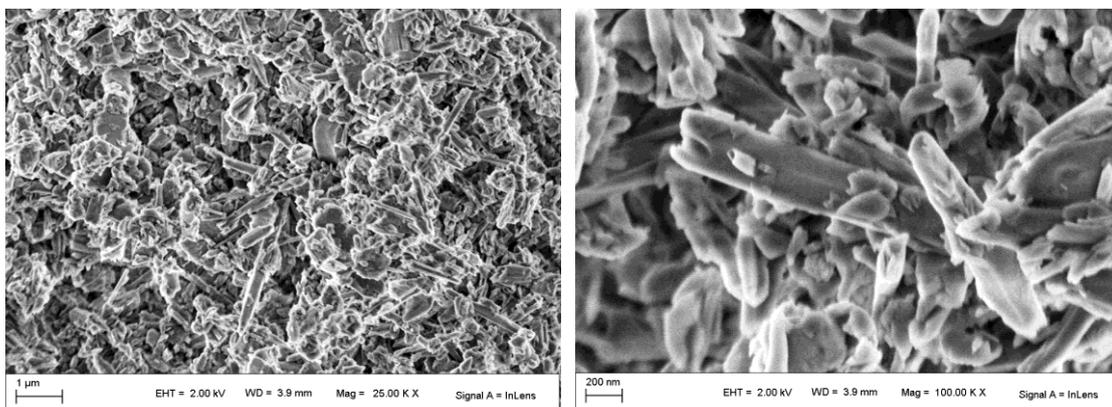


Figura 5.24: Immagini SEM HNT + APTMS + Acido Ialuronico

Come per il composito con Chitosano, anche la funzionalizzazione con acido ialuronico non comporta alcuna modifica morfologica né evidenti alterazioni della struttura.

5.3.4 TEM

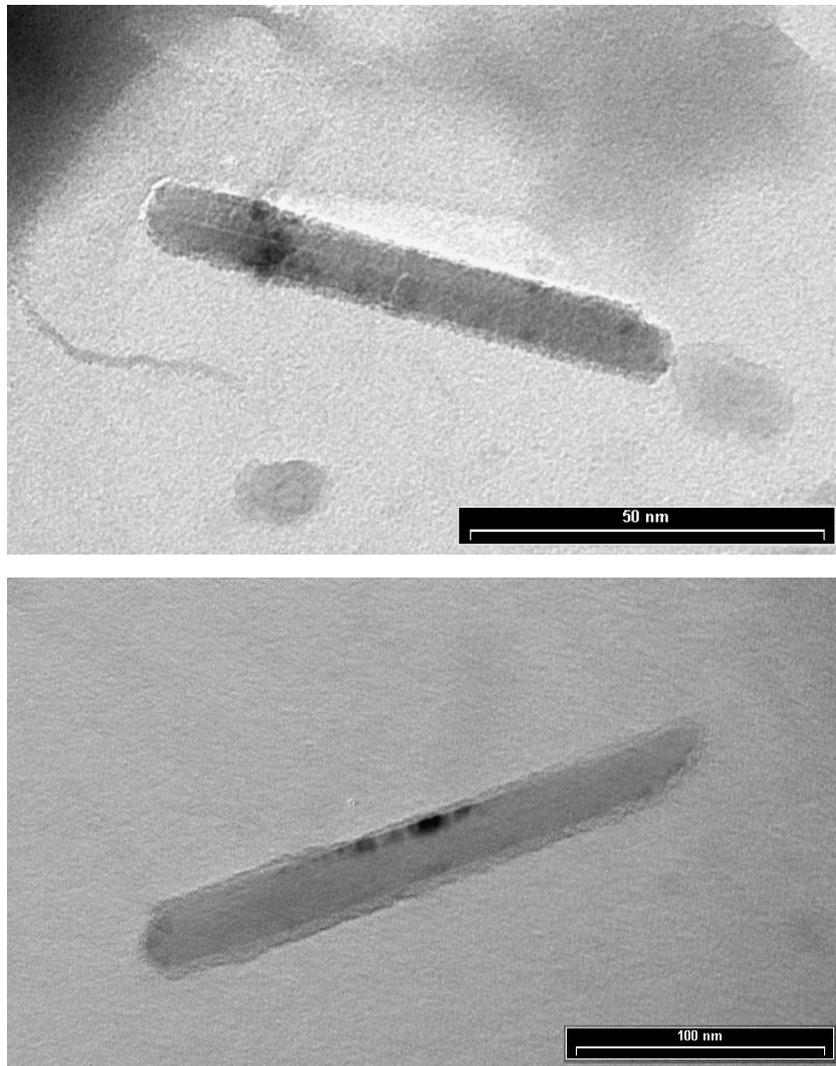


Figura 5.25: Immagini TEM HNT + APTMS + Acido Ialuronico

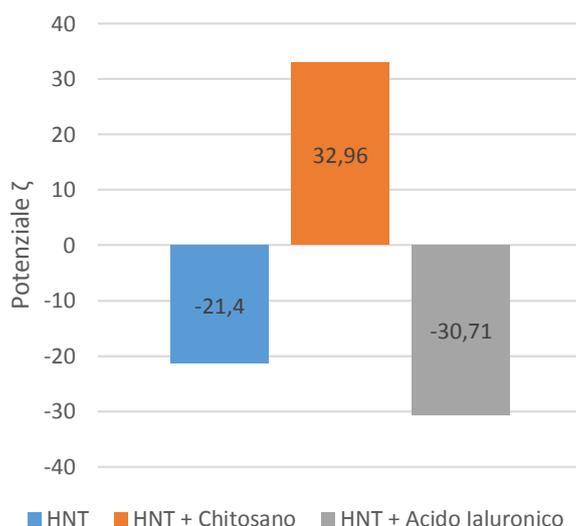
Anche per il composito con acido ialuronico le immagini TEM ottenute mettono in evidenza uno strato sottile, ma uniforme di polisaccaride che ricopre interamente la superficie degli HNT.

5.4 Potenziale Zeta

In accordo con le previsioni fatte, da misure di potenziale zeta osserviamo una carica superficiale negativa per il campione di HNT non trattato, una carica positiva per il campione trattato con chitosano e nuovamente un'altra ancora più negativa per quello funzionalizzato con acido ialuronico.

La possibilità di modulare la carica superficiale dei nostri HNT al variare dell'agente funzionalizzante può avere impieghi interessanti per quanto riguarda applicazioni biomediche o in tutte quelle applicazioni dove si richiede un'affinità più selettiva.

Campione	Potenziale ζ
HNT	- 21.40
HNT + Chitosano	32.96
HNT + Acido Ialuronico	- 30.71



5.5 Prove di rilascio

Per valutare la concentrazione di fluoroforo rilasciata dal nostro sistema abbiamo eseguito misure di spettrofotometria di fluorescenza.

Per ogni frazione è stata eseguita una prima scansione eccitando ad una λ costante e acquisendo il profilo di emissione su tutte le lunghezze d'onda (figura 5.26). In seguito abbiamo riportato i valori di intensità alla λ massima di emissione in funzione del tempo. Misurando la concentrazione di sonda nella soluzione prima e dopo il loading degli HNT abbiamo stimato la percentuale di fluoroforo trattenuta dai nanotubi. In particolare abbiamo misurato una quantità di sonda trattenuta per mg di HNT pari a $0.678 \mu\text{g}$ per la carbossifluoresceina e $0.595 \mu\text{g}$ per la rodamina 110. Attraverso rette di calibrazione (figura 5.27), le intensità sono state convertite in concentrazioni (mg/L) e ogni valore è stato normalizzato sui mg di nanocomposito inizialmente usati. Infine in grafico è stata riportata la percentuale di sonda rilasciata (fissando il 100% con i mg di sonda trattenuti dal sistema) in funzione del tempo.

