

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA INDUSTRIALE

**TESI DI LAUREA MAGISTRALE IN
INGEGNERIA DEI MATERIALI**

Nanocompositi a base di seta

Relatore: Prof Alessandro Martucci

Correlatore: Dott.sa Elena Colusso

Laureando: Francesco Sciarrabba

Matricola 1157184

ANNO ACCADEMICO 2019-2020

*I have learned to use
the word "impossible"
with greatest caution*
Wernher Von Braun

INDICE

CAPITOLO 1.....	1
La Seta.....	1
1.2 La seta come biomateriale	5
1.3 La seta come materiale ad alta tecnologia sostenibile.....	8
1.4 Funzionalizzazione della seta - <i>Feeding Engineering</i>	9
1.5 Struttura di biomateriali a base di fibroina di seta	11
1.5.1 Biomateriali.....	11
1.5.2 Micro- e nanoparticelle	11
1.5.3 Membrane.....	12
1.5.4 <i>Scaffolds</i>	12
1.5.5 Dispositivi Biomedici	13
CAPITOLO 2.....	15
L'ossido di zinco.....	15
2.1 Introduzione	15
2.2 Struttura e proprietà ottiche dello ZnO.....	15
2.2.1 Struttura cristallina dello ZnO.....	15
2.2.2 Proprietà fotoluminescenti dello ZnO.....	16
2.2.3 Sintesi chimica delle nanoparticelle di ZnO	17
2.2.4 Proprietà meccaniche	18
2.3 L'Ossido di Zinco come biomateriale	19
CAPITOLO 3.....	21
Ossido di Zirconio	21
3.1 Introduzione.....	21
3.2 Struttura e proprietà.....	21
3.2.1 Stabilizzazione della zirconia.....	22

3.2.2	Biocompatibilità della Zirconia.....	23
3.2.3	Nanoparticelle di Zirconia.....	23
	CAPITOLO 4.....	25
4.1	Materiali Compositi.....	25
4.2	Materiali nanocompositi.....	26
4.1.1	Caratteristiche del nanocomposito a matrice biopolimerica.....	27
4.3	Nanocompositi a base di seta.....	29
	CAPITOLO 5.....	31
	Materiali e metodi.....	31
5.1	Sintesi dei materiali e set-up.....	31
5.1.1	Fibroina di seta.....	31
5.1.2	Sintesi nanoparticelle di Ossido di Zinco.....	34
5.1.2.1	Dieta dei bachi da seta.....	34
5.2	Nanoparticelle di zirconia.....	35
5.1.3	Sintesi nanocompositi seta/zirconia.....	35
5.1.4	Film <i>free-standing</i> mediante <i>drop casting</i>	36
5.1.5	Sintesi di <i>scaffolds</i> mediante <i>solvent casting</i>	38
5.1.6	Sintesi di <i>scaffolds</i> mediante liofilizzazione.....	40
	CAPITOLO 6.....	43
	Tecniche di caratterizzazione.....	43
6.1	Spettroscopia FTIR.....	43
6.2	Modalità Riflettanza Totale Attenuata (ATR).....	44
6.3	Spettroscopia Uv-Vis-NiR.....	46
6.4	Spettroscopia di fluorescenza.....	47
6.5	Analisi Termiche – TGA/DSC.....	48
6.6	Diffrazione a raggi X – XRD.....	50

6.7	Microscopio elettronico a scansione – SEM.....	51
6.8	Plasma accoppiato induttivamente – ICP	53
6.9	Analisi porosità	54
6.10	Prove meccaniche.....	54
	CAPITOLO 7.....	57
	Risultati e analisi.....	57
7.1	Nanocompositi Seta/ZnO mediante <i>feeding engineering</i>	57
7.1.1	Nanoparticelle di Ossido di Zinco	57
7.1.2	Analisi termica TGA-DSC	59
7.1.3	Caratterizzazione ottica e cristallina delle ZnO NPs	60
7.1.1	Dieta dei bachi	64
7.1.2	Caratterizzazione delle fibre ottenute dai bachi	66
7.2	Caratterizzazione dei nanocompositi SF-ZrO ₂	75
7.2.1	Caratterizzazione delle membrane SF-ZrO ₂	75
7.2.2	Caratterizzazione degli scaffold prodotti tramite <i>freeze-dry</i> e <i>liofilizzazione</i> ..	80
7.2.3	Caratterizzazione degli <i>scaffolds</i> sintetizzati attraverso <i>solvent casting</i>	84
	CAPITOLO 8.....	87
	CONCLUSIONI E SVILUPPI FUTURI	87
	Bibliografia.....	91
	RINGRAZIAMENTI	103

Introduzione

Da diversi decenni l'uomo sta affrontando una sfida senza precedenti per preservare l'equilibrio dell'eco-sistema in cui vivono milioni di specie animali, attraverso la produzione di materiali eco-sostenibili e biocompatibili. L'interesse e la ricerca di materiali naturali, al fine di legare sostenibilità ambientale con le proprietà meccaniche e fisiche richieste, è aumentata esponenzialmente. È stato osservato che, tra i tanti, la seta è uno dei materiali idonei ad avere tali caratteristiche, portando alla produzione di dispositivi *eco-friendly*.

Le quote proteiche maggiori all'interno della fibra di seta grezza sono la fibroina e la sericina, proteine fibrose prodotte da ragni, la larva *bombyx mori* e alcuni insetti. La fibroina di seta (SF), grazie alle sue caratteristiche di biocompatibilità e biodegradabilità, è un buon candidato per applicazione biomediche. Inoltre, presenta delle ottime proprietà meccaniche e, nella sua forma rigenerata, può essere facilmente processata in varie forme quali gel, spugne o film. Quest'ultimi possono essere prodotti in ambiente acquoso a temperatura ambiente a pH neutro, ottenendo così dei materiali aventi alta trasparenza e buona rugosità superficiale; queste caratteristiche, legate alle proprietà di biocompatibilità precedentemente accennate, permettono la realizzazione di dispositivi tecnologici che possono interfacciarsi con l'ambiente naturale e quello umano, come ad esempio la realizzazione di dispositivi ottici, biofotonici e sensori impiantabili, senza causare reazioni immunologiche. La seta, inoltre, può essere facilmente funzionalizzata, attraverso l'utilizzo di dopanti organici o inorganici in soluzione, ottenendo così delle proprietà chimico-fisiche in funzione della specifica applicazione.

Lo scopo di questa tesi è la sintesi e la caratterizzazione di nanocompositi a matrice di seta. Nel primo studio è stata svolta l'ingegnerizzazione della dieta dei bachi da seta, introducendo nella loro alimentazione le nanoparticelle, al fine di ottenere una seta funzionalizzata. Successivamente è stato utilizzato un approccio classico, integrando le nanoparticelle nella matrice di fibroina di seta con un metodo di dispersione in soluzione. La prima fase della ricerca si è concentrata quindi sulla produzione di nanoparticelle di ossido di zinco. Queste sono state utilizzate, attraverso opportuni trattamenti chimici e seguendo opportuni protocolli etici, come *feeding* per il baco da seta, al fine di analizzare gli stadi e le fasi di crescita della larva durante l'assimilazione delle nanoparticelle,

valutandone le proprietà antibatteriche acquisite dalle larve, caratteristiche delle nanoparticelle utilizzate. La scelta di nanoparticelle ricade su diversi fattori: la luminescenza dell'Ossido di Zinco (in forma di Quantum Dots) ne permette la sua rilevazione, attraverso opportune tecniche, al fine di investigare l'assimilazione di tali particelle nei bachi da seta, in modo da ottenere in fine delle fibre contenente ZnO. Tale materiale inoltre non è tossico e ha delle proprietà antibatteriche che possono aiutare lo sviluppo e la crescita della larva, al fine di aumentare soprattutto la resistenza UV delle fibre. Superata la prima fase verrà analizzata la seta prodotta con lo scopo di comparare le proprietà chimico/fisiche con altre fibre comuni. Questa parte di ricerca è stata effettuata in collaborazione con la Dott.ssa Silvia Cappelozza esperta in bachicoltura e gelsicoltura del CREA, Consiglio per la Ricerca in agricoltura e l'analisi dell'economia agraria.

La seconda fase si concentra sullo studio e la realizzazione di strutture a base di fibroina di seta ad alto indice di rifrazione, attraverso l'aggiunta di nano particelle di zirconia. Nello specifico la ricerca verge sulla sintesi e la caratterizzazione di un nano composito a matrice di fibroina di seta, sintetizzata da bozzoli del Bombyx mori, e nano particelle di zirconia come fase dispersa. L'obiettivo è quello di ottenere un materiale avente elevate prestazioni meccaniche ed ottiche, legando le proprietà di trasparenza del materiale, grazie al suo alto indice di rifrazione, di biocompatibilità e biodegradabilità, al fine di poterne caratterizzare le proprietà chimico-fisiche attraverso la modulazione della concentrazione delle nanoparticelle precedentemente citate, intercalate nella matrice del nano composito. La fase sperimentale ha previsto la realizzazione di diverse soluzioni a base di sola fibroina di seta e di fibroina di seta/zirconia, seguendo opportuni protocolli. Attraverso queste due soluzioni, modulando la concentrazione di zirconia, sono stati prodotti diversi campioni di film free standing, mediante drop casting su supporto piano di PDMS, e scaffold aventi un certo grado di porosità in funzione del metodo di sintesi. La tesi è suddivisa in 8 capitoli. Nei primi 4 capitoli, di carattere teorico, vengono presentate le proprietà principali della seta, dell'ossido di zinco e della zirconia, effettuando inoltre una panoramica sulle principali caratteristiche dei materiali compositi e nano compositi. Nel capitolo 5, sempre di carattere teorico, vengono presentati i materiali e i metodi utilizzati per la realizzazione dei campioni, mentre le capitolo 6 le tecniche di caratterizzazione utilizzate per studiare le proprietà del materiale. I risultati

sono riportati e commentati nel capitolo 7, mentre nel capitolo 8 sono esposte le conclusioni di questo lavoro di tesi.

CAPITOLO 1

La Seta

La seta è una fibra proteica di origine animale elaborata da alcune specie di insetti (in particolare dal baco da seta, la larva del Lepidottero *Bombyx mori*) come secrezione di particolari ghiandole, dette seritteri. Viene prodotta attraverso due orifizi chiamati filiere, in forma di due bavelle che, a contatto con l'aria, si rapprendono e si saldano fra loro in un filo unico detta bava. Con quest'ultima il baco confeziona il bozzolo, entro il quale si rinchiude per compiere le fasi di metamorfosi [1]. La seta è stata scoperta e lavorata già nel 3000 a.C. in Cina e trova diversi campi di applicazione nella società moderna, come nel campo tessile e quello chirurgico, grazie alle sue caratteristiche sia meccaniche sia di biocompatibilità e biodegradabilità, permettendone l'impiego per dispositivi biomedici e materiali nano-compositi [3-6]. Essa viene prodotta da alcuni insetti dell'ordine dei lepidotteri, il cui nome significa letteralmente "ali con le scaglie", dovuto alla presenza di piccole scaglie che ne rivestono le ali e il corpo, donandone la tipica colorazione. Questi comprendono circa 158.000 specie e la più comune, come precedentemente accennato, è il *Bombyx mori*, una specie di falena della famiglia *Bombycidae*, originaria dell'Asia centro orientale [2]. Durante la propria vita, i lepidotteri cambiano radicalmente la struttura del corpo e il loro ciclo vitale è caratterizzato da 4 stadi: uovo, larva, crisalide ed infine la forma adulta.

1.1 Caratteristiche e proprietà della seta

Le proteine fibrose vengono prodotte all'interno di due ghiandole situate ai lati dell'apparato digerente delle larve, dopo un processo di biosintesi nelle cellule epiteliali che ne rivestono le pareti. Chimicamente la seta è costituita da due proteine, la fibroina e la sericina, oltre che da grassi, pigmenti e minerali in minime quantità. Essa può essere prevalentemente proteica o chitinosa se alle proteine sono associate alte percentuali di amminozuccheri.

Le fibre della fibroina di seta (*bombyx mori*) presentano un diametro di 10-25 μm e sono costituite da due proteine: una catena leggera a basso PM (~26 kDa) e una catena pesante ad alto PM (~390 kDa) presenti in un rapporto 1:1 e legati da un legame singolo disolfuro [7]. Queste sono rivestite da una famiglia di proteine idrofiliche “glue-like” chiamata sericina (20-310 kDa), che costituisce il 25-30% del peso totale dei bozzoli ed hanno la funzione di legante tra i mono filamenti di fibroina (Figura 1.1)

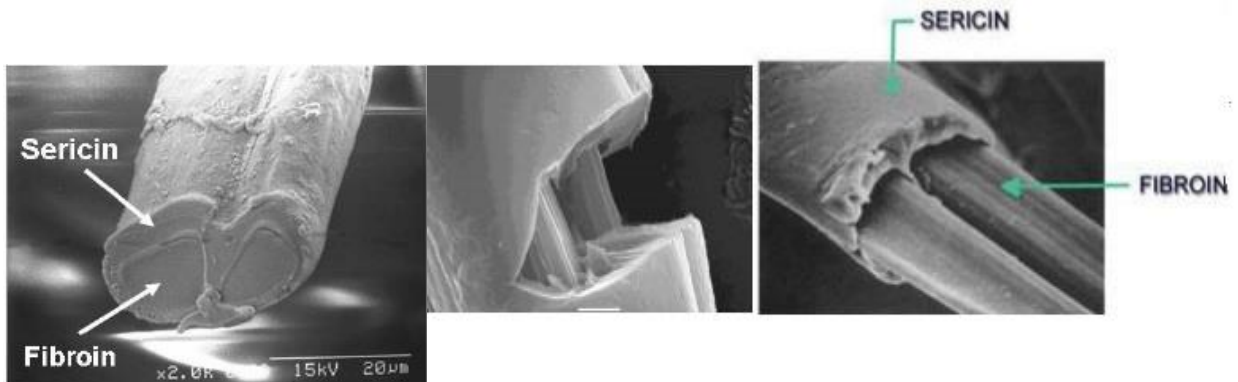


Figura 1.1: Immagine al microscopio elettronico di una fibra di seta in cui sono mostrati i nano filamenti di fibroina ed il loro rivestimento di sericina.

