

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIMICHE

TESI DI LAUREA MAGISTRALE IN SCIENZE DEI MATERIALI

**COMPOSITI A BASE DI BIOPOLIMERI E NITRURO DI SILICIO
PER APPLICAZIONI BIOMEDICHE**

Relatore: Prof. Alessandro Martucci

Correlatore: Dott.ssa Elena Colusso

Laureando: Nicola Marigo

ANNO ACCADEMICO 2021/2022

Indice

Introduzione	5
Capitolo 1: La seta	8
1.1 Struttura e proprietà.....	8
1.2 Fibroina rigenerata.....	12
1.3 Compositi a base di seta.....	12
Capitolo 2: Nitruro di silicio	15
2.1 Sintesi.....	15
2.2 Struttura e proprietà.....	17
2.3 Chimica di superficie.....	18
2.4 Attività anti-batterica.....	19
2.5 Applicazioni biomediche.....	20
Capitolo 3: Materiali e metodi	22
3.1 Degumming (estrazione della fibroina).....	22
3.2 Dissoluzione in acido formico.....	23
3.3 Dissoluzione in bromuro di litio.....	24
3.4 Fabbricazione membrane.....	26
3.5 Variazione parametri e trattamenti.....	27
3.6 Fabbricazione pellet.....	29
3.7 Tecniche di caratterizzazione.....	34
Capitolo 4: Risultati e discussione	37
4.1 Fabbricazione membrane.....	37
4.1.1 Variazione parametri.....	37
4.1.2 FTIR.....	38
4.1.3 Spessore membrane.....	42
4.1.4 SEM.....	43

4.1.5 XRD.....	49
4.1.6 Self-healing.....	50
4.2 Fabbricazione pellet.....	51
4.2.1 Misura densità.....	51
4.2.2 FTIR.....	52
4.2.3 Trasmittanza.....	54
Capitolo 5: Conclusioni e sviluppi futuri.....	56
Bibliografia.....	59
Ringraziamenti.....	64

Introduzione

La seta è un biopolimero utilizzato da sempre per la maggior parte nell'ambito dell'industria tessile. Negli ultimi decenni la seta è stata sviluppata in biomateriali variabili tra cui spugne, idrogel, scaffold, fibre e film sottili, ed è stata combinata con vari nanomateriali funzionali per fornire proprietà uniche che possono essere applicate all'ingegneria biomedica, elettrica o dei materiali. In generale, diversi metodi di fabbricazione del materiale possono influenzare la struttura e le proprietà fisiche di materiali costituiti da fibroina di seta. Il tipo di struttura che è stato ricercato in questo lavoro è una struttura secondaria di tipo β -sheet, idrofobica, e sono stati studiati diversi metodi per provare a indurre questo tipo di struttura, più cristallina rispetto a una struttura secondaria di tipo α -elica.

Per quanto riguarda il nitrato di silicio Si_3N_4 , invece, negli ultimi anni del 20° secolo è stato ampiamente sviluppato per applicazioni come turbine a gas ad alta temperatura, viste le notevoli proprietà meccaniche e termiche. I risultati sono stati quelli sperati, ma al contempo è stata scoperta la sua possibile applicazione in ambito biomedico grazie alle proprietà della chimica di superficie. In ambiente acquoso infatti, questo materiale rilascia ioni silicio e azoto inibendo la proliferazione batterica, migliorando la guarigione del tessuto osseo e sradicando i virus. Può essere quindi utilizzato per un'ampia gamma di applicazioni come in ortopedia, odontoiatria e virologia.

Lo scopo di questo lavoro è stato di ottenere un composito stabile a base di fibroina di seta e nitrato di silicio, per ottenere un materiale biocompatibile e biodegradabile con la resistenza meccanica e stabilità termica del nitrato.

In letteratura al momento non sono presenti lavori di nessun tipo riguardo a questo tipo preciso di materiale composito, e gli unici materiali compositi simili sono stati realizzati principalmente con fibroina di seta e idrossiapatite, silicati di calcio o nitrato di alluminio.

Il lavoro si è incentrato inizialmente sulla produzione di materiale in forma di membrana, partendo da una soluzione (sia acquosa che acida), e successivamente si è cercato di sfruttare il meccanismo di sinterizzazione a bassa temperatura con pressioni relativamente moderate, per produrre dei pellet compositi stavolta a partire da materiale allo stato solido, che possono avere applicazioni nell'ingegneria tissutale.

La prima fase del lavoro di tesi quindi ha previsto la sintesi della fibroina tramite la procedura del degumming, e l'ottimizzazione dei parametri relativi alle concentrazioni della fibroina, del cloruro di calcio e del nitrato di silicio per i vari tipi di soluzione (acquosa e acida).

Questa parte si è conclusa con il casting della soluzione di materiale composito su PDMS, l'evaporazione (in un caso dell'acqua, nell'altro caso dell'acido formico), lo studio sui trattamenti post-evaporazione per indurre una struttura cristallina e la successiva caratterizzazione del materiale composito risultante.

La fase successiva invece si è basata sull'ottenimento della fibroina in fase solida, e questo è stato possibile tramite congelamento della soluzione acquosa di LiBr (freeze-drying) con azoto liquido, seguito da un processo di liofilizzazione.

La tesi è suddivisa in 5 capitoli. Il primo capitolo è dedicato alla seta, dove verranno esaminate struttura, proprietà ed esempi di materiali compositi simili. Il secondo capitolo è dedicato invece al nitruro di silicio, in cui verranno spiegate le caratteristiche principali del materiale con un focus maggiore sulla chimica di superficie, utile a capire l'origine dell'attività antibatterica del materiale ceramico e delle possibili applicazioni biomediche. Nel terzo capitolo, materiali e metodi, è presente la parte sperimentale con le varie procedure eseguite in laboratorio per la realizzazione delle membrane e i pellet compositi, ed un'introduzione alle tecniche di caratterizzazione usate. Nel quarto capitolo sono presenti i risultati ottenuti, mentre nel quinto ed ultimo capitolo sono presenti le conclusioni e possibili sviluppi futuri.

CAPITOLO 1

FIBROINA DI SETA

La seta è una proteina fibrosa che fornisce un modello polimerico versatile per la progettazione di architetture gerarchiche su scala nanometrica.

L'interesse, in questo lavoro, è stato dedicato alla fibroina del baco da seta *B. mori* per la disponibilità e le proprietà, come la facilità con cui può essere modificata chimicamente, la biocompatibilità, il lento tasso di degradazione in vivo e la capacità di essere trasformata in più formati di materiale a partire da soluzioni acquose o solventi organici.

Storicamente, la seta del baco da seta è stata utilizzata dall'industria tessile per migliaia di anni, ma recentemente, grazie alla biocompatibilità, alla biodegradabilità e alla non immunogenicità, viene usata anche per usi biomedici. In seguito alla crescente necessità di tecnologie sostenibili, la seta ha attirato l'interesse anche per l'elettronica e la fotonica (i film che si possono ottenere sono trasparenti e hanno una superficie perfettamente planare).

In questo capitolo verranno esposte in particolare la struttura e le proprietà di questo materiale e il processo di "degumming" che porta all'estrazione della fibroina, la componente usata in questo lavoro.

1.1 Struttura e Proprietà

A livello macroscopico, la morfologia delle fibre di seta presenta una struttura nucleo-guscio, con uno strato interno di fibroina e un rivestimento esterno di sericina, una proteina adesiva con funzione di collante. Il nucleo di fibroina di *B. mori* è costituito da due filamenti, ciascuno dei quali presenta una sezione trasversale triangolare. Il diametro del filo di seta varia a seconda del tipo e della specie di baco da seta; in questo caso, le fibre di seta di *B. mori* con sericina possiedono diametri nell'intervallo da 10 a 25 μm .⁽¹⁾

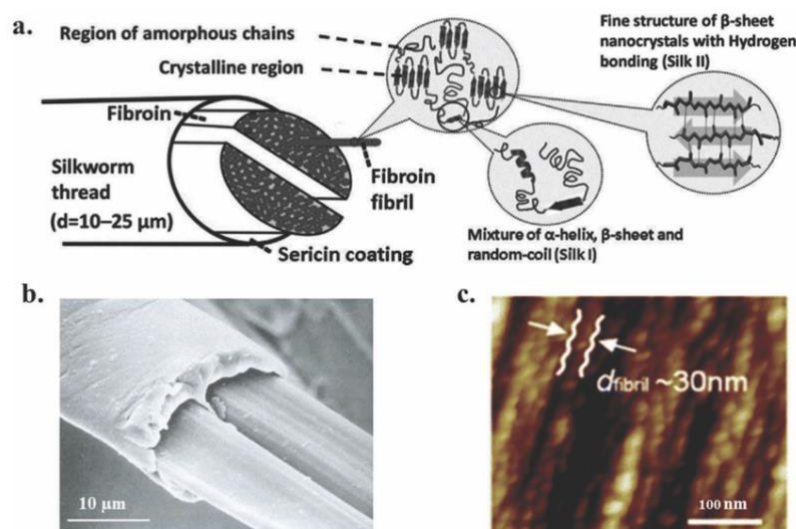


Figura 1. (a) Struttura gerarchica della seta *B. mori*. (b) Immagine SEM dei filamenti di seta *B. mori* (scala: 10 μm). (c) Immagine AFM della struttura fibrillare nella seta *B. mori* (scala: 100 nm). Adattata da (1).

La fibroina di seta rappresenta dal 65 all'85% dello strato del bozzolo, mentre lo strato di sericina rappresenta dal 15 al 35%. La maggior parte delle varietà commerciali di bozzoli di bachi da seta sono bozzoli bianchi e sono composti da circa il 75% di fibroina di seta e il 25% di sericina.⁽²⁾

La fibroina quindi è il componente principale delle fibre della seta, ed è composta da una catena pesante, una catena leggera e una glicoproteina, P25. La catena pesante è lunga 5263 amminoacidi, con un peso molecolare di 391 kDa. È composta da 45,9% glicina (G), 30,3% alanina (A), 12,1% serina (S), 5,3% tirosina (Y), 1,8% valina (V) e il 4,7% degli altri 15 tipi di amminoacidi. La struttura primaria della catena pesante è caratterizzata da una regione altamente ripetitiva. La catena leggera conta invece 244 amminoacidi (con un peso molecolare di 26 kDa), e presenta una sequenza non ripetitiva. Le catene pesanti e leggere sono legate da un legame disolfuro. La glicoproteina P25 si associa al complesso della catena pesante-leggera principalmente per interazioni idrofobiche con la catena pesante e aiuta a mantenere il complesso dato da catena pesante-leggera.⁽¹⁾

L'analisi strutturale delle fibre di seta mostra che la formazione di varie strutture secondarie nelle regioni cristalline e amorfe della fibroina della seta di *B. mori* è dipendente dalla sequenza primaria delle proteine della seta.

Le sequenze ripetitive della catena pesante, dette filamenti, si organizzano in cristalliti β -sheet, che conferiscono un'elevata stabilità meccanica alla fibra. Questi, per essere impacchettati, possono organizzarsi in due modi: antiparalleli o paralleli.

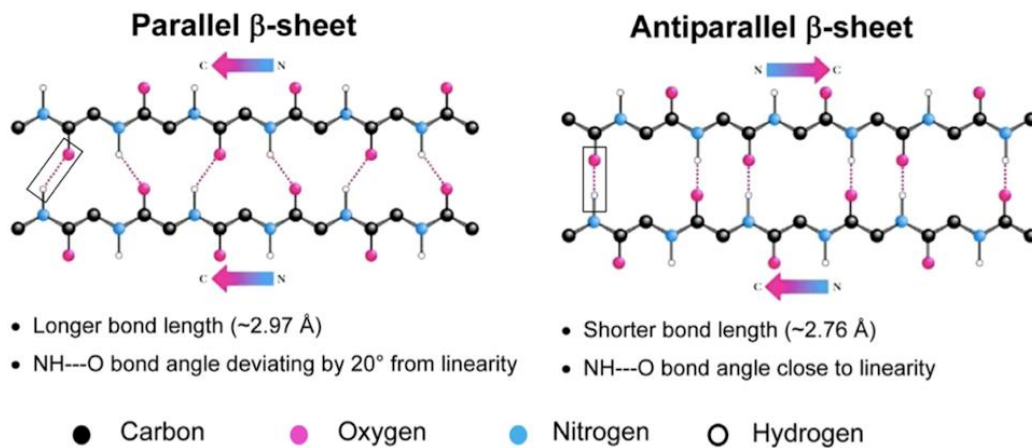


Figura 2. Configurazione β -sheet paralleli e antiparalleli.

Nella disposizione antiparallela, l'estremità C-terminale di un segmento è sullo stesso lato dell'estremità N-terminale dell'altro segmento. Nella disposizione parallela, l'estremità C-terminale e l'estremità N-terminale sono sugli stessi lati per entrambi i segmenti. La formazione di sheet avviene a causa dell'alternanza tra i piani dei legami peptidici tra gli amminoacidi. La disposizione parallela è meno stabile in quanto la geometria delle molecole di amminoacidi costringe i legami idrogeno ad essere ad angolo; saranno quindi più lunghi e più deboli. Nella disposizione antiparallela invece i legami idrogeno sono allineati uno di fronte all'altro, e come risultato si avranno quindi

legami più forti e stabili. I cristalliti sono separati tra di loro da un dominio idrofilo, meno ordinato, che forma la regione semi-amorfa e che facilita il ripiegamento delle proteine.⁽³⁾

La catena leggera, invece, è costituita da una struttura secondaria che si presenta principalmente in spire casuali (random coil), con cristallinità scarsa o nulla. La diversità strutturale delle due catene si manifesta sulle loro proprietà fisiche: la catena pesante è rigida e idrofobica; la catena leggera è flessibile e idrofila. Il comportamento complessivo della fibroina è influenzato dalla presenza della catena leggera, nonostante la catena pesante domini in termini percentuali nella composizione totale (in massa).⁽³⁾

La struttura secondaria però non è l'unica struttura di tipo microscopico che può assumere la seta. Gli altri tipi di struttura sono:

- Struttura primaria, solubile ma stabile e costituita sia da regioni random coil, sia da regioni con struttura ordinata
- Struttura terziaria, instabile costituita principalmente da α -elica

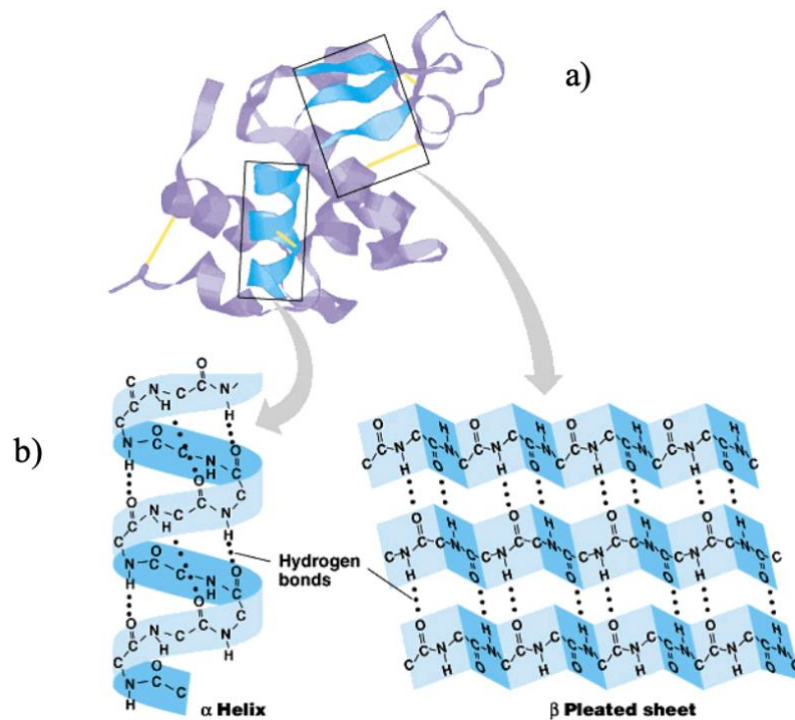


Figura 3. a) Esempio di struttura in cui sono presenti sia regioni random coil, sia domini ordinati. b) rappresentazione schematica di una struttura α -elica a confronto con una struttura β -sheet.

Dal punto di vista delle proprietà, la seta ha ottime proprietà meccaniche come resistenza e tenacità, che offrono numerose opportunità per la fabbricazione, la funzionalizzazione e la lavorazione di biomateriali robusti. Per quanto riguarda la rigidità, invece, quella della seta è superiore a quella di altri biopolimeri come collagene e acido polilattico (PLA). La tenacità delle fibre di seta è maggiore rispetto ai migliori materiali sintetici, come il Kevlar, materiale con cui vengono realizzati i giubbotti antiproiettile.⁽¹⁾

Materials	Stiffness [GPa]	Strength [MPa]	Extensibility [%]	Toughness [MJ m ⁻³]
<i>B. mori</i> silk (with sericin)	5–12	500	19	70
<i>B. mori</i> silk (without sericin)	15–17	610–690	4–16	70–78
<i>N. clavipes</i> silk	11–13	875–972	17–18	111–160
<i>N. clavipes</i> silk (285 kDa recombinant)	21	508	15	—
Bone	20	160	3	4
Collagen	0.0018–0.046	0.9–7.4	24–68	—
Elastin	0.001	2	150	2
Resilin	0.002	3	190	4
Synthetic rubber	0.001	50	850	100
Polylactic acid	1.2–3.0	28–50	2–6	1–3
Nylon fiber	5	950	18	80
Kevlar 49 fiber	130	3600	2.7	50

Tabella 1. Proprietà meccaniche di trazione della seta a confronto con altri materiali. Adattata da (1).

Come si evince dalla Tabella 1, le fibre di seta del tipo *B. mori* hanno elevata resistenza (dell'ordine di 10 GPa), alta estensibilità (circa il 20%) e buona comprimibilità. Inoltre sono meccanicamente stabili fino a 200 °C.⁽⁴⁾

Oltre alle straordinarie proprietà meccaniche, la seta del baco da seta è anche un materiale biodegradabile. In generale, la degradazione della seta è mediata da enzimi, e la velocità di degradazione della seta può essere alterata dalle tecniche di lavorazione.

I recenti progressi nella lavorazione dei materiali hanno portato alla trasformazione della seta *B. mori* in una varietà di nuovi formati di materiale, inclusi film (realizzati per spin coating o drop casting), idrogel, nano-fibre, spugne porose 3D e scaffold. Tra le molte possibili forme di materiale, i film di seta sono di particolare interesse per l'ottica e le applicazioni fotoniche a causa della trasparenza e della planarità della superficie. Idrogel di seta, spugne e scaffold, invece, sono di particolare interesse per l'ingegneria dei tessuti a causa delle loro proprietà meccaniche regolabili e per il rilascio di farmaci a causa dei metodi di lavorazione acquosi disponibili per questo tipo di materiale.

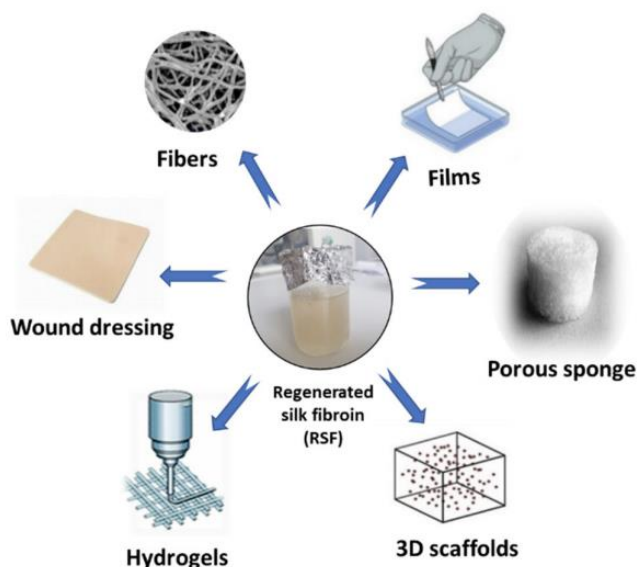


Figura 4. Possibili applicazioni e impieghi della fibroina di seta come biomateriale. Adattata da (1).

1.2 Fibroina rigenerata

Per il trattamento e la dissoluzione della fibroina di seta, e quindi per ottenere la “fibroina rigenerata” esistono diversi metodi.

Il processo di rigenerazione tradizionale solitamente prevede la dissoluzione della seta “degummata” in soluzioni ad alto contenuto salino come la soluzione 9.3 M LiBr o la soluzione CaCl_2 /Etanolo/ H_2O (1: 2: 8 molare), seguita dalla dialisi per eliminare il sale.⁽⁵⁾

Questi metodi però presentano diversi svantaggi: tempi lunghi (quindi difficilmente praticabile a livello industriale), i campioni sono inizialmente solubili in acqua, sono necessari trattamenti con metanolo/etanolo per ottenere proprietà meccaniche migliori che portano però a materiali estremamente fragili e rigidi dopo la cristallizzazione, e quindi inadatti per usi pratici.⁽⁶⁾

Un nuovo metodo di rigenerazione per indurre l'insolubilità pur mantenendo la flessibilità è tramite soluzione di acido formico e cloruro di calcio. I film risultanti sono insolubili in acqua e meccanicamente flessibili allo stato secco e non sono secondo letteratura necessari ulteriori trattamenti fisici o chimici.⁽⁷⁾

Questo processo semplifica i passaggi richiesti poiché la fibroina viene sciolta a temperatura ambiente, e si ottengono soluzioni più trasparenti e stabili rispetto al sistema con soluzione acquosa. I materiali così disciolti presentano una lavorabilità migliore, aspetto probabilmente dovuto alla differenza nelle dimensioni molecolari⁽⁶⁾. Questo metodo infatti dissolve la seta senza distruggere la struttura nanofibrillare consentendo così migliori flessibilità e controllabilità.⁽⁵⁾

In questo lavoro sono stati usati la dissoluzione in cloruro di calcio CaCl_2 e acido formico, e quella in soluzione acquosa di bromuro di litio (LiBr) 9.3 M.

1.3 Compositi a base di seta

Film

In uno studio di Xue et al.⁽⁸⁾ vengono realizzati film a base di fibroina di seta e nitrato di alluminio (AlN). La fibroina viene sciolta in una soluzione di acido formico e cloruro di calcio (CaCl_2 al 4% in peso), e successivamente viene aggiunto il nitrato di alluminio in percentuali variabili, fino ad arrivare al 25% in volume di AlN . La percentuale che rappresenta il migliore compromesso tra proprietà meccaniche e fisiche è del 15% in volume di AlN . In seguito al casting su PDMS e all'evaporazione per 2 giorni, i campioni vengono trattati in acqua per 1 h, con lo scopo di promuovere la cristallizzazione a β -sheet, di rimuovere i residui di acido formico e sale rimasti e di promuovere la formazione di legami idrogeno tra le particelle di nitrato e la matrice di fibroina.