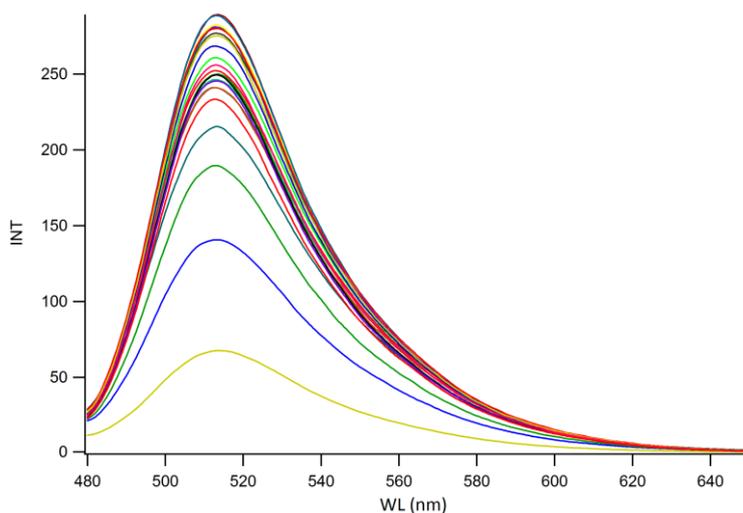


Figura 5.26: esempio di spettri di emissione carbossifluoresceina a diverse concentrazioni

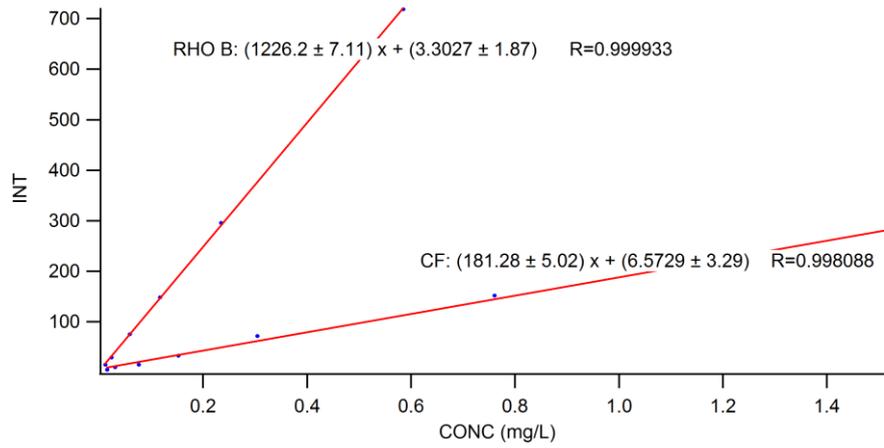


Figura 5.27: rette di calibrazione Carbossifluoresceina e Rodamina 110

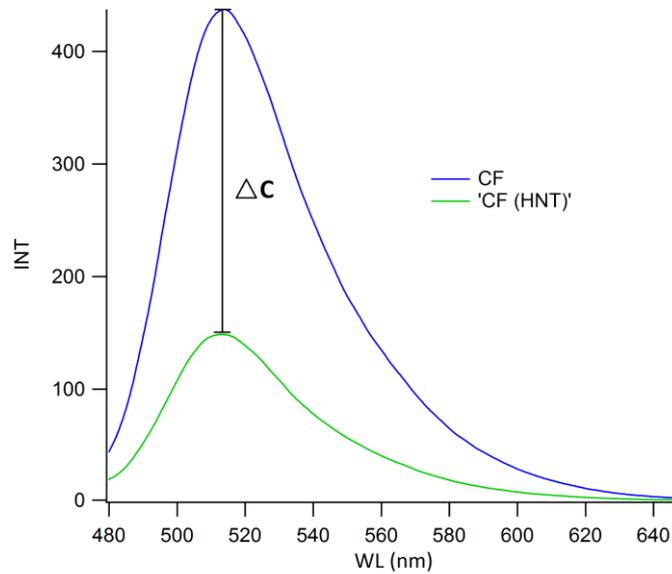
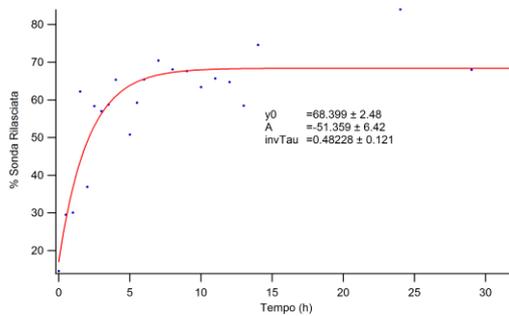
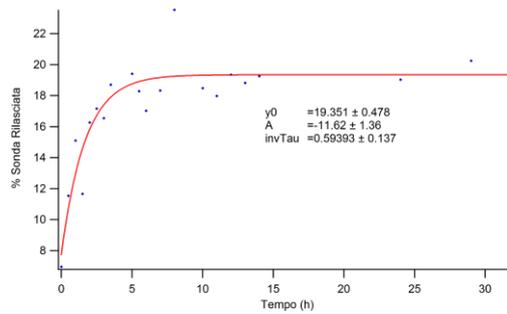


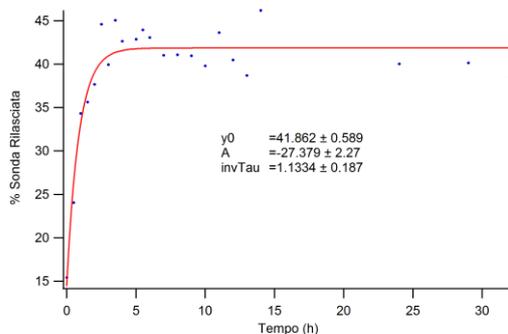
Figura 5.28: spettri di emissione carbossifluoresceina prima e dopo il loading degli HNT



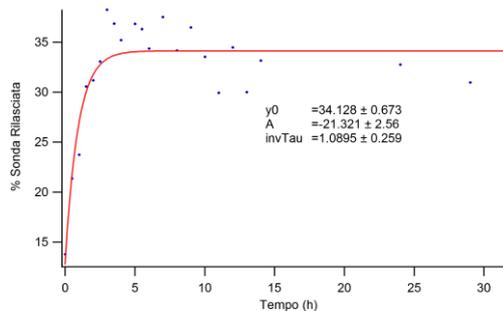
HNT + CF



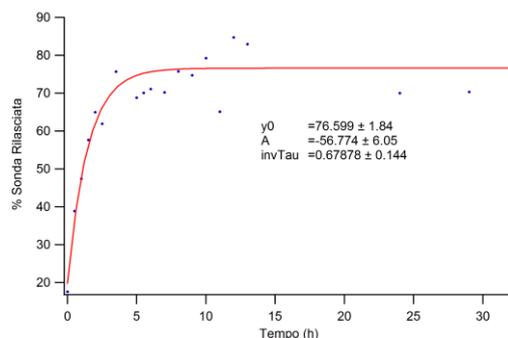
HNT + Acido Ialuronico + CF



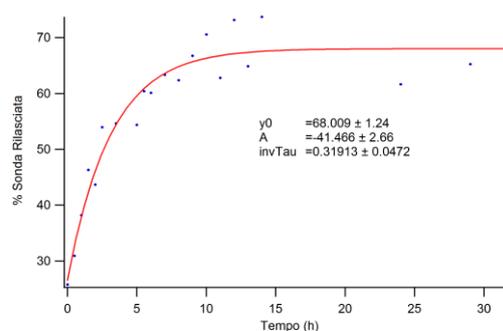
HNT + RHO 110*



HNT + Acido Ialuronico + RHO 110



HNT + RHO 110*



HNT + Chitosano + RHO 110

*i due sistemi contenenti stesso tipo e quantità di composto presentano profili di rilascio diversi in quanto trattati in modo diverso (vedi nota a pag. 20)

Il sistema HNT + Chitosano + Carbossifluoresceina non rilascia la sonda se non in quantità trascurabili. Studiando il sistema nel tempo si misura un valore unico, costante e poco superiore allo zero senza mostrare alcuna progressione durante le 48 h della misura. Sviluppi futuri potrebbero incentrarsi sul rilasci effettuati in condizioni di degradazioni controllate del polisaccaride in presenza di enzimi.

Fittando i dati ottenuti con una funzione esponenziale $y = y_0 + Ae\left(\frac{-x}{\tau}\right)$ si osserva che $1/\tau$ ha le dimensioni di una velocità e y_0 è il plateau al quale raggiungiamo la concentrazione massima rilasciata dal nostro sistema.