L'aminoacido della fibroina di seta del *Bombyx mori* è composto da glicina (Gly – 43%), alanina (Ala – 30%) e serina (Ser – 12%) [8] (Figura. 1.2). Le catene ad alto PM hanno dodici domini che formano le regioni cristalline della fibra di seta, intervallati da sequenze primarie che non sono ripetitive formando meno domini organizzati nelle fibre. I domini cristallini consistono in una media di 381 domini residui. Ognuno di essi è costituito da sottodomini di esapeptidi tra cui: GAGAGS, GAGAGY, GAGAGA o GAGYGA dove G è la glicina (Gly), A è l'alanina (Ala), S e la serina (Ser) e Y è la Tirosina. [7,12].

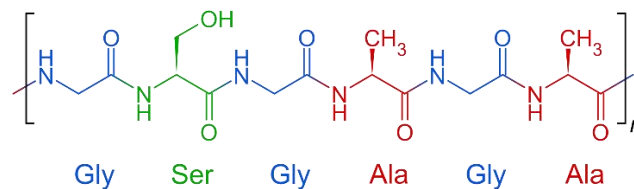


Figura 1.2: Struttura primaria della fibroina, (Gly-Ser-Gly-Ala-Gly-Ala)_n

Sulla base di evidenze di tipo chimico, quali la sequenza amminoacidica, e di tipo strutturale, ottenute mediante diffrazioni a raggi X, la conformazione della fibroina è stata ricondotta ad una predominante struttura a foglietto β (β -sheet) antiparallelo (figura 1.3),

denominata *silk II*, prodotta dalla ripetizione per lunghi tratti della molecola di un'unità cristallina caratterizzata dai residui di aminoacidi glicina (Gly), alanina (Ala) e serina (ser); questa risulta insolubile in acqua e si forma durante la filatura delle fibre alla fuoriuscita dalla filiera del baco. I foglietti β sono strutture cristalline asimmetriche occupate da un lato da catene laterali di idrogeno da glicina, dall'altro invece da catene laterali metiliche dalle alanine che popolano i domini idrofobici. Questi foglietti sono disposti in modo tale che i gruppi metilici e i gruppi idrogeno tra fogli opposti interagiscano tra loro per formare l'impilamento tra fogli nei cristalli. Forti legami a idrogeno e forze di Van del Waals generano una struttura termodinamicamente stabile [8]. I legami idrogeno inter- e intra-catena si formano tra aminoacidi perpendicolari all'asse delle catene e alla fibra, conferendo alle fibre eccellenti proprietà meccaniche.

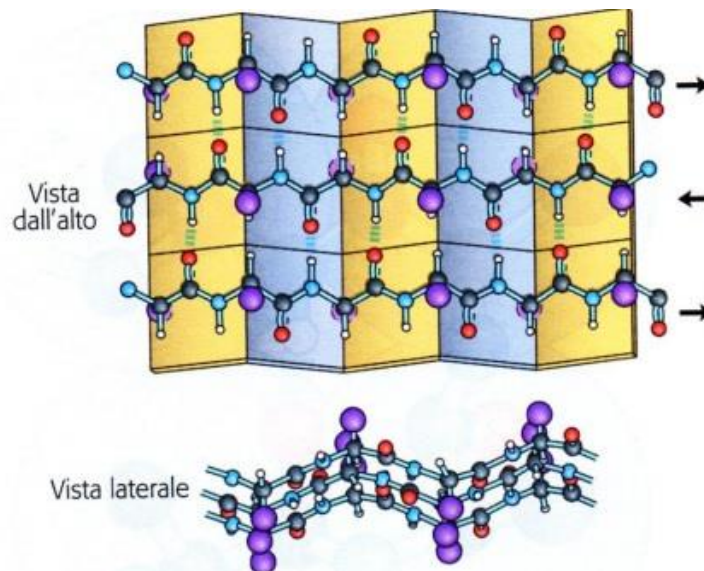


Figura 1.3: rappresentazione dei foglietti β della struttura secondaria

Questa struttura coesiste con minoritarie strutture amorphe eterogenee ed insolubili (*random coil*, α -elica e β -turn) (Tabella 1.1), definita *silk I*, prodotte da sequenze aminoacidiche più complesse contenenti treonina e aminoacidi con gruppi laterali ingombranti e carichi [92]

Tabella 1.1: Struttura della fibra di seta

<i>Bombyx mori</i> silk worm				
Silk fiber	Silk fibroin (72-81%)			Silk sericin (19-58%)
	H chain	L chain	P 25 glycoprotein	a glue-like protein
Molecular Weight	325 kDa	25 kDa	25 kDa	~300 kDa
Polarity	Hydrophobic			Hydrophilic
Structure	silk I (random-coil or unordered structure)			
	silk II (crystalline structure)			non-crystalline structure
	silk III (unstable structure)			
Function	the structure protein of fibers filament core protein			binds two fibroins together coating protein

Le α eliche sono delle strutture elicoidali stabilizzate tramite legami a idrogeno tra i gruppi amminici della stessa catena, in particolare tra i gruppi carbonilici $-C=O$ e il gruppo amminico $-N-H$ (Figura 1.4). Eventuali residui (catene $-R$) si posizionano all'esterno della spirale a causa del loro ingombro sterico all'interno della catena.

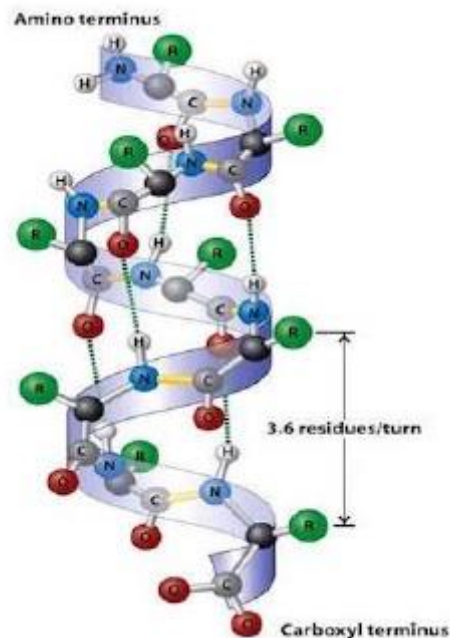


Figura 1.4: Rappresentazione della struttura α elica

Esiste anche una terza struttura, che è instabile, denominata *Seta III*, la si osserva all'interfaccia aria/acqua ed ha una struttura elicoidale [14] (Figura 1.5).

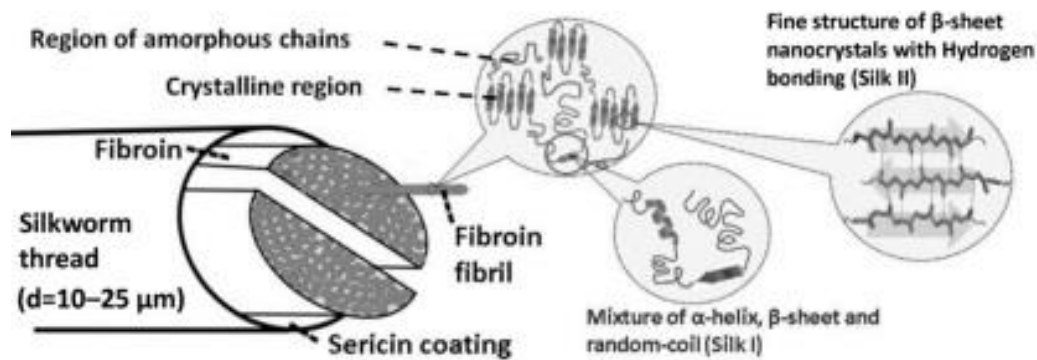


Figura 1.5: Rappresentazione schematica della struttura della fibroina di seta

Le fibre della seta sono resistenti ma poco estendibili in quanto un allungamento potrebbe avvenire solo per una rottura dei legami che tengono uniti i residui delle catene disposti in una conformazione quasi completamente estesa. Tali fibre però sono flessibili perché le strutture β vicine si associano le une alle altre solo con le forze deboli di Van del Waals. Nella fibroina, inoltre, sono presenti regioni con residui di grandi catene laterali; quest'ultimi tendono a distorcere e a rendere disordinata la struttura microcristallina. Le fibre della seta sono composte quindi da regioni cristalline e regioni amorfe in alternanza tra loro, e quest'ultime sono responsabili della loro estensibilità.

1.2 La seta come biomateriale

Secondo la Società Europea dei Biomateriali si definisce biomateriale una sostanza non vivente utilizzata per la realizzazione di un dispositivo medico, destinato ad interagire con sistemi biologici [15]. Tale definizione assume carattere generale e può essere associata ad applicazioni inerenti a tessuti ingegneristici ed organi artificiali ibridi, in cui vengono utilizzate cellule vive, se non si considerano le parole chiavi "medico" e "vivente". La scienza dei Biomateriali studia le interazioni fisiche e biologiche del materiale con l'ambiente attraverso la sintesi, la caratterizzazione e l'ottimizzazione. Molti biomateriali causano una reazione biologica specifica e stereotipata, ragione per cui negli ultimi decenni la ricerca si è concentrata nello sviluppo di superfici ingegnerizzate [16], al fine di ottimizzare la velocità e la precisione delle reazioni con cellule e proteine per una specifica applicazione. A lungo la seta è stata utilizzata come biomateriale grazie

alla qualità delle fibre prodotte dal baco, per la realizzazione di suture in campo medico. Molti studi hanno messo in dubbio la biocompatibilità della fibroina, dovuto a reazioni infiammatorie causate dalla presenza di sericina sulle fibre utilizzate. In questo senso è importante definire il concetto di Biocompatibilità, ovvero la capacità di un materiale di compiere, in un ambiente ospitante, una specifica applicazione [15].

È stata dimostrata la responsabilità della sericina nell'insorgenza di reazioni immunologiche [93], causando delle risposte allergiche di tipo I, asma e sovra regolazione delle immunoglobuline. La fibroina di seta viene quindi purificata dalla sericina attraverso l'ebollizione dei bozzoli di seta in una soluzione alcalina (Figura 1.6; 1.7). La soluzione di fibroina di seta rigenerata è un biopolimero viscoelastico (proteina) le cui molecole sono dei copolimeri a blocchi regolari, in cui dieci blocchi altamente idrofobici sono separati da nove blocchi meno idrofobici, facendolo comportare come un copolimero a blocchi anfifilico [8]. Il termine sgommatura (*degumming*) indica il processo di separazione della sericina dalla fibroina, tramite il quale vengono allontanate anche le impurezze naturali o acquisite durante le operazioni di filatura e torcitura, quali grassi, cere e sali inorganici, ottenendo la soluzione di fibroina di seta rigenerata [13].

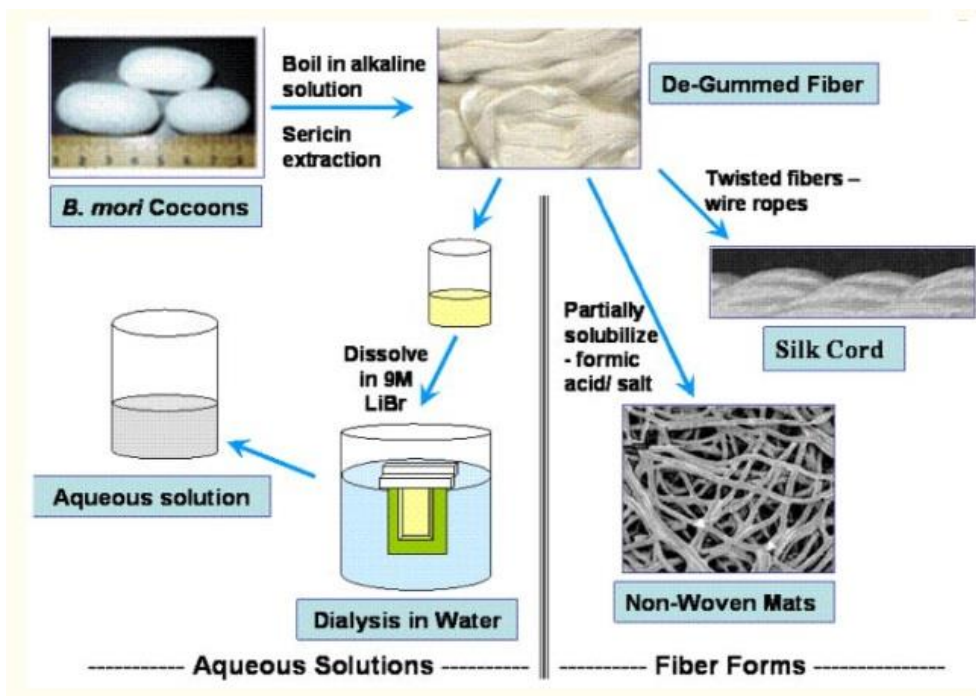


Figura 1.6: Schema di purificazione della fibroina dalla sericina attraverso l'ebollizione in soluzione alcalina. Il *de-gumming* delle fibre di seta può avvenire nei cordoncini di seta attraverso il "twisting"[9], tessuto non tessuto della seta per solubilizzazione parziale [10] o dissoluzione in litio bromuro, dializzato e formato in soluzione acquosa di fibroina di seta per la preparazione di altre morfologie di materiali[11]

Il *degumming* costituisce, inoltre, una fase necessariamente preliminare alle operazioni di tintura della sera, in quanto la presenza di sericina ostacolerebbe la penetrazione degli agenti coloranti nella fibra, mentre la seta sgommata, morbida, liscia e di colore bianco brillante, ne risulta facilmente predisposta.