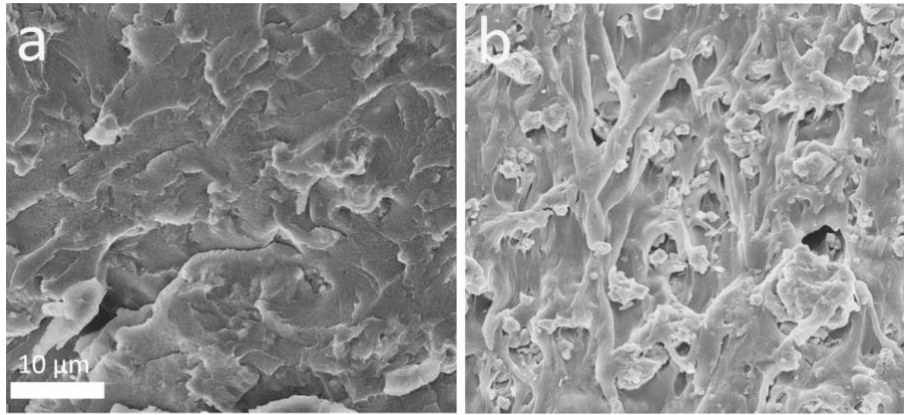


Figura 5. a) Immagine SEM della sezione di un film composito di fibroina e 10% AlN. b) Immagine SEM della sezione di un film composito di fibroina e 25% AlN. Adattata da (8).

Idrogel

Per produrre idrogel ibridi, la fibroina rigenerata è stata miscelata con diversi polimeri sintetici. Quando si combina la seta con altri polimeri e si varia la quantità relativa dei due polimeri nella combinazione, il metodo di miscelazione e la densità di reticolazione possono influenzare proprietà come resistenza, porosità, rigonfiamento, biocompatibilità. Durante la fabbricazione di un idrogel ibrido, pertanto, è essenziale garantire che un tentativo di migliorare un aspetto particolare dell'idrogel non influisca negativamente su altre proprietà fisiche o biologiche.⁽⁹⁾

Un primo studio è stato fatto con la poliacrilammide per ottenere un'elevata resistenza meccanica. Un altro studio è stato ottenuto con miscela 50:50 di alcol polivinilico e fibroina di seta, che ha permesso di incrementare il modulo di Young dei gel (146,7 MPa) di tre volte rispetto a quello del gel di sola fibroina (50 MPa).⁽⁹⁾

Un terzo tentativo è stato fatto con gli idrogel di gelatina, i quali non sono stabili a causa della dissoluzione della gelatina a 37°C. La miscelazione di fibroina di seta con gelatina si è rivelata vantaggiosa, in quanto la presenza di β -sheets di fibroina di seta fornisce stabilità. La calorimetria a scansione differenziale e l'analisi reologica dinamica hanno indicato che la presenza di β -sheets di fibroina di seta aumenta il modulo elastico dinamico degli idrogel, che a sua volta li stabilizza a temperature più elevate. Altri idrogel compositi sono quelli a base di collagene e fibroina, preparati reticolando collagene e fibroina utilizzando di 1-etil-3-(3-dimetilamminopropil) carbodiimide cloridrato (EDC). Oltre a migliorare la resistenza meccanica e la stabilità termica, il gel ha mostrato una transizione da gel a sol in un mezzo di pH 4,0. La caratteristica di gelificazione reversibile può essere associata ad un aumento della repulsione elettrostatica tra le catene proteiche con diminuzione del valore del pH.⁽⁹⁾

Scaffold

In uno studio effettuato da Zhu⁽¹⁰⁾ sono stati realizzati degli scaffold a base di fibroina disciolta in un sistema di solventi ternario (CaCl₂/H₂O/EtOH in rapporto molare 1:8:2), e successivamente sottoposti a freeze-drying.

La Fig.6 mostra le immagini SEM degli scaffold compositi di fibroina di seta con percentuali variabili di wollastonite (CaSiO₃).

La struttura di sola fibroina (Fig.6a) mostra una struttura macroporosa con pori aperti interconnessi e con le dimensioni dei pori che variano da 100 a 200 μm . La superficie della parete dei pori degli scaffold di fibroina pura mostra una morfologia densa e uniforme (Fig.6b). Nel caso degli scaffold compositi (Fig.6c-d), le particelle di wollastonite sono state disperse in modo omogeneo e la quantità di particelle di wollastonite è aumentata con l'aumentare del contenuto di silicato. Per un aumento fino al 40% in peso, alcune particelle di wollastonite si sono aggregate e la dimensione delle particelle è aumentata.

La porosità dello scaffold di fibroina pura era dell'89,7%. Quando il contenuto di wollastonite è aumentato dallo 0% al 40% in peso, le porosità degli scaffold compositi sono diminuite dall'89,7% all'81,8%.⁽¹¹⁾

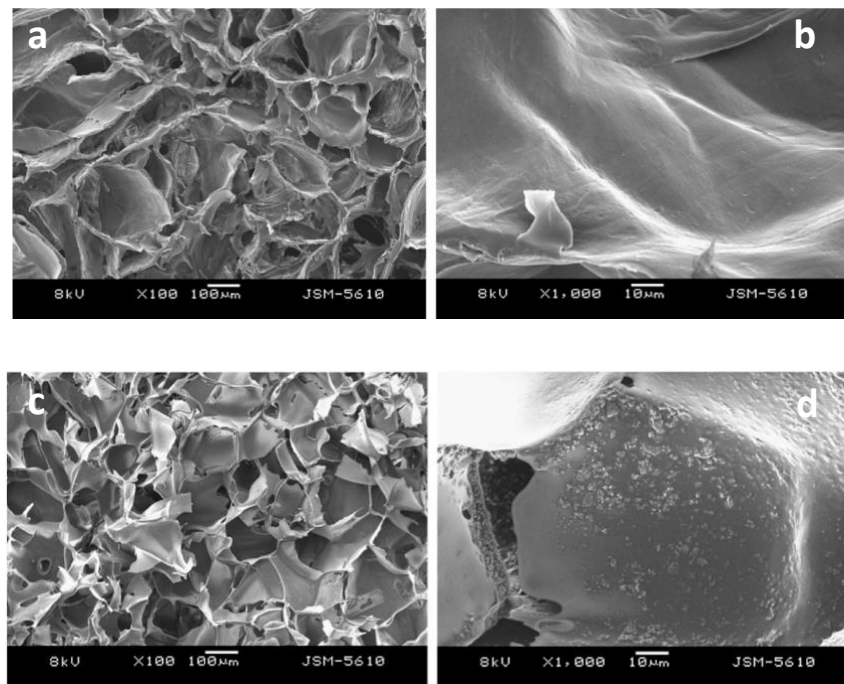


Figura 6. a) Scaffold di fibroina di seta. b) Immagine della morfologia superficiale della parete dei pori per scaffold di fibroina di seta. c) Scaffold di fibroina di seta con 40% di wollastonite. d) Immagine della morfologia superficiale della parete dei pori per scaffold compositi di fibroina di seta e 40% di wollastonite. Adattata da (11).

CAPITOLO 2

NITRURO DI SILICIO

Il nitrato di silicio, formula chimica Si_3N_4 , è un materiale ceramico impiegato per diverse applicazioni strutturali, sia a temperatura ambiente che ad alta temperatura, grazie alle sue proprietà come resistenza meccanica, resistenza agli shock termici, stabilità alle alte temperature, durezza e resistenza all'usura.

Il nitrato di silicio ha dimostrato anche di essere biocompatibile, stabile in vivo e visibile all'imaging radiografico come materiale impiantabile parzialmente radiotrasparente. Queste proprietà, combinate con le proprietà meccaniche, fanno di Si_3N_4 un materiale in ceramica sanitario, usato in particolare per la chirurgia ortopedica.⁽¹²⁾



Figura 7. Esempi di impianti in nitrato di silicio per chirurgia ortopedica. Adattata da (12).

2.1 Sintesi

Il nitrato di silicio bulk (Si_3N_4 3D) viene prodotto tramite due principali percorsi di fabbricazione:

- Nel primo percorso, le particelle di silicio (Si) vengono fatte reagire con azoto in fase gassosa (N_2) a temperature comprese tra 1200 e 1400 °C, ottenendo un materiale poroso
- Nel secondo percorso, la polvere di Si_3N_4 viene miscelata con additivi di sinterizzazione, compattata e densificata tramite sinterizzazione

I principali metodi di sinterizzazione per questo materiale sono:

1. Nitrato di silicio legato per reazione RBSN (poroso)
2. Nitrato di silicio sinterizzato SSN (denso)

Entrambe le tecniche di sinterizzazione sono costose e si possono ottenere solo forme geometriche semplici.⁽¹³⁾

La sinterizzazione RBSN parte da polveri di silicio che, compattate durante il riscaldamento in atmosfere di N_2 o NH_3 tra 1000 e 1450°C risulta in una miscela di fasi α - e β - Si_3N_4 . Questo metodo viene utilizzato principalmente per produrre componenti con forme complesse senza la necessità di

costose lavorazioni successive, rendendo questi componenti più appetibili dal punto di vista economico. La porosità ottenuta con questo metodo è compresa tra il 20 e il 30%, ma questo non influisce negativamente sulle prestazioni meccaniche che possono raggiungere valori di resistenza alla flessione fino a 350 MPa (Tabella 2).⁽¹³⁾

Nella sinterizzazione SSN invece, viene eseguita la pressatura a caldo (HP) o isostatica a caldo (HIP) a partire da polveri a cui vengono aggiunti ossidi di magnesio, alluminio o ittrio che hanno funzione di leganti. A temperature superiori a 1550°C, questi ossidi formano (insieme a un film di silice) un sottile film di Si–Al–Y–O–N capace di dissolvere il nitrato di silicio e determinando una densificazione del materiale ceramico.⁽¹³⁾

I parametri critici per la sinterizzazione SSN sono:

- Dimensione delle particelle nell'intervallo da 100 a 200 nm
- La capacità degli ossidi leganti di formare una fase liquida attorno ai granuli di Si₃N₄
- Atmosfera di N₂ ad alta pressione (per prevenire la dissociazione termica)
- Temperatura di sinterizzazione fino a 1850°C

Per produrre forme monolitiche resistenti, durante la densificazione ad alta temperatura delle polveri, la fase α-Si₃N₄ a bassa temperatura si trasforma in fase β-Si₃N₄, e si genera una morfologia “bastoncellare” con una microstruttura che ha l’effetto di rafforzare le prestazioni meccaniche e termiche del prodotto finale. Per accelerare il tasso di conversione, vengono aggiunti semi di β-Si₃N₄ alla polvere di precursore α-Si₃N₄. I cristalliti β-Si₃N₄ vengono poi allineati con pressatura a caldo, o tramite “Template Grain Growth” (TGG) seguita da pressatura a freddo.⁽¹³⁾

Property	RBSN	SSN
Density (Mg·m ⁻³) (% of theoretical density)	70–88	95–100
Compressive strength (MPa)	600	2950
Flexural strength (4-point, 25 °C) (MPa)	150–350	500–1000
Fracture toughness (25 °C) (MPa·√m)	1.5–3	5–8
Fracture energy (J·m ⁻²)	4–10	~60
Modulus of elasticity (25 °C) (GPa)	120–220	300–330
Thermal conductivity (25 °C) (W/m·K)	4–30	15–50
Thermal shock resistance R (K)	220–580	300–780
Thermal shock fracture toughness R' (W·m ⁻¹)	500–10,000	7000–32,000
Coefficient of thermal expansion (10 ⁻⁶ K ⁻¹)	2.5	3.2
Specific heat capacity (J/kg·K)	720	800
Poisson ratio	0.24	0.27

Tabella 2. Proprietà meccaniche per RBSN e SSN. Adattata da (13).

2.2 Struttura e Proprietà

Il nitruro di silicio si trova in tre strutture polimorfiche, due esagonali α - e β - Si_3N_4 e una struttura cubica (γ - Si_3N_4) ad alta pressione o alta temperatura con struttura a spinello.

Le strutture di nitruro di silicio esagonale sono costituite da tetraedri SiN_4 distorti che, condividendo gli angoli, formano anelli esagonali distorti disposti a strati con sequenza di impilamento ABCD per α - Si_3N_4 , e sequenza di impilamento ABAB per β - Si_3N_4 .

Sebbene lo strato AB di base sia identico in entrambe le fasi α e β , nella fase α il secondo strato (CD) è correlato al primo strato (AB) da un piano di slittamento. Poiché il doppio strato in α - Si_3N_4 può essere considerato una sovrapposizione di uno strato β - Si_3N_4 e il suo opposto invertito di 180° ; ci sono il doppio degli atomi per cella unitaria in α - Si_3N_4 ($Z = 4$) rispetto a β - Si_3N_4 ($Z = 2$). I tetraedri SiN_4 interconnessi in β - Si_3N_4 formano ampi canali che consentono una maggiore diffusione ionica in tutto il reticolo che facilitano la sinterizzazione a temperature elevate. Di conseguenza, la fabbricazione di parti biomediche dense dovrebbe vantaggiosamente iniziare con polveri precursori β - Si_3N_4 .⁽¹³⁾

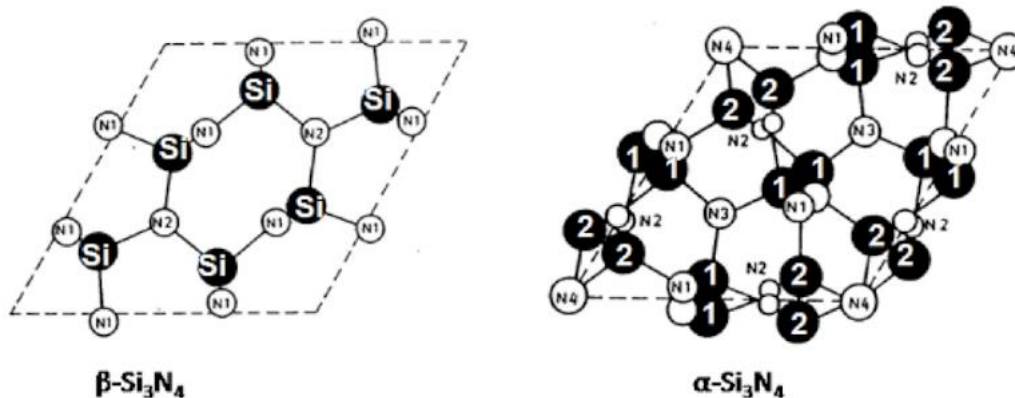


Figura 8. Proiezione schematica su un piano della disposizione degli atomi di Si e N per le due fasi esagonali di nitruro. Adattata da (13).

Per Si_3N_4 fabbricato con gli additivi di sinterizzazione comunemente usati ($\text{Y}_2\text{O}_3 + \text{Al}_2\text{O}_3$), le proprietà meccaniche ottimali (tra cui resistenza alla flessione, tenacità alla frattura e modulo di Weibull) si ottengono con una microstruttura temperata in situ.

Per il Si_3N_4 utilizzato in ambito medico, formato con pressatura isostatica a freddo e densificato tramite sinterizzazione HIP, si ottengono una resistenza alla flessione (a temperatura ambiente) di 923 ± 70 MPa e una tenacità alla frattura di $10 \pm 1 \text{MPa} \times \text{m}^{1/2}$.⁽¹⁴⁾

I test di resistenza alla flessione vengono eseguiti dopo la molatura e la lucidatura. Questo comporta una superficie liscia con una popolazione di difetti uniforme e dimensioni dei difetti ridotte. Per alcune applicazioni ortopediche e dentali, invece, gli impianti devono essere utilizzati senza essere sottoposti ai processi appena descritti per preservare la topografia della superficie microruvida.⁽¹⁴⁾

2.3 Chimica di superficie

La chimica superficiale del nitruro di silicio può essere descritta dalle reazioni di dissociazione/protonazione acquosa di silanoli anfoteri (Si-OH) e gruppi di superficie di ammine secondarie basiche (Si₂-NH). Similmente a molti altri composti a base di silicio, il Si₃N₄ è propenso a reagire con gli agenti nucleofili mediante il meccanismo di sostituzione nucleofila S_N2.

Nel caso del nitruro di silicio, il ruolo degli agenti nucleofili è svolto dalla combinazione di acqua e ioni ossidrile. Si formano dei complessi molecolari con silicio pentacoordinato che possiedono una stabilità piuttosto elevata e che aumentano l'energia del sistema. Questi complessi quindi tendono a formarsi spontaneamente piuttosto che a richiedere energia di attivazione per la loro formazione. La dissociazione dei siti superficiali dell'ammina e la successiva formazione di legami Si-OH determinano infine la separazione di ioni ammonio (NH₄⁺) o ammoniaca (NH₃) e la creazione di silanoli superficiali.⁽¹⁵⁾

I calcoli Ab-initio svolti nel lavoro di Pezzotti⁽¹⁵⁾ hanno individuato il percorso più favorevole dal punto di vista energetico per l'idrolisi del Si₃N₄ come:

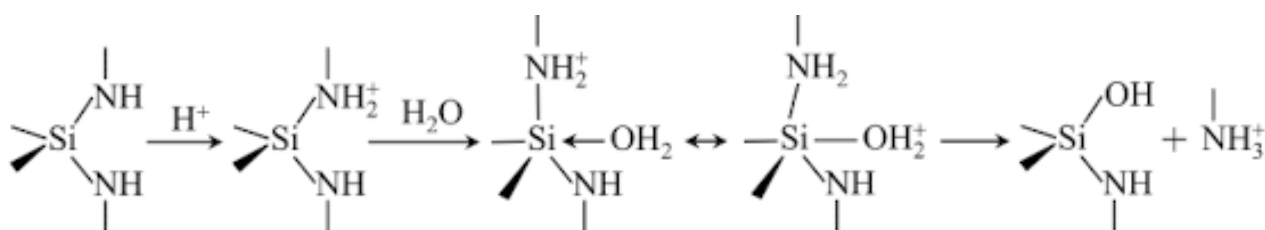


Figura 9. Percorso energetico favorevole per l'idrolisi del Si₃N₄. Adattato da (15).

Gli ioni azoto che eluiscono da Si₃N₄ diventano prevalentemente NH₄⁺ e NH₃ rispettivamente a valori di pH bassi e alti. Il loro rilascio lascia N-vacanze in superficie e genera elettroni liberi. A loro volta, questi elettroni inducono la scissione delle molecole d'acqua circostanti.

In un ambiente ossidante o acquoso, Si₃N₄ è termodinamicamente instabile e la sua superficie è quindi ricoperta da uno strato ossidato. Questo strato ha uno spessore di circa 3-5 nm e una composizione di ossinitruro di silicio. A causa di questa ossidazione, la composizione di Si₃N₄ varia da legami Si-N puri nel bulk, a Si-O-N nella regione interna dello strato ossidato, a Si-O in superficie, con una composizione equivalente a SiO₂ per uno strato ossidato sufficientemente spesso.⁽¹⁵⁾

L'elevata adesione cellulare e la migliore osteoconduttività presentate dal nitruro di silicio, sono probabilmente dovute anche al comportamento zwitterionico della molecola, che è dato dalla presenza di vacanze caricate positivamente nel reticolo di atomi di azoto (N) del nitruro di silicio e dai gruppi silanoliche caricate negativamente sulla sua superficie.⁽¹³⁾

2.4 Attività Anti-Batterica

Poiché si suppone che questi biomateriali funzionino a stretto contatto con i tessuti biologici, devono essere biologicamente sicuri, meccanicamente resilienti, economicamente sostenibili e fisiologicamente accettabili.

La bioceramica può essere di due tipi:

- Bioinerte (ossido di alluminio, l'ossido di zirconio parzialmente stabilizzato e il carbonio pirolitico)
- Bioattiva (fosfati di calcio)

Le ceramiche bioinerti sono ampiamente utilizzate in applicazioni che richiedono materiali meccanicamente forti e resilienti, resistenti all'usura e alla corrosione, come teste femorali e parti intervertebrali e nell'artroplastica del ginocchio. Tuttavia, la fragilità intrinseca delle ceramiche e la loro limitata capacità di integrarsi con i tessuti ne limitano attualmente l'applicazione clinica.

Le ceramiche bioattive, invece, sono utilizzate principalmente per la loro osteointegrazione e in combinazione con proteine che supportano la crescita dei tessuti.

Recentemente, un crescente interesse è stato dedicato al nitruro di silicio, un materiale ceramico avanzato che eccelle per elevate resistenze alla compressione e alla flessione, tenacità alla frattura relativamente elevata, coefficiente di attrito molto basso, forte resistenza alla corrosione, capacità di imaging medico migliorato basato sulla radiotrasparenza nel visibile e regione del vicino infrarosso (NIR), biocompatibilità e osteoconduttività migliorate. Grazie a queste proprietà, il nitruro di silicio sta emergendo come un nuovo e promettente materiale bioceramico per numerose applicazioni mediche. Queste includono cuscinetti resistenti all'usura per impianti endoprotesici dell'anca e del ginocchio, nuovi impianti dentali, distanziatori intervertebrali spinali, scaffold per l'ingegneria dei tessuti, rivestimenti antibatterici, e biosensori ottici.