Questi sono i dati ricavati:

Nanocomposito	y_0[%]	$\tau^{-1}[\text{h}^{-1}]$
HNT + CF	68 ± 2	0.5 ± 0.1
HNT + Acido Ialuronico + CF	19.3 ± 0.5	0.6 ± 0.1
HNT + RHO 110	41.9 ± 0.6	1.1 ± 0.1
HNT + Acido Ialuronico + RHO 110	34.1 ± 0.7	1.1 ± 0.3
HNT + RHO 110	77 ± 2	0.7 ± 0.1
HNT + Chitosano + RHO 110	68 ± 1	0.32 ± 0.05

Si nota come la presenza di polisaccaride influisca in alcuni casi significativamente sui profili di rilascio. In tutti i sistemi si osserva una percentuale inferiore di sonda rilasciata dove presente il polisaccaride. Con acido ialuronico il rilascio di carbossifluoresceina passa dal 68% del totale a poco più del 19%, mentre con chitosano la stessa sonda non viene rilasciata nell'arco di tutte le 48 ore di monitoraggio. Nel caso della rodamina l'effetto dei polisaccaridi è meno eclatante ma sempre evidente: con acido ialuronico si passa da 42% al 34% di sonda totale rilasciata, mentre con chitosano il rilascio passa da 77 a 68%. Il fatto che le quantità di fluorofori rilasciate siano inferiori indica che i polisaccaridi costituiscono una barriera fisica in grado di impedire la diffusione delle molecole in soluzione. L'acido ialuronico non modifica in modo significativo la velocità di rilascio di entrambi i fluorofori (probabilmente per la sua presenza in così bassa percentuale), mentre il chitosano invece rallenta sensibilmente il rilascio della rodamina. Infatti mentre con la rodamina 110 l'effetto del chitosano fisisorbito è quello di inibirne fortemente il rilascio, la stessa sonda in presenza di acido ialuronico non mostra alcuna variazione significativa nella sua velocità di rilascio.

6 Strumenti

6.1 Termogravimetria

Un'analisi termogravimetrica consiste nella registrazione continua della massa di un campione, in atmosfera controllata, in funzione della temperatura o del tempo. Il diagramma della massa (o percentuale di massa) in funzione della temperatura (o del tempo) si chiama *termogramma* o *curva di decomposizione termica*.

Gli strumenti per la misura delle variazioni di massa sono le *termobilance*. Una termobilancia è composta da una bilancia analitica estremamente sensibile, una fornace, un sistema per il controllo dei gas, un dispositivo per il controllo della temperatura ed un computer per l'acquisizione continua dei dati, come schematizzato nella Figura 6.1.

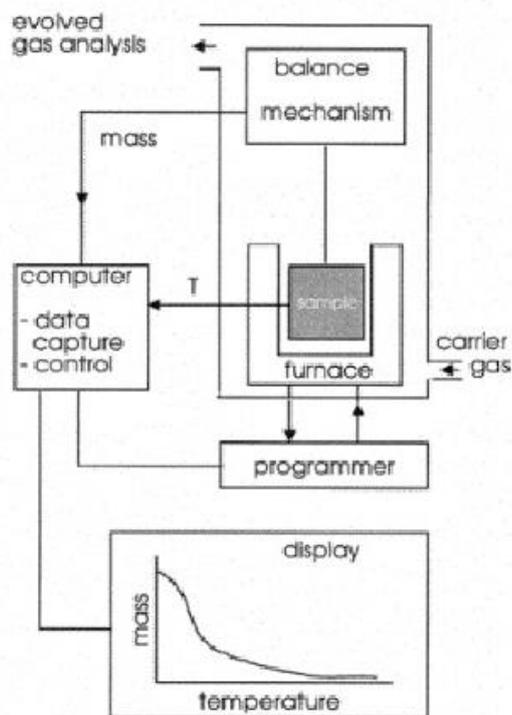


Figura 6.1. Diagramma schematico di una termobilancia.

Esistono diversi tipi di termobalance. Lo strumento SDT Q600 della TA Instruments (figura 6.2) ha una termobilancia dual-beam orizzontale, progettata per permettere la misura contemporanea della perdita di peso e del flusso di calore. La bilancia è costituita da due bracci di ceramica identici per l'alloggiamento di un campione e di un riferimento, che durante la misura vengono posizionati all'interno di una fornace in grado di regolare la temperatura da temperatura ambiente fino a 1500°C (vedi figura 6.3). Il segnale di peso rilevato è la differenza fra i due bracci in modo da eliminare i contributi strumentali, migliorando precisione e accuratezza della misura.



Figura 6.2: SDT Q600 (TA Instruments)

La temperatura registrata in un termogramma è teoricamente la temperatura effettiva del campione, che potrebbe essere rilevata immergendovi direttamente una termocoppia. Questa procedura, tuttavia, è utilizzata raramente, a causa della possibile decomposizione catalitica del campione in contatto con il metallo della termocoppia, della possibilità di contaminazione e degli elevati errori di pesata causati da questa

configurazione. Di conseguenza la temperatura viene registrata da una termocoppia posta il piu' vicino possibile al contenitore (pan) del campione. Nel caso dello strumento da noi utilizzato la termocoppia platino/platino-rodio è incorporata nelle estremita' dei bracci di ceramica, sotto gli alloggiamenti di campione e riferimento, come mostrato in figura 3B.

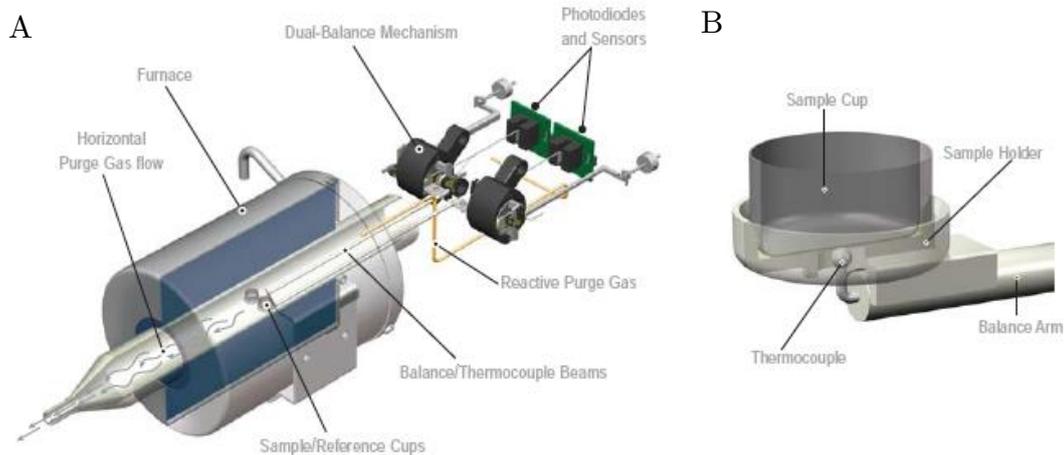


Figura 6.3: A) Sistema di misura della termobilancia SDT Q600 (TA Instruments); B) Posizionamento della termocoppia del campione sull'estremita' di un braccio della bilancia.

Le misure termogravimetriche possono essere effettuate variando la velocita' di riscaldamento in un ampio range. Generalmente si utilizzano velocita' fra 5 e 20°C/min. L'atmosfera all'interno della fornace è controllata mediante un flusso costante di gas. Generalmente viene utilizzato un gas inerte (azoto o argon), in modo da evitare l'ossidazione del campione. Altre volte, invece, l'interesse della misura è proprio lo studio di processi di ossidazione o combustione: in questi casi il gas utilizzato è aria o ossigeno.

La risposta strumentale dipende fortemente dal gas utilizzato, dalla velocita' di scansione e dal tipo di pan porta campione utilizzato. Quando una di queste condizioni viene variata lo strumento va ricalibrato, utilizzando materiali standard di cui viene osservato il punto di fusione o il punto di

Curie. Nel nostro caso è stata utilizzata una calibrazione a tre punti: temperatura ambiente (con termometro certificato), Indio (156.6°C) e Zinco (419.5°C).

6.2 Microscopi elettronici

Un microscopio elettronico utilizza gli stessi principi di funzionamento di un microscopio ottico solamente, invece di utilizzare luce visibile, usa un fascio di elettroni permettendo così di spingersi ad ingrandimenti molto più elevati. Infatti il limite invalicabile del potere risolutivo del microscopio ottico è legato sostanzialmente alla lunghezza d'onda della radiazione impiegata. Il potere risolutivo cresce proporzionalmente al decrescere della lunghezza d'onda della radiazione impiegata secondo il criterio di Abbe e la scoperta che gli elettroni possiedono una radiazione di bassissima lunghezza d'onda (da 0.1 a 0.005 Å) ha suggerito la possibilità di usare fasci di elettroni per ottenere poteri risolutivi assai elevati. Pur non raggiungendo i limiti teorici previsti, un microscopio elettronico (a trasmissione) fornisce ingrandimenti fino a 150 000 - 200 000 volte con un potere risolutivo dell'ordine del milionesimo di millimetro (nanometro).