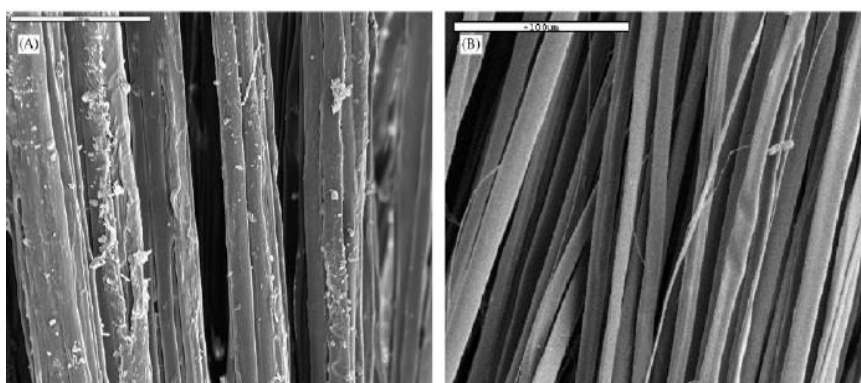


Figura 1.7: Immagini SEM relative a fibre di seta prima (a) e dopo (b) il processo di estrazione della sericina

Questo trattamento della fibroina non provoca reazioni trombogeniche e stimola l'adesione cellulare sulla superficie favorendo la crescita dei tessuti [17,18]. Inoltre, è un materiale degradabile che dipende da fattori fisici, chimici e biologici e, in base alla modalità di degradazione, può essere classificata come un polimero enzimaticamente degradabile [19, 20]. Gli enzimi giocano un ruolo importante nella degradazione del biomateriale, processo che avviene in due fasi. Nella prima c'è l'assorbimento degli enzimi sulla superficie del substrato attraverso i domini dei legami superficiali, mentre la seconda fase è caratterizzata dall'idrolisi dei legami estere [20]. La capacità di degradazione in composti a minor peso molecolare è una caratteristica importante dei biomateriali, spesso legata alla loro applicazione in vivo. La velocità di degradazione della fibroina, che dipende dalla struttura, dalla morfologia, dalle condizioni meccaniche e biologiche del sito di impianto, può essere controllata agendo sulla cristallinità e sulla distribuzione media del peso molecolare della fibroina, oltre che dalle caratteristiche morfologiche del substrato [21,22].

1.3 La seta come materiale ad alta tecnologia sostenibile

È stata effettuata una intensa ricerca sulla proteina della seta come materiale sostenibile per applicazioni ottiche, fotoniche ed elettroniche, ottenendo dei progressi in termini di struttura e processo [24]. Questo ha permesso la trasformazione della fibroina di seta in diverse forme come idrogel, film ultrasottili, film spessi, rivestimenti, matrici 3D porose o fibre, quest'ultime avente diametri in scala micro o nanometrica [23] (Figura 1.8).

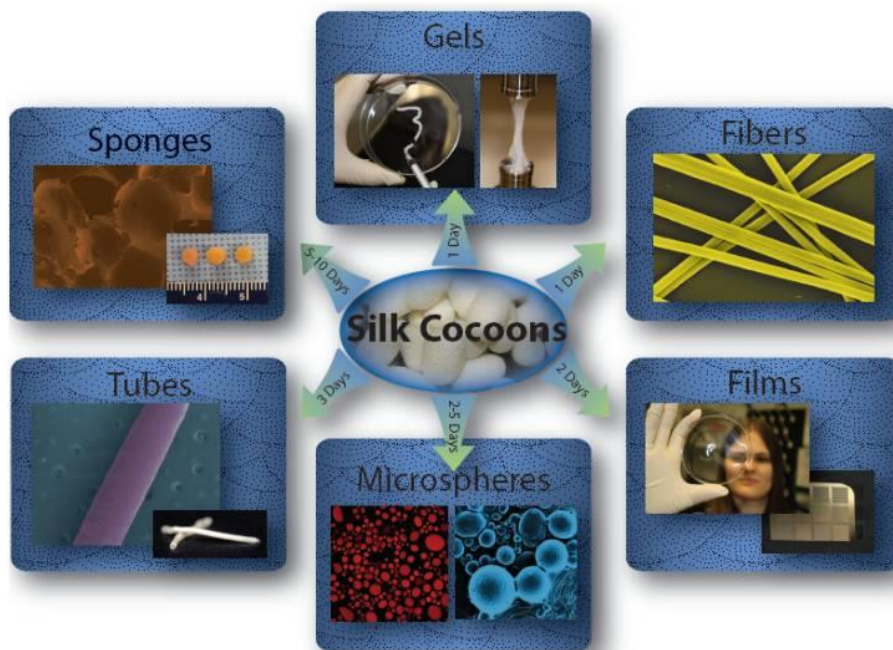


Figura 1.8: Alcune applicazioni della fibroina di seta

La realizzazione di questi dispositivi parte dalla soluzione della fibroina di seta, rigenerata attraverso la purificazione dei bozzoli e dissoluzione delle fibre. La rimozione della sericina è essenziale per applicazioni mediche e questo avviene attraverso il *degumming* in cui si mettono a bollire i bozzoli della seta in una soluzione alcalina (per esempio 0.02 M carbonato di sodio). Avvenuta la rimozione della sericina, le fibre di seta possono essere disciolte in una soluzione acquosa contenente 9.3 M di litio bromuro ed in fine purificate dalla presenza del sale attraverso dialisi. Successivamente la soluzione acquosa di seta può essere stoccata o usata come elemento costitutivo per la realizzazione di materiali speciali. In questo senso la soluzione ottenuta può essere attivata, biochimicamente e/o fisicamente, con dopanti organici (cellule, proteine o enzimi) o inorganici (quantum dots, nanoparticelle metalliche). La soluzione può essere quindi

depositata su un substrato specifico per il tipo di applicazione, e cristallizza attraverso l'autoassemblaggio delle proteine attraverso l'esposizione in aria, portando a strutture patternate *free-standing*, per applicazioni meccaniche, ottiche, fotoniche ed elettroniche.

1.4 Funzionalizzazione della seta - *Feeding Engineering*

Le fibre ottenute dal *Bombyx mori* stanno ricevendo un'attenzione significativa per le varie applicazioni funzionali come tessuti, biomateriali e nanodispositivi, grazie alle loro eccezionali proprietà meccaniche, di biocompatibilità e biodegradabilità [3-6]. Sono stati fatti grandi passi avanti per la fabbricazione e la funzionalizzazione delle fibre di seta attraverso processi fisici [25-27], chimici [28-30] e biologici [31,32].

Il nutrimento naturale del *Bombyx mori* è la foglia di gelso mentre, sotto opportune condizioni di laboratorio e seguendo dei protocolli etici, le larve possono essere allevate attraverso una dieta artificiale (*Diet Engineering*). Negli ultimi anni sono stati affrontati diversi studi riguardante il *feeding* delle larve dei bachi da seta, attraverso l'utilizzo di additivi (ad es. coloranti organici [33,34], amminoacidi sintetici e nanoparticelle [26,27,35-37]) che ne hanno permesso la funzionalizzazione "*in vivo*", ottenendo un processo *green* e sostenibile, al fine di poter modificare le fibre di seta. Questi additivi si distribuiscono principalmente nella fibroina di seta piuttosto che nella sericina, portando ad un miglioramento delle proprietà termiche e meccaniche delle fibre [27,33,38]. Da recenti studi è stato dimostrato che gli additivi ostacolano la transizione conformazionale da *random coil*/ α -elica a β -sheet della fibroina, riducendone il grado di cristallinità. Questo implica che le strutture secondarie e le proprietà meccaniche delle fibre di seta potrebbero essere ulteriormente ottimizzate e migliorate attraverso l'alimentazione di additivi appropriati. Le strutture secondarie e le proprietà meccaniche sono influenzate non solo dal contenuto e dalla sequenza amminoacidica della fibra di seta [39], ma anche dalla transizione conformazionale delle proteine della seta e dalle condizioni di filatura [40, 42]. Da recenti studi fatti in vivo ed in vitro è stato dimostrato che la presenza di ioni metallici (ad es. Ca^{2+} , Cu^{2+} , K^+ e Zn^{2+}) possono portare ad una transizione conformazionale della fibroina nella struttura β -sheet [41]. Inoltre, possono essere ottenute delle fibre di seta con resistenza e capacità di estensione superiori, interrompendo l'equilibrio ionico che si viene a formare nel condotto di filatura; Questo avviene perché

la presenza di diversi additivi, precedentemente citati, possono influenzare il bilancio ionico, portando a differenze significative nelle prestazioni meccaniche della fibra di seta. Il “*Diet Engineering*” si afferma anche nel campo della seta ad uso tessile al fine di abbattere il grande consumo di risorse e quindi l’inquinamento che ne deriva [43]. Tansil et al. hanno confermato la presenza di coloranti nella seta quando i bachi venivano alimentati con una dieta contenente questi additivi, permettendo di ottenere dei bozzoli colorati [33,34,38] (Figura 1.9)

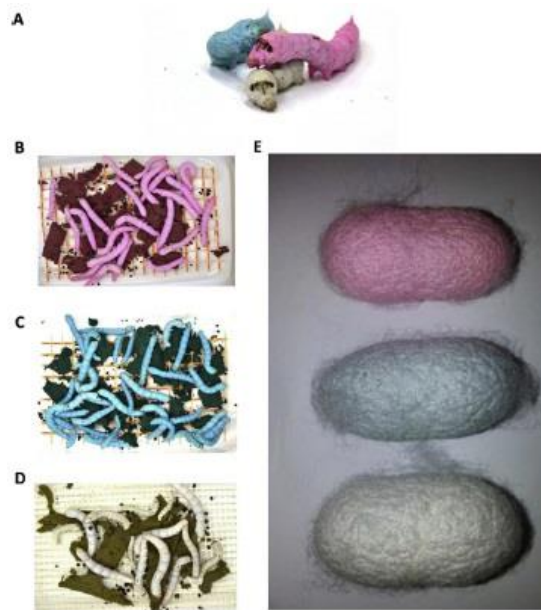


Figura 1.9: Larva alimentata con una dieta a base di Rodamina B (A-B); Nile blue (A-C); Senza dopanti (A-D)

A parte il colore per le applicazioni tessili, la luminescenza nella seta è utile anche nelle applicazioni biomediche; in combinazione con tecniche di microscopia è possibile la visualizzazione, il monitoraggio e la quantificazione delle sostanze luminescenti. Oltre all’assorbimento dei coloranti per produrre colore e luminescenza, questo concetto può essere esteso in applicazioni dove è possibile incorporare altre molecole funzionali nella seta (ad esempio farmaci, antibiotici, profumi e sostanze nutritive).

1.5 Struttura di biomateriali a base di fibroina di seta

1.5.1 Biomateriali

La fibroina possiede una lunga lista di proprietà vantaggiose come biomateriale, in termini di proprietà meccaniche, di biocompatibilità, bassa degradazione e permeabilità ad acqua e ossigeno. Recentemente l'uso della seta si è notevolmente ampliato grazie alle sue proprietà anfifiliche, meccaniche e di rigonfiamento, permettendone l'utilizzo in diverse morfologie come fibre di vari diametri, film di vari spessori, idrogel, matrici porose, schiume, capsule, nanoparticelle e sfere [11,44-46]. La possibilità di ottenere diverse morfologie, grazie all'eccellente processabilità della fibroina di seta, ha permesso una versatilità nelle loro applicazioni biomediche come *scaffold*, *imaging* molecolari e sistemi di trasporto e rilascio controllato di farmaci.

1.5.2 Micro- e nanoparticelle

La tecnologia *Self-assembly* è ampiamente usata per preparare micro e nano particelle di SF. La catena idrofila (Tyr,Ser) e idrofoba (Gly, Ala) si possono riarrangiare in modo alternato, permettendo alle molecole della proteina di formare delle micelle attraverso meccanismo di autoassemblaggio (*self-assembly*). Aggiungendo una certa quantità di etanolo ed effettuando un rapido raffreddamento sotto la temperatura di congelamento si ottiene la formazione di microsfele, di dimensione 0.2-1.5 μm , senza l'utilizzo di agenti tossici. La dimensione delle microsfele dipende dalla concentrazione di SF, dalla temperatura e dalla quantità di etanolo utilizzata. Lammel et al. hanno mostrato la formazione di nanoparticelle di SF, superiore ai 500nm, utilizzando fosfato di potassio. Esistono vari metodi di sintesi di micro e nano particelle di SF come *spray drying*, rottura del flusso laminare (*laminar jet break-up*), tecniche di elettro-spray e micro-punti capillari [77-80]. In figura 1.10 viene mostrato un esempio di microparticelle di SF fabbricate a diversi rapporti di etanolo.

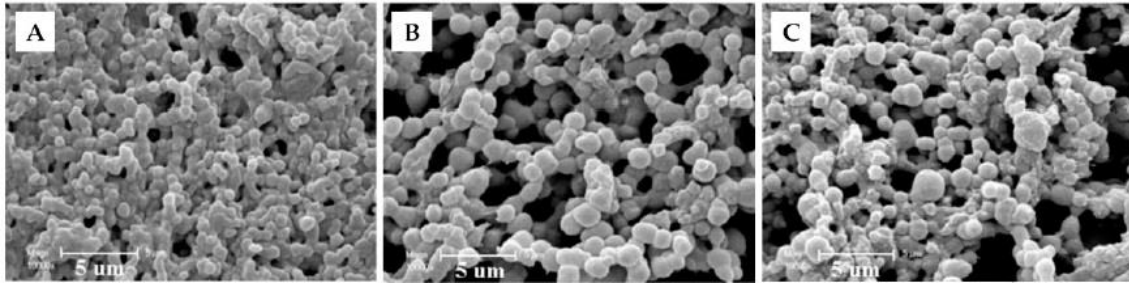


Figura 1.10: Immagine al microscopio a scansione elettronica (SEM) di microparticelle di SF fabbricate a diversi rapporti di etanolo (A) 2:1, (B) 3:1, (C) 4:1 – scale bar 5µm [81]

1.5.3 Membrane

Le membrane (film) vengono generalmente preparate attraverso tecniche per colata, *spin-coating*, deposizione verticale e assemblaggio *layer-by-layer*. Nella colata si versa la soluzione acquosa di SF su una superficie pulita e perfettamente piana e, grazie ad un sistema chiuso a temperatura e umidità controllata che permette la normale evaporazione dell'acqua, si ottiene una membrana il cui spessore dipende dalla quantità di soluzione utilizzata, dalla concentrazione di fibroina di seta e dalla velocità di evaporazione.