La chimica di superficie per il Si_3N_4 in un sistema acquoso, infatti, può inibire l'attività batterica e allo stesso tempo stimolare la sintesi di tessuto agendo sulla regolazione degli osteoblasti. I batteri tendono ad acidificare l'ambiente circostante, innescando concentrazioni maggiori di ioni NH_4^+ eluiti. Se il tasso di eluizione dello ione ammonio supera il tasso di crescita della popolazione batterica, si crea un surplus di NH_4^+ non metabolizzato, che tende a migliorare l'ambiente circostante e quindi anche la frazione eluita di ammoniaca, che penetrando nei batteri potrebbe rappresentare il trigger per interrompere il loro metabolismo cellulare e impedirne l'adesione al materiale. Gli ioni Si eliminati dai silanoli di superficie invece costituiscono un elemento costitutivo nella sintesi di nuovo tessuto osseo. Anche il basso coefficiente di usura (rispetto ad impianti in Ti o PEEK) contribuisce all'azione antibatterica: l'usura di impianti in Ti infatti genera particelle che possono portare a situazioni di infiammazione. Per il Si_3N_4 invece, oltre ad avere elevata resistenza all'usura, le particelle di usura sono potenzialmente solubili nei fluidi biologici.⁽¹⁵⁾

Come bonus aggiuntivo, più recentemente è stato scoperto che il nitruro di silicio è un potente disattivatore bioceramico a stato solido di virus a RNA a filamento singolo (ssRNA), incluso il virus SARS-CoV-2. Sono in corso sviluppi per commercializzare maschere antimicrobiche "catch-and-kill" comprendenti fibre di polipropilene rivestite di nitruro di silicio per proteggere dalla pandemia di COVID-19.⁽¹³⁾

Le caratteristiche della superficie di un impianto, come la topografia (rugosità o levigatezza) e le proprietà biofisiche (energia superficiale, carica superficiale, grado di idratazione), possono avere

effetto sulla risposta delle cellule, tessuti e batteri. Di conseguenza, le caratteristiche della superficie possono influenzare fortemente le prestazioni di un impianto in vivo. Le bioceramiche Si_3N_4 possono essere create con una topografia superficiale liscia o microruvida e con uno strato superficiale ossidato di composizione equivalente a un ossinitruro di silicio. Il trattamento termico o chimico di Si_3N_4 può essere utilizzato per variare la composizione chimica di questo strato superficiale da prevalentemente Si_3N_4 all'interfaccia a prevalentemente SiO_2 sulla superficie dello strato e per modificare l'angolo di contatto con mezzi acquosi. Si_3N_4 con una topografia superficiale microruvida ha mostrato una maggiore resistenza all'attaccamento e alla proliferazione batterica in vitro e una superiore attività antimicrobica e osteointegrazione in vivo rispetto a PEEK e Ti, due biomateriali comuni utilizzati nella fusione spinale.⁽¹²⁾

2.5 Applicazioni Biomediche

Gli impianti in Si_3N_4 sono generalmente prodotti con metodi di fabbricazione convenzionali, che richiedono una lucidatura post-fabbricazione per ottenere forma e dimensioni richieste. A causa dell'elevata durezza, la produzione di impianti in Si_3N_4 può essere costosa; un metodo alternativo è la stampa tridimensionale (3D), più conveniente per ottenere impianti con la forma anatomica e le dimensioni richieste.⁽¹³⁾

Property	Si_3N_4	Al_2O_3	ZTA ^a	YSZ ^b	CoCr	PEEK	Ti-alloy	Cortical bone
Density (g cm^{-3})	3.15–3.26	3.986	4.37	6.04	~8.5	1.29	4.43	1.85
Elastic modulus (GPa)	300–320	400–450	350	210	210–250	4.2	105–115	8–12
Poisson's ratio	0.25–0.27	0.27	0.24	0.30	0.27–0.32	0.36	0.34	0.6
Strength (MPa)								
Tensile	350–400	250–300				100–110	920–980	50–130
Compressive	2500–3000	2000–3000	4300	2200	600–1800	130–140	950–990	130–190
Flexural	800–1100	300–500	1000	1050		160–180		
Fracture toughness $\text{MPa m}^{1/2}$	8–11	4–5	5.7	10.5	50–100		75	
Vickers hardness (GPa)	13–16	14–16	19.1	12.5	3–4		3.4	
Thermal expansion coefficient (10^{-6} K^{-1}) (25–1000 °C)	3.0–3.5	8.0–8.5	8.5	11	~14	47	8.6–9.6	
Thermal conductivity ($\text{Wm}^{-1} \text{ K}^{-1}$)	30–40	30	17	1.8–2.9	~100		6.7	
Surface composition	SiNH_2 and SiOH groups	Al_2O_3	$\text{Al}_2\text{O}_3/\text{ZrO}_2$	ZrO_2	$\text{CoO}/\text{Cr}_2\text{O}_3$	OH Groups	$\text{TiO}_2/\text{Al}_2\text{O}_3$	
Isoelectric point	9	8–9	8–9	7.5				
Surface charge at pH = 7	Lightly positive	Slightly positive	Slightly positive	Slightly positive				

Tabella 3. Proprietà del Si_3N_4 temprato in situ rispetto ad altri materiali come Al_2O_3 , YSZ (Ittria stabilizzata con Zirconia), lega di Titanio e PEEK. Adattata da (14)

Gli impianti Si_3N_4 sono utilizzati clinicamente nella riparazione spinale. Al momento gli impianti più comunemente usati sono ancora composti principalmente da PEEK (polietere-etere-chetone) e Ti, ma gli impianti in Si_3N_4 presentano un vantaggio nelle prestazioni biologiche (come l'attività antimicrobica) grazie alla microruvidità della superficie. È possibile ottenere un miglioramento delle prestazioni biologiche con il trattamento termico del Si_3N_4 (in N_2 a 1400°C), ma questo miglioramento sembra essere limitato.

Inoltre il Si_3N_4 è in fase di sviluppo per l'uso come cuscinetti nella sostituzione dell'articolazione dell'anca e del ginocchio. Lo standard per i cuscinetti ortopedici al momento è costituito da Al_2O_3 temperato con ZrO_2 .⁽¹³⁾

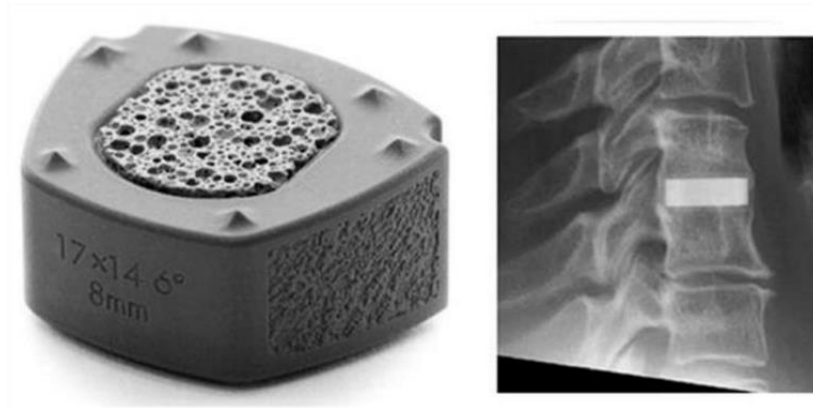


Figura 10. Dispositivo di fusione intersomatica cervicale in nitruro di silicio (sinistra) con l'immagine radiografica del dispositivo impiantato (a destra). Adattata da (13).

Sebbene vengano utilizzate prevalentemente ceramiche non ossidiche come il nitruro di silicio nelle applicazioni ad alta temperatura, comprese parti di turbine a gas avanzate, rotori di turbocompressori per motori automobilistici ad alte prestazioni e propulsori a razzo, i risultati di ricerche più recenti hanno fortemente incoraggiato l'uso del nitruro di silicio in una varietà di applicazioni biomediche. La sua struttura superficiale e chimica possono portare a una maggiore osteointegrazione e resistenza batterica e virale, oltre ad avere ottime proprietà meccaniche, termiche e chimiche.⁽¹³⁾

CAPITOLO 3

MATERIALI E METODI

3.1 Degumming (Estrazione della fibroina)

Per l'estrazione della fibroina, a partire dai bozzoli di *B. mori*, è stato utilizzato il protocollo più comune, riportato anche da Rockwood et al.⁽¹⁶⁾

I **reagenti** utilizzati sono:

- Bozzoli di bachi da seta *B. mori*
- Carbonato di sodio (Na_2CO_3 , Sigma Aldrich)
- Acqua ultra-pura (H_2O , Sigma Aldrich)

Gli **strumenti** utilizzati invece sono:

- Becker di vetro da 2 L
- Bacchetta in vetro
- Hot plate
- Bilancia

L'estrazione della fibroina inizia mettendo a bollire 2 L di acqua ultra-pura in un becker. Una volta arrivato a bollore, vengono versati 4.24 g di Na_2CO_3 , in modo da realizzare una soluzione 0.02 M. Nel frattempo, dopo aver pesato 5 g di bozzoli, questi vengono tagliati manualmente in pezzetti più piccoli, e una volta tornata a bollire la soluzione vengono versati nel becker. La seta viene lasciata a bollire per 1 ora, mescolando di tanto in tanto con una bacchetta per favorire il movimento circolare della seta nella soluzione e quindi la separazione della sericina. Il tempo di bollitura influisce sul peso molecolare delle fibre; maggiore è il tempo di bollitura e minore è il peso molecolare, e viceversa. Questo è stato un parametro importante nel corso di questo lavoro, in quanto sono stati provati diversi tempi: 30 minuti, 60 minuti e una doppia bollitura da 30 minuti. I risultati migliori sono stati ottenuti con un solo tempo di bollitura di 60 minuti.

Al termine dei 60 minuti, la fibroina viene separata dalla fase surnatante, estratta e sottoposta a 3 bagni in acqua ultra pura (1 L di acqua per ogni bagno), ciascuno della durata di 20 minuti.

All'inizio di ogni bagno le fibre vengono leggermente aperte, in modo da permettere un'eliminazione migliore del sale, e al termine del bagno viene cambiata l'acqua per sottoporre la fibroina al bagno successivo.

Al termine di questa procedura la seta viene strizzata e lasciata asciugare in aria per 1 giorno circa.

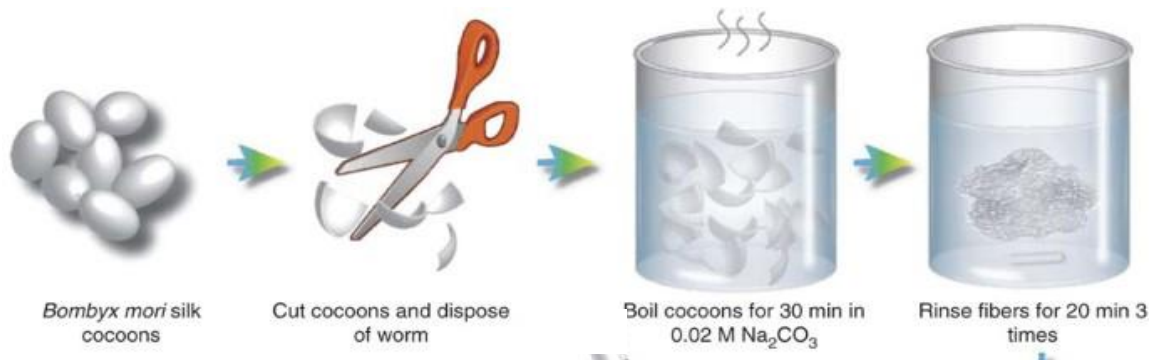


Figura 11. Processo di estrazione della fibroina a partire dai bozzoli. Adattata da (1).

3.2 Dissoluzione in Acido Formico

Per la dissoluzione della fibroina nella soluzione di acido formico e cloruro di calcio, inizialmente sono stati usati i parametri presenti nei paper di Zhang et al.⁽⁶⁾ e di Xue et al.⁽¹⁷⁾ e dopo alcune prove sono stati fissati alcuni parametri di riferimento, come la percentuale di cloruro di calcio rispetto all'acido formico e la percentuale di fibroina rispetto alla soluzione.

I **reagenti** utilizzati sono:

- Cloruro di calcio (CaCl_2 , Sigma Aldrich)
- Acido formico (CH_2O_2 , Sigma Aldrich)
- Fibroina di seta

Gli **strumenti** utilizzati invece sono:

- Vials in vetro da 20 mL
- Micropipetta
- Ancoretta magnetica
- Bilancia

Nel corso di questo lavoro sono state provate 3 diverse concentrazioni per le soluzioni di fibroina in acido formico e cloruro di calcio. Inizialmente, sulla base dei dati di letteratura^(5,6,17) sono state provate soluzioni al 6% w/w e all'8% w/w di fibroina. Queste tuttavia nel corso del tempo non si sono dimostrate stabili una volta effettuato il casting su PDMS. La terza concentrazione provata, quella principalmente usata nel corso di questo lavoro, è del 15% w/w di fibroina.

Per realizzare una soluzione al 15% in peso di fibroina, vengono prelevati 2 mL di acido formico con l'ausilio della micropipetta e messi in una vial di vetro dotata di ancoretta magnetica. All'acido formico si aggiungono 0,1 g di CaCl_2 (4% w/w)⁽¹⁸⁾, e a temperatura ambiente viene messa in moto l'ancoretta magnetica per favorire una dissoluzione del sale migliore e più rapida. Una volta sciolti tutti i residui del sale vengono aggiunti 0,3 g di fibroina, e si ottiene una soluzione di colore trasparente.

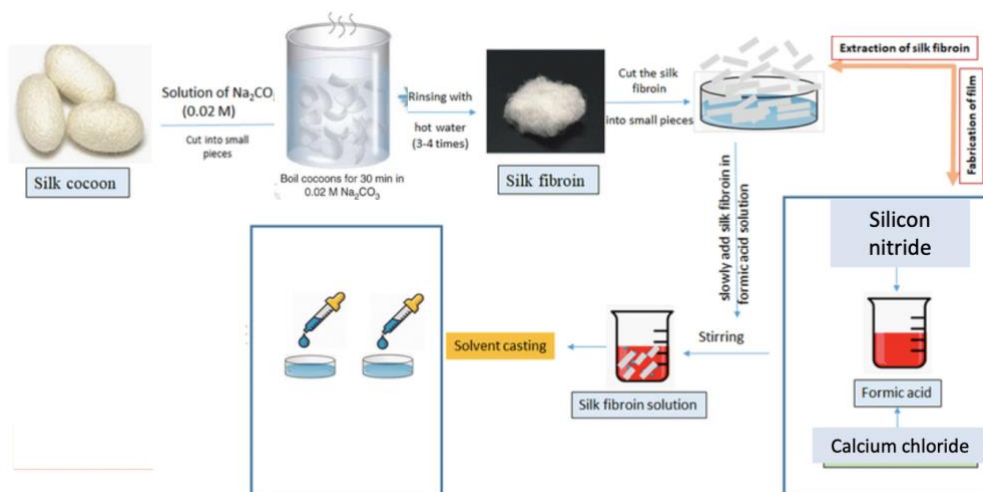


Figura 12. Procedimento della dissoluzione della fibroina in acido formico e cloruro di calcio. Adattata da (1).

3.3 Dissoluzione in Litio Bromuro

Per la dissoluzione della fibroina in litio bromuro, e quindi in soluzione acquosa, occorre preparare prima la soluzione 9.3 M di LiBr.

I **reagenti** utilizzati sono:

- Litio bromuro (LiBr, Sigma Aldrich)
- Acqua ultra-pura (Sigma Aldrich)
- Fibroina di seta

Gli **strumenti** utilizzati invece sono:

- Becker in vetro da 50/100 mL
- Bilancia

Vengono inizialmente pesati 20,2 g di LiBr e vengono aggiunti a 12 mL di acqua ultra-pura. La reazione che si sviluppa è esotermica, perciò il becker è stato messo in un bagno di acqua fredda. Un problema riscontrato tutte le volte che è stato svolto questo procedimento, è la tendenza del sale a cristallizzare, a formare un gel biancastro più che una soluzione. Per ovviare a questo problema sono stati aggiunti 5 mL di acqua ultra-pura.

Quindi, la fibroina ricavata dal degumming, solitamente tra i 4 e 5 g, viene sciolta in circa 18.5 mL di soluzione e messa in forno a 60°C per 4 h.

A seguito di questo processo viene effettuata la dialisi; la soluzione viene messa in una membrana per dialisi che viene chiusa alle estremità, fissata ad un supporto e immersa in un bagno di acqua ultra-pura, con lo scopo di eliminare i residui dei sali accumulati durante i vari processi.

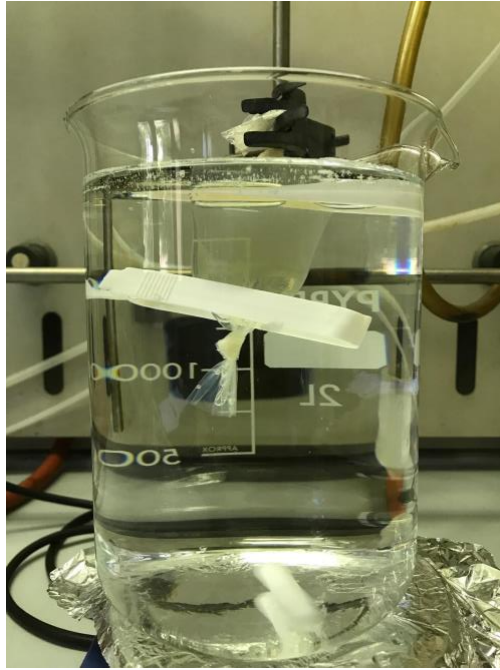


Figura 13. Apparato strumentale durante le 72 h di dialisi. Si può notare la soluzione dentro alla membrana che è stata chiusa a sacchetto.

La soluzione viene tenuta in dialisi per 72 h; i cambi d'acqua il primo giorno vengono effettuati dopo 1 h dall'inizio della dialisi e dopo 1 h e 2 h rispettivamente dai precedenti cambi. Il secondo giorno e il terzo giorno vengono effettuati cambi d'acqua ogni 4 h circa fino al termine delle 72 h, al termine delle quali la soluzione viene centrifugata a 4°C e 11.000 rpm e conservata in frigo sempre a 4°C circa.

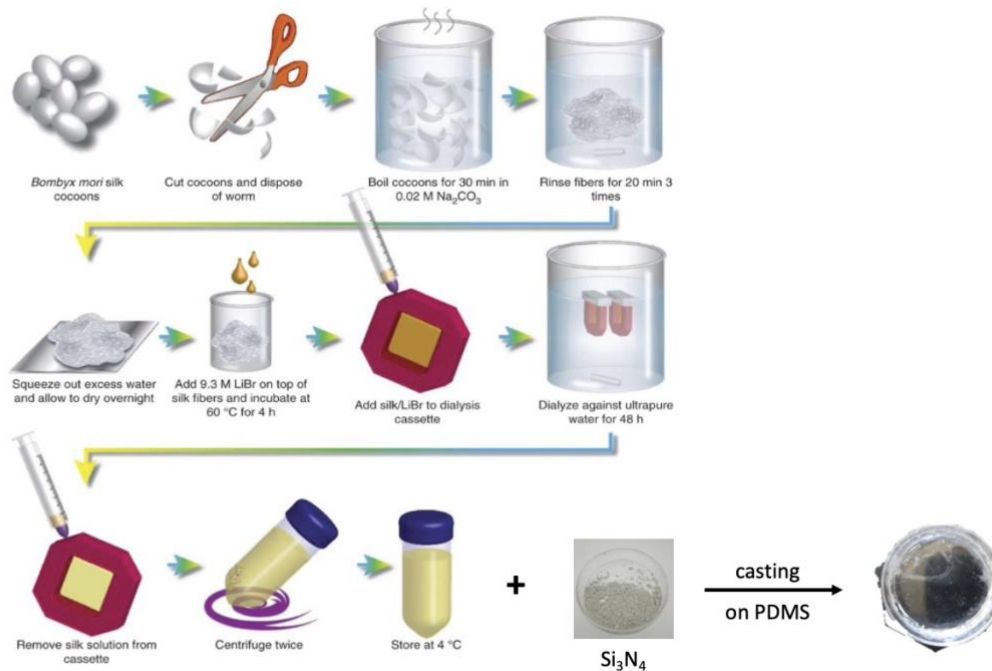


Figura 14. Procedimento produzione membrane. Adattato da (1).

Per misurare la concentrazione della soluzione w/v, viene prelevato un volume noto (solitamente 0,5 mL), messo in forno a 60°C overnight e pesato il giorno successivo. La concentrazione ottenuta mediamente è stata tra il 7% e l'8%.

3.4 Fabbricazione membrane

Per la produzione delle membrane il procedimento è lo stesso, sia che la fibroina sia stata messa in acido formico o nella soluzione di litio bromuro. Partendo dalla soluzione ottenuta nei due casi, è importante distinguere tra il caso di campioni con e senza nitruro di silicio Si_3N_4 .

Per campioni senza nitruro, la soluzione viene depositata su un substrato di PDMS per favorirne il distacco finale, e lasciata evaporare sotto cappa per circa 5 giorni (parametro variabile a seconda dell'umidità relativa dell'ambiente), al termine dei quali viene posta in una box ad umidità costante del 30% circa per 1-2 giorni con lo scopo di completare il processo di evaporazione (di acqua o di acido). I trattamenti post per indurre un grado di cristallinità maggiore e una struttura quanto più β -sheet possibile avvengono al termine dell'evaporazione, e quindi una settimana circa dopo il casting.

Per campioni con nitruro partendo da soluzione acquosa, il maggiore problema riscontrato è stato relativo alla dispersione e all'omogeneità della polvere di ceramico. Dopo l'aggiunta del nitruro alla soluzione sono stati provati diversi metodi per favorire una dispersione migliore, tra cui il mixing e il bagno sonico. Visti gli scarsi risultati, un ultimo tentativo si è basato sulla calcinazione del nitruro a circa 600°C; questo trattamento termico avrebbe dovuto favorire la repulsione elettrostatica tra le particelle modificandone la composizione superficiale, ma non si è rivelato migliore degli altri. Per questo motivo e per le tempistiche di sintesi si è preferito virare verso la dissoluzione in acido formico. In questo caso la dispersione e l'omogeneità si sono rivelate essere leggermente migliori, e in particolare si è osservato un miglioramento di queste proprietà aggiungendo la polvere di Si_3N_4 prima della fibroina, probabilmente dovuto a interazioni con la soluzione di acido. È stata comunque necessario l'utilizzo del mixer e del bagno sonico (10 minuti circa) per provare a ridurre l'aggregazione delle particelle (già di partenza troppo grandi, dell'ordine di grandezza di 10 μm). La procedura di casting, evaporazione ed i trattamenti post sono gli stessi descritti in precedenza.

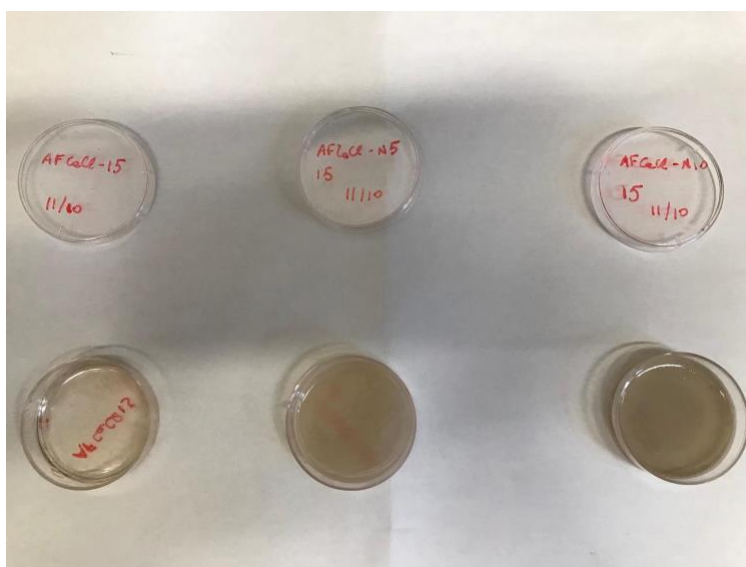


Figura 15. Campioni di membrane composite rispettivamente al 15% di fibroina, al 15% di fibroina con il 5% di nitruro e al 15% di fibroina con il 10% di nitruro.

3.5 Variazione parametri e trattamenti

Nella realizzazione delle membrane sono stati variati diversi parametri, con lo scopo di ottenere un materiale più stabile ed omogeneo possibile.

Concentrazione fibroina: le concentrazioni di fibroina sperimentate sono state del 6%, dell'8% e del 15 % w/w (quindi solitamente 0,3 g in 2 mL di acido e 0,1 g di CaCl_2).

Concentrazione CaCl_2 : per il cloruro di calcio le concentrazioni usate sono state inizialmente del 2% e del 5% w/w rispetto al peso dell'acido formico, per poi fissarla al 4% come suggerito in alcuni articoli di letteratura (quindi 0,1 g di CaCl_2 rispetto ai 2 mL di acido).