In linea di principio un microscopio elettronico opera come un normale microscopio ottico qualora si usasse luce con lunghezza d'onda bassissima. Poiché però i normali dispositivi ottici non deviano gli elettroni, si ricorre a lenti elettrostatiche o a lenti magnetiche che, agendo sulla carica elettrica degli elettroni, ne provocano la deviazione. Il microscopio elettronico è quindi essenzialmente composto da una sorgente elettronica di conveniente intensità (generalmente un filamento incandescente di tungsteno che emette elettroni per effetto termoelettronico) e da un dispositivo che imprime forti accelerazioni al fascio di elettroni emesso, sottoponendoli ad una elevata

tensione fino a 100k volt. Il fascio di elettroni accelerato attraversa un condensatore (elettrostatico o magnetico), incide sul campione, i raggi riflessi e trasmessi vengono raccolti su un obiettivo e passando attraverso un oculare va ad incidere o su uno schermo fluorescente o su una lastra fotografica formando l'immagine per l'osservazione visiva. Nei sistemi moderni viene utilizzato un rivelatore collegato ad un computer. Ovviamente per evitare deviazioni collaterali degli elettroni, il tutto è mantenuto sotto costante vuoto spinto.

Fra i vari tipi di segnale emessi da un campione bombardato con un fascio di elettroni troviamo:

- Elettroni retrodiffusi (*backscattering*)
- Elettroni secondari
- Elettroni Auger
- Fotoni di fluorescenza X e di differente energia.

In particolare in microscopia elettronica si sfruttano prevalentemente gli elettroni retrodiffusi e quelli secondari e recentemente sono stati realizzati SEM con rivelatori di raggi X. Di seguito le loro proprietà.

Elettroni Secondari (SE): sono gli elettroni del campione legati ai livelli atomici più esterni che ricevono dal fascio incidente un'energia addizionale sufficiente a causarne l'espulsione. Hanno un'energia inferiore ai 50 eV e sono emessi dagli strati più superficiali del campione, pertanto forniscono esclusivamente informazioni morfologiche del campione.

Elettroni Retrodiffusi (BSE): rappresentano quella porzione di elettroni del fascio che viene riflessa con energie elevate (fino a quella di incidenza). Sono portatori di segnali principalmente composizionali. La quantità di BSE dipende in massima parte dal numero atomico medio del materiale presente

nella porzione di campione irradiato permettendo così di distinguere le diverse fasi che lo costituiscono.

Raggi X: caratteristici degli elementi che compongono il campione in esame. L'intensità di queste radiazioni caratteristiche è proporzionale alla concentrazione dell'elemento nel campione. La microanalisi ai raggi X dà informazioni specifiche circa la composizione degli elementi in termini di quantità e distribuzione.

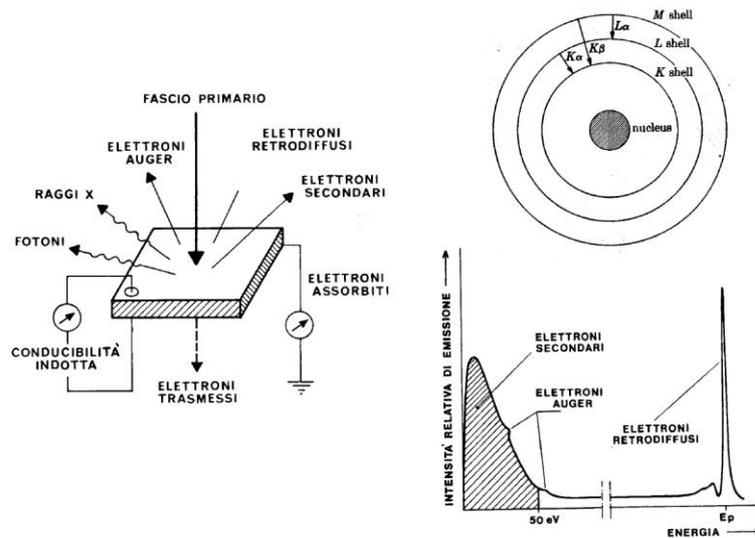


Figura 6.4: schema delle radiazioni emesse, riflesse e trasmesse e la loro distribuzione

6.2.1 SEM - Scanning Electron Microscope

La microscopia elettronica a scansione è una tecnica che permette di ottenere immagini morfologiche di superfici ad elevata risoluzione “illuminandole” con un fascio di elettroni che viene focalizzato sulla superficie del campione. La superficie risponde all'eccitazione dovuta all'interazione elettroni-campione tramite la produzione di diversi tipi di segnale che vengono acquisiti da opportuni detectors e successivamente elaborati fino a formare un'immagine.



Figura 6.5: esempio di micorscopio SEM

La sorgente elettronica è generalmente un catodo a filamento di tungsteno o, negli strumenti a più elevata risoluzione, un cannone ad emissione di campo. Gli elettroni, aventi un'energia tra 1 e 30 KeV , vengono fatti passare attraverso un sistema di lenti magnetiche di condensazione e focalizzazione. Tanto più acceleriamo gli elettroni del fascio, tanto più piccola sarà la lunghezza d'onda della radiazione associata agli elettroni, permettendo così di ottenere risoluzioni sempre più alte. Tuttavia l'energia massima imprimibile agli elettroni è limitata dalla capacità del campione di resistere a tale forza senza andare incontro a decomposizione. Le lenti del condensatore determinano la velocità con cui il fascio di elettroni raggiunge la lente dell'obiettivo, mentre quest'ultima stabilisce la dimensione del fascio che colpirà il campione. La scansione con il SEM viene eseguita tramite una coppia di bobine localizzate all'interno della lente dell'obiettivo, esse permettono la deflessione del fascio nelle due direzioni x e y lungo il campione. Un segnale elettrico inviato alle bobine permette il controllo della

scansione. La risposta del campione è elaborata da un rivelatore il cui segnale d'uscita serve a produrre l'immagine del campione. Lo schema semplificato di un SEM è riportato in Figura 6.6.

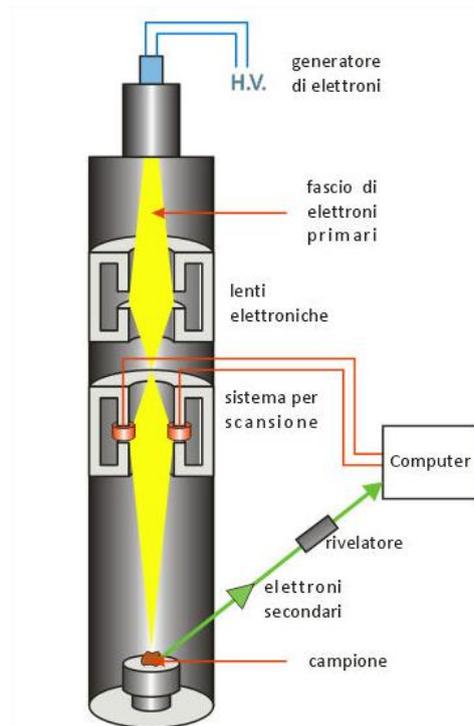


Figura 6.6: schema semplificato di un SEM

Durante la misura il campione è collocato in una apposita camera mantenuta ad una pressione di circa 10^{-6} torr grazie ad un sistema di pompe da vuoto. Le interazioni tra il fascio elettronico e la superficie del campione possono essere di due tipi: elastiche ed anelastiche. Quelle elastiche modificano la traiettoria degli elettroni ma non alterano la loro energia, mentre quelle anelastiche causano il trasferimento di energia dagli elettroni al campione causandone la sua eccitazione e provocando l'emissione di elettroni secondari, elettroni Auger e raggi X. Parte degli elettroni che urtano anelasticamente perdono una tale energia da rimanere nel campione, altri invece subiscono numerose collisioni e vengono retrodiffusi formando un fascio allargato limitando entrambi il potere risolutivo dello strumento. Gli

elettroni retrodiffusi nascono dall'interazione quasi elastica tra gli elettroni del fascio primario e i nuclei atomici del campione, sono poco deviati rispetto la direzione iniziale del fascio e hanno un'energia abbastanza elevata in confronto agli elettroni secondari. Questi ultimi sono emessi in seguito all'interazione tra gli elettroni del fascio incidente e gli elettroni di valenza del materiale. Gli elettroni secondari, aventi un'energia di pochi eV, possono essere eventualmente deviati grazie all'applicazione di una debole differenza di potenziale impedendo il loro ingresso nel rivelatore, oppure possono essere raccolti. Il fascio primario può inoltre causare l'espulsione degli elettroni degli strati più interni e provocare l'eccitazione degli atomi. L'energia di diseccitazione rilasciata quando un elettrone da uno shell esterno va a riempire il posto vacante del guscio ionizzato può essere convertita in un quanto di energia caratteristica dei raggi X oppure può essere trasferita ad un altro elettrone che lascerà il campione come elettrone Auger. Gli elettroni Auger possiedono limitata energia e sono caratteristici dell'atomo che li ha emessi, per tale ragione danno informazioni riguardo la composizione superficiale del campione. I raggi X permettono invece di ottenere informazioni riguardo la natura chimica degli atomi del campione.