1.5.4 Scaffolds

Le strutture tridimensionali di SF solitamente esistono come *hydrogels* e spugne. Nel primo caso si ottiene una struttura di rete interconnessa ad alto contenuto di acqua. È stata sfruttata la biocompatibilità della fibroina, insieme alla morfologia degli *scaffolds*, per creare dei supporti che fungessero come base di adesione e proliferazione delle cellule. Gli *scaffolds* a base di fibroina possono popolare le cellule, controllarne la proliferazione e la differenziazione, depositare proteine strutturali e rigenerare i tessuti. Inoltre, presentano buone proprietà meccaniche e sono intrinsecamente luminescenti in un certo range di lunghezze d'onda di emissione e possono consentire l'uso di varie tecniche di *imaging* ottico e di caratterizzazione nello studio dell'ingegneria dei tessuti, minimizzando al contempo la citotossicità, poiché i coloranti sono ben confinati all'interno della seta negli *scaffolds*. In figura 1.11 vengono mostrati alcuni esempi di strutture ottenibili dalla soluzione di fibroina di seta

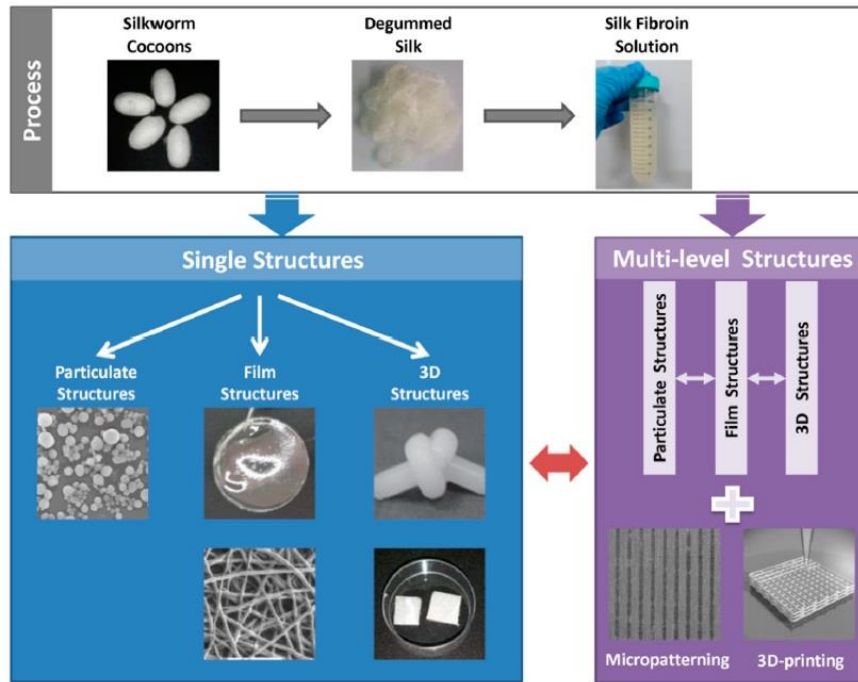


Figura 1.11: Esempi di strutture ottenibili dalla soluzione di Fibroina di Seta

La sintesi di queste strutture verrà affrontata nel § Capitolo 7, Risultati e analisi

1.5.5 Dispositivi Biomedici

Le interfacce ottiche biocompatibili sono i componenti necessari per sfruttare appieno i progressi dei dispositivi biomedici per l'*imaging* e il rilevamento come sensori. La fibroina di seta nei film sottili ha dimostrato di essere un materiale ideale per diverse ragioni. Strutturalmente consente la formazione di film *free-standing* sufficientemente sottili e altamente trasparenti in tutta la regione del visibile (20nm - 100 μ m con trasmissione > 95%) [47]. Inoltre, offre una superficie molto liscia facilitandone il *pattern* su scala nanometrica. Vari componenti ottici sono stati fabbricati dalla fibroina di seta (Figura 1.12). Questa, infatti, può essere formata in foglietti β termodinamicamente stabili controllando lo spessore attraverso la durata dello *spin coating*. È possibile quindi ottenere delle strutture con proprietà meccaniche, qualità superficiale e trasparenza idonee per la realizzazione di substrati ottici [25]. È possibile inoltre realizzare l'approccio di *soft lithography* mediante stampi in PDMS, per realizzare strutture patternate su scala nanometrica. Questo approccio legato alla trasparenza del film permette di ottenere delle strutture bio-fotoniche diffrattive mono e bi-dimensionali (figura 1.12).

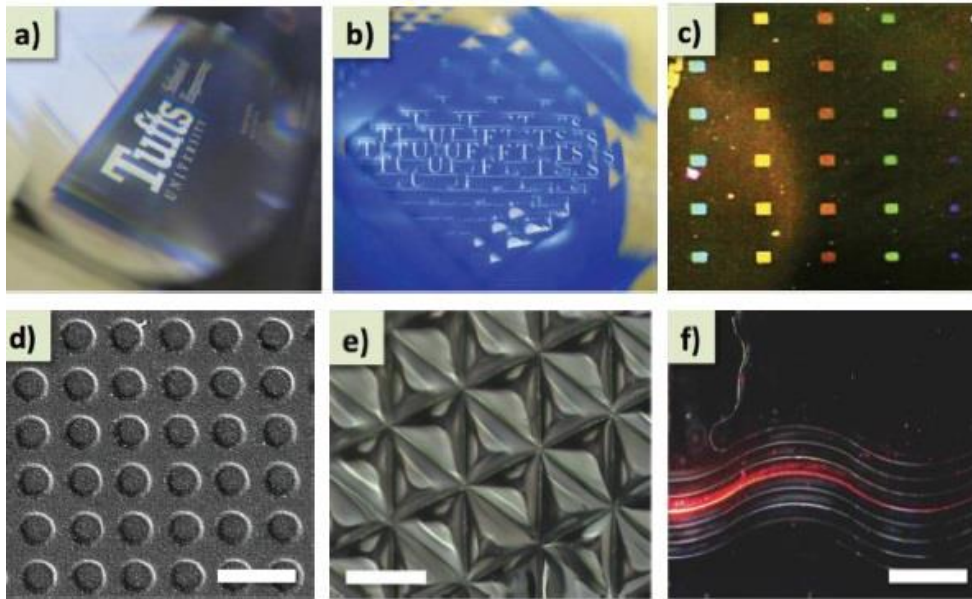


Figura 1.12: Esempio di dispositivi ottici e fotonici a base di seta. a) Lente di Fresnel; b) microlente; c) sequenza periodica di nanocavità 2D su film di seta sotto illuminazione in campo scuro; d) sequenza periodica di nano cavità con costante di reticolo pari a 400 nm; 3) microprismi di seta; f) guide d'onda.

CAPITOLO 2

L'ossido di zinco

2.1 Introduzione

L'ossido di zinco (ZnO) è un composto chimico inorganico la cui ionicità risiede al limite tra i semiconduttori covalenti e ionici. I primi studi svolti sulle proprietà di questo materiale risalgono al 1930 e l'ampio band gap diretto (3.36 eV a 25°C) e l'energia di legame dell'eccitone (60 meV a 25°C), rendono lo ZnO un materiale interessante per un ampio range di applicazioni, soprattutto per dispositivi fotonici a bassa lunghezza d'onda e dispositivi elettronici ad alta frequenza; inoltre sono stati effettuati degli studi sulla possibilità di sintetizzare degli strati epitassiali di ZnO, *nanorods*, *quantum dots* e *quantum wells*, al fine di ottenere dei materiali per dispositivi optoelettronici blue/UV, diodi laser, sensori di gas, nano attuatori ecc. [48].

2.2 Struttura e proprietà ottiche dello ZnO

2.2.1 Struttura cristallina dello ZnO

Le strutture cristalline dello ZnO sono tre (Figura 2.1): wurtzite, zinco-blenda e *rocksalt*. La wurtzite è una struttura esagonale, è stabile a temperatura ambiente ed è caratterizzata da due sotto-reticoli interconnessi di Zn^{2+} e O^{2-} , così che ogni ione Zn è circondato da un tetraedro di ioni O, e viceversa. Questa coordinazione tetraedrica da origine alla simmetria polare tra gli assi degli esagoni. Questa polarità è responsabile di molte proprietà dello ZnO, come ad esempio la sua caratteristica piezoelettrica e la sua polarizzazione spontanea, ed è un fattore chiave nella crescita cristallina e nella generazione dei difetti [49].

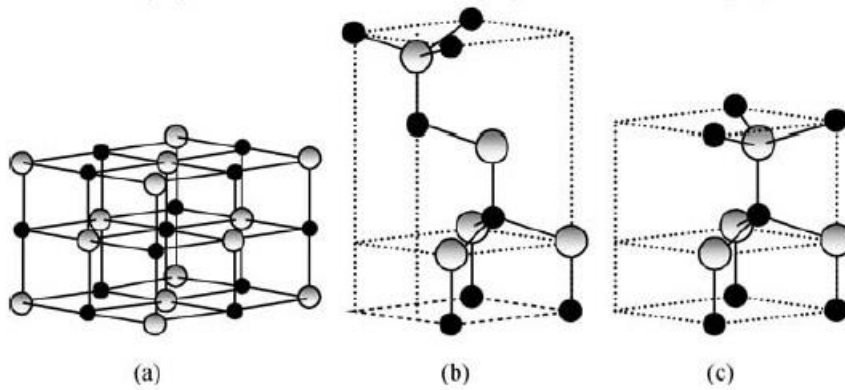


Figura 2.1: Strutture cristalline dello ZnO: a) *rocksalt* cubico; b) zinco-blenda cubica; c) wurtzite esagonale

2.2.2 Proprietà fotoluminescenti dello ZnO

Processi di non equilibrio possono indurre un'alta concentrazione di difetti che sono benefici per lo studio della luminescenza. Ci sono un numero di difetti intrinseci e diverse energie di ionizzazione. L'energia dei livelli elettronici dei difetti nativi dello ZnO, all'interno dell'energia del band-gap, sono riportati in figura 2.2.

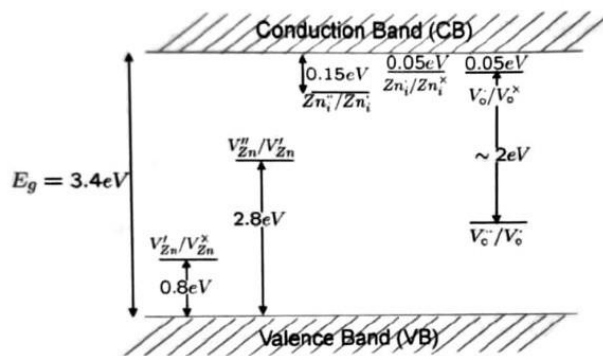


Figura 2.2: Livelli energetici dei difetti nativi dello ZnO. I difetti donatori sono Zn_i^* , Zn_i^X , Zn_i^{**} , V_o^{**} , V_o^* , Zn_o , mentre i difetti accettori sono V_{Zn}^{**} , $V_{Zn}^'$ [50].

La notazione di Kröger-Vink, usata per descrivere la carica elettrica e la posizione dei difetti reticolari nelle strutture cristalline, definisce: i = siti interstiziali, Zn = zinco, O = ossigeno, V = vacanza. I termini indicano i siti atomici, gli apici indicano le cariche, gli asterischi indicano le cariche positive, l'apostrofo le cariche negative mentre la X indica carica zero. L'energia di ionizzazione dei difetti varia da 0.05 – 2.8 eV. Lo Zn interstiziale deriva dalla reazione di Frenkel [50,52]



Le vacanze di ossigeno, difetti ionici predominanti, provengono dalla reazione di Schottky



Le successive reazioni di ionizzazioni e di equilibrio sono



Nello spettro fotoluminescente (PL) dello ZnO solitamente ci sono delle bande di emissione nell'ultravioletto (UV) e nella regione del visibile (verde, giallo, blue e viola). L'emissione caratteristica dello ZnO è quella UV ed è attribuito alla transizione del *band-edge* o alla combinazione dell'eccitone. Sebbene l'emissione nella regione del visibile sia generalmente associata ai difetti intrinseci ed estrinseci dello ZnO, la transizione elettronica non è ancora ben conosciuta nel dettaglio.

2.2.3 Sintesi chimica delle nanoparticelle di ZnO

ZnO ha ricevuto grande attenzione negli ultimi anni grazie alle grandi proprietà che dipendono dall'uso di dopanti, alta trasparenza, proprietà piezoelettriche, semi conduttività a banda larga, proprietà ferromagnetiche a temperatura ambiente e ottime capacità ottico-magnetiche [53]. Questo materiale inoltre può essere sintetizzato in diverse forme nanometriche, permettendo lo sviluppo di nuovi materiali. È possibile inoltre sintetizzare diverse nanostrutture in ZnO, come ad esempio *nanorods*, *nanobelts*, nano pettini, nano molle, nano anelli e nano particelle. Queste strutture possono essere ottenute attraverso *Chemical Vapor Deposition* (CVD), dove il vapore reagisce sul substrato producendo il prodotto desiderato, o attraverso *Metal-organic CVD* (MO-CVD), processi solido-vapore o elettrodeposizione.