Concentrazione nitrato: per quanto riguarda il nitrato di silicio, sono state sondate diverse concentrazioni nel corso delle varie prove, in particolare dall'1% al 30% w/w rispetto al peso della fibroina, e in alcune prove è stato aggiunto prima della fibroina di seta, mentre in altre prove è stato aggiunto dopo la dissoluzione della fibroina.

I trattamenti post-evaporazione provati sulle membrane sono stati:

- Water annealing (W.A.)
- Water rinsing (W.R.)
- Methanol annealing
- Vapour annealing

Tutti i trattamenti provati hanno la funzione di dover favorire la transizione della struttura della fibroina a una struttura di tipo β -sheet rispetto alla struttura random-coil presente inizialmente.

Il vapour annealing prevede l'utilizzo di un essiccatore. Si pone una piastra Petri piena d'acqua sul fondo, sopra viene posizionata una grata (dove verrà appoggiato il campione), e il tutto verrà poi coperto con il coperchio e tirato a vuoto. In questo caso il vapour annealing non ha funzionato perché il materiale assorbiva troppa acqua (quindi non era stabile nel corso del tempo) e per la formazione di bolle in superficie.^(6,17,19)

Il methanol annealing consiste nell'immersione della membrana "asciutta" (ovvero dopo i canonici 5 giorni di evaporazione) in una piccola Petri riempita con metanolo e lasciata immersa per 30 minuti. In questo caso questo trattamento non ha funzionato perché il materiale risultante era cristallino, ma lo era addirittura troppo, e quindi troppo fragile da maneggiare e da usare per situazioni pratiche (come anche semplicemente per le misure FTIR).

Il water rinsing consiste nel risciacquo rapido della membrana immersa interamente per 4-5 volte rapidamente in un becker contenente acqua ultra-pura.

Per il water annealing invece bisogna immergere la membrana asciutta in acqua per 1 ora e successivamente lasciarla asciugare per 24-48 h a un'umidità costante del 30% circa.

Nel corso delle prove riguardanti i trattamenti post, e in particolare per il water annealing, ci si è accorti di un dettaglio importante: la perdita di massa tra prima e dopo il trattamento. È stato fatto uno studio quindi su 3 campioni contenenti fibroina al 15% per misurare l'entità di questa perdita. Non è stato possibile effettuare lo stesso tipo di caratterizzazione per i campioni all'8% a causa della loro elevata instabilità in acqua e la tendenza a sciogliersi.

Sample	Before water annealing	After water annealing
AFCaCl-N5-15-302	0,1136 g	0,0442 g
AFCaCl-15-N5-302	0,1572 g	0,0738 g
AFCaCl-N15-15-302	0,0445 g	0,0190 g

Tabella 4. Studio sulla perdita in peso dopo il trattamento di water annealing

Come si evince dalla Tabella 7, la perdita in peso per i vari campioni è risultata essere circa del 50% in media. Nonostante ciò si è scelto di continuare ad usare questo come trattamento migliore per indurre la cristallinità (a discapito del water rinsing) in quanto, come si vedrà nel capitolo successivo, i sali rimasti nelle membrane erano ancora preponderanti. Si è pensato quindi che un trattamento prolungato in acqua potesse essere la soluzione migliore.

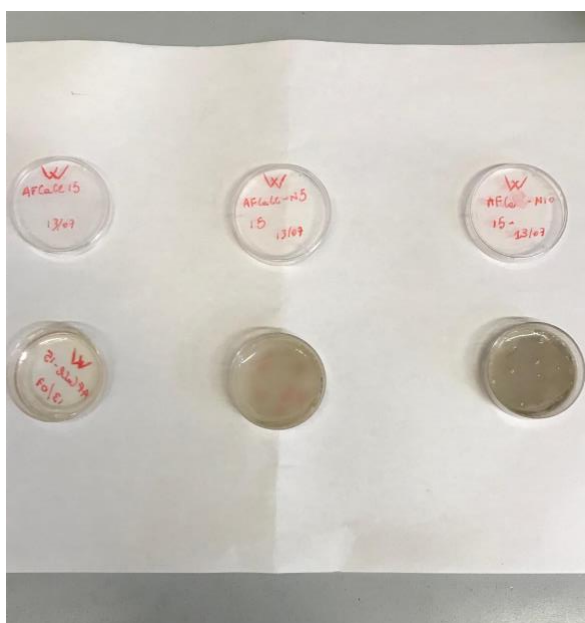


Figura 20. Campioni di membrane composite dopo il trattamento di water annealing rispettivamente al 15% di fibroina, al 15% di fibroina con il 5% di nitruro e al 15% di fibroina con il 10% di nitruro.

3.6 Fabbricazione pellets

Per la fabbricazione dei pellet è stato sfruttato il meccanismo di sinterizzazione a bassa temperatura proposto anche da Bucciarelli⁽³⁾. Partendo dalla soluzione ottenuta per dissoluzione della fibroina in litio bromuro 9.3 M, questa è stata centrifugata a 11.000 rpm e 4°C per separare eventuali impurezze rimaste, e infine filtrata tramite un filtro per siringa con dimensioni di 5 µm. Il filtraggio è avvenuto senza effettuare una pressione con lo stantuffo della siringa in quanto si volevano evitare sforzi meccanici di qualsiasi tipo sulla seta, perché avrebbero potuto portare a una modifica della microstruttura. Per la concentrazione della seta è stata scelta una concentrazione del 4% come indicato anche in alcuni paper in letteratura⁽²⁰⁾. Quindi è stato prelevato 1 mL di soluzione (originariamente all'8%) con una micropipetta ed è stato rilasciato in una provetta contenente 1 mL di acqua ultra-pura (precedentemente prelevato). Le provette contenenti 2 mL di soluzione al 4% quindi sono state sottoposte a congelamento con azoto liquido. Il primo step prevede il congelamento della soluzione. In questo caso i campioni sono stati immersi in azoto liquido e sono stati testati diversi tempi, a partire da 1 minuto fino ad arrivare a 3 minuti. Il tempo più efficace si è rivelato essere 3 minuti, che ha consentito un "freezing" del materiale migliore. Successivamente le provette sono state aperte e messe nel liofilizzatore (a gruppi di 3 in ogni becker) per 3 giorni. I parametri del liofilizzatore usati sono stati:

- Pressione: 0,2 mbar
- Temperatura: -53°C

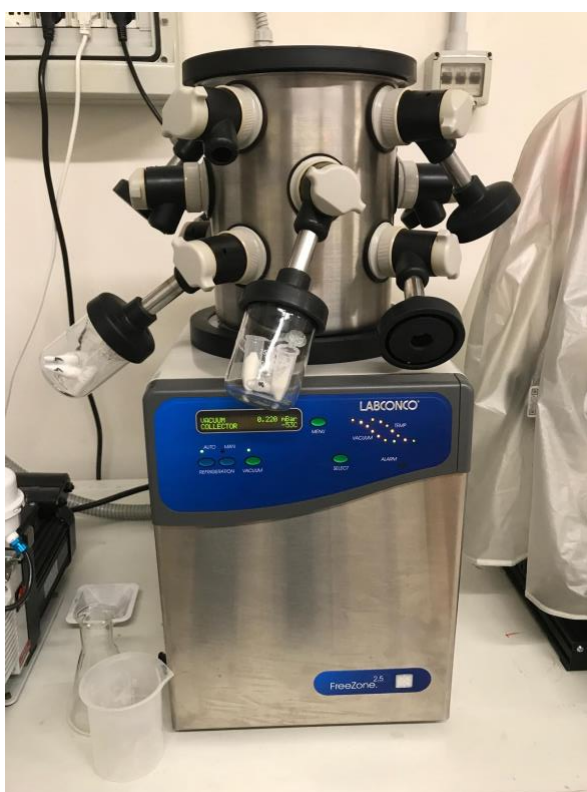


Figura 16. Liofilizzatore con le provette contenenti la soluzione "freezata" tramite azoto liquido.

Alla fine dei 3 giorni, i campioni sono stati rimossi, tagliuzzati finemente a mano e lasciati seccare per un giorno in una box a un'umidità costante del 30%. Il giorno successivo sono stati ritagliati manualmente a pezzi ancora più fini.

Per ridurre le dimensioni dei pezzi di fibroina è stata presa in considerazione l'idea di utilizzare la macinazione criogenica, ma è stata scartata in quanto avrebbe.

L'ultimo passaggio è quello della compressione della fibroina per formare dei pellet. Questa fase si basa sulla sinterizzazione a bassa temperatura, un fenomeno per cui, tramite l'applicazione di pressioni dell'ordine delle centinaia di MPa e l'assorbimento di acqua/umidità (che in questo caso svolge un ruolo di plasticizzante), si riesce ad abbassare la temperatura di transizione vetrosa T_g (che per la fibroina sarebbe di 180-200°C circa⁽³⁾) a circa 40°C. I campioni di fibroina liofilizzata sono quindi stati messi in un ambiente ad umidità costante del 90% RH e per le prime prove è stato registrato il tempo per cui sono stati al 90% RH, mentre per il terzo ciclo è stato misurato l'incremento di peso rispetto al campione iniziale.

Sono stati realizzati 3 cicli di prove per i pellet.

Per la compressione è stata usata una pressa manuale con uno stampo con mantello riscaldante.

Nelle tabelle seguenti verrà utilizzata una nomenclatura per i campioni di pellet tale per cui:

- S(X) rappresenta il numero del ciclo
- N(X) dove presente indica la percentuale di nitrato
- (X) la lettera finale rappresenta il numero del campione

Per il primo ciclo di pellet le condizioni utilizzate sono le seguenti:

Liofilizzazione						
Nome Campione	Concentrazione	Freeze-drying (min)	Durata Liofilizzazione (giorni)	Temperatura (°C)	Pressione (mbar)	Tempo in umidità 90%
S1-A	8%	1	3	-53	0,2	30 min
S1-B	4%	1	3	-53	0,2	30 min

Pre-compressione			
Nome Campione	Temperatura (°C)	Pressione (MPa)	Tempo
S1-A	25	7	60 secondi
S1-B	25	7	60 secondi

Compressione			
Nome Campione	Temperatura (°C)	Pressione (MPa)	Tempo
S1-A	40	270	20 min
S1-B	40	270	20 min

Tabella 5. Parametri utilizzati nel primo ciclo di produzione dei pellet.

I pellet ottenuti vengono mostrati di seguito:



Figura 17. Pellet S1-A e S1-B.

Questi campioni hanno evidenziato una sinterizzazione incompleta, perciò i parametri per il ciclo successivo sono stati variati, principalmente in pressione, temperatura e durata.

Per il secondo ciclo di pellet le condizioni utilizzate sono le seguenti:

Liofilizzazione						
Nome Campione	Concentrazione	Freeze-drying (min)	Durata Liofilizzazione (giorni)	Temperatura (°C)	Pressione (mbar)	Tempo in umidità 90%
S2-A	4%	3	3	-53	0,2	60 min
S2-B	4%	3	3	-53	0,2	60 min
S2-N5-C	4%	3	3	-53	0,2	60 min

Pre-compressione			
Nome Campione	Temperatura (°C)	Pressione (MPa)	Tempo
S2-A	25	7	60 secondi
S2-B	25	18	300 secondi
S2-N5-C	25	11	60 secondi

Compressione			
Nome Campione	Temperatura (°C)	Pressione (MPa)	Tempo
S2-A	40	270	30 min
S2-B	60	290	35 min
S2-N5-C	40	270	30 min

Tabella 6. Parametri utilizzati nel secondo ciclo di produzione dei pellet.

I pellet ottenuti vengono mostrati di seguito. Il campione S2-N5-C è stato realizzato con il 5% di nitrato aggiunto prima della pre-compressione. Tuttavia è risultato troppo fragile, perciò per le prove successive si è scelto di abbassare la percentuale di nitrato all'1%.

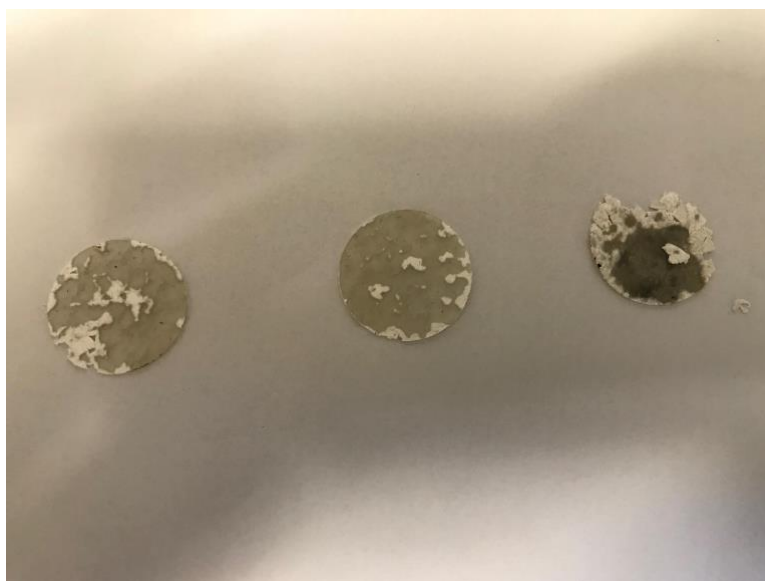


Figura 18. Da sinistra a destra vengono mostrati i pellet S2-A, S2-B e S2-N5-C.

Per il terzo ciclo di pellet le condizioni utilizzate sono le seguenti:

Liofilizzazione						
Nome Campione	Concentrazione	Freeze-drying (min)	Durata Liofilizzazione (giorni)	Temperatura (°C)	Pressione (mbar)	Incremento peso dopo assorbimento umidità
S3-A	4%	3	3	-53	0,2	0,18%
S3-B	4%	3	3	-53	0,2	9,8%
S3-N1-C	4%	3	3	-53	0,2	8,5%
S3-D	4%	3	3	-53	0,2	5%
S3-N1-E	4%	3	3	-53	0,2	9,3%
S3-N1-F	4%	3	3	-53	0,2	10,2%

Pre-compressione			
Nome Campione	Temperatura (°C)	Pressione (MPa)	Tempo
S3-A	25	18	300 secondi
S3-B	25	18	300 secondi
S3-N1-C	25	18	300 secondi
S3-D	25	18	300 secondi
S3-N1-E	25	18	300 secondi
S3-N1-F	25	18	300 secondi

Compressione			
Nome Campione	Temperatura (°C)	Pressione (MPa)	Tempo
S3-A	60	290	35 min
S3-B	60	340	30 min
S3-N1-C	60	340	30 min
S3-D	40	290	35 min
S3-N1-E	90	340	30 min
S3-N1-F	90	340	50 min

Tabella 7. Parametri utilizzati nel terzo ciclo di produzione dei pellet.

I pellet ottenuti vengono mostrati di seguito:



Figura 19. In fotografia sono presenti rispettivamente da sinistra a destra i campioni S3-A, S3-B, S3-N1-C e S3-D.

3.7 Tecniche di caratterizzazione

Le principali tecniche di caratterizzazione usate per membrane e pellet sono l'FTIR, il SEM, la diffrazione a raggi-X (XRD) e la spettrofotometria UV-Visibile.

FTIR

La spettroscopia a infrarossi a trasformata di Fourier è un metodo di analisi utilizzato per comprendere la struttura delle molecole o la composizione molecolare di campioni. È basata sull'assorbimento di radiazione infrarossa da parte delle molecole a frequenze specifiche per cui si hanno variazioni nella distanza di legame (stretching) e nell'angolo di legame (bending). Quando un fotone della radiazione infrarossa viene assorbito, la molecola passa dallo stato vibrazionale fondamentale a uno stato eccitato.

Nello strumento è presente un interferometro, che permette la scansione di tutte le frequenze presenti nella radiazione IR generata dalla sorgente. La scansione è possibile grazie a uno specchio mobile che spostandosi introduce una differenza di cammino ottico, che origina una interferenza costruttiva o distruttiva con il raggio riflesso da uno specchio fisso. In questo modo si ottiene un interferogramma che mostra la rappresentazione dell'intensità nel dominio del tempo. Applicando la trasformata di Fourier si ottiene lo spettro infrarosso, ovvero la rappresentazione dell'intensità nel dominio della frequenza.

In un tipico spettro FTIR quindi, in ascissa si trova il numero d'onda del fotone incidente, mentre in ordinata c'è la trasmittanza (o l'assorbanza). Inoltre nello spettro possiamo distinguere due zone:

- Da 3800 a 1300 cm^{-1} si trova il dominio dei gruppi funzionali
- Da 1300 a 650 cm^{-1} si trova la zona delle cosiddette "impronte digitali", in cui si trovano le bande caratteristiche per le specifiche molecole

La spettroscopia FTIR può essere fatta anche nella modalità ATR (riflettanza totale attenuata) nel caso particolare di campioni massivi.

Questa misura funziona misurando i cambiamenti che si verificano in un raggio infrarosso riflesso totalmente all'interno quando il raggio entra in contatto con un campione. Un raggio infrarosso viene diretto su un cristallo otticamente denso con un alto indice di rifrazione ad un certo angolo; la riflettanza interna crea un'onda evanescente che si estende oltre la superficie del cristallo nel campione tenuto a contatto con il cristallo. Questa onda evanescente sporge solo di pochi micron (fino a 5 μm) oltre la superficie del cristallo e nel campione. Di conseguenza, deve esserci un buon contatto tra il campione e la superficie del cristallo. Nelle regioni dello spettro infrarosso in cui il campione assorbe energia, l'onda evanescente sarà attenuata o alterata. L'energia attenuata di ogni onda evanescente viene restituita al raggio IR, che quindi esce dall'estremità opposta del cristallo e viene trasmessa al rivelatore nello spettrometro IR e il sistema genera uno spettro infrarosso. Affinché la tecnica abbia successo, l'indice di rifrazione del cristallo deve essere significativamente maggiore di quello del campione, altrimenti non si verificherà la riflettanza interna e la luce sarà trasmessa invece che riflessa internamente nel cristallo.

SEM

Il microscopio elettronico a scansione (SEM) utilizza un raggio focalizzato di elettroni ad alta energia per generare una varietà di segnali sulla superficie di campioni solidi.

Gli elettroni vengono prodotti nella parte superiore della colonna, accelerati verso il basso e fatti passare attraverso una combinazione di lenti e aperture per produrre un fascio focalizzato di elettroni che colpisce la superficie del campione. La posizione del fascio di elettroni sul campione è controllata da bobine di scansione situate sopra la lente dell'obiettivo.

Come risultato dell'interazione elettrone-campione, vengono prodotti numerosi segnali che vengono rilevati da opportuni rivelatori. Quando gli elettroni interagiscono con il campione, producono elettroni secondari, elettroni retrodiffusi e raggi X caratteristici.

Questi segnali vengono raccolti da uno o più rivelatori per formare immagini che vengono poi visualizzate sullo schermo del computer. Quando il fascio di elettroni colpisce la superficie del campione, penetra nel campione fino a una profondità di pochi micron, a seconda della tensione di accelerazione e della densità del campione.

I campioni sono stati analizzati mediante microscopia elettronica lavorando in bassa pressione, a 20 kV in un microscopio ESEM (FEI Quanta 200). Le immagini sono state raccolte in modalità elettroni retro diffusi (*back scattered*, BSE) per evidenziare meglio differenze composizionali. Si sono poi effettuate analisi qualitative della composizione mediante spettroscopia EDS su diverse zone dei campioni. L'assegnazione degli elementi è stata effettuata utilizzando il software in dotazione dello strumento (EDAX Element- C2B).

XRD

La diffrazione a raggi X è una tecnica utilizzata per l'analisi qualitativa e quantitativa dei solidi cristallini e la natura non distruttiva della misura la rende adatta anche per campioni relativamente piccoli. Il fenomeno della diffrazione si basa sulla legge di Bragg:

$$2d * \sin(\theta) = n * \lambda$$

Dove:

- d = distanza tra due piani cristallografici adiacenti
- θ = angolo formato dal fascio uscente e il piano cristallino
- n = numero intero
- λ = lunghezza d'onda della radiazione

La tecnica si basa sull'interazione tra la radiazione prodotta (con una determinata lunghezza d'onda λ e un angolo di incidenza θ) e gli atomi costituenti il reticolo cristallino del campione, sia che esso sia in forma di solido che di polvere. Gli atomi provocano la diffrazione del fascio di raggi X incidente in diverse direzioni (specifiche). Misurando l'angolo e l'intensità dei raggi diffratti, è possibile ottenere un'immagine 3D della densità degli elettroni nel cristallo.

Le analisi XRD sulle polveri di nitruro sono state condotte con un diffrattometro Philips PW1710.

UV-Vis

La spettroscopia UV-Vis è una delle tecniche di analisi ottica principali. Con questa caratterizzazione, è possibile ottenere informazioni sulle proprietà ottiche e composizionali dei campioni, studiando l'interazione della materia con l'energia elettromagnetica. La misura si basa sull'assorbimento selettivo delle molecole di fotoni di lunghezza d'onda compresa tra 200-2500 nm. L'assorbimento dell'energia è tale da far vibrare i gruppi funzionali della molecola o a promuovere transizioni elettroniche. Quindi viene registrata la risposta del campione ed in base ai dati raccolti è possibile risalire ad informazioni come la composizione del campione. L'analisi può essere sia qualitativa che

quantitativa; nel primo caso l'identificazione avviene attraverso le lunghezze d'onda assorbite; nel secondo caso, invece, si sfrutta la legge di Lambert-Beer:

$$A = \varepsilon * C * d$$

Dove:

- A = assorbanza ottica
- C = concentrazione
- d = cammino ottico compiuto dalla radiazione
- ε = coefficiente di estinzione molecolare

Nello specifico, tale tecnica è stata utilizzata per verificare il grado di trasparenza dei campioni massivi, andando a caratterizzare la trasmittanza. Una riduzione della trasmittanza può essere infatti causata da fenomeni di assorbimento, ma anche di scattering dovuti a disuniformità superficiali o vuoti. Tale misura è stata quindi utilizzata come caratterizzazione qualitativa ed indiretta del grado di "sinterizzazione" dei campioni massivi.

Gli spettri sono stati raccolti in modalità di trasmittanza normale tramite uno spettrofotometro Jasco V-770, plottando la percentuale di trasmittanza sui nanometri, con un passo di 2 nm, larghezza della banda passante di 10 nm, e con velocità di scansione di 400 nm/min.

CAPITOLO 4

RISULTATI E DISCUSSIONI

Di seguito sono riportati i principali risultati ottenuti durante le analisi e le caratterizzazioni effettuate, elencate in precedenza.

Nella prima parte verranno analizzati i risultati relativi alle membrane, quindi la variazione e l'effetto dei parametri ottimizzati, i trattamenti post evaporazione, gli spettri FTIR e le immagini raccolte al SEM.

Nella seconda parte invece verranno analizzate le misure e i risultati preliminari relativi ai pellet, di cui ci si è occupati solo nell'ultima parte del lavoro di tesi.