Figura 6.7: esempio di immagine SEM di un comune insetto

6.2.2 TEM - Transmission Electron Microscopy

Il TEM risulta essere simile al SEM per strumentazione e sorgente luminosa ma i due sistemi forniscono misure molto differenti. Mentre il SEM sfrutta prevalentemente l'emissione di elettroni secondari ed è principalmente utilizzato per lo studio delle superfici, il TEM acquisisce immagini studiando gli elettroni trasmessi e fornisce informazioni circa la struttura interna del campione analizzato.



Figura 6.8: esempio microscopio TEM

Nel TEM il fascio elettronico è condensato da lenti elettromagnetiche per attraversare campioni molto sottili di 100 nm o meno. Lo spessore del campione deve essere sufficientemente sottile in modo da consentire che alcuni degli elettroni incidenti siano in grado di attraversarlo; durante tale attraversamento molti elettroni sono assorbiti ed altri, colpendo zone non uniformi, sono deviati irregolarmente. Dopo che il fascio ha attraversato il campione, viene focalizzato da una lente “obiettivo” e quindi allargato e

proiettato su uno schermo fluorescente. Le zone dello schermo che appaiono scure sono dovute appunto ad un'irregolare deviazione degli elettroni trasmessi da parte delle dislocazioni della struttura cristallina del campione. Quando il fascio incide sul campione, una parte degli elettroni del medesimo viene diffratta, deviando dalla direzione del fascio trasmesso; sia il fascio trasmesso che quello diffratto passano attraverso una lente obiettivo che ha il compito di focalizzarli e creare così un segnale in grado di dare informazioni sul campione.

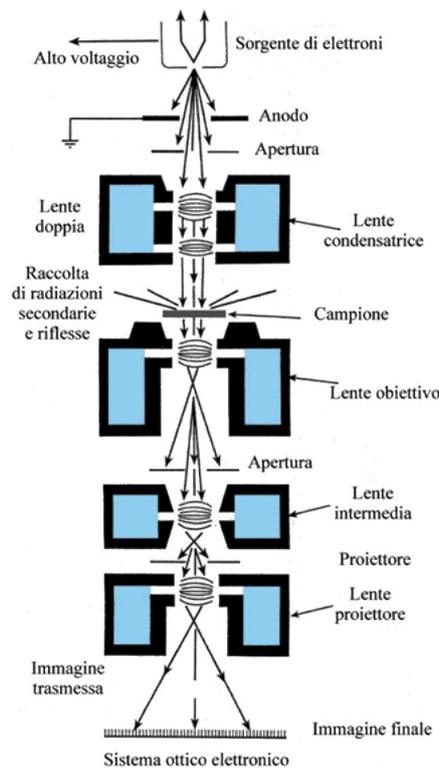


Figura 6.9: Rappresentazione schematica di un TEM

Utilizzando il microscopio, l'operatore può decidere di utilizzare il fascio diretto o quello diffratto, mediante un diaframma, per formare l'immagine sullo schermo; la riproduzione dell'immagine sullo schermo è dovuta a fenomeni di contrasto. Il termine contrasto si riferisce alle differenze di intensità che rendono distinguibili dallo sfondo le parti di un'immagine. Il contrasto di diffrazione è dovuto all'uso del diaframma che permette il

passaggio dei soli elettroni deviati secondo un certo angolo; questo significa che qualunque cosa crei delle alterazioni negli angoli del reticolo (presenza di dislocazioni, precipitati, inclusioni, difetti di vario genere) altera la diffrazione degli elettroni e crea fenomeni di contrasto che permettono di individuare la causa che ha creato la diffrazione sullo schermo. Dato che in assenza del campione l'immagine appare chiara, e che le imperfezioni reticolari (o i precipitati) che deformano il reticolo creano contrasti scuri, il modo di visualizzazione che usa il fascio diffratto si dice "campo chiaro" (BF = Bright Field). Analogamente si può posizionare il diaframma selezionando il passaggio del solo fascio diretto; così che ogni cosa che crei nel reticolo distorsioni altera le condizioni di diffrazione del fascio, dando origine a quei fenomeni di contrasto che permettono di vedere l'immagine sullo schermo. Questa volta in assenza del campione l'immagine appare scura e il contrasto provocato dal campione è chiaro; questa modalità di visualizzazione si dice "campo scuro" (DF = Dark Field).

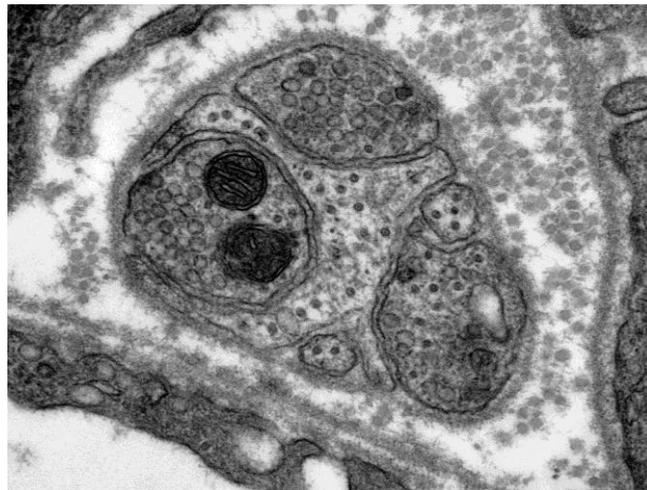


Figura 6.10: esempio di immagine TEM di una cellula pancreatica

6.3 Tecnica BET

Tecnica di caratterizzazione di solidi che ha l'acronimo derivato dagli autori (Brunauer, Emmett e Teller) della particolare equazione che permette di determinare un parametro di grande importanza nello studio dei solidi ovvero l'area superficiale specifica (SS). Tale parametro esprime il rapporto tra la superficie complessiva del campione e il peso dello stesso e viene solitamente espresso in m^2/g . La tecnica BET utilizza il principio dell'adsorbimento fisico di un gas inerte (azoto), di cui si conoscono le dimensioni, per determinare la superficie totale non nota di un campione. La misura viene fatta studiando la quantità di gas adsorbito al variare del rapporto tra la pressione parziale dell'azoto e la sua tensione di vapore alla temperatura dell'azoto liquido. Opportune procedure di calcolo permettono anche di determinare la distribuzione dei pori nel campo della mesoporosità.

Equazione BET:

$$\frac{1}{v \left[\frac{P_0}{P} - 1 \right]} = \frac{C - 1}{v_m C} \left(\frac{P_0}{P} \right) + \frac{1}{v_m C}$$

con $C = \exp\left(\frac{E_1 - E_L}{RT}\right)$ = costante BET, P e P_0 sono rispettivamente le pressioni di equilibrio e di saturazione del gas alla temperatura di adsorbimento, v è il volume di gas adsorbito e v_m la quantità di gas adsorbito nel primo monostato. E_1 e E_L sono rispettivamente le energie di adsorbimento del primo monostato e degli strati successivi.

Plottando l'equazione riportando sulle ordinate $\frac{1}{v} \frac{\varphi}{1 - \varphi}$ e sulle ascisse φ (con $\varphi = \frac{P}{P_0}$) otteniamo una retta con pendenza A e intercetta I. Da queste possiamo ricavare v_m e C:

$$v_m = \frac{1}{A + I} \quad C = 1 + \frac{A}{I}$$

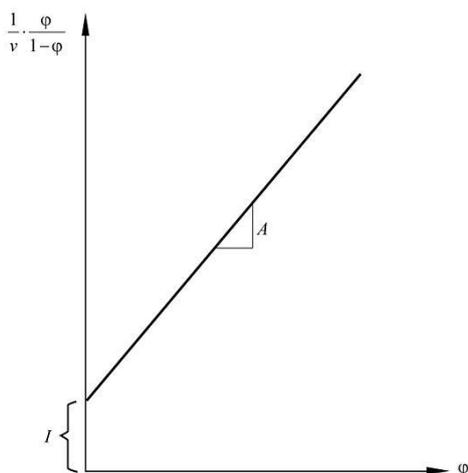


Figura 6.11: grafico dell'equazione BET

Da v_m possiamo ricavarci l'area totale come $S_{tot} = \frac{v_m N s}{V}$ con N = numero di Avogadro, s = sezione di adsorbimento del gas e V = volume molare del gas. Per la superficie specifica è sufficiente dividere l'area totale per la massa del campione.