Le nanoparticelle vengono inoltre sintetizzate attraverso metodi chimici ad umido, attraverso nucleazione colloidale e accrescimento, dove il sale di zinco (che fornisce Zn^{2+})

reagisce con una base forte (che fornisce ioni OH⁻). Questi vengono mescolati con un solvente al fine di formare il precursore Zn(OH)₂ ottenendo così dei nanocristalli di ZnO attraverso fenomeni di disidratazione. Un metodo semplice per preparare le nanoparticelle di ZnO è l'idrolisi e la condensazione dello zinco acetato e dell'idrossido di tetrametilammonio. La procedura di sintesi è basata sul lavoro presentato da Gamelin et al.[52]. (§ Capitolo 5, *Materiali e metodi* - 5.1.1 Fibroina di seta)

2.2.4 Proprietà meccaniche

In tabella 2.1 vengono brevemente riportati i valori teorici e sperimentali delle proprietà meccaniche dell'Ossido di Zinco.

Tabella 2.1: Proprietà meccaniche dello ZnO (wurtzite *c-axis oriented*)

Parameter	Experimental	Theoretical
Bulk Young's modulus, E (GPa)	111.2 ± 4.7^a	
Bulk hardness, H (GPa)	5.0 ± 0.1^a	
Epitaxial Young's modulus, E (GPa)	310 ± 40^b	
Epitaxial hardness, H (GPa)	5.75 ± 0.8^b	
Bulk modulus, B (GPa)	142.4^c	156.8^d
dB/dP	3.6^c	3.6^d
e_{33} (C m ⁻²)	0.96^e	1.19^f
e_{31} (C m ⁻²)	-0.62^e	-0.55^f
e_{15} (C m ⁻²)	-0.37^e	-0.46^f
Spontaneous polarization (C m ⁻²)		-0.047^g
c_{11} (GPa)	209^h	246^f
c_{33} (GPa)	216^h	246^f
c_{12} (GPa)	120^h	127^f
c_{13} (GPa)	104^h	105^f
c_{44} (GPa)	44^h	56^f
Born effective charge, Z^*		2.1^g

- a. Indentazione sferica nel ZnO bulk [53]
- b. Indentazione sferica nel ZnO epitassiale [54]
- c. [55]
- d. Calcolo di Hartree Fock *ab initio* [56]
- e. [57,58]
- f. Calcolo di Hartree Fock *ab initio* [59]
- g. Calcolo usando LDA e Hartree Fock [60]
- h. [61]

Il comportamento alla deformazione del bulk, per il singolo cristallo di ZnO, è stato studiato attraverso la combinazione della nano-indentazione sferica e della microscopia a forza atomica [62]. Lo ZnO esibisce deformazione plastica per bassi carichi ($> 4-13$ mN con $a \approx 4.2$ mm raggio di indentazione sferica). Il valore di durezza dello ZnO è di 5.0 ± 0.1 GPa ad una profondità di penetrazione plastica di 300nm.

2.3 L'Ossido di Zinco come biomateriale

Negli ultimi anni i materiali per applicazioni biomediche hanno ricevuto maggiore attenzione grazie alle loro importanti caratteristiche. Le nanoparticelle di ossidi metallici hanno mostrato delle proprietà interessanti nel campo del *biotech*, come antibatterici, farmaci antitumorali, *cell-imaging*, bio-sensori ecc. [63]. Le nanoparticelle di ZnO presentano grandi proprietà di assorbimento nell'UV, utilizzati per questo nel campo della cosmetica [64], caratteristiche antibatteriche e antimicrobiche, utilizzate nell'industria tessile per la produzione di deodoranti [67], oltre che nell'industria edile ed elettronica, rispettivamente nella produzione di calcestruzzo per la produzione di foto-catalizzatori, sensori ottici ecc. [64-68]. Riconosciuta come sostanza "GRAS" (*generally recognized as safe*) dalla *US Food and Drug Administration (FDA)* [69], e grazie al basso costo e alle sue basse proprietà tossiche rispetto ad altri ossidi metallici, lo ZnO ha ricevuto grande attenzione nella ricerca per applicazioni biomediche come materiale antiinfiammatorio, antitumorale, *drug delivery* e antibatterico [63,70,71]. Inoltre, sono stati pubblicati diversi report sulla citotossicità delle nanoparticelle dello ZnO nelle cellule dei mammiferi dimostrando la non tossicità per una cultura di fibroblasti cutanei umani [72], mentre esibiscono una tossicità verso le cellule di neuroblastoma [73] e cellule endoteliali vascolari [74], inducendo l'apoptosi nelle cellule staminali neurali [75]. Jones et al. ha dimostrato l'influenza della dimensione delle nanoparticelle sul tasso di mortalità delle cellule: particelle della dimensione di 8nm di ZnO presentano una maggiore tossicità rispetto a particelle di 50nm in *Staphylococcus aureus* [76].

La scelta di utilizzare le nanoparticelle di ZnO come dieta nel *feeding engineering* per i bachi da seta è dovuta principalmente alle proprietà antibatteriche che possono portare da un lato all'ottenimento di fibre con questa caratteristica, migliorando anche la resistenza dei bachi stessi. In aggiunta, le proprietà di fotoluminescenza dello ZnO (in forma di

quantum dots), può essere sfruttata per avere fibre luminescenti, che in corso di sperimentazione come sonda “*in situ*” per verificare la presenza e l’incorporazione delle nanoparticelle stesse.

CAPITOLO 3

Ossido di Zirconio

3.1 Introduzione

L'ossido di Zirconio (o Zirconia - ZrO_2) è una sostanza cristallina polimorfa e si presenta, a temperatura ambiente, come una polvere bianca ed inodore. La maggior parte del tonnellaggio usato è per applicazioni tradizionali, quali sabbie e farine per fonderia, refrattari, pigmenti ceramici, pittura e abrasivi. Tuttavia, le proprietà termomeccaniche ed elettriche delle ceramiche a base di zirconia hanno portato ad una vasta gamma di applicazioni ceramiche avanzate e ingegneristiche. I compositi contenenti ZrO_2 , ad esempio, mostrano risultati promettenti in applicazioni come utensili da taglio. Inoltre, grazie alle caratteristiche ottiche, di bio-compatibilità e di conduzione ionica, l'ossido di zirconio può essere utilizzato come elettrolita solido in sensori di ossigeno, celle a combustibile e come nano-filler in materiali a base di fibroina di seta per applicazioni biomediche.

3.2 Struttura e proprietà

Identificata nel 1789 dal chimico tedesco Martin Heinrich Klaproth [82], la Zirconia si presenta in tre polimorfismi ben definiti (figura 3.1): monoclino (m), cubico (c) e tetragonale (t). La tabella 3.1 elenca alcune proprietà tipiche della Zirconia monocristallina. Lo ZrO_2 puro presenta una fase monoclino stabile a $1170^\circ C$; sopra questa temperatura la struttura si trasforma in simmetria tetragonale e poi cubica a $2370^\circ C$ per poi fondere a $2680^\circ C$. La trasformazione da monoclino a tetragonale mostra un'isteresi, infatti durante il raffreddamento la trasformazione si verifica a $1070^\circ C$. La trasformazione in monoclino è martensitica e, durante il raffreddamento, si ottiene un aumento di volume dell'ordine del $3 \pm 4\%$. Questa espansione di volume è sufficiente a superare il limite elastico dei grani di ZrO_2 causando il cracking. In molte applicazioni la zirconia richiede

una stabilizzazione parziale o totale della struttura attraverso l'aggiunta di terre alcaline o ossidi di terre rare.

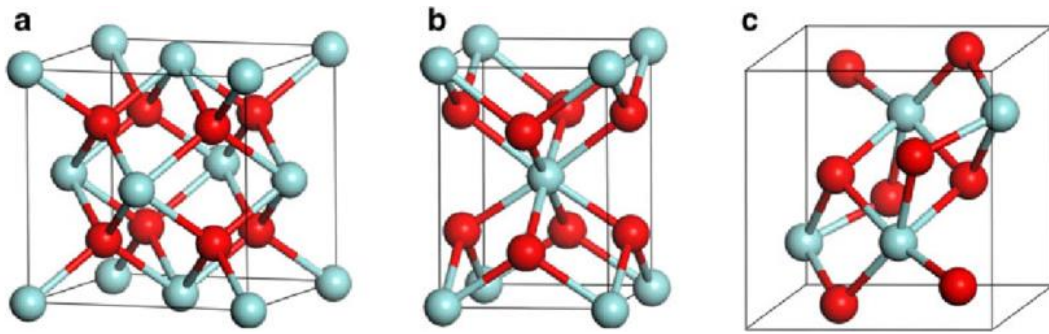


Figura 3.1: struttura della zirconia – a) cubica, b) tetragonale, c) monoclina

3.2.1 Stabilizzazione della zirconia

Il termine “stabilizzato” si riferisce ad una stabilizzazione cinetica di una soluzione solida avente struttura cubica a temperatura ambiente. La stabilizzazione completa si riferisce a composizioni che esibiscono un comportamento monofase dalla temperatura dello zero assoluto fino alla curva di *solidus*. In un primo momento l'aggiunta di queste leghe però non ha assorbito del tutto il problema alla resistenza e agli shock termici; questo dovuto al loro elevato coefficiente di dilatazione termica e alla bassa conducibilità termica. Quest'ultima tende a causare forti gradienti termici durante il riscaldamento o il raffreddamento, causando lo sviluppo di grandi deformazioni termiche ed alti stress [83]. Diversi studi [94] hanno permesso di migliorare la stabilità termica stabilizzando parzialmente la fase cubica, portando all'uso della zirconia parzialmente stabilizzata (PSZ) come materiale refrattario. L'aggiunta di stabilizzanti ossidi, come CaO, MgO, CeO₂ e Y₂O₃, alla zirconia pura permette la generazione di un materiale multifase conosciuto come Zirconia Parzialmente Stabilizzata (PSZ); l'aggiunta di questi composti modificano la microstruttura ottenendo a temperatura ambiente una concentrazione di zirconia cubica contenente in fase dispersa zirconia monoclina e tetragonale come fase minore. L'aggiunta degli stabilizzanti porta ad una tenacizzazione della zirconia in quanto la fase cubica e/o tetragonale, metastabile a temperatura ambiente, assorbe l'energia di propagazione della cricca, trasformandosi in zirconia monoclina, bloccandone la propagazione. In tabella 3.1 sono riportate le principali proprietà meccaniche della zirconia.

Tabella 3.1: Proprietà meccaniche della Zirconia

<i>General</i>	
Chemical formula	ZrO ₂ (zirconium oxide)
Names	baddeleyite
Crystal systems and space groups	monoclinic, P21/c (up to 1170°C) tetragonal, P42/nmc (1170–2370°C) cubic, Fm3m (2370–2680°C)
<i>Thermal</i>	
Melting point	2680°C
Maximum useful temperature	~ 2400°C
Thermal conductivity	1.5 W m ⁻¹ K ⁻¹ (25°C), 2 W m ⁻¹ K ⁻¹ (1000°C)
Thermal expansion coefficient (25–1000°C)	
Monoclinic	7 × 10 ⁻⁶ °C ⁻¹ (parallel to a-axis) 2 × 10 ⁻⁶ °C ⁻¹ (parallel to b-axis) 13 × 10 ⁻⁶ °C ⁻¹ (parallel to c-axis)
Tetragonal	9 × 10 ⁻⁶ °C ⁻¹ (parallel to a-axis) 12 × 10 ⁻⁶ °C ⁻¹ (parallel to c-axis)
Cubic	7.5–13 × 10 ⁻⁶ °C ⁻¹ (dependent on stabilizer type and amount)
<i>Physical/mechanical density</i>	
Monoclinic	5830 kg m ⁻³
Tetragonal	5860 kg m ⁻³
Cubic	5640 kg m ⁻³ (stabilizer type and amount can alter density)
<i>Optical (stabilized cubic form)</i>	
Refractive index	2.15–2.18
Birefringence	none
Dispersion	0.058–0.060
Spectral emittance	0.2 (visible wavelengths)

3.2.2 Biocompatibilità della Zirconia

In generale, la zirconia ha dimostrato di essere biologicamente sicura nei test di citotossicità e cito-compatibilità eseguiti in vitro usando fibroblasti 3T3 e L929, linfociti, osteoblasti umani e macrofagi [95]. I risultati dei test in vivo hanno mostrato l'assenza di effetti tossici locali o sistemici dopo l'impianto della zirconia, nonostante le differenze tra materiali, forma dei campioni, sito di impianto e metodo di valutazione selezionato [84]. Le caratteristiche meccaniche della zirconia, legate alla biocompatibilità, permettono un'applicazione in campo medico come protesi o impianti per l'odontoiatria.

3.2.3 Nanoparticelle di Zirconia

Negli ultimi anni le nanoparticelle di zirconia sono state oggetto d'intensa attività di ricerca date le innumerevoli applicazioni che possono essere sviluppate sfruttando l'elevatissima aria superficiale di tali sistemi. Infatti, queste nanoparticelle sono utilizzate su grande scala in nano-medicina, fotonica, cosmesi, catalisi e filtrazione, grazie all'elevata interazione superficiale che consente a questi dispositivi di essere utilizzati

come veicoli per il trasporto, il deposito specifico o l'assorbimento di altre molecole organiche o inorganiche [101,104]. Le caratteristiche strutturali ed ottiche delle nanoparticelle dipendono dalla temperatura di trattamento termico, dalla presenza di stabilizzanti e dal metodo di sintesi utilizzato [85]. Per la sintesi, infatti, si possono applicare diversi metodi, quali: sol-gel, sintesi chimica da vapore, combustione, microonde, condensazione di gas inerti, micro-emulsioni e sintesi idrotermali. In uno studio precedente questo lavoro di tesi [86], sono stati prodotti dei film sottili di seta caricata con ZrO₂ NPs tramite spin coating, su supporti di silicio e vetro di silice, e free-standing tramite *drop casting*. Sono state realizzate diverse composizioni partendo da una soluzione di seta al 100% fino a soluzioni contenente il 90% in massa di zirconia.