4.1 Fabbricazione membrane

4.1.1 Variazione parametri

Nella realizzazione delle membrane sono stati analizzati gli effetti della variazione delle concentrazioni di alcuni parametri, come la concentrazione di cloruro di calcio, quella di fibroina di seta e di nitrato di silicio.

Inizialmente la concentrazione scelta era del 2% w/w (utilizzata con una concentrazione di fibroina dell'8% w/v), ma i film sono risultati non stabili e si è scelto di aumentare questa concentrazione. Secondo alcuni studi^(16,18) l'aumento della percentuale in peso di cloruro, comporta notevoli effetti sulle proprietà del materiale. Aumentando ad esempio la concentrazione dal 2% al 10% aumenta la ritenzione idrica del campione; inoltre, un'elevata concentrazione di CaCl_2 può ridurre la struttura delle fibrille di seta. Questo implica che aumentando la concentrazione di cloruro di calcio, il tipo di struttura β -sheet diminuisce, in quanto vengono rotti i legami idrogeno tra le catene molecolari della fibroina e si passa perciò al tipo di struttura random-coil. Questi motivi hanno fatto sì che dopo le prime prove la concentrazione sia stata fissata al 4%⁽¹⁸⁾.

Il materiale ottenuto è risultato flessibile ma stabile nel tempo, le cui proprietà possono essere modificate in base all'umidità a cui viene esposto (l'acqua ha funzione di plastificante). A meno di esposizione ad ambiente acquoso quindi viene esclusa la reversibilità del materiale di tornare allo stato di idrogel.

Le concentrazioni di fibroina provate sono quelle suggerite in letteratura^(1,6,16,21) e sono del 6%, 8% e 15% in peso rispetto al volume di soluzione. Le prime due concentrazioni però sono risultate insufficienti in termini di massa perché i campioni non sono stabili nel tempo e tendono a tornare alla condizione di idrogel quando esposti ad umidità.

Il nitrato di silicio è stato provato in diverse concentrazioni, a partire dall'1% wt rispetto al peso della fibroina fino al 30%. L'incremento di materiale ceramico comporta una rigidità del materiale maggiore e quindi anche una maggiore fragilità. Come verrà mostrato di seguito, le immagini catturate al SEM mostrano una tendenza del nitrato alla coalescenza aumentando la concentrazione. Inoltre il Si_3N_4 ha mostrato una tendenza a rimanere sulla superficie del campione

(lucida) piuttosto che precipitare sul fondo della membrana (che presenta una superficie opaca essendo a contatto con il substrato di PDMS).

4.1.2 FTIR

La caratterizzazione FTIR in modalità ATR è stata realizzata con uno spettrometro Jasco FT/IR-4200. Queste misure hanno lo scopo di determinare il tipo di struttura secondaria della fibroina di seta nel caso dei vari campioni. Le scansioni sono state realizzate con una risoluzione di 4 cm^{-1} , angolo incidente di 45° , apertura di 7.1 mm e una velocità di scansione di 2 mm/sec . Di seguito viene riportato il dettaglio degli spettri relativo ai picchi nella zona amidica.

La fibroina presenta un picco a 3250 cm^{-1} , che potrebbe essere dovuto allo stretching vibrazionale del legame O-H o all'amide A.

Tra 1500 e 1700 cm^{-1} invece si trova la regione amidica, costituita da due picchi principali. La banda dell'amide I si trova tra 1600 e 1700 cm^{-1} , è associata soprattutto alla vibrazione di stretching C=O (tra il 70 e l'85%) e C-N (tra il 10 e il 20%), ed è correlata alla conformazione del backbone. La banda dell'amide II invece si trova tra 1500 e 1600 cm^{-1} , deriva principalmente dal bending nel piano del legame N-H (40-60%), e da vibrazioni di stretching C-C (10%) e C-N (18-40%). Anche questa banda è sensibile alla conformazione^(11,13,18).

I picchi a numeri d'onda più bassi, quindi tra 1620 e 1630 cm^{-1} nel caso della banda I e tra 1520 e 1530 cm^{-1} per la banda dell'amide II, indicano la presenza di una struttura di tipo β -sheet. Picchi a numeri d'onda più alti, al contrario, indicano la presenza di una struttura di tipo random-coil o α -elica.

Vengono quindi analizzati gli spettri confrontando la variazione dei parametri precedentemente spiegati tra i vari campioni:

Variation Concentrazione Fibroina:

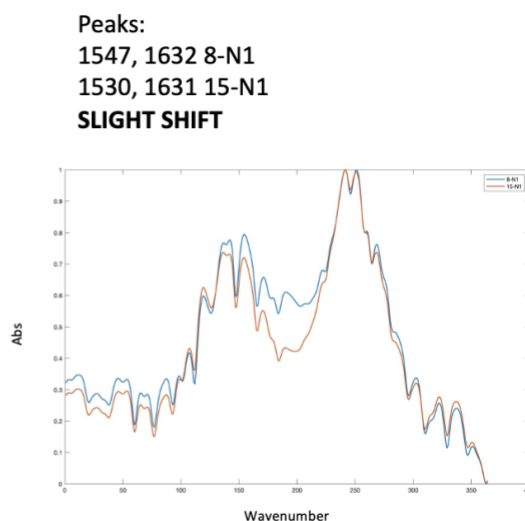
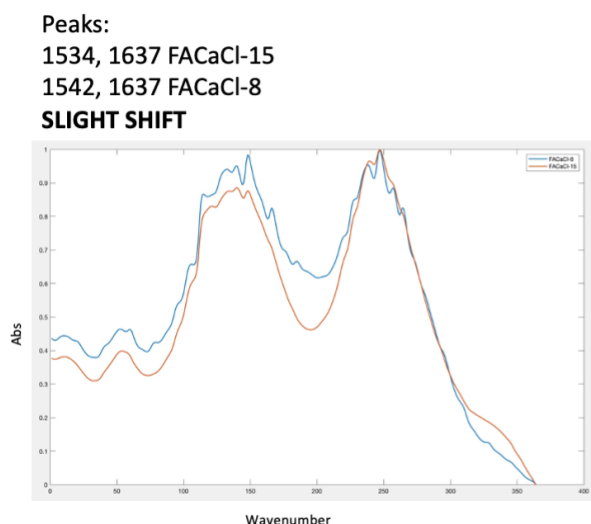


Figura 20. A sinistra il confronto tra un campione di fibroina all'8% (blu) e uno al 15% (rosso), a destra il confronto tra gli stessi campioni (8% blu e 15% rosso) a cui è stato aggiunto l'1% di nitrato.

Peaks:
1540, 1637 8-N1-W
1537, 1636 15-N1-W

SLIGHT SHIFT but not
sufficient to justify the change
of secondary structure

Peaks:
1541, 1637 8-W
1538, 1635 15-W

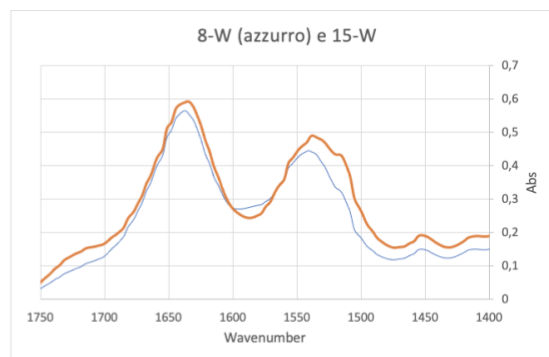
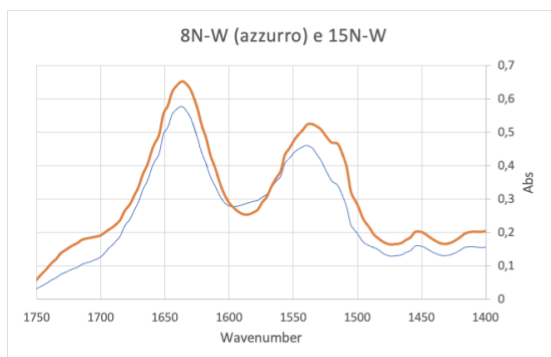


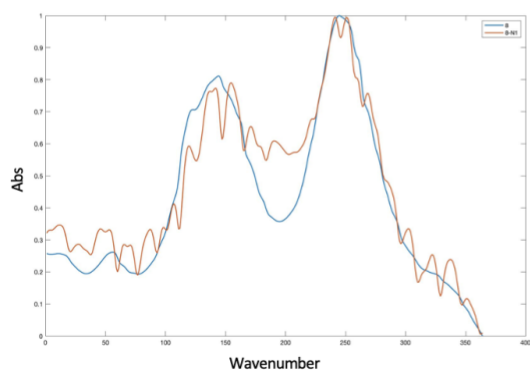
Figura 21. A sinistra il confronto tra un campione di fibroina all'8% e uno al 15%, entrambi con 1% di nitrato e trattati in acqua. A destra il confronto tra gli stessi campioni, senza nitrato, trattati in acqua.

Dalla Figura 20 si nota come la variazione della concentrazione di fibroina non influisca sulla struttura secondaria della fibroina. Si osserva solamente un leggero spostamento del picco dell'amide II ma non è sufficiente a giustificare la variazione della struttura secondaria, in quanto è situato a numeri d'onda ancora troppo alti. Questa ipotesi è confermata anche dalla Figura 21 per la quale si può fare la stessa osservazione.

Variation Concentration Nitro:

Peaks:
1547, 1632 8-N1
1542, 1637 8

SLIGHT SHIFT



Peaks:
1530, 1631 15-N1
1534, 1637 15

SLIGHT SHIFT

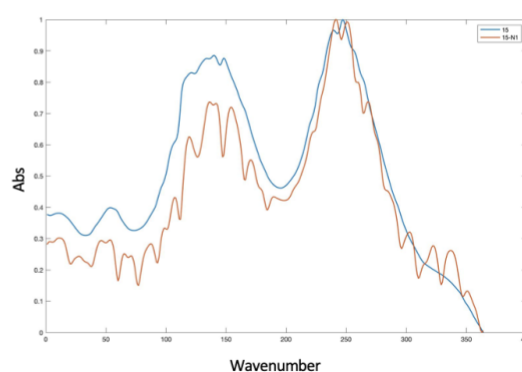


Figura 22. A sinistra il confronto tra un campione di fibroina all'8% con (arancio) e senza (blu) nitrato (1%). A destra il confronto tra un campione di fibroina al 15% con (arancio) e senza (blu) nitrato (1%).

Azzurro nitruro 5%
Peaks: 1536, 1637

Arancione nitruro 10%
Peaks: 1537, 1637

Grigio nitruro 15%
Peaks: 1539, 1633

SLIGHT SHIFT but not sufficient to justify the change of secondary structure

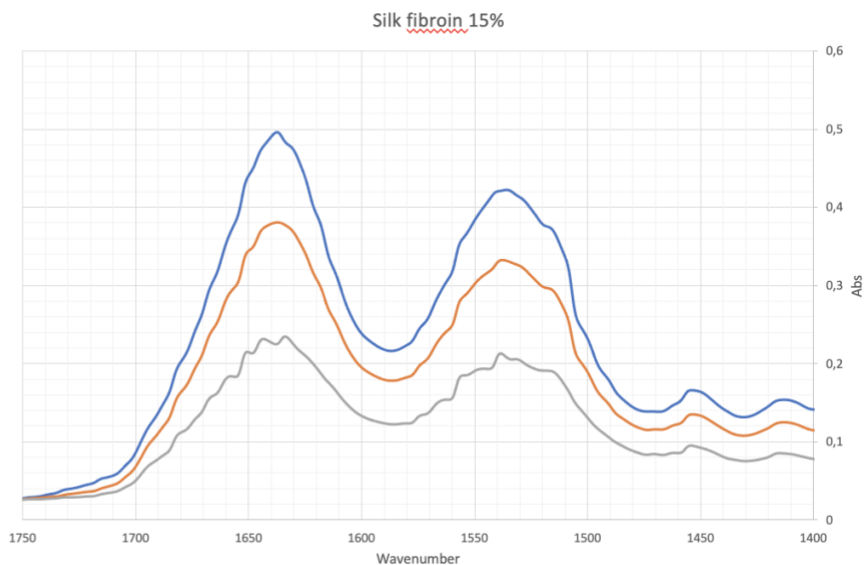
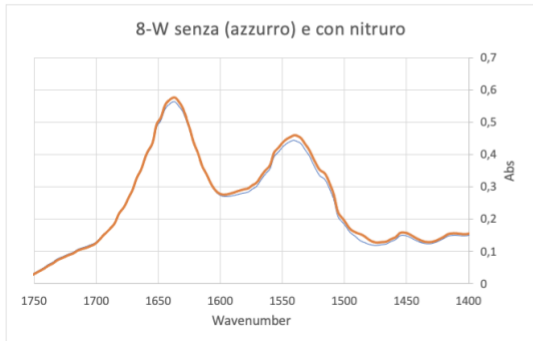


Figura 23. Confronto tra campioni di fibroina al 15% con percentuali diverse di nitruro, e in particolare il 5%, il 10% e il 15%.

Peaks:
1541, 1637 8-W
1540, 1637 8-N1-W

NO SHIFT



Peaks:
1538, 1635 15-W
1537, 1636 15-N1-W

NO SHIFT

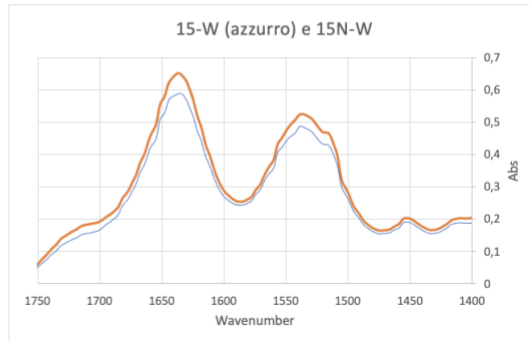


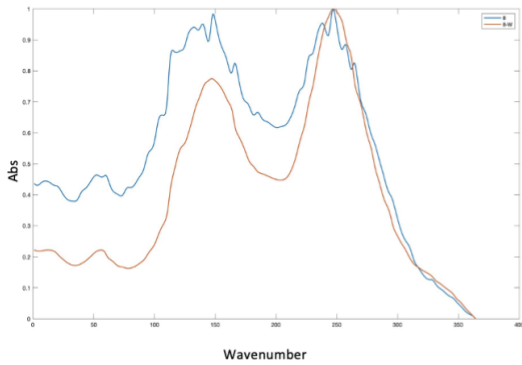
Figura 24. A sinistra il confronto tra un campione di fibroina all'8% trattato in acqua e uno all'8% con 1% di nitruro trattato in acqua. A destra un confronto simile con concentrazione di fibroina del 15%.

Nelle Figure 22 e 24 sono presenti gli spettri relativi al confronto tra campioni con e senza l'1% di nitruro di silicio per le diverse concentrazioni, e dopo il trattamento in acqua per gli stessi campioni. Nonostante gli spettri rumorosi della Figura 22, sono stati determinati i picchi, e nel primo caso si osserva una variazione minima, troppo piccola per poter giustificare la variazione da struttura α -elica a β -sheet, nel secondo caso non c'è alcuno spostamento dei picchi. Anche nella Figura 23 che riporta gli spettri per lo stesso campione con concentrazioni di nitruro differenti, non si ha uno shift dei picchi.

Variazione Trattamento Post-Evaporazione:

Peaks:
1541, 1637 8-W
1542, 1637 8

NO SHIFT



Peaks:
1538, 1635 15-W
1534, 1637 15

NO SHIFT

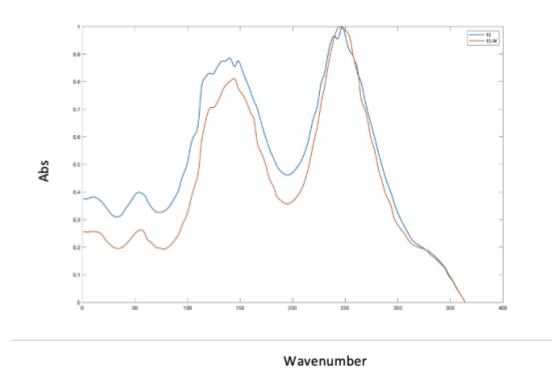
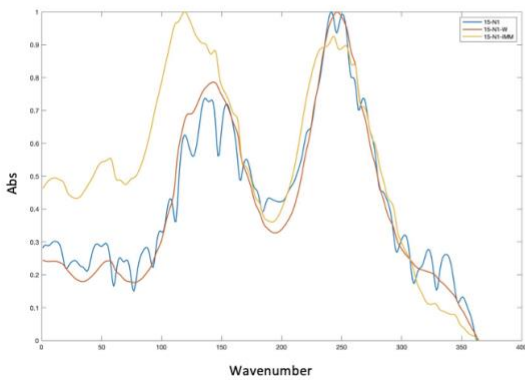


Figura 25. A sinistra il confronto tra un campione di fibroina all'8% non trattato (blu) e uno all'8% trattato (arancio) in acqua. A destra un confronto simile con concentrazione di fibroina del 15% (blu non trattato, arancio trattato).

Peaks:
Before (azzurro) 1530, 1631 15-N1
W.A. (arancio) 1513, 1633 15-N1-IMM
W.R. (giallo) 1537, 1636 15-N1-W



Peaks:
Before (azzurro) 1534, 1637 15
W.A. (arancio) 1508, 1632 15-IMM
W.R. (giallo) 1538, 1635 15-W

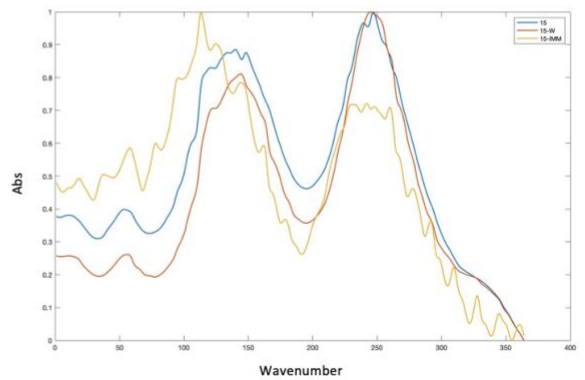
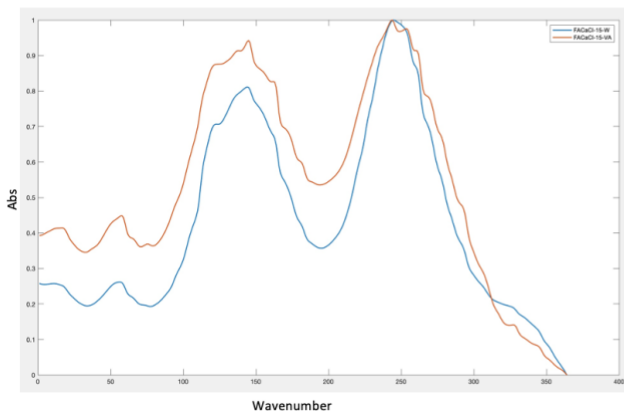


Figura 26. A sinistra il confronto tra campioni di fibroina al 15% con 1% di nitrato non trattato, trattato in acqua, e trattato con water rinsing. A destra un confronto tra gli stessi campioni senza nitrato.

Peaks:
1538, 1635 15-W
1539, 1634 15-VA
NO SHIFT



Peaks:
1541, 1637 8-W
1515, 1621 8-M
SHIFT

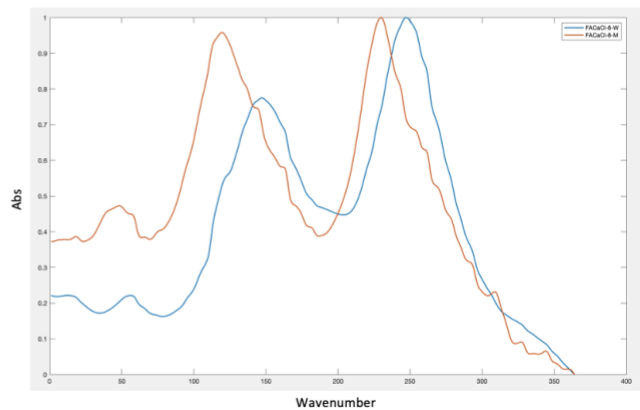


Figura 27. A sinistra il confronto tra campioni di fibroina al 15% trattato in acqua (blu) e in vapour annealing (arancio). A destra il confronto tra un campione all'8% trattato in acqua (blu) e in metanolo (arancio).

In Figura 25 è presente il confronto tra campioni con concentrazione diverse (8% e 15%) rispettivamente prima e dopo il risciacquo in acqua (water rinsing). Nonostante fosse uno di quelli più suggeriti in letteratura^(13,21) non ha portato a nessuna variazione della microstruttura della fibroina. In Figura 26 invece viene confrontato, per campioni al 15% di fibroina con e senza nitrato, l'effetto dei diversi trattamenti in acqua, tra water annealing e water rinsing. Nonostante la rumorosità dei picchi, in questo caso il metodo che sembra aver parzialmente funzionato è il water annealing, in quanto presenta uno shift del picco dell'amide II a numeri d'onda più bassi, e quindi una struttura leggermente più cristallina. Il picco dell'amide I tuttavia rimane immutato.

Nell'ultima immagine, la Figura 27, vengono confrontati tra loro il water rinsing ed il vapour annealing, che non hanno dato i risultati sperati, e sempre il risciacquo in acqua con il trattamento in metanolo. Quest'ultimo è l'unico che ha realmente funzionato al 100% come da aspettativa, ma come detto in precedenza il materiale è risultato troppo fragile per qualsiasi tipo di applicazione e misura.

4.1.3 Spessore membrane

Per verificare lo spessore delle membrane è stato utilizzato un micrometro, con sensibilità di 0,01 mm. Lo spessore delle membrane è costante su tutto il campione, sintomo di un casting fatto "in bolla" e di un buon substrato di PDMS. I campioni in generale differiscono tra di loro di qualche centesimo di millimetro; i casi da evidenziare in particolare sono:

- Il campione trattato tramite methanol annealing, risultato troppo fragile per poter essere misurato
- Il campione con l'8% di fibroina (AFCaCl-8-N1) che in fase di distacco dal substrato si era ripiegato su se stesso portando a una zona con spessore doppio
- La percentuale di fibroina (in alcuni campioni qui elencati è all'8%, in altri al 15%) influisce sullo spessore in modo proporzionale
- Non c'è differenza in spessore tra i campioni non trattati e quelli trattati in acqua (tra i campioni AFCaCl15-N1 e 15N-W lo spessore è lo stesso)

Sample	Thickness (mm)
AFCaCl-8	0,4 (doppio)
AFCaCl-8-m	Troppo "geloso"
AFCaCl-8-N1	0,20 (dove doppio 0,45)
AFCaCl-15	0,31
AFCaCl-15-m	0,29
AFCaCl-15-N1	0,35
8-W	0,32
15-W	0,31
8N-W	0,34
15N-W	0,35
8-M	Troppo fragile
AFCaCl-15-N5	0,30
AFCaCl-15-N10	0,31
AFCaCl-15-N15	0,40

Tabella 8. Spessore medio (mm) misurato con micrometro di alcune membrane in seguito alla variazione di alcuni parametri.