La BET, confrontando le differenze fra la curva di assorbimento e quella di desorbimento, è in grado inoltre di stimare il volume totale dei pori e la loro distribuzioni dei volumi.

6.4 ATR-FTIR - Attenuated Total Reflectance FTIR

La spettroscopia infrarossa o spettroscopia IR è una tecnica spettroscopica di assorbimento utilizzata nel campo della chimica analitica e della caratterizzazione dei materiali a matrice organica, oltre che in chimica fisica per lo studio dei legami chimici.

Quando un fotone infrarosso viene assorbito da una molecola, questa passa dal suo stato vibrazionale fondamentale ad uno stato vibrazionale eccitato. La differenza di energia fra i due stati determina la frequenza della radiazione assorbita secondo la legge di Bohr $\Delta E = h\nu$ con h costante di Planck e ν la frequenza della radiazione.

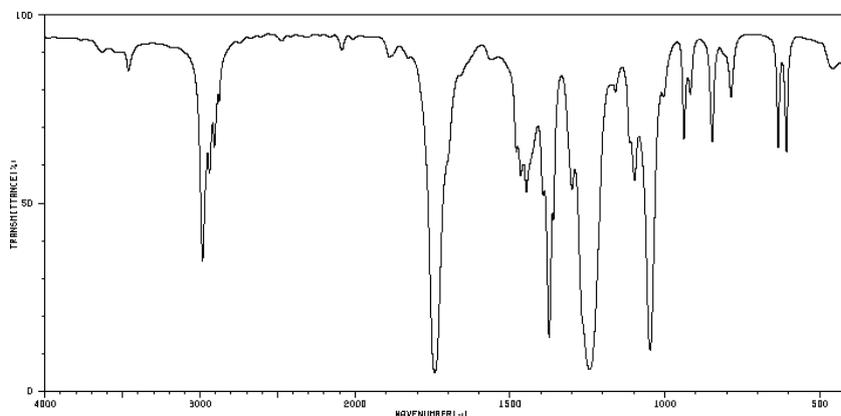


Figura 6.12: esempio di spettro IR

In un tipico spettro IR troviamo in ascissa una scala di frequenze espresse in numero d'onda, ovvero quantità di onde per centimetro (λ^{-1}), e in ordinata la trasmittanza percentuale. Se un materiale è trasparente alla radiazione infrarossa il suo spettro si presenterà come una linea parallela all'asse delle ascisse. Se un materiale non è completamente trasparente significa che ci saranno delle transizioni tra livelli energetici vibrazionali e quindi si verificheranno degli assorbimenti a lunghezze d'onda specifiche. In questo secondo caso lo spettro registrato sarà caratterizzato da una serie di picchi di altezza variabile per ciascuna transizione.

Dallo spettro infrarosso è possibile trarre utili informazioni sui gruppi funzionali di una molecola incognita.

La spettroscopia IR a trasformata di Fourier, o in forma abbreviata FT-IR, viene realizzata sfruttando la possibilità di cogliere contemporaneamente

tutte le frequenze dello spettro IR nel rivelatore, il che rende superflua la scansione delle lunghezze d'onda. Questo è possibile trasformando, per mezzo di un interferometro (figura 6.13), la radiazione IR policromatica emessa dalla sorgente (istante per istante con la medesima intensità) in un interferogramma, dove l'assorbimento non è più funzione della frequenza, ma del tempo, cioè si passa da dominio delle frequenze a dominio dei tempi.

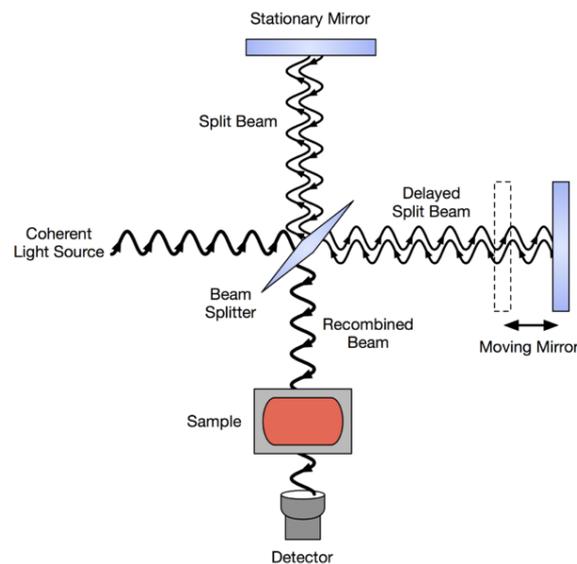


Figura 6.13: esempio di interferometro di Michaeleson

Tra i principali vantaggi della FT-IR vi è l'elevata intensità della radiazione incidente che si traduce in un rapporto segnale/rumore nettamente migliore rispetto alla classica spettroscopia infrarossa nonché la drastica riduzione dei tempi di analisi. Infatti non dovendo lavorare con un monocromatore a dispersione non è più necessario selezionare una piccola porzione dello spettro e non occorre fare nessuna considerazione sulla larghezza delle fenditure o compromessi fra intensità del segnale e risoluzione.

L'interferogramma acquisito viene in fine riconvertito in un comune spettro di più facile lettura grazie ad un calcolatore applicando la trasformata di Fourier (o più precisamente l'antitrasformata)

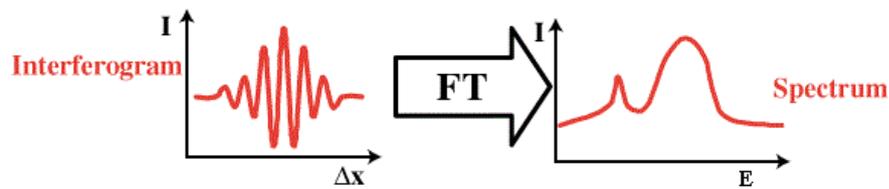


Figura 6.13: esempio di interferogramma convertito in spettro IR

La tecnica ATR (da Attenuated Total Reflectance, riflettanza totale attenuata) è una tecnica di campionamento della spettroscopia infrarossa che sfrutta la ripetuta riflessione di un raggio che attraversa il campione.

Quando un fascio di luce si propaga da un mezzo otticamente più denso ad uno otticamente meno denso esiste un angolo di incidenza, detto angolo critico, superato il quale si verifica il fenomeno della riflessione totale interna. In questo caso, nel mezzo con indice di rifrazione minore (il campione) si crea una regione in cui è presente un'onda elettromagnetica, detta onda evanescente, che penetra nel mezzo per una frazione della sua lunghezza d'onda. L'onda evanescente penetra e decade nel campione in modo esponenziale con la distanza dalla superficie del cristallo.

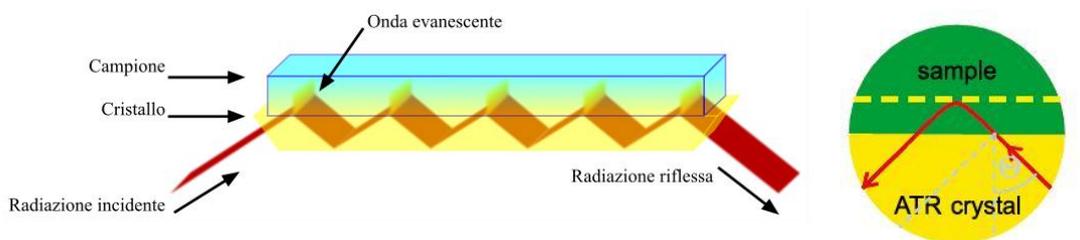


Figura 6.14: schema ATR (a sinistra) e di onda evanescente (a destra)

In questa tecnica il campione è posto in stretto contatto con un elemento ottico definito elemento di riflessione interna (o cristallo ATR) costituito da un cristallo a elevato indice di rifrazione. Il raggio IR emesso dalla fonte, prima di giungere al campione, passa dapprima attraverso questo elemento e

ne viene riflesso più volte al suo interno. Questo raggio riflesso, arrivando sulla superficie del campione che costituisce l'interfaccia, può penetrare fino a uno spessore di 2 μm del materiale meno rifrangente. Tale onda evanescente penetra più volte all'interno del mezzo ad indice di rifrazione minore (tante quante le riflessioni all'interno del cristallo) che a seguito dell'assorbimento di radiazione da parte del campione risulterà attenuata. In questo modo è possibile registrare lo spettro ATR.