- È stato dimostrato un alto indice di rifrazione sia per i film di seta pura, ottenendo un valore di indice di rifrazione pari a 1.5, sia per il nanocomposito seta/zirconia contenente il 90% di ZrO₂, ottenendo un valore di indice di rifrazione pari a 1.8.
- Misure di FTIR hanno dimostrato l'importanza del metodo di realizzazione del nanocomposito nella struttura secondaria finale.
- Misure di trasmittanza hanno dimostrato una trasparenza, nel range del visibile, del 90% per i film sottili, mentre dell'80% per i *free-standing*. Anche in questo caso il metodo di sintesi è importante data la presenza di fenomeni di scattering della luce dovuto a superfici rugose del campione (per i film sottili inferiore all'1%) o agglomerati di nanoparticelle.

A partire da questi risultati preliminari, in questo lavoro di tesi verranno investigate le proprietà del nanocomposito di fibroina di seta/zirconia, in correlazione con la tecnica di processo e la geometria realizzata (film bidimensionali o strutture 3D), mediante l'utilizzo di diverse tecniche di caratterizzazione riportate nel § capitolo 7, *Risultati ed analisi*.

CAPITOLO 4

4.1 Materiali Compositi

I materiali compositi possono essere definiti come la combinazione di due o più materiali che risultano avere delle proprietà chimico/fisiche migliori rispetto ai medesimi componenti usati singolarmente. Questi sono costituiti da:

- Matrice, può essere polimerica, metallica o ceramica. Questa protegge il rinforzo da danni superficiali e dall'interazione con l'ambiente, ostacolando la propagazione di cricche, in virtù della sua duttilità e plasticità, che potrebbero dare origine a rottura catastrofica
- Rinforzo, offrono un aumento delle proprietà del materiale, può avere diverse geometrie e dimensioni e, solitamente, hanno proprietà meccaniche superiori rispetto alla matrice.
- Additivi o filler, non offrono proprietà meccaniche e vengono utilizzate per diminuire il costo del prodotto finale ed aumentare la stabilità dimensionale.

Solitamente la matrice è una fase continua ed omogenea e racchiude al suo interno la fase rinforzante, separate da una interfaccia ben distinta. Nel caso di compositi a fibre, è importante che il legame adesivo interfacciale matrice/rinforzo sia elevato per minimizzare il fenomeno del pull-out (sfilamento) delle fibre; un buon legame è essenziale per massimizzare la trasmissione dello sforzo dalla matrice debole al rinforzo. I principali vantaggi dei materiali compositi sono la loro elevata resistenza e rigidità, combinate con bassa densità, rispetto ai materiali sfusi, consentendo una riduzione del peso del prodotto finale. La fase di rinforzo, di solito, ha delle proprietà meccaniche superiori rispetto alla matrice, e fornisce resistenza meccanica e rigidità.

I rinforzi possono essere particelle sferiche, fibre, tubi o avente altra geometria regolare o irregolare e il tipo e la quantità di rinforzo determina le proprietà finali del composito. In figura 4.1 viene mostrato che la maggiore resistenza e modulo si ottiene utilizzando delle fibre continue nel composito. Il limite massimo che può essere aggiunto alla matrice è del 70% in volume in quanto, per valori maggiori, la quantità di matrice è troppo poca per supportare le fibre e trasmettere le tensioni matrice/fibre.

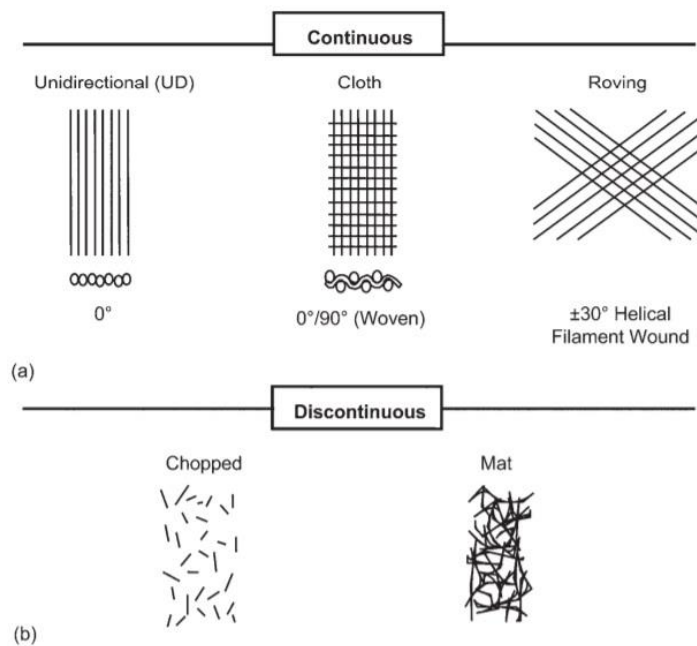


Figura 4.1: Tipi di rinforzi in un composito

4.2 Materiali nanocompositi

Il campo dei nanocompositi coinvolge lo studio di materiali multifase dove almeno uno delle fasi costituenti ha una dimensione inferiore ai 100nm. La caratteristica dei nanocompositi risiede nelle loro multifunzionalità, grazie alla possibilità di realizzare combinazioni uniche, in termini di proprietà, impossibile da raggiungere attraverso materiali tradizionali. Queste proprietà derivano dall'aumento della area superficiale e dalla presenza di effetti quantistici, dovuti all'interazione interfacciali tra la fase rinforzante, dispersa all'interno della matrice, e la matrice stessa [87]. In questo caso i nano-rinforzi possono essere raggruppati in tre categorie generali

- Nano cariche 3D, sono particelle isodimensionali (nanoparticelle o nanosfere), hanno caratteristiche equiassiali con diametro <100 nm.
- Fibre o tubi, aventi diametro minore di 100nm e un *aspect ratio* maggiore di 100
- Nano cariche a forma di piattelli, avente spessore tipicamente dell'ordine di 1nm e un *aspect ratio* nelle altre due direzioni di almeno 25

Il cambiamento delle proprietà dipende fortemente da una dimensione critica [88]:

- Attività catalitica se <5 nm

- Mutamenti dell'indice di rifrazione <50 nm
- Effetto super-paramagnetico, irrobustimento meccanico e limitazione delle dislocazioni della matrice <100nm

La presenza di dimensioni nanometriche aumenta di molto il rapporto superficie/volume aumentando di conseguenza l'interazione dell'interfaccia matrice/rinforzo. L'effetto positivo sulle proprietà della matrice si raggiunge grazie ad una uniforme dispersione del rinforzo nanometrico; questo non è facile da raggiungere in quanto le nanoparticelle tendono ad agglomerarsi. L'effetto di agglomerazione/aggregazione aumenta per maggiori concentrazioni disperse e per minori dimensioni della carica, portando ad un peggioramento delle proprietà [89].

I nanocompositi possono essere divisi in tre grandi categorie:

- *Ceramic Matrix Nanocomposites* (CMNC): materiali avente buona stabilità termica, chimica e buona resistenza all'usura, ottenendo un aumento delle proprietà meccaniche con un incremento della tenacità.
- *Metal Matrix Nanocomposites* (MMNC): materiali avente una matrice metallica duttile nella quale sono dispersi i rinforzi nanodimensionali. Combinando le caratteristiche metalliche e ceramiche si ottengono dei prodotti ad alta resistenza e alto modulo elastico.
- *Polymer Matrix Nanocomposites* (PMNC): materiali avente bassa densità e buona duttilità, solitamente presentano un modulo elastico inferiore rispetto ai sopracitati

4.1.1 Caratteristiche del nanocomposito a matrice biopolimerica

I bio-nanocompositi presentano molti vantaggi innati, come le caratteristiche rinnovabili, biocompatibili, biodegradabili, meccaniche e multifunzionali, rispetto ai materiali a base di polimeri sintetici. I componenti sintetici possono essere incorporati nella matrice del biopolimero con un controllo della distribuzione e organizzazione altamente ordinata, a seconda delle applicazioni richieste. I benefici funzionali sono molteplici e spaziano dal campo medico a quello meccanico e ottico. Essi infatti possono essere conduttivi, otticamente attivi e biodegradabili, nonché presentare una ridotta citotossicità e una biocompatibilità migliorata a causa dell'incorporazione di componenti di derivazione biologica. La progettazione programmata e controllata di bio-interfacce funzionali tra

componenti sintetici e biologici è altamente desiderata e coinvolge molte nuove morfologie come le strutture *core-shell* [114,115] che offrono bio-funzionalità aggiuntiva, oltre a mantenere uniche le proprietà delle nanostrutture sintetiche incorporate (come ad esempio proprietà magnetiche o ottiche). La matrice bio-polimerica permette inoltre di poter sintetizzare dei bio-nanocompositi in grado di imitare piante e animali che si adattano agli ambienti esterni modificando la loro forma o il colore [116-121]. Un'altra caratteristica importante di questi materiali è la capacità adattiva e di autoguarigione [122], permettendo agli organismi di rigenerare strutture complesse come pelle e corteccia dopo danni esterni; questi inoltre possono presentare un comportamento reattivo al pH, temperatura, umidità e luce, al fine di modificare le proprietà meccaniche e il comportamento alla bagnabilità [121-123].

È importante sottolineare che a fine vita, i bio-nanocompositi possono essere prontamente degradati nei loro costituenti organici. Questo permette di effettuare dei processi *green*, avente una prospettiva rinnovabile e biodegradabile, che possono significativamente ridurre le emissioni di anidride carbonica e la produzione di rifiuti pericolosi. Per realizzare o migliorare questi vantaggi ecologici, vari componenti funzionali, che possiedono interazioni forti e complementari con i biopolimeri, devono essere incorporati nella matrice del biopolimero per ottenere il miglioramento meccanico desiderato o altre funzionalità aggiuntive. In figura 4.2 vengono mostrate alcuni esempi di progettazione e fabbricazione dei bio-nanocompositi per applicazioni strutturali e funzionali.

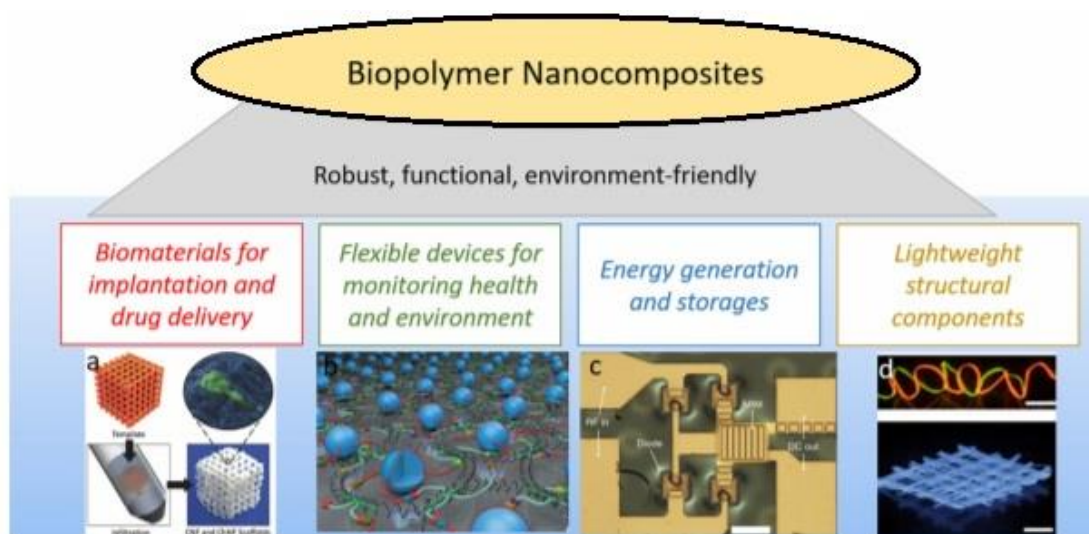


Figura 4.2: progettazione e fabbricazione dei bio-nanocompositi per diverse applicazioni strutturali e funzionali.