4.1.4 SEM

Le membrane sono state caratterizzate anche al SEM per cercare di osservare meglio la morfologia, la topografia superficiale, la distribuzione della polvere di Si_3N_4 e i principali elementi chimici presenti. Sono state esaminate rispettivamente le membrane di sola fibroina e di fibroina contenente nitrato di silicio in percentuali diverse (1, 5, 10 e 15%) prima e dopo il trattamento in acqua.

Di seguito vengono illustrati i risultati delle immagini per ogni membrana prima e dopo il trattamento, le mappe EDS più significative e le percentuali degli elementi presenti maggiormente.

- Seta (15%) pre e post-trattamento:

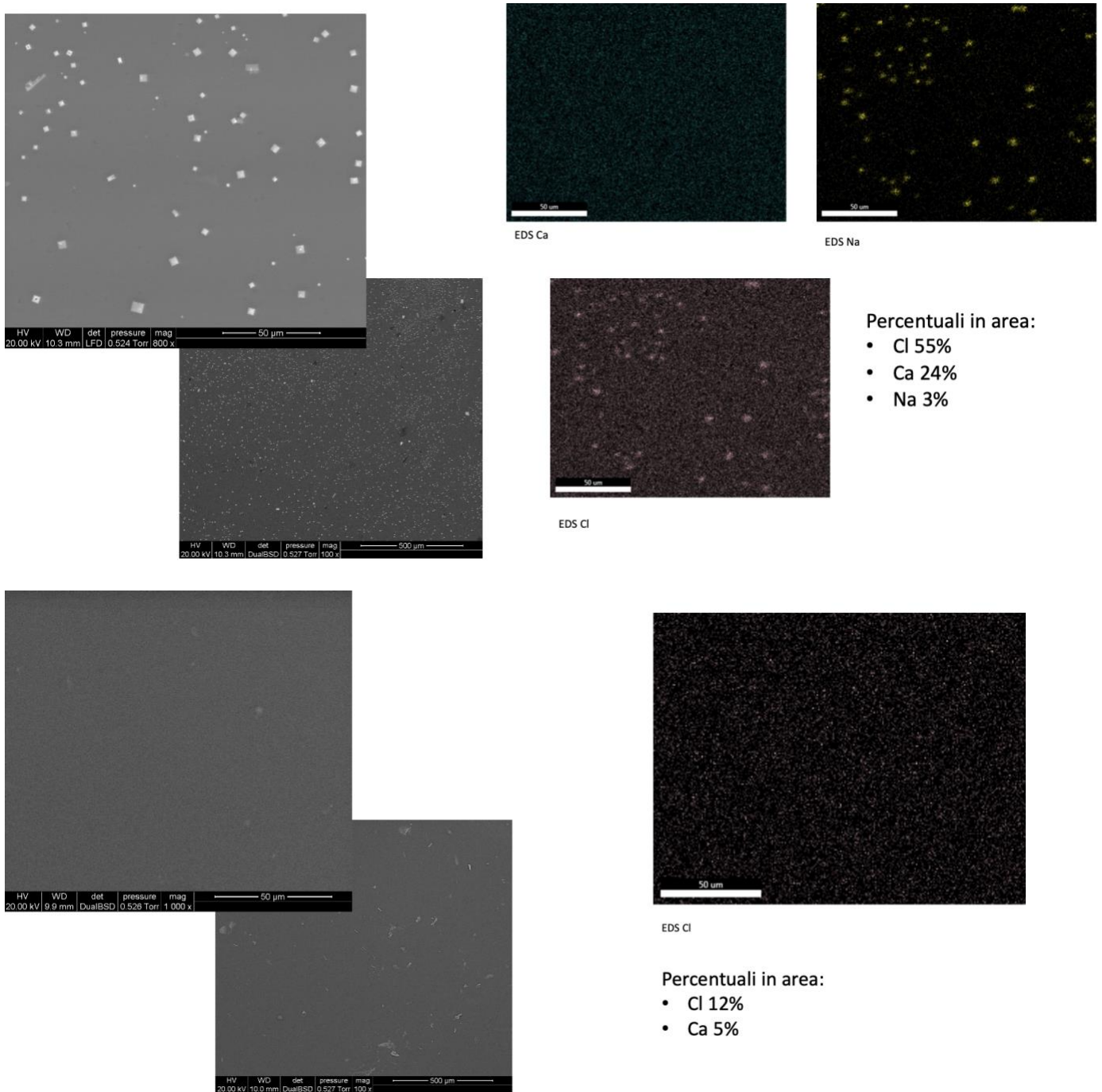
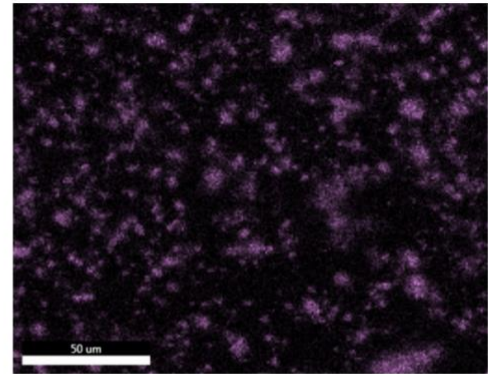
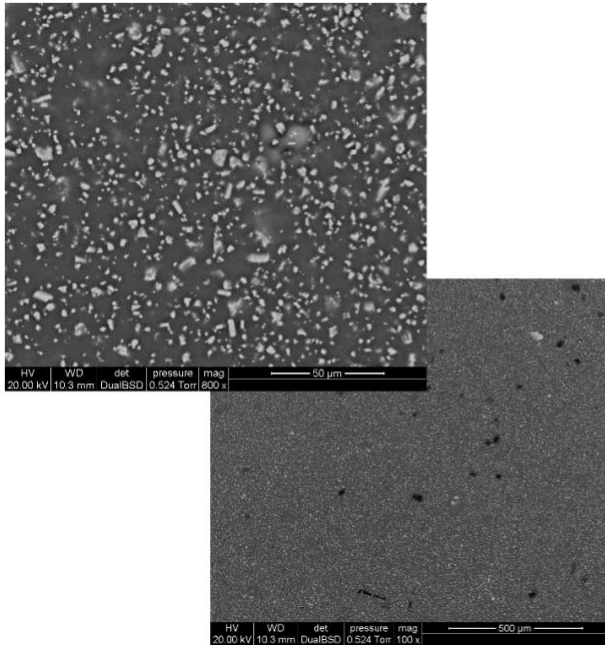


Figura 28. In alto le immagini SEM del campione di fibroina al 15% prima di essere sottoposto a water annealing, sotto le immagini SEM del campione di fibroina al 15% dopo il trattamento.

Nel caso del campione di sola fibroina al 15% prima del trattamento si possono notare dei piccoli cristalli. L'ipotesi più probabile, considerando anche le mappe EDS dei vari elementi principali presenti, è che si tratti di cristalli di NaCl. Tracce di sodio infatti potrebbero essere rimaste dalla procedura di degumming dovute ad un risciacquo non ottimale delle fibre, mentre il cloro è presente a causa del cloruro di calcio usato per la soluzione con acido formico. Dopo il trattamento

in acqua le percentuali di ioni derivanti dai sali diminuiscono drasticamente, passando dal 55% per il cloro al 12%, mentre il calcio passa dal 24% al 5%, mentre il sodio scompare.

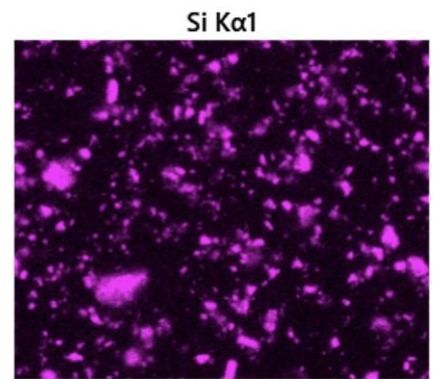
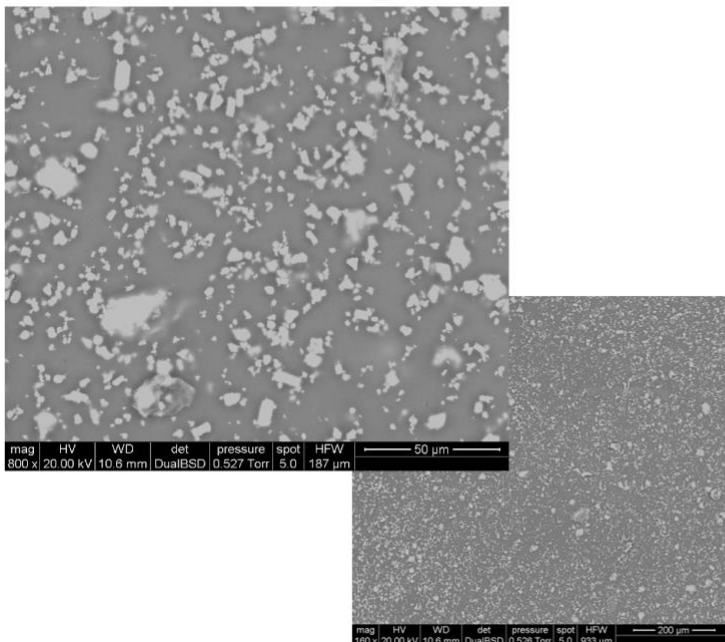
- **Seta + 1% nitrato pre e post-trattamento:**



EDS Si

Percentuali in area:

- Si 32%
- Cl 35%
- Ca 17%



EDS Si

Percentuali in peso:

- Si 3.2%
- Cl 0.8%
- Ca 0.4%

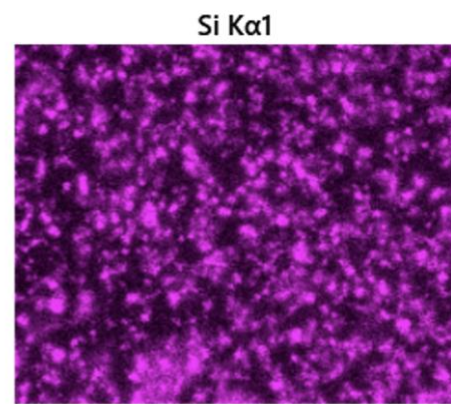
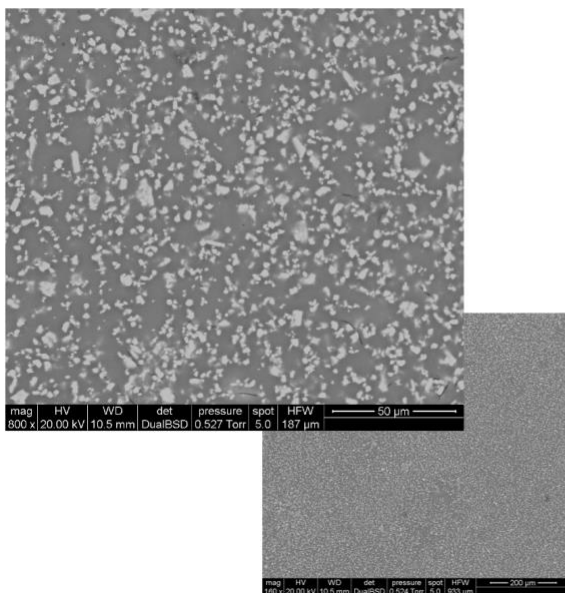
Figura 29. In alto le immagini SEM del campione di fibroina al 15% con 1% di nitrato prima di essere sottoposto a water annealing, sotto le immagini SEM del campione dopo il trattamento.

In questo caso il campione presenta l'1% di nitrato. Come si può notare dagli ingrandimenti delle immagini SEM il problema più grande per il materiale ceramico è l'uniformità della dispersione. In

questo caso c'è stato un problema nell'acquisizione iniziale dell'immagine del campione post-trattamento che è stata ripetuta dopo una manutenzione al SEM ed è stato cambiato l'EDAX. Le percentuali degli elementi nel caso del campione dopo il trattamento sono quindi in peso e non più in area. Questo problema è avvenuto anche per altri due campioni, in quanto le facce del campione sono diverse e danno immagini e informazioni diverse. Dal lato dell'altra faccia infatti non viene rilevato il nitruro, o viene rilevato molto poco, e il segnale degli altri elementi come il cloro e il calcio risulta quindi amplificato e prevalente.

Tuttavia tra le due immagini è possibile notare che il trattamento in acqua non influisce sul Si_3N_4 . La percentuale in peso del 3% di silicio è di poco superiore a quella teorica, questo potrebbe essere dovuto alla zona considerata (maggior agglomerazione) o ad una non perfetta stima strumentale.

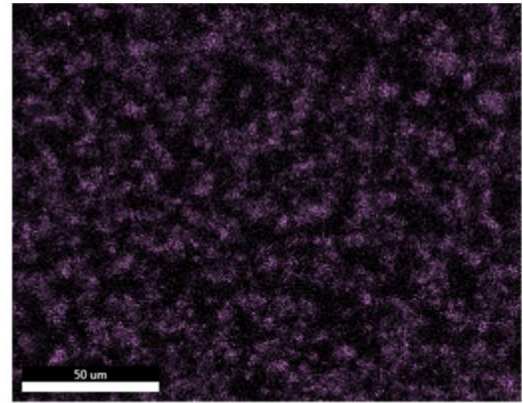
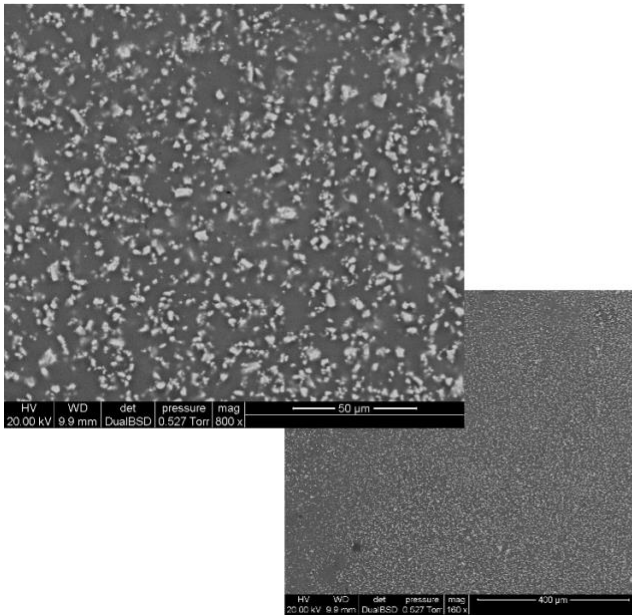
- **Seta + 5% nitruro pre e post-trattamento:**



EDS Si

Percentuali in peso:

- Si 9%
- Cl 5.6%
- Ca 3%



EDS Si

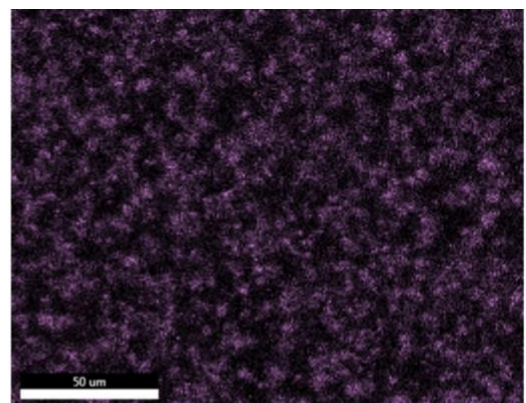
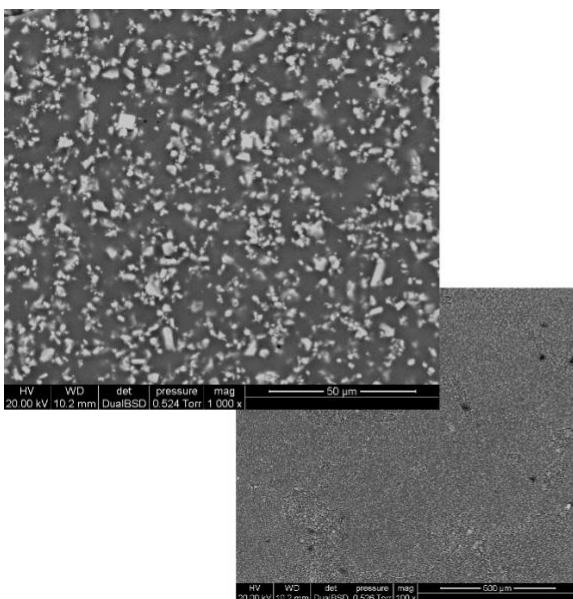
Percentuali in area:

- Si 45%
- Cl 26%
- Ca 13%

Figura 30. In alto le immagini SEM del campione di fibroina al 15% con 5% di nitruro prima di essere sottoposto a water annealing, sotto le immagini SEM del campione dopo il trattamento.

Anche in questo caso c'è stato un problema nell'acquisizione della prima immagine quindi non è possibile confrontare le percentuali degli elementi tra di loro. È possibile però confrontare le percentuali in peso per questo campione con quello precedente dopo il trattamento. La percentuale di nitruro maggiore è dovuto all'incremento della quantità usata, mentre le percentuali degli ioni salini confermano come il trattamento in acqua sia utile al fine di rimuoverli.

● **Seta + 10% nitruro pre e post-trattamento:**



EDS Si

Percentuali in area:

- Si 50%
- Cl 24%
- Ca 11%

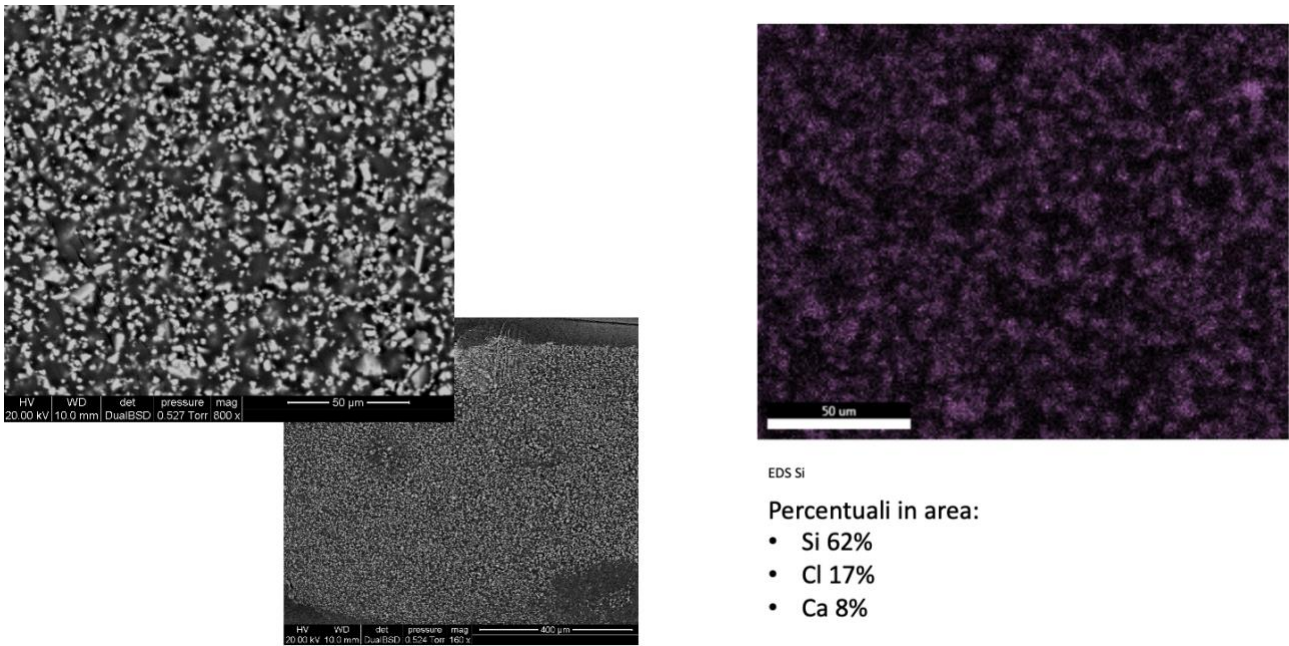
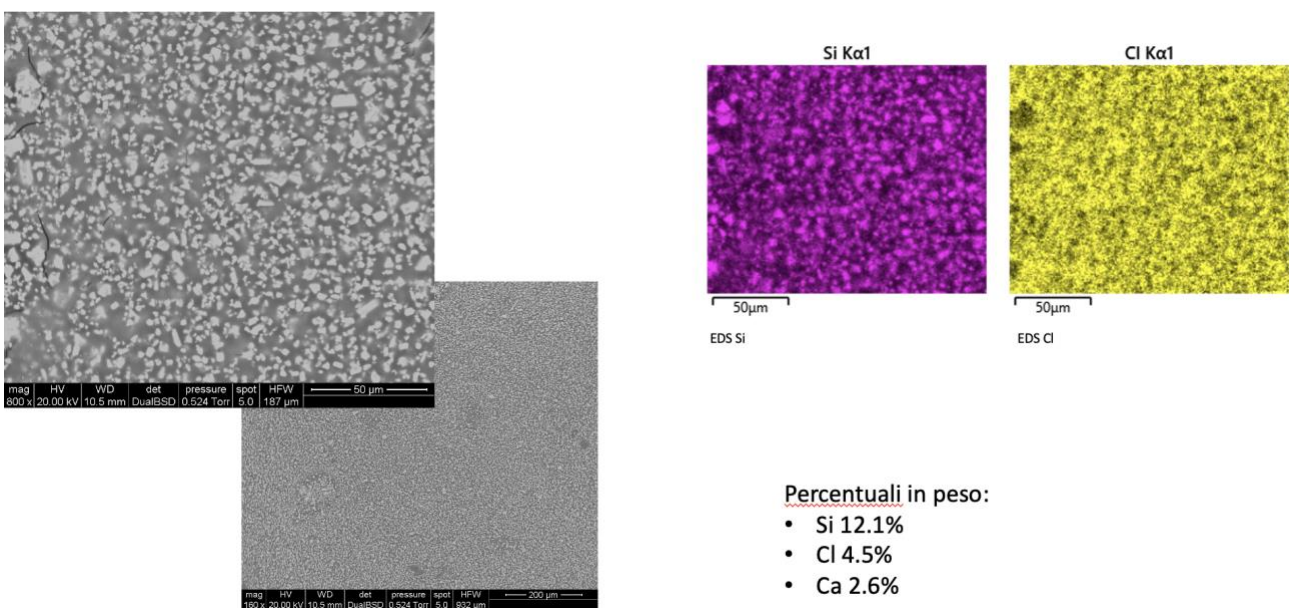


Figura 31. In alto le immagini SEM del campione di fibroina al 15% con 10% di nitrato prima di essere sottoposto a water annealing, sotto le immagini SEM del campione dopo il trattamento.

Anche in questo caso il trattamento in acqua è risultato utile al fine di rimuovere gli ioni salini, che passano dal 24 al 17% per il cloro e dall'11 all'8% per il calcio. Si può notare inoltre come aumentando la percentuale di nitrato migliori leggermente anche l'omogeneità del campione rispetto ai campioni precedenti, nonostante la tendenza delle particelle a clusterizzare.