Tale tecnica è particolarmente impiegata per tutti i campioni liquidi o comunque non campionabili come gli altri della spettroscopia IR in trasmissione.

6.5 Spettrofluorimetro

La spettrofluorimetria è una tecnica spettroscopica basata sul principio della fluorescenza. La fluorescenza è un tipo di luminescenza molecolare a seguito dell'eccitazione provocata dall'assorbimento di fotoni di una data lunghezza d'onda. I metodi di luminescenza in generale sono molto sensibili e selettivi, poiché poche sono le specie in grado di dare fotoluminescenza. La sostanza viene investita con una radiazione a specifica lunghezza d'onda in grado di far saltare un elettrone dallo stato fondamentale, in generale di singoletto S_0 , ad uno di singoletto eccitato S_n . La molecola nel suo stato eccitato può andare incontro a diversi tipi di processi di rilassamento competitivi fra loro, non necessariamente tutti di tipo radiativo e che possono essere divisi in tre principali blocchi: rilassamento vibrazionale, rilassamento per fosforescenza e per fluorescenza.

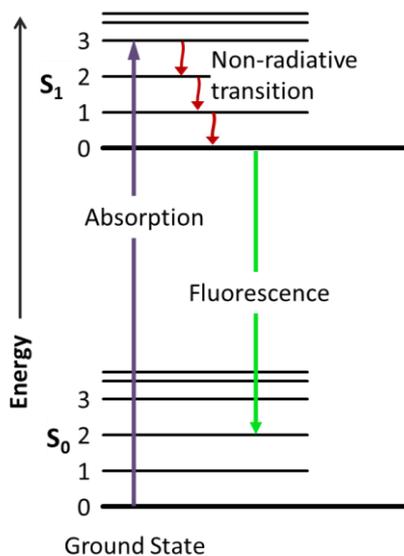


Figura 6.15: diagramma di Jablonski

Considerando solamente quest'ultimo, la molecola eccitata può fluorescere in diversi modi: l'elettrone può tornare direttamente allo stato vibrazionale fondamentale dello stato S_0 , in questo caso si ha la cosiddetta fluorescenza di risonanza per la quale la radiazione assorbita viene riemessa senza variazione di frequenza, o l'elettrone passa dallo stato vibrazionale fondamentale dell' S_1 a uno stato vibrazionale non fondamentale dell' S_0 , dal quale poi rilassa in modo non radiativo fino allo stato fondamentale. In quest'ultimo caso le bande di fluorescenza corrispondenti risultano dunque spostate a λ maggiori (minore energia). Lo spostamento a lunghezze d'onda maggiori viene chiamato spostamento di Stokes (figura 6.16). La fluorescenza si osserva in generale per transizioni di bassa energia, quali le $\pi^* \rightarrow \pi$ o le $\pi^* \rightarrow n$.

La radiazione emessa, passando per un monocromatore a dispersione, viene dunque raccolta e registrata da un rivelatore posto a 90° rispetto alla sorgente.

La sorgente è rappresentata nella maggior parte dei casi da una lampada ad arco allo xeno ad alta pressione da 75-50 W, in grado di fornire uno spettro in modo continuo nel range che va da 300 nm fino ai 1300 nm, avvicinandosi a quello di un corpo nero.

Si riportata infine in grafico le intensità in funzione della frequenza (o numero d'onda). Tale grafico prende il nome di spettro di fluorescenza (o di emissione)

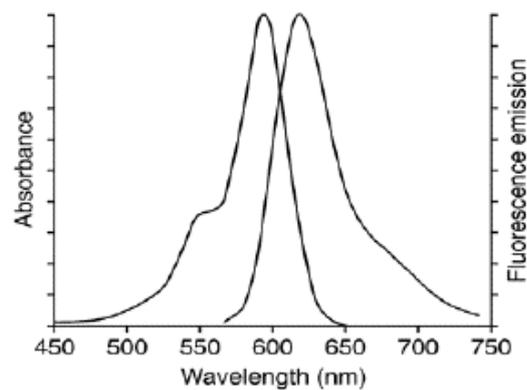


Figura 6.16: spettro di emissione e assorbimento a confronto

6.6 Potenziale Zeta

Il potenziale ζ (zeta), o potenziale elettrocinetico, è il potenziale generato in seguito alla formazione di un doppio strato elettrico.

Una particella dispersa in un liquido generalmente presenta delle cariche elettrostatiche superficiali che determinano un campo elettrico responsabile della redistribuzione degli ioni presenti nello spazio che circonda la particella. Questa distribuzione comporta un aumento della concentrazione di controioni in prossimità della superficie. In particolare, lo strato di liquido con gli ioni che circonda la particella è composto da due zone: una interna (strato stazionario, o di Stern) con gli ioni fortemente legati alla particella carica, ed una esterna (strato diffuso, o di Gouy-Chapman), dove le interazioni sono più

deboli. Le due zone, costituiscono un doppio strato elettrico intorno a ciascuna particella. All'interno dello strato diffuso - di spessore molto maggiore rispetto allo strato di Stern - gli ioni formano strutture metastabili: quando la particella si muove nel liquido, gli ioni si muovono con essa; in particolare, quelli oltre il piano di taglio (shear plane) si scambiano con gli ioni liberi presenti nel liquido in modo che le dimensioni del doppio strato, determinate dal potenziale zeta, rimangano costanti.

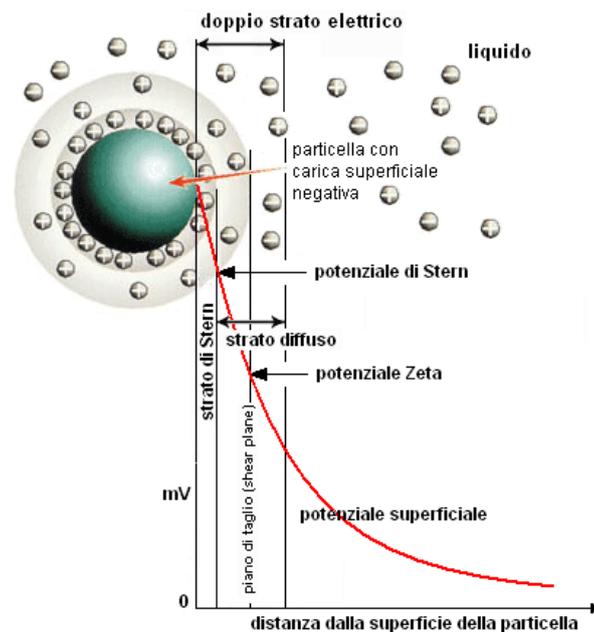


Figura 6.17: andamento del potenziale in funzione della distanza dalla superficie

L'immagine mostra, per una generica particella carica, la variazione del potenziale elettrico in funzione della distanza dalla sua superficie: si può vedere come questo diminuisca rapidamente all'interno dello strato stazionario, più lentamente all'interno dello strato diffuso e poi ancora più lentamente fino ad annullarsi all'infinito. In particolare, poiché la carica intrinseca sulla superficie della particella è schermata dalle cariche dello strato stazionario, le interazioni fra particelle saranno ovviamente regolate proprio dal potenziale presente alla superficie di questo strato. Immaginiamo dunque di allontanarci dalla superficie delle particella, per raggiungere lungo

la curva di potenziale in figura, il piano di taglio: il potenziale presente in questo punto prende il nome di potenziale zeta e definisce il comportamento dei sistemi dispersi, in particolare delle sospensioni. Infatti grandi valori assoluti di potenziale zeta indicano una repulsione elettrostatica relativamente forte da impedire l'aggregazione delle particelle e aumentarne così la stabilità in sospensione.

Per acquisire il dato sperimentale si applica una differenza di potenziale nota e costante nel mezzo liquido e osservando direzione e velocità traslazionale (v_s) delle particelle cariche determiniamo segno e intensità della carica netta.

Conoscendo velocità traslazionale e campo elettrico applicato ci ricaviamo una grandezza che prende il nome di mobilità elettroforetica (μ) che a sua volta è correlata al potenziale zeta secondo la formula

$$v_s = \mu \cdot E \quad \mu = \frac{2\varepsilon \cdot \zeta \cdot f(ka)}{3\eta}$$

con ε costante dielettrica, ζ il potenziale zeta, $f(ka)$ la funzione di Henry e η la viscosità del solvente.