4.3 Nanocompositi a base di seta

Notevoli risultati sono stati ottenuti con i compositi polimerici che consentono il miglioramento delle proprietà termiche, meccaniche ed elettriche per applicazioni in settori quali costruzione, elettronica, prodotti di consumo, sensori e attuatori, applicazioni biologiche, energetiche ed altri [25,90,91]. Negli ultimi anni l'obiettivo recente è quello di ottenere materiali compositi ad alte prestazioni a base di polimeri e biopolimeri naturali, al fine di ridurre l'uso di polimeri ottenuto da petrolio greggio, mantenendo allo stesso tempo prestazioni funzionali. La produzione di polimeri da fonti biologiche, come amidi, chitosano, collagene, PLA o seta di fibroina, è quella che ha ricevuto più attenzione. L'utilizzo di grafene "green" attraverso la fotoriduzione di ossido di grafite, miscelata con le proteine della fibroina di seta in soluzione acquosa, ha permesso di ottenere dei biomateriali dalle proprietà meccaniche e termiche interessanti, aumentando di circa 5,8% il modulo elastico della seta pura rispetto a quella caricata con solo lo 0,5% di grafene [105]; inoltre, lo studio sulle cellule di fibroblasti hanno anche dimostrato che i materiali di seta-grafene possono migliorare significativamente l'adesione, la crescita e la proliferazione cellulare [105]; l'utilizzo di grafene ossido al 85% wt ha permesso inoltre la sintesi di strutture idrogel ottenendo dei valori di resistenza a trazione di 221 ± 16 Mpa, una deformazione limite dell' $1.8 \pm 0.4\%$ e un modulo elastico di 17.2 ± 1.9 GPa, attribuibile all'alto contenuto in peso di GO, alla sua struttura e alla forte interazione di legame idrogeno tra le catene SF e i fogli di GO [110]. Sono state sviluppate compositi idrogel preparati a 37°C e attraverso metodo freeze-dry, intercalando nella matrice di SF delle nanoparticelle di idrossiapatite al 15% in peso, ottenendo rispettivamente un modulo di compressione pari a 109.8 kPa e 111.6 kPa [111]; Le catene proteiche della seta forniscono la capacità di poter mantenere e preservare la funzione biochimica dei componenti biologici (quali enzimi e anticorpi) all'interno della struttura del materiale; queste proprietà, legate alle proprietà ottiche di alta trasparenza nel range del visibile dei film in fibroina di seta, unite alle caratteristiche di flessibilità, biodegradabilità e biocompatibilità, hanno permesso lo sviluppo di reticoli di diffrazioni basato sul sangue, attraverso il *casting* di una miscela emoglobina/SF [106]; elementi riscaldanti attivati dalla luce per alimentare in modalità wireless dei micro dispositivi, tramite drogaggio di tessuti di seta con nanoparticelle di oro [107]; fluorescenza localizzata del film di seta

attraverso drogaggio di questa con dei fluorofori [108]; l'utilizzo di TiO_2 e $\text{TiO}_2\text{-F}$ al 5, 10, 15, 20% w/v nella matrice di fibroina di seta attraverso delle strutture *scaffold* ha permesso di ottenere dei nanocompositi per applicazioni di tessuti ossei, permettendo di ottenere nei casi limite un aumento della resistenza a compressione dell'83% e del modulo a compressione del 108%, con una diminuzione del peso del 70% [109]; Sono stati fabbricati da una soluzione di SF-idrotalcite, attraverso l'utilizzo di grafene ossido, dei film free-standing organici-inorganici trasparenti e biodegradabili, usando una procedura drop casting: aggiungendo una concentrazione di HTlc in un range 1.2-1.8% è stato possibile aumentare il modulo elastico da 2278Mpa, per i compositi di sola SF, a 2812Mpa, per i nanocompositi a base di SF-HTlc1.8. La diminuzione della deformazione e dello stress a rottura ha portato ad un comportamento fragile del nanocomposito, ottenendo però un notevole successo in applicazioni per il packaging, dispositivi medicali e nei sensori [112]; Strutture 2D di SF rinforzati con il 2 w/w% *nanowhiskers* di cellulosa hanno permesso di ottenere un aumento delle proprietà meccaniche due volte superiori a quelle senza rinforzo, ottenendo una potenziale applicazioni di catalisi, sistemi di filtrazione e in campo medico [113].

CAPITOLO 5

Materiali e metodi

Nel seguente capitolo verranno descritti i metodi e i materiali utilizzati in questo lavoro. Nella prima parte verrà illustrato il metodo di estrazione della fibroina dalle fibre di seta, la sintesi delle nanoparticelle di ossido di zinco e il set-up utilizzato per la formazione dei nanocompositi con l'ossido di zirconio. Successivamente verranno descritte le tecniche utilizzate per la realizzazione dei film, attraverso il metodo *free standing* e degli *scaffold*. Nella seconda parte invece verranno descritte le tecniche utilizzate per la caratterizzazione dei campioni.

5.1 Sintesi dei materiali e set-up

5.1.1 Fibroina di seta

La soluzione di fibroina di seta viene ottenuta partendo dai bozzoli grezzi del *Bombyx mori*, seguendo il protocollo messo a punto da Kaplan et al. [90]. Tale protocollo si articola in tre fasi consecutive:

- Eliminazione della sericina (*degumming*)
- Dissoluzione della fibroina in litio bromuro
- Dialisi della soluzione di fibroina e litio bromuro al fine di ottenere una soluzione acquosa di fibroina

I bozzoli grezzi vengono forniti dalla stazione sperimentale di bachicoltura di Padova. Di seguito viene riportato in dettaglio il protocollo seguito, designato per lavorare un lotto di cinque grammi di bozzoli di seta; per quantità superiori è sufficiente effettuare una proporzione del volume in modo appropriato.

Reagenti:

- Bozzoli di seta (Tajima Shoji o equivalente);
- Carbonato di sodio (Na_2CO_3 , Sigma-Aldrich®);
- Acqua bidistillata o milliQ;
- Bromuro di litio (LiBr, Sigma-Aldrich®);

Set-up:

Estrazione fibroina

- Becher di vetro 2L;
- Hot plate;
- Bacchetta di vetro;
- Stirring e ancorotta magnetica

Dissoluzione in LiBr

- Cilindro graduato (50 mL);
- Becker di vetro (50 mL)
- Pipetta volumetrica da 1000-100 μ L;
- Stirring e ancorotta magnetica;

Dialisi e centrifugazione

- Sacca da dialisi (Fisherbrand®);
- Pipetta volumetrica da 100-10 μ L;
- Pipette pasteur;
- Stirring e ancorotta magnetica;
- Centrifuga;
- Falcon ed eppendorf;
- Micro filtri (Millex®-SV 5.00 μ m – PVDF Membrane)
- Siringhe (NIPRO 10 mL)

Metodi:

Il *degumming* della seta, che è la fase iniziale del protocollo, è un passaggio necessario per rendere la seta biocompatibile [3], in quanto la presenza di sericina stimola la proliferazione di fibroblasti. Per fare questo vengono bolliti 2 litri di acqua milliQ dove vengono sciolti 4.24 gr di carbonato di sodio (Na_2CO_3) al fine di ottenere una soluzione 0.02M. Nel mentre, 5 gr di bozzoli di seta grezzi vengono tagliati in piccoli pezzi e immersi nella soluzione salina, una volta che questa è arrivata a bollore. La seta viene lasciata bollire per 30 minuti e mescolata attraverso stirring e bacchetta di vetro, così da

migliorare la dispersione della fibroina. Successivamente il surnatante viene rimosso mentre la seta viene risciacquata e strizzata ogni 20 minuti per tre volte, in un becker contenente 1 L di acqua bidistillata, mescolandola ogni tanto con una spatola. Al termine del risciacquo la seta viene strizzata e lasciata asciugare in aria sotto cappa per 48 ore. Successivamente la seta sgommata viene pesata e sciolta in una soluzione LiBr 9.3 M a 60°C per 4 ore, in modo da ottenere una soluzione finale con il 20% w/v di fibroina; questa in fine viene inserita in una sacca da dialisi, precedentemente idratata in acqua bidistillata, e immersa in un becker contenente 1 L di acqua milliQ per 48 ore agitata attraverso l'utilizzo di uno stirring magnetico, effettuando nove ricambi di acqua ad intervalli crescenti. A fine dialisi la soluzione viene versata nelle eppendorf e centrifugata due volte ad una temperatura di 5 °C e ad una velocità di 11000 rpm per venti minuti, al fine di eliminare le impurità residue. Dopo la centrifuga la soluzione viene versata in una falcon e filtrata attraverso l'utilizzo di siringa e microfiltro. La fibroina ottenuta deve essere conservata ad una temperatura di circa 4-7 °C, al fine di evitare fenomeni di gelificazione; questa può essere conservata per circa 30-60 giorni, tempo che dipende da diversi fattori, come la concentrazione della soluzione, la purezza e la temperatura. In figura 5.1 si riporta una rappresentazione schematica del processo di realizzazione della soluzione di fibroina di seta

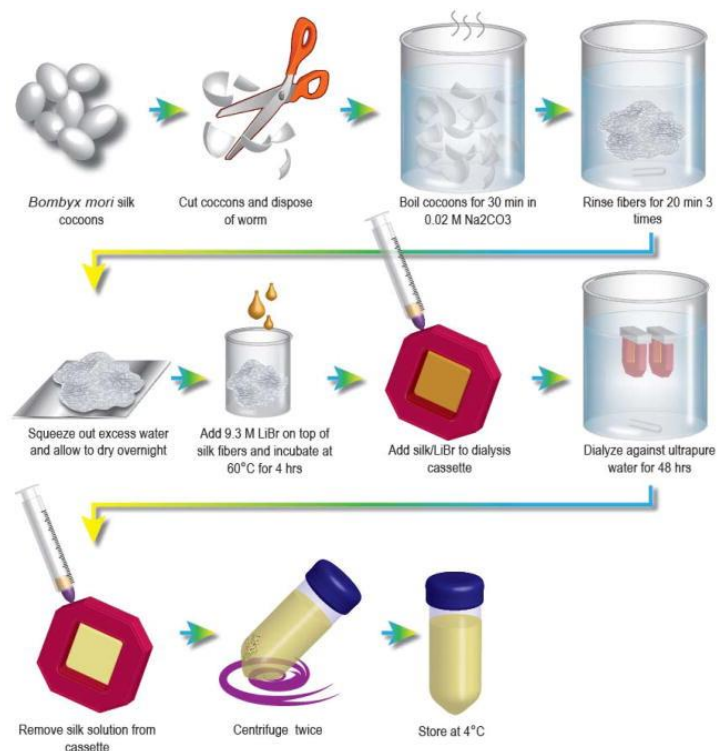


Figura 5.1: rappresentazione schematica del processo di realizzazione della soluzione di fibroina

5.1.2 Sintesi nanoparticelle di Ossido di Zinco

Set Up

- Beuta graduata
- Hot plate
- Becker
- Pipetta Pasteur
- Spatola e pinzetta
- Essiccatore
- stirring e ancoretta magnetica
- falcon
- centrifuga

La sintesi delle nanoparticelle di ZnO in questo lavoro è un adattamento del protocollo messo a punto da Gamelin et al [52]: vengono pesati 500 mg di Zinco acetato diidrato ($\text{Zn}(\text{Ac})_2$) e disciolti, attraverso stirring e ancoretta magnetica, all'interno di una beuta graduata contenente 22.5 mL di dimetilsolfossido (DMSO). Allo stesso modo vengono disciolti 750 mg di tratrametilammonio idrato (TMAH) in una beuta contenente 7.5 mL di etanolo (EtOH). Quest'ultima soluzione viene aggiunta goccia a goccia (circa 2cc/min), attraverso pipetta pasteur, nella soluzione di zinco mantenuta in vigorosa agitazione a temperatura ambiente; dopo 10 minuti la soluzione viene scaldata a 40°C per 1 ora al fine di promuovere il meccanismo di *Ostwald ripening* delle particelle. Dopo un'ora a 40°C la soluzione viene fatta raffreddare a temperatura ambiente e viene fatta precipitare utilizzando un'agente cappante (2-butanone) attraverso centrifuga a 2500 rpm per 5 minuti, per poi ridisperderle in etanolo.

5.1.2.1 Dieta dei bachi da seta

È stata effettuata una tesi in valutazione sulle larve alimentate con una dieta artificiale al 25%. Inizialmente per ognuna tesi sono state svolte tre repliche da 100 larve, ognuna al primo stadio:

- i. SF-Controllo: dieta di controllo con formulazione standard al 25%
- ii. SF-Etanolo: come al punto "i" ma addizionata con 20 ml di EtOH al 95%
- iii. SF-ZnO: come al punto "i" ma addizionando le ZnO NPs in 20 ml di EtOH.

I risultati verranno discussi nel § capitolo 7, *Risultati e analisi*.

5.2 Nanoparticelle di zirconia

Le nanoparticelle di zirconia, utilizzate in questo lavoro, hanno una dimensione media di 5nm e sono state fornite in soluzione acquosa in concentrazione 134% w/v dall'azienda Mathym. Per la realizzazione del nanocomposito la soluzione acquosa di zirconia viene diluita con una soluzione NH₃ 0.1 M, ottenendo una concentrazione del 50% w/v; questa viene successivamente sonicata per 5 minuti al fine di evitare agglomerati e stoccata ad una temperatura di 4-7 °C.

5.1.3 Sintesi nanocompositi seta/zirconia

Sono stati realizzati dei nanocompositi seta/zirconia sotto forma di membrana e *scaffolds*. Nel primo caso sono state miscelate due soluzioni acquose, rispettivamente avente una concentrazione del 50% w/v di zirconia e dell'8% w/v di fibroina di seta; in questo senso sono state realizzate varie formulazioni della soluzione, modulando la concentrazione in volume fibroina/zirconia, al fine di realizzare diversi campioni attraverso metodo *free standing* tramite *drop casting* controllato su una superficie rivestita di PDMS. In tabella 5.2 si riportano le quantità utilizzate per un volume di riferimento pari a 3 mL

Tabella 5.2: Quantità di soluzione per la realizzazione dei campioni *free standing*

Concentrazione % SF	Concentrazione % ZrO ₂	Quantità SF [mL]	Quantità ZrO ₂ [mL]	Umidità %	Temperatura [C]	Tempo [giorni]
100	0	3	0	20:30	19:21	2
90	10	2,948	0,052	20:30	19:21	2

Gli *scaffolds* sono stati prodotti, dopo aver miscelato le due soluzioni acquose a diverse concentrazioni volumetriche fibroina/zirconia, con due metodi diversi tra loro: il primo metodo avviene per *solvent casting*, ed in particolare *leachinig method*, e prevede l'utilizzo di NaCl, per la creazione della struttura porosa, mentre il secondo metodo avviene per liofilizzazione della miscela precedentemente citata. Verrà indagata la percentuale massima di zirconia per entrambi i metodi e successivamente verranno

caratterizzati i materiali. In tabella 5.3 e 5.4 sono riportate le quantità utilizzate per un volume di riferimento pari a 2 mL per i rispettivi metodi di sintesi.