● **Seta + 15% nitrato pre e post-trattamento:**



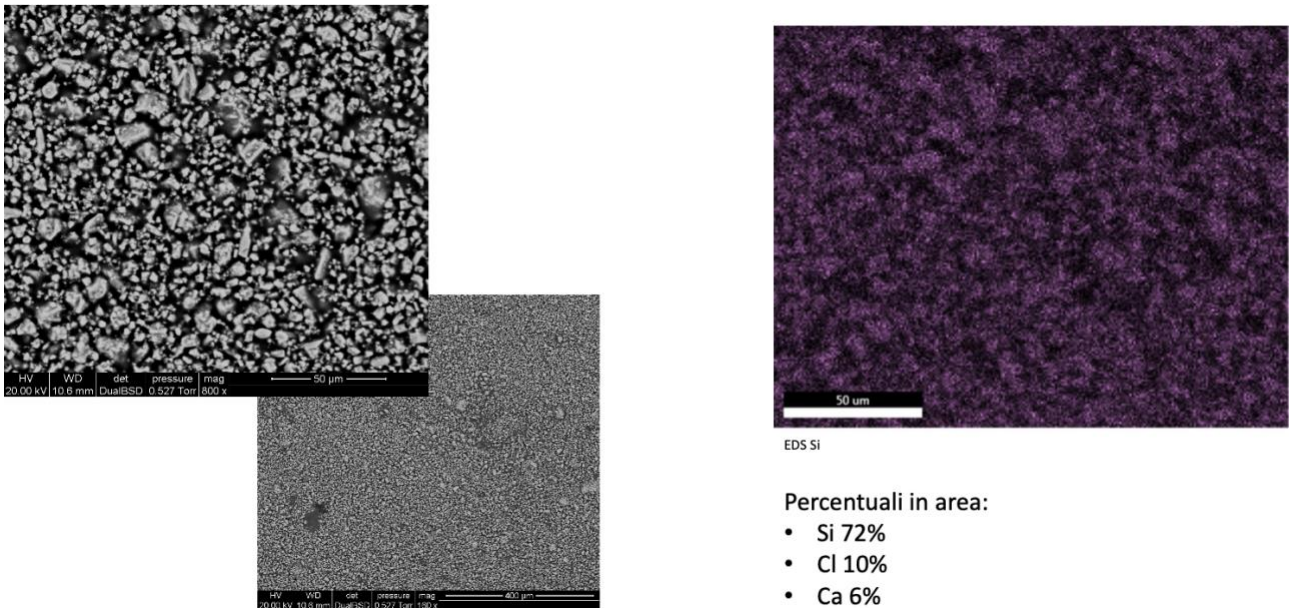


Figura 32. In alto le immagini SEM del campione di fibroina al 15% con 15% di nitrato prima di essere sottoposto a water annealing, sotto le immagini SEM del campione dopo il trattamento.

Da questa figura è possibile fare un confronto tra il campione al 15% di nitrato prima del trattamento e quello al 1% dopo il trattamento. Le percentuali degli ioni salini in peso infatti vengono ridotte drasticamente, sotto l'1% a seguito dell'esposizione del campione in acqua per 1 h. Dall'ingrandimento dell'immagine SEM invece è visibile la clusterizzazione delle particelle rispetto ai campioni precedenti. Oltre alla calcinazione (effettuata nel caso di soluzione acquosa) però non sono stati trovati altri metodi per favorire la dispersione delle particelle in soluzione, nonostante nella soluzione acida questa proprietà migliori anche solo attraverso l'utilizzo del bagno sonico e del mixer. Una possibile soluzione potrebbe essere quella di utilizzare nano-particelle, mentre le particelle commerciali usate nel corso di questa esperienza risultano molto grandi in partenza, con una dimensione dichiarata di circa 10 µm.

4.1.5 XRD

Sulle polveri di nitrato di silicio è stata fatta una caratterizzazione XRD sulle polveri, per verificare la fase β come dichiarato nell'etichetta del prodotto, in quanto è la fase che presenta le migliori proprietà antibatteriche.

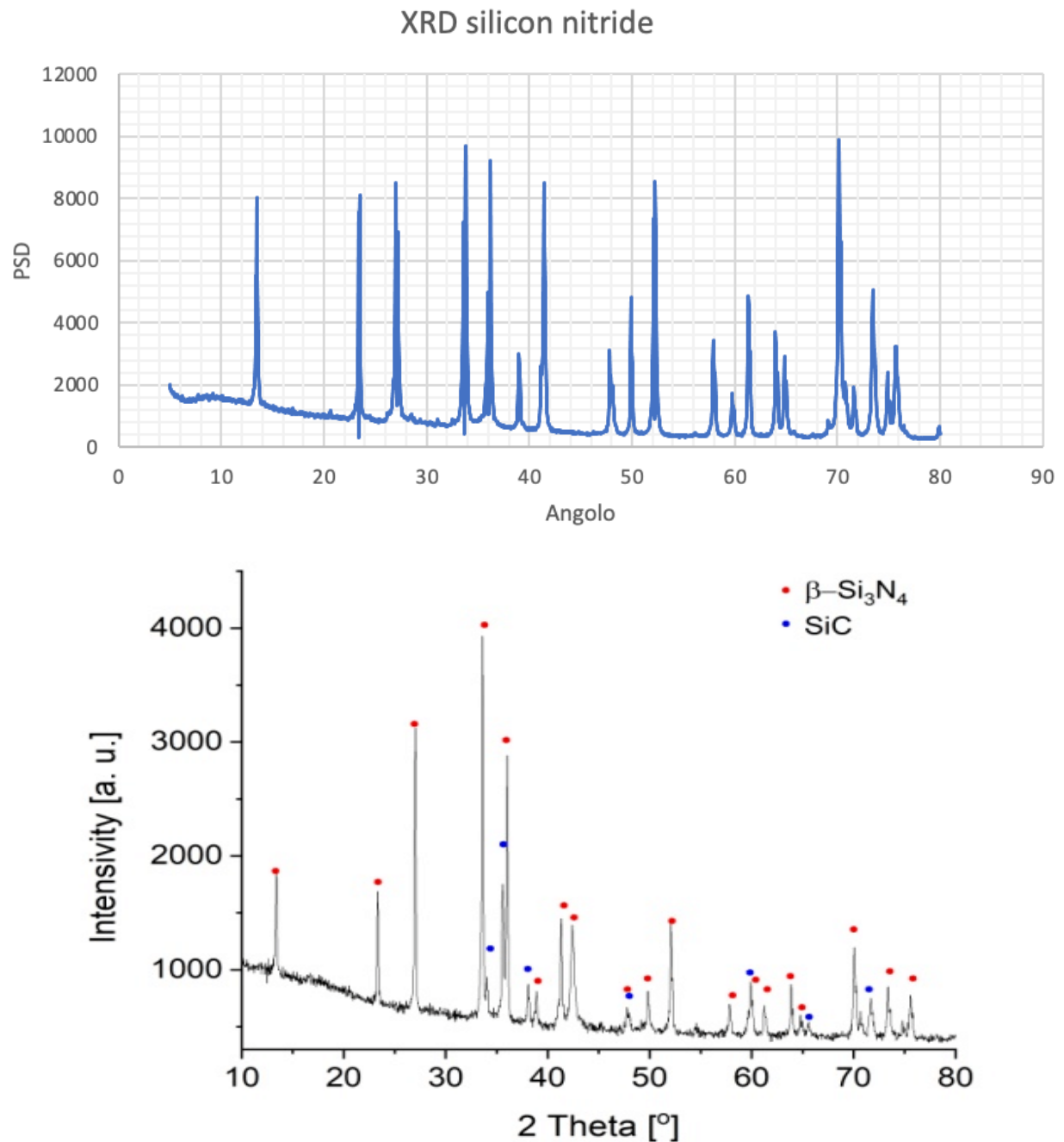


Figura 33. Sopra lo spettro sperimentale, mentre sotto quello trovato in letteratura⁽²²⁾.

Come si può notare dalla Figura 33 si ha una perfetta corrispondenza tra i picchi sperimentali e riportati in letteratura. Questo ha confermato la presenza della fase β nella polvere di nitruro di silicio.

4.1.6 Self-healing

Una proprietà sperimentata in modo qualitativo inoltre è quella del self-healing. È stata verificata prendendo due pezzi di campione, sia per una membrana composta da sola fibroina sia per una membrana composta con 10% di nitruro, entrambi asciutti. Questi sono stati posti per 24 h in un

ambiente con umidità relativa del 90%, al termine delle quali i pezzi erano tornati sottoforma di gel e avevano mostrato una tendenza a fondersi.

Successivamente sono stati posti per altre 24 h ad umidità relativa bassa, del 23-30% circa. Come risultato si è ottenuto un pezzo unico rigido e stabile formato a partire dai due pezzi iniziali.



Figura 34. A sinistra il campione contenente solo fibroina, a destra il campione di membrana contenente il 10% di nitruro.

4.2 Fabbricazione pellet

I campioni risultanti a base di sola fibroina sono risultati trasparenti nelle zone sinterizzate e non fragili, al contrario di quelli con nitruro che risultano essere più disomogenei (soprattutto quello al 5%), fragili e in cui i pezzi tendono a non rimanere attaccati tra di loro. Il grado di trasparenza è migliorato con le prove; tuttavia, soprattutto nelle prove del ciclo 3 (quindi quelli con più umidità assorbita) sono visibili a occhio nudo i singoli grani di materiale. Il campione che sembra avere il migliore compromesso tra trasparenza e grado di sinterizzazione/omogeneità è il campione S2-B.

4.2.1 Misure densità

Una delle caratterizzazioni svolte per i pellet è stata il calcolo della densità geometrica, sulla base del diametro, peso e spessore dei vari campioni.

Campione	Peso (g)	Spessore (mm)	Diametro (cm)	Densità (g/cm ³)
S1-A	0,426	1,25	2,4	0,75
S1-B	0,204	0,45	2,4	1,00
S2-A	0,214	0,36	2,4	1,31
S2-B	0,217	0,37	2,4	1,29
S3-A	0,198	0,44	2,4	0,99
S3-D	0,225	0,47	2,4	1,06

Tabella 9. Misurazione densità pellet.

Questi campioni sono costituiti da sola seta. La varietà di valori relativi alla densità probabilmente dipende dal grado di porosità dei campioni, imputabile quindi alla variazione dei parametri sperimentali. Questi valori dovranno essere valutati in modo migliore tramite tecniche di analisi della densità come il picnometro.

4.2.2 FTIR

Anche sui pellet S1-A, S1-B, S2-A ed S2-B è stato svolto lo spettro FTIR per verificare il tipo di struttura. Questi contengono solo fibroina, e tra i campioni del primo ciclo l'unica differenza è la concentrazione di fibroina; per i campioni del secondo ciclo variano la temperatura in fase di compressione, e tempo e pressione sia nella fase di pre-compressione che in quella di compressione.

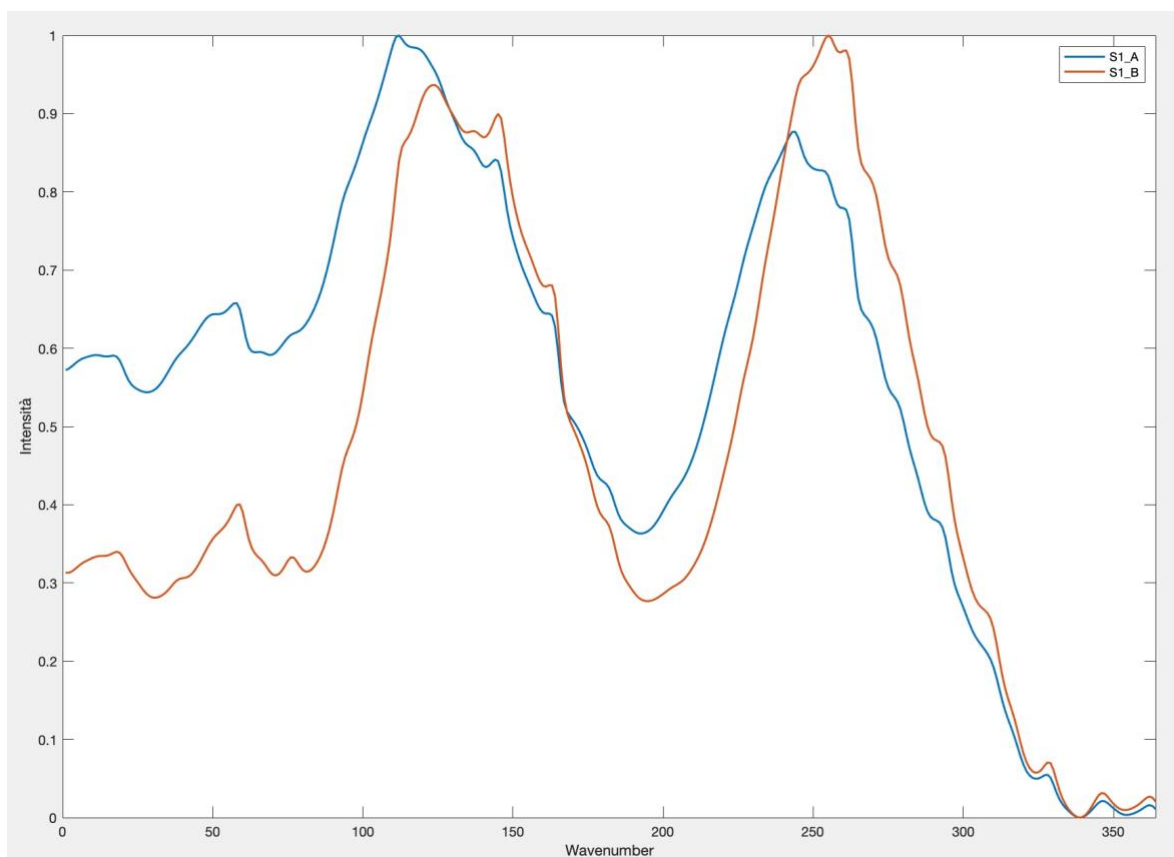


Figura 35. Spettri FTIR dei campioni S1-A e S1-B.

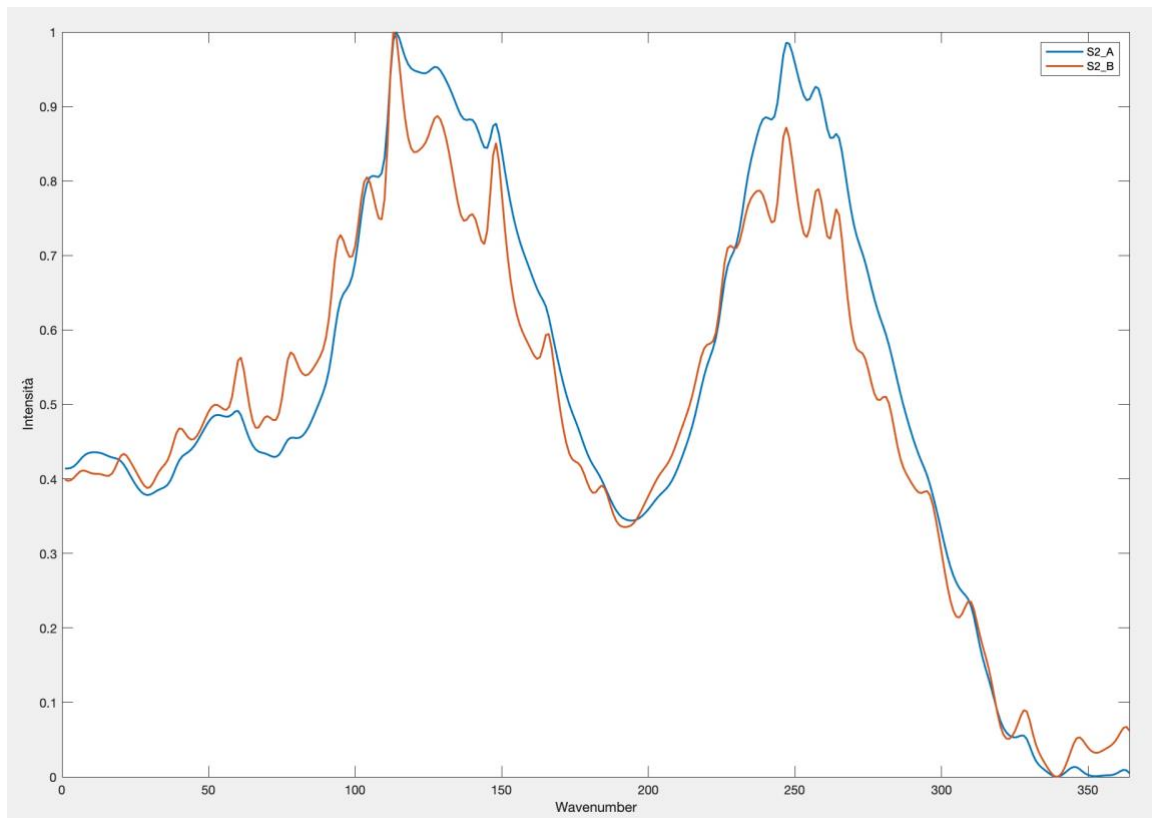


Figura 36. Spettri FTIR dei campioni S2-A e S2-B.

I picchi in figura 35 sono rispettivamente situati a 1507 e 1634 cm^{-1} per il campione S1-A, mentre si trovano a 1518 e 1644 cm^{-1} per il campione S1-B. La differenza tra questi campioni è la percentuale di fibroina (nel primo caso all'8%, nel secondo caso al 4%); si può affermare che anche per materiali ottenuti partendo dallo stato solido, oltre che per le membrane, la variazione nella concentrazione di fibroina usata influisce poco sul tipo di struttura secondaria. Con questo processo si sono ottenuti dei pellet con struttura secondaria di tipo β -sheet (o almeno sicuramente più cristallini rispetto alle membrane), osservabile soprattutto dal picco dell'amide II situato in entrambi i casi poco sopra i 1500 cm^{-1} .

In figura 36 invece i picchi sono situati a 1509 e 1637 cm^{-1} nel caso del campione S2-A, mentre nel caso del campione S2-B si trovano a numeri d'onda di 1508 e 1637 cm^{-1} . La differenza in questo caso è data dalla variazione dei parametri sperimentali usati nella compressione del materiale, ed in particolare la temperatura in compressione (passa da 40°C a 60°C), la durata e la pressione per entrambe le fasi di pre-compressione e compressione. Questa differenza sembra non influire sul tipo di microstruttura della fibroina. È da verificare con spettri analoghi se differenze più drastiche rispetto a queste analizzate possano influire o meno sulla struttura del materiale.

4.2.3 Trasmittanza

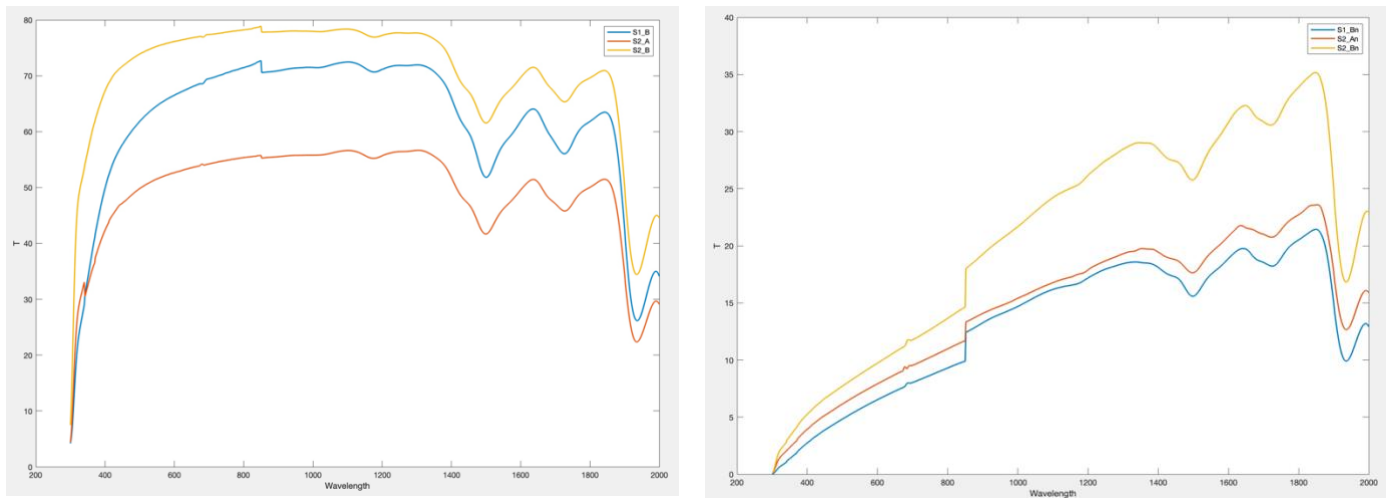


Figura 37. Spettro UV-Vis per misurare la trasmittanza a sinistra, e la trasmittanza normalizzata a destra, dei campioni S1-B, S2-A e S2-B.

La caratterizzazione sulla trasmittanza è stata realizzata con lo scopo di ottenere un'informazione qualitativa sul grado di sinterizzazione dei campioni. In letteratura⁽³⁾ è stato riportato che per film di fibroina di seta in acido formico, la trasmittanza è circa del 90% fino ai 350 nm, dopodiché si verifica assorbimento nell'UV e la curva decresce fino ad arrivare allo 0% di trasmittanza a 300 nm. Nel caso dei campioni investigati invece si può notare come il campione S2-B sia quello che presenta un grado di trasmittanza più elevato e quindi una migliore omogeneità, visibile anche a occhio dalle immagini precedenti. Tuttavia la percentuale di trasmittanza è ancora bassa rispetto a quella ottenibile (probabilmente non 90% come nel caso dei film perché i campioni sono più spessi) a causa della diffusione della luce dovuta al grado di disomogeneità della superficie e ad una sinterizzazione non completa, visibile in più punti in tutti i campioni. Le condizioni del campione S2-B risultano quindi quelle migliori ottenute finora. Un eventuale determinazione del grado di sinterizzazione potrà essere effettuata con il SEM.

Capitolo 5

CONCLUSIONI E SVILUPPI FUTURI

Lo scopo del lavoro svolto in laboratorio e presentato in questi capitoli è l'ottimizzazione della sintesi per ottenere dei materiali compositi a base di fibroina di seta e nitruro di silicio per possibili applicazioni biomediche, in particolare per ingegneria tissutale o rigenerazione ossea. Si è investigata la possibilità di ottenere questo tipo di materiale sia in forma di membrana partendo dallo stato liquido, e quindi dalla soluzione di acido formico e cloruro di calcio in un caso e dalla soluzione acquosa di bromuro di litio nell'altro caso, sia in forma di pellet partendo dalla soluzione acquosa di bromuro di litio per ottenere un materiale allo stato solido.