7 Conclusioni

Essendo già note le proprietà come adiuvante immunologico della sepiolite, lo scopo di questo progetto di tesi è stato quello di sfruttare la composizione e la morfologia simile dell'alloysite per la preparazione di un prodotto con scopi analoghi, ma con caratteristiche superiori.

Considerato che l'alluminio è stato uno dei primi adiuvanti immunologici nonché uno dei più diffusi ancora ai giorni d'oggi, abbiamo pensato di sfruttare la presenza naturale del metallo all'interno della composizione chimica delle alloisiti per la preparazione di una nanostruttura in grado di stimolare il sistema immunitario e di aumentarne la risposta ad un vaccino.

La scelta dei nanotubi di alloisite non è dovuta esclusivamente alla sua composizione chimica, ma anche per la sua conformazione. La cavità interna naturale e di dimensioni dell'ordine del nanometro comporta interessanti proprietà dovute all'inerzia di diffusione da e per l'interno del nanotubo. Questa caratteristica permetterebbe al sistema di trasportare e rilasciare nel tempo farmaci o altre molecole di interesse biologico.

Per ottimizzare il nostro sistema e per avere un maggior controllo sul rilascio della sostanza trattenuta, nonché per avere una migliore biocompatibilità, abbiamo posto un'ulteriore barriera intorno al nanotubo costituita da un gel polisaccaridico e legata covalentemente alla superficie dell'alloysite. Qualora il polisaccaride stesso avesse proprietà utili per l'organismo, tale funzionalizzazione non comporterebbe solo un'inibizione nel rilascio del farmaco, ma comporterebbe numerose altre proprietà dovute alla presenza della componente organica stessa.

Per i polisaccaridi necessari alla funzionalizzazione sono stati scelti acido ialuronico e chitosano. La scelta è stata fatta sia per le loro caratteristiche acido-base opposte (il primo si carica negativamente deprotonandosi e l'altro positivamente protonandosi) sia per il loro già vasto impiego nella preparazione di sistemi biocompatibili. È stato infatti interessante studiare le diverse affinità dei due polisaccaridi a contatto con la superficie delle alloisiti (con carica leggermente negativa) e valutare un eventuale effetto al variare della carica di una sonda modello.

In particolare l'acido ialuronico è un componente fondamentale per la maturazione delle cellule dendritiche e responsabile della regolazione di numerosi processi infiammatori. Inoltre enzimi litici rilasciati da cellule tumorali sarebbero in grado di degradare il polisaccaride e permettere un rilascio repentino del farmaco solo in presenza del bersaglio garantendone una dispersione nell'organismo minima.

In questo modo la funzionalizzazione avrebbe un ruolo di controllo e modulazione del rilascio e allo stesso tempo garantirebbe un supporto a sviluppo e maturazione delle cellule del nostro sistema immunitario.

Allo scopo di valutare le proprietà di delivery dei compositi preparati, le alloisiti sono state caricate con molecole tipicamente utilizzate in letteratura come sistemi modello di farmaci. Per quanto riguarda le sonde fluorescenti impiegate abbiamo usato carbossifluoresceina e rodamina 110 in quanto hanno struttura analoga, ma carica opposta (rispettivamente negativa e positiva). Il loading dei nanotubi è stato effettuato utilizzando una soluzione di sonda in cui sono stati sospesi i nanotubi di alloisite. All'intera sospensione, mantenuta costantemente sotto agitazione, è stato applicato il vuoto in modo da far fuoriuscire l'aria contenuta nella cavità interna e

provocando l'introduzione forzata della sonda. Eseguendo spettri di fluorescenza prima e dopo il loading si osserva una quantità di sonda trattenuta pari al 60-70 % la concentrazione iniziale.

Per la funzionalizzazione con chitosano abbiamo riscontrato una buona affinità dovuta ad un'interazione di tipo elettrostatico, mentre per l'acido ialuronico siamo dovuti ricorrere ad una funzionalizzazione di tipo covalente. Inizialmente abbiamo fatto reagire le alloisiti con APTMS sfruttando la reattività dei silani per la superficie silicatica dei nanotubi e in seguito abbiamo provveduto alla formazione di un legame ammidico fra il gruppo carbossile dell'acido ialuronico e l'ammina primaria dell'APTMS per mezzo di una carbodiimide. Non soddisfatti della resa finale abbiamo provato una sintesi alternativa che prevedeva l'impiego di GPTS. Con questo approccio l'unica differenza rispetto al metodo precedente era la presenza di un anello epossidico terminale, assai più reattivo dell'ammina. Il problema dell'eccessiva reattività dell'eossido è stato contenuto svolgendo l'intera reazione in toluene e successivamente in una miscela 2:1 di etanolo-acqua.

Dalla caratterizzazione dei due compositi possiamo sostenere che la funzionalizzazione degli HNT con APTMS e GPTS può essere provata dall'analisi elementare CHN e dalla presenza del segnale IR dovuto ai C-H stretching, nonché da un'incrementata stabilità degli HNT in sospensione acquosa. L'avvenuta formazione di un legame covalente fra acido ialuronico e HNT non può essere provata da nessuna misura diretta fatta. Che tale legame si sia formato è tuttavia deducibile da analisi termogravimetriche che evidenziano un valore di polisaccaride trattenuto nettamente superiore nei campione dove è avvenuta una reazione di funzionalizzazione covalente. Lo strumento che con più precisione ci ha fornito stime sul rapporto fra

componente organica e inorganica è sicuramente la TGA, ma è stato possibile riscontrare la presenza del polisaccaride anche da misure di potenziale zeta e dalle immagini TEM. La prima evidenzia un cambio di carica superficiale dovuta alla carica del polisaccaride stesso, la seconda mostra una ricopertura uniformemente distribuita su tutta la superficie del nanotubo.

Per quanto riguarda le proprietà di rilascio si osserva come sia la percentuale finale di sonda rilasciata sia la velocità con cui viene raggiunto il plateau siano condizionate dalla presenza del polisaccaride. Per il primo dato riscontriamo un'inibizione più o meno marcata del valore massimo rilasciato dal nostro sistema dove presente il polisaccaride, mentre per il secondo dato, pur osservando variazioni dovute alla presenza del polisaccaride, non ci è possibile stabilire una correlazione con un aumento o diminuzione della velocità con cui rilascia la sonda. La rodamina 110 risente fortemente della presenza di chitosano e la sua velocità di rilascio risulta più che dimezzata. La stessa sonda non sembra mostrare effetti dovuti alla presenza di acido ialuronico, mentre la velocità della carbossifluoresceina risulta perfino accelerata dalla presenza di acido ialuronico.

Bibliografia

- (1) Ridi, F.; Bonini, M.; Baglioni, P. Magneto-Responsive Nanocomposites: Preparation and Integration of Magnetic Nanoparticles into Films, Capsules, and Gels. *Adv. Colloid Interface Sci.* 2013, *Published Online*.
- (2) Du, M.; Guo, B.; Jia, D. Newly Emerging Applications of Halloysite Nanotubes: A Review. *Polym. Int.* 2010, n/a–n/a.
- (3) Joussein, E.; Petit, S.; Chruchman, J.; Theng, B.; Righi, D.; Delvaux, B. Halloysite Clay Minerals - a Review. 2005.
- (4) Termeer, C.; Benedix, F.; Sleeman, J.; Fieber, C.; Voith, U.; Ahrens, T.; Miyake, K.; Freudenberg, M.; Galanos, C.; Simon, J. C. Oligosaccharides of Hyaluronan Activate Dendritic Cells via Toll-like Receptor 4. *J. Exp. Med.* 2002, *195*, 99–111.
- (5) Liu, M.; Zhang, Y.; Wu, C.; Xiong, S.; Zhou, C. Chitosan/halloysite Nanotubes Bionanocomposites: Structure, Mechanical Properties and Biocompatibility. *Int. J. Biol. Macromol.* 2012, *51*, 566–575.
- (6) Sistema immunitario. *Wikipedia*, 2013.
- (7) Antigen-presenting cell. *Wikipedia*, 2013.
- (8) O'Hagan, D. T.; De Gregorio, E. The Path to a Successful Vaccine Adjuvant – “The Long and Winding Road.” *Drug Discov. Today* 2009, *14*, 541–551.
- (9) Abdelmouleh, M.; Boufi, S.; ben Salah, A.; Belgacem, M. N.; Gandini, A. Interaction of Silane Coupling Agents with Cellulose. *Langmuir* 2002, *18*, 3203–3208.