La membrana composita nel caso della soluzione acquosa è stata realizzata tramite una soluzione acquosa di LiBr 9.3 M in cui è stata dissolta la fibroina (a 60°C per 4 h). Successivamente la soluzione è stata posta in dialisi per 72 h con lo scopo di rimuovere gli ioni dei sali, quindi la soluzione è stata centrifugata, il surnatante è stato separato dal deposito ed è stata filtrata ulteriormente per rimuovere le impurezze rimaste. Le combinazioni di concentrazioni provate non hanno dato un risultato stabile o sono risultate troppo problematiche per la dispersione omogenea del nitruro di silicio.

Nel caso della soluzione acida è stata realizzata partendo da una soluzione di acido formico (2 mL) e cloruro di calcio (4% w/w) a cui sono state aggiunte diverse concentrazioni di nitruro di silicio Si_3N_4 e al 15% w/v di fibroina.

Le polveri di nitruro sono state caratterizzate mediante XRD per controllare la presenza effettiva della fase β che è la fase responsabile dell'attività anti-batterica, e che è stata verificata per confronto con letteratura.

Una volta ottenute delle membrane stabili e con proprietà di flessione in base all'umidità relativa a cui erano esposte, sono stati provati diversi metodi post-evaporazione per indurre la cristallizzazione del materiale. Dagli spettri FTIR realizzati si è concluso che il vapour annealing ed il water rinsing non sono stati efficaci, il water annealing ha funzionato parzialmente (con lo spostamento di un solo picco della zona amidica), mentre il trattamento in metanolo ha funzionato fin troppo bene, inducendo una cristallizzazione tale da rendere impossibile l'applicazione del materiale per qualsiasi scopo data la fragilità.

La caratterizzazione al SEM tramite immagini e mappe EDS ha confermato l'utilità del trattamento di water annealing, utile anche per rimuovere gli ioni salini rimasti nel materiale dai vari passaggi di sintesi.

Possibili sviluppi futuri potrebbero implicare il miglioramento dei trattamenti post-evaporazione, magari con altri alcoli al posto del metanolo o con altri metodi, l'utilizzo di polvere di Si_3N_4 più fine. Per la realizzazione dei pellet invece, si è partiti da una soluzione acquosa di fibroina, che è stata congelata, e sottoposta a liofilizzazione per 3 giorni a -53°C e 0,2 mbar. Prima della fase di pressatura si è cercato di ridurre manualmente il più possibile le dimensioni dei pezzi di fibroina liofilizzata.

Per la fase di compressione si è sfruttato il meccanismo di sinterizzazione a bassa temperatura, che consiste nell'abbassare la temperatura di transizione vetrosa del materiale utilizzando acqua (in questo caso dall'umidità) come plasticizzante per poter utilizzare temperature di sinterizzazione più basse, abbinate a una pressione dell'ordine dei 300 MPa circa.

I campioni sono stati quindi esposti a diverse umidità per periodi più o meno prolungati per far sì che assorbissero parte dell'umidità e aumentassero la massa. Sono state provate anche in questo caso diversi parametri come la temperatura, la rampa di compressione e la durata. Tuttavia questo aspetto è stato sviluppato nella fase finale del lavoro in attesa dei risultati delle prove anti-batteriche delle membrane, quindi il processo non è ottimizzato.

In particolare, in ottica futura, si può continuare a investigare l'effetto dei vari parametri appena citati sui campioni, migliorare la macinazione della seta liofilizzata e la dispersione del nitrato. Inoltre altre possibili caratterizzazioni che potrebbero essere svolte sono la cross-section, la DSC/TGA, dei test meccanici per valutare il grado di flessione del materiale, e se può sviluppare capacità anti-batteriche tramite test batteriologici.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Huang W., Ling S., Li C., Omenetto F.G., Kaplan D.L., Silkworm silk-based materials and devices generated using bio-nanotechnology, *Chem. Soc. Rev.*, 2018, 47, 6486
- 2) Cao T.T., Zhang Y.Q., processing and characterization of silk sericin from *Bombyx mori* and its applications in biomaterials and biomedicines, *Materials Science and Engineering C*, 61, 2016, 940-952
- 3) Bucciarelli A., Chiera S., Quaranta A., Yadavalli V.K., Motta A., Maniglio D., A Thermal-Reflow-Based Low-Temperature, High-Pressure Sintering of Lyophilized Silk Fibroin for the Fast Fabrication of Biosubstrates, *Adv. Funct. Mater.* 2019, 29, 1901134
- 4) De Luca G., Treossi E., Liscio A., Mativetsky J.M., Scolaro L.M., Palermo V., Samorì P., Solvent vapour annealing of organic thin films: controlling the self-assembly of functional systems across multiple length scales, *J. Mater. Chem.*, 2010, 20, 2493–2498
- 5) Ming J., Liu Z., Bie S., Zhang F., Zuo B., Novel silk fibroin films prepared by formic acid/hydroxyapatite dissolution method, *Materials Science and Engineering C* 37 (2014) 48–53
- 6) Zhang F., You X., Dou H., Liu Z., Zuo B., Zhang X., Facile fabrication of robust silk nanofibril films via direct dissolution of silk in CaCl₂-formic acid solution, *ACS Appl. Mater. Interfaces* 2015, 7, 3352-3361
- 7) Hu X., Shmelev K., Sun L., Gil E.S., Park S.H., Cebe P., Kaplan D.L., Regulation of silk material structure by temperature-controlled water vapor annealing, *Biomacromolecules* 2011, 12, 1686–1696
- 8) Wang Y., Huang W., Wang Y., Mu X., Ling S., Yu H., Chen W., Guo C., Watson M.C., Yu Y., Black L.D., Li M., Omenetto F.G., Li C., Kaplan D.L., Stimuli-responsive composite biopolymer actuators with selective spatial deformation behavior, *PNAS*, June 23 2020, Vol. 117, N°25, 14602-14608
- 9) Mathieu L.M., Bourban P.E., Manson J.A.E., Processing of homogeneous ceramic/polymer blends for bioresorbable composites, *Composites Science and Technology* 66 (2006) 1606–1614
- 10) Bie S., Ming J., Zhou Y., Zhong T., Zhang F., Zuo B., Rapid formation of flexible silk fibroin gel-like films, *J. Appl. Polym. Sci.* 2015
- 11) Moisenovich M.M., Arkhipova A. Yu., Orlova A.A., Drutskaya M. S., Volkova S. V., Zacharov S. E., Agapov I. I., Kirpichnikov M. P., Composite Scaffolds Containing Silk Fibroin, Gelatin, and Hydroxyapatite for Bone Tissue Regeneration and 3D Cell Culturing, *Acta Naturae*, Vol.6 N°1 (20), 2014, 96-101
- 12) Ni Z., Yang X., Yang X., He Q., Xu X., Xie H., Surface modification of ultrafine silicon nitride powders by calcination, *Int J Appl Ceram Technol.* 2019;16:1364–1372
- 13) Bal B.S., Rahaman M.N., Orthopedic applications of silicon nitride ceramics, *Acta Biomaterialia* 8 (2012) 2889–2898
- 14) Jacob J., Haponiuk J.T., Thomas S., Gopi S., Biopolymer based nanomaterials in drug delivery systems: A review, *Materials Today Chemistry* 9 (2018) 43-55
- 15) Farokhi M., Mottaghitalab F., Samani S., Shokrgozar M.A., Kundu S.C., Reis R.L., Fatahi Y., Kaplan D.L., Silk fibroin/hydroxyapatite composites for bone tissue engineering, *Biotechnology Advances* 36 (2018) 68–91
- 16) Rockwood D., Preda R., Yücel T., Wang X., Lovett M., Kaplan D.L., Materials fabrication from *Bombyx mori* silk fibroin, *Nature* (2011), 6, 1612-1631

- 17) Xue Y., Wang F., Torculas M., Lofland S., Hu X., Formic acid regenerated Mori, Tussah, Eri, Thai and Muga silk materials: mechanism of self-assembly, *ACS Biomater. Sci. Eng.* 2019, 5, 6361–6373
- 18) Liu Q., Wang F., Gu Z., Ma Q., Hu X., Exploring the structural transformation mechanism of Chinese and Thailand silk fibroin fibers and formic-acid fabricated silk films, *Int. J. Mol. Sci.* 2018, 19, 3309
- 19) Vu H.V., Li C., Guo C., Hanna P., Lechtig A., Qiu Y., Mu X., Ling S., Nazarian A., Lin S.J., Kaplan D.L., Thermoplastic moulding of regenerated silk, *Nature Materials*, Vol 19, January 2020, 102–108
- 20) Rnjak-Kovacina J., Wray L.S., Burke K.A., Torregrossa T., Golinski J.M., Huang W., Kaplan D.L., Lyophilized Silk Sponges: A Versatile Biomaterial Platform for Soft Tissue Engineering, *ACS Biomater. Sci. Eng.* 2015, 1, 260–270
- 21) Kopp A., Schunck L., Gosau M., Smeets R., Burg S., Fuest S., Kroger N., Zinser M., Krohn S., Behbahani M., Kopf M., Lauts L., Rutkowski R., Influence of the casting concentration on the Mechanical and Optical Properties of FA/CaCl₂-Derived Silk Fibroin Membranes
- 22) Dubiel A., Grabowski G., Goly M., Skrzypek S., The Influence of Thermal Residual Stresses on Mechanical Properties of Silicon Nitride-Based Composites, *Materials* 2020, 13, 1092
- 23) Lujerdean C., Baci G.-M., Cucu A.-A., Dezmirean D.S., The Contribution of Silk Fibroin in Biomedical Engineering, *Insects* 2022, 13, 286
- 24) Wang Q., Yan S., Han G., Li X., You R., Zhang Q., Li M., Kaplan D.L., Facile production of silk nanofibers for electronic device applications, *Composites Science and Technology* 187 (2020) 107950
- 25) Gulrajani M.L., Degumming of silk, *Rev. Prog. Coloration* Volume 22, 1992
- 26) Kalia S., Kaith B.S., Kaur I., Pretreatments of natural fibers and their application as reinforcing material in polymer composites-a review, *Polymer Engineering and Science* 2009
- 27) Wang M., Jin H., Kaplan D.L., Rutledge G.C., Mechanical properties of electrospun silk fibers, *Macromolecules* 2004, 37, 6856-6864
- 28) Yang Y., Chen X., Ding F., Zhang P., Liu J., Gu X., Biocompatibility evaluation of silk fibroin with peripheral nerve tissues and cells in vitro, *Biomaterials* 28, (2007), 1643-1652
- 29) Seo J.W., Kim H., Kim K., Choi S.Q., Lee H.J., Calcium-modified silk as a biocompatible and strong adhesive for epidermal electronics, *Adv. Funct. Mater.* 2018, 1800802
- 30) Wang F., Yu H.Y., Gu Z.G., Si L., Liu Q.C., Hu X., Impact of calcium chloride concentration on structure and thermal property of Thai silk fibroin films, *J Therm Anal Calorim* (2017) 130:851–859
- 31) Ajisawa A., Dissolution of silk fibroin with calcium chloride/ethanol aqueous solution *J. Seric. Sci. Jpn.* Vol.67 N°.2, 91-94, 1998
- 32) Dos Santos F.V., Yoshioka S.A., Branciforti M.C., Large-area thin films of silk fibroin prepared by two methods with formic acid as solvent and glycerol as plasticizer, *J Appl Polym Sci.* 2021;138:e50759
- 33) Zhu H., Wu B., Feng X., Chen J., Preparation and characterization of bioactive mesoporous calcium silicate–silk fibroin composite films, *Journal of Biomedical Materials Research B: Applied Biomaterials* | Aug 2011 vol 98b, issue 2
- 34) Xue Y., Lofland S., Hu X., Protein-based flexible thermal conductive materials with continuous network structure: Fabrication, properties, and theoretical modeling, *Composites Part B* 201 (2020) 108377

- 35) Precnerová M., Bodišová K., Frajkorová F., Galusková D., Nováková Z.V., Vojštaššák J., Lenčěš Z., Šajgalík P., In vitro bioactivity of silicon nitride–hydroxyapatite composites, *Ceramics International* 41 (2015) 8100–8108
- 36) Wang L., Nemoto R., Senna M., Effects of alkali pretreatment of silk fibroin on microstructure and properties of hydroxyapatite-silk fibroin nanocomposite, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 15 (2004) 261-265
- 37) Zhu H., Shen J., Feng X., Zhang H., Guo Y., Chen J., Fabrication and characterization of bioactive silk fibroin/wollastonite composite scaffolds, *Materials Science and Engineering C* 30 (2010) 132–140
- 38) Gogotsi Y.G., Review-Particulate silicon nitride-based composites, *Journal of Materials Science* 29 (1994) 2541-2556
- 39) Kapoor S., Kundu S.C., Silk protein-based hydrogels: Promising advanced materials for biomedical applications, *Acta Biomaterialia* 31 (2016) 17–32
- 40) Pezzotti G., Marin E., Adachi T., Lerussi F., Rondinella A., Boschetto F., Zhu W., Kitajima T., Inada K., McEntire B.J., Bock R.M., Bal B.S., Mazda O., Incorporating Si₃N₄ into PEEK to Produce Antibacterial, Osteoconductive, and Radiolucent Spinal Implants, *Macromol. Biosci.* 2018, 18, 1800033
- 41) Qi G., Zhang C., Hu H., Effects of precoating and calcination on microstructure of 3D silica fiber reinforced silicon nitride based composites, *Trans. Nonferrous Met. Soc. China* 16(2006) 824-827
- 42) Rahaman M., Xiao W., Silicon nitride bioceramics in healthcare, *Int J Appl Ceram Technol.* 2018;15:861–872
- 43) Heimann R.B., Silicon Nitride, a Close to Ideal Ceramic Material for Medical Application, *Ceramics* 2021, 4, 208-223
- 44) Hnatko M., Hičák M., Labudová M., Galusková D., Sedláček J., Lenčěš Z., Šajgalík P., Bioactive silicon nitride by surface thermal treatment, *Journal of the European Ceramic Society* 40 (2020) 1848–1858
- 45) Bock R.M., Jones E.N., Ray D.A., Bal B.S., Pezzotti G., McEntire B.J., Bacteriostatic behavior of surface modulated silicon nitride in comparison to polyetheretherketone and titanium, *Journal Of Biomedical Materials Research A* | May 2017 Vol 105a, Issue 5
- 46) Goswami C., Bhat I.K., Patnaik A., Singh T., Fekete G., Fabrication of Ceramic Hip Implant Composites: Influence of Silicon Nitride on Physical, Mechanical and Wear Properties, *Silicon* (2020) 12:1237–1245
- 47) Kusunose T., Sekino T., Choa Y.H., Niihara K., Machinability of Silicon Nitride/Boron Nitride Nanocomposites, *J. Am. Ceram. Soc.*, 85 (11) 2689-95 (2002)
- 48) Zanooco M., Boschetto F., Zhu W., Marin E., McEntire B.J., Bal B.S., Adachi T., Yamamoto T., Kanamura N., Ohgitani E., Yamamoto K., Mazda O., Pezzotti G., 3D-additive deposition of an antibacterial and osteogenic silicon nitride coating on orthopaedic titanium substrate, *Journal Of The Mechanical Behavior Of Biomedical Materials* 103 (2020) 103557
- 49) Pezzotti G., Silicon Nitride: A Bioceramic with a Gift, *ACS Appl. Mater. Interfaces* 2019, 11, 26619–26636
- 50) Park D.C., Yano T., Effect of Nitrate Salts as Sintering Additives during the Ball-Milling Process of Silicon Nitride Powders, *J. Am. Ceram. Soc.*, 83 (12) 2967-73 (2000)
- 51) Taddei P., Monti P., Vibrational Infrared Conformational Studies of Model Peptides Representing the Semicrystalline Domains of Bombyx mori Silk Fibroin, *Biopolymers*, Vol. 78, 249–258 (2005)
- 52) Mo C., Wu P., Chen X., Shao Z., Near-Infrared Characterization on the Secondary Structure of Regenerated Bombyx mori Silk Fibroin, *Applied Spectroscopy*, Volume 60, N° 12, 2006

- 53) Mathur A.B., Tonelli A., Rathke T., Hudson S., The dissolution and characterization of Bombyx mori silk fibroin in calcium nitrate-methanol solution and the regeneration of films, *Inc. Biopoly* 42 : 61-74, 1997
- 54) Sarret M., Muller C., Amell A., Characterization of SiC and Si₃N₄ nanoparticles and their aqueous dispersions, *Journal of Nanoparticle Research* (2007) 9:1073–1080
- 55) Qiu B., Li M., Xu B., Liu P., Chen Q., Xu B., Han Z., Effects of amino groups on dispersibility of silicon nitride powder in aqueous media, *Ceramics International* 45 (2019) 4268–4273
- 56) Zhang J., Ye F., Jiang D., Iwasa M., Dispersion of Si₃N₄ powders in aqueous media, *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* 259 (2005) 117–123
- 57) Servoli E., Maniglio D., Motta A., Predazzer R., Migliaresi C., Surface Properties of Silk Fibroin Films and Their Interaction with Fibroblasts, *Macromol. Biosci.* 2005, 5, 1175-1183
- 58) Jiang C., Wang X., Gunawidjaja R., Lin Y.H., Gupta M.K., Kaplan D.L., Naik R.R., Tsukruk V.V., Mechanical Properties of Robust Ultrathin Silk Fibroin Films, *Adv. Funct. Mater.* 2007, 17, 2229–2237
- 59) Puerta M., Peresin M.S., Restrepo-Osorio A., Effects of Chemical Post-treatments on Structural and Physicochemical Properties of Silk Fibroin Films Obtained From Silk Fibrous Waste, *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, December 2020, Volume 8, Article 523949
- 60) Sinturel C., Vayer M., Morris M., Hillmyer M.A., Solvent Vapor Annealing of Block Polymer Thin Films, *Macromolecules* 2013, 46, 5399–5415
- 61) Grabska-Zielinska S., Sionkowska A., How to Improve Physico-Chemical Properties of Silk Fibroin Materials for Biomedical Applications?—Blending and Cross-Linking of Silk Fibroin—A Review, *Materials* 2021, 14, 1510
- 62) Celino A., Freour S., Jacquemin F., Casari P., The hygroscopic behavior of plant fibers: a review, *Frontiers in Chemistry Polymer Chemistry*, January 2014, Volume 1, Article 43
- 63) Zhao M., Qi Z., Tao X., Newkirk C., Hu X., Lu S., Chemical, Thermal, Time, and Enzymatic Stability of Silk Materials with Silk I Structure, *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22, 4136.
- 64) Guo J., Berbano S.S., Guo H., Baker A.L., Lanagan M.T., Randall C.A., Cold Sintering Process of Composites: Bridging the Processing Temperature Gap of Ceramic and Polymer Materials, *Adv. Funct. Mater.* 2016, 26, 7115–7121
- 65) Weska R.F., Vieira Jr W.C., Nogueira G.M., Beppu M.M., Effect of Freezing Methods on the Properties of Lyophilized Porous Silk Fibroin Membranes, *Materials Research*, Vol. 12, No. 2, 233-237, 2009
- 66) Ming J., Liu Z., Bie S., Zhang F, Zuo B., Novel silk fibroin films prepared by formic acid/hydroxyapatite dissolution method, *Materials Science and Engineering C* 37 (2014) 48–53
- 67) Um I.C., Kweon H.Y., Park Y.H., Hudson S., Structural characteristics and properties of the regenerated silk fibroin prepared from formic acid, *International Journal of Biological Macromolecules* 29 (2001) 91 – 97
- 68) Ghalei S., Handa H., A review on antibacterial silk fibroin-based biomaterials: current state and prospects, *Materials Today Chemistry* 23 (2022) 100673
- 69) Freddi G., Monti P., Nagura M., Gotoh Y., Tsukada M., Structure and Molecular Conformation of Tussah Silk Fibroin Films: Effect of Heat Treatment, *Inc. J Polym Sci B: Polym Phys* 35: 841-847, 1997
- 70) Sacco B.L., de Santana H., Impact of temperature on the stability of silkworm cocoon fibers, *Quim. Nova*, Vol. 42, No. 9, 1014-1019, 2019

- 71) Li M., Wu Z., Zhang C., Lu S., Yan H., Huang D., Ye H., Study on Porous Silk Fibroin Materials Preparation and Characteristics of Spongy Porous Silk Fibroin Materials, *J Appl Polym Sci* 79:2192-2199, 2001
- 72) Hashimoto T., Nakamura Y., Tamada Y., Kurosu H., Kameda T., The influence of thermal treatments on the secondary structure of silk fibroin scaffolds and their interaction with fibroblasts, *PeerJ Materials Science* 2:e8
- 73) Mallamace F., Corsaro C., Mallamace D., Vasi S., Vasi C., Dugo G., The role of water in protein's behaviour: the two dynamical crossovers studied by NMR and FTIR techniques, *Computational and Structural Biotechnology Journal* (2014)

Ringraziamenti

Un primo ringraziamento va al mio relatore, il professore Alessandro Martucci che ha accettato di farmi svolgere questo lavoro di tesi nonostante ci fosse un po' di indecisione sul tipo di strada da intraprendere per questo argomento, ed è sempre stato disponibile. Un altro ringraziamento va alla mia correlatrice, la dottoressa Elena Colusso che pazientemente mi ha seguito ogni giorno per questi 6 mesi di laboratorio, e che ha sempre saputo darmi indicazioni preziose riguardo al prosieguo del lavoro.

Un Grazie di cuore va anche a tutte le persone che mi sono vicine e mi vogliono bene. In primis grazie ai miei genitori e ai miei fratelli, la mia famiglia, che mi ha permesso di svolgere questo percorso e che mi ha sempre sostenuto e motivato, supportandomi in tutti questi anni di studio.

Grazie anche al nonno Vittorino, che mi ha educato ed aiutato crescere da sempre, e grazie anche alle persone che purtroppo non sono riuscite a vedermi raggiungere questo traguardo, in particolare nonna Paola e nonna Giovannina. Se ho raggiunto questo obiettivo è stato anche per Voi.

Un altro Grazie enorme va a Giulia, la mia ragazza da ormai più di 5 anni, che mi ha supportato e sopportato durante tutto il mio percorso universitario, che mi ha spronato nei momenti difficili e che ha sempre creduto in me, ed è stata una "preziosa e paziente consigliera".

Grazie anche agli altri familiari tra cui zii e cugini, e grazie a tutti i miei amici, alla compagnia che si è formata negli ultimi mesi, agli amici di lunga data che conosco dalle superiori, agli amici che lavorano con me in piscina e agli amici conosciuti all'università.

Grazie a Fuji, una presenza che con il suo amore incondizionato, e a volte anche con le montagne di pelo, ha saputo rendere più leggeri questi anni e ha rallegrato ogni giornata con la sua presenza ed il suo musetto simpatico.

Infine un ultimo ringraziamento va a me, per essere riuscito a portare a termine questo corso di studi nel tempo prestabilito, per non avere mai mollato, per la caparbia e l'impegno messi nonostante l'impegno di un lavoro part-time.