Tabella 5.3: Quantità di soluzione utilizzata per la realizzazione dei campioni mediante Solvent Casting

<i>Solvent Casting</i>						
% SF	%ZrO ₂	Quantità SF [mL]	Quantità ZrO ₂ [mL]	Tempo gelificazione [ore]	Tempo risciacquo [ore]	Quantità NaCl [gr]
100	0	2	0	26	48	3
90	10	1,974	0,026	26	48	2,96
70	30	1,902	0,098	26	48	2,85
50	50	1,786	0,214	26	48	2,68
30	70	1,562	0,438	26	48	2,34

Tabella 5.4: Quantità di soluzione utilizzata per la realizzazione dei campioni mediante liofilizzazione

<i>Liofilizzazione</i>					
% SF	%ZrO ₂	Quantità SF [mL]	Quantità ZrO ₂ [mL]	Tempo <i>freeze-dry</i> [min]	Tempo Liofilizzazione [ore]
100	0	2	0	5	24
90	10	1,974	0,026	5	24
70	30	1,902	0,098	5	24
50	50	1,786	0,214	5	24
30	70	1,562	0,438	5	24

5.1.4 Film *free-standing* mediante *drop casting*

Il *drop-casting* è una tecnica che consente la realizzazione di film o membrane (figura 5.2). Si versano alcuni mL di soluzione su una superficie piana e si lascia evaporare il solvente così da far avvenire la gelificazione. La semplicità del processo e l'assenza di scarti rende questo metodo vantaggioso per la creazione di film; lo svantaggio, invece, è la difficoltà di controllarne lo spessore e la qualità superficiale.

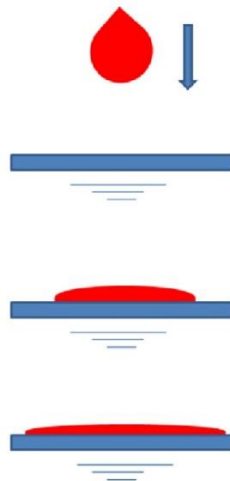


Figura 5.2: rappresentazione schematica del metodo *drop-casting*

Al fine di poter facilmente staccare la soluzione, lo stampo è stato realizzato rivestendo dei *petri dish* con uno spessore di 2mm in PDMS (polidimetilsilossano), materiale superidrofobico. Quest'ultimo è stato creato partendo da una miscela di polimero siliconico (Sylgard® 184, Sigma-Aldrich®) e un agente di *curing* in rapporto 10:1. La soluzione di polimero e reticolante viene lasciata reticolare, su una superficie perfettamente in bolla, in un forno a 60°C, al fine di ottenere uno stampo piano in modo da non causare problemi di omogeneità dello spessore del campione. Attraverso questo metodo sono stati prodotti dei campioni *free-standing* con uno spessore di 15-50 μm . La soluzione a diversi rapporti seta/zirconia è stata versata sulla superficie del substrato posto all'interno di un sistema a temperatura e umidità controllata, rispettivamente 25 gradi con un'umidità del 20-30%. La dimensione del campione, lo spessore e il tempo di essiccazione, dipendono dalla quantità di soluzione utilizzata, dalla concentrazione della fibroina di seta, dal contenuto di zirconia e dall'area superficiale della superficie di PDMS. In figura 5.3 vengono mostrati due campioni rispettivamente di SF 100% e 90%SF-10%ZrO₂



Figura 5.3: Campioni 100%SF (sinistra) 90%SF-10%ZrO₂ (destra)

5.1.5 Sintesi di *scaffolds* mediante *solvent casting*

Set-up:

Estrazione fibroina

- Contenitore plastica cilindrico 2mL;
- NaCl Sigma-Aldrich®;
- Pipetta volumetrica 1000-100 μ L;
- Forno
- Becker 2L
- Falcon

Per la sintesi degli *scaffolds* mediante *solvent casting* è stato utilizzato del sale NaCl, al fine di generare i micropori all'interno della struttura tridimensionale; la dimensione di quest'ultimi saranno leggermente più piccole delle particelle del sale, in quanto esso verrà parzialmente disciolto durante la gelificazione della fibroina (figura 5.4).

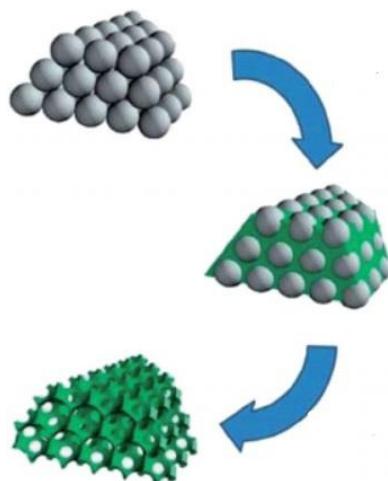


Figura 5.4: Rappresentazione schematica del processo *solvent casting*

Viene pesato del sale, con una dimensione delle particelle di 500 - 750 μm per ogni contenitore, in rapporto in peso di seta 25:1. Con una micropipetta sono stati prelevati 2mL di soluzione, come da tabella 5.3. La grandezza dello *scaffold* può variare in base al tipo di stampo utilizzato, in questo senso è stato utilizzato uno stampo cilindrico da 2 mL. E' stata versata gentilmente la soluzione di fibroina/zirconia e successivamente il sale, facendo attenzione a disperderlo in modo uniforme attraverso rotazione dello stampo. Quest'ultimo in fine è stato tappato e messo in forno ad una temperatura di 60°C per 24h al fine di far avvenire una completa gelificazione della fibroina di seta. Successivamente i contenitori sono stati inseriti in un backer contenente 2L di acqua milliQ agitata attraverso stirring; al fine di disciogliere completamente il sale sono stati effettuati due ricambi di acqua per due giorni. Gli *scaffolds* ottenuti possono essere conservati in delle falcon da 50mL a 4°C oppure fatti essiccare e conservati a temperatura ambiente. In figura 5.5 vengono mostrati dei campioni in fibroina di seta, rispettivamente 100%SF, 90%SF-10%ZrO₂, 70%SF-30%ZrO₂, 50%SF-50%ZrO₂, ottenuti mediante *solvent casting* con successiva essiccazione in aria.

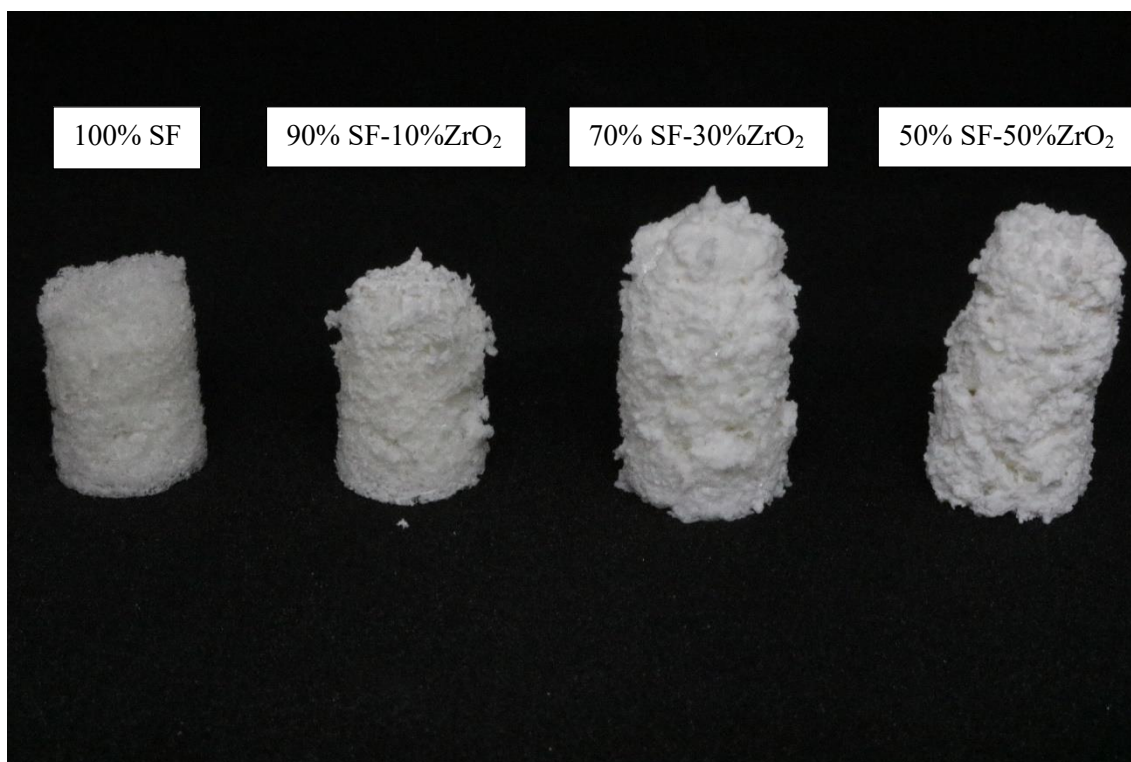


Figura 5.5: Campioni ottenuti mediante solvent casting: 100%SF, 90%SF-10%ZrO₂, 70%SF-30%ZrO₂, 50%SF-50%ZrO₂

5.1.6 Sintesi di *scaffolds* mediante liofilizzazione

Set-up:

- Contenitore alluminio 5mL;
- Pipetta volumetrica 1000-100 μ L;
- Azoto liquido 250 mL
- Liofilizzatore
- Pinze
- Contenitore vetro
- Contenitore per liofilizzatore

La sintesi degli *scaffolds* mediante liofilizzazione è avvenuta attraverso tecniche di *freeze-drying*: I campioni sono stati immersi in azoto liquido per 5 minuti e poi liofilizzati ad una temperatura di -53°C ad una pressione di 0.220 mBar per 24 ore, utilizzando uno strumento LABCONCO FreeZone 2,5. Sono state prodotte diverse concentrazioni di

soluzione espresse in tabella 5.4. In figura 5.6 vengono mostrati i campioni, rispettivamente 100%SF, 10%ZrO₂90%SF, ottenuti mediante liofilizzazione.

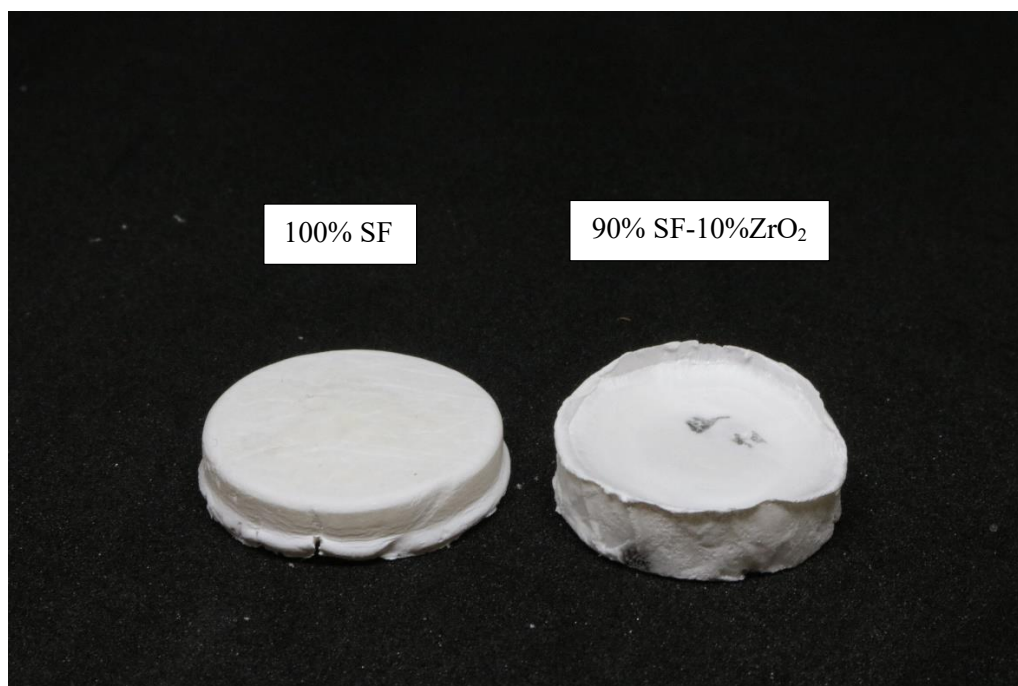


Figura 5.7: Campioni 100%SF e 90%SF-10%ZrO₂ ottenuti attraverso *freeze-dry* e successiva liofilizzazione

CAPITOLO 6

Tecniche di caratterizzazione

6.1 Spettroscopia FTIR

La spettroscopia IR è una tecnica analitica che si basa sull'interazione fra la radiazione elettromagnetica e la materia. In particolare, la radiazione infrarossa è compresa nella zona dello spettro elettromagnetico che si trova tra le regioni del visibile e delle microonde (figura 6.1)

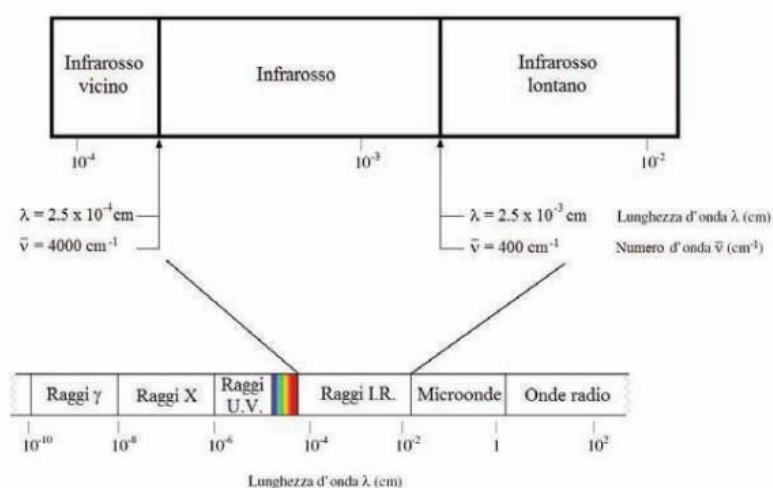


Figura 6.1: Collocazione della radiazione infrarossa nello spettro elettromagnetico

I segnali relativi ai gruppi funzionali vengono chiamate *finger print*, e sono caratteristici della molecola nel suo complesso. I parametri che caratterizzano una banda di assorbimento IR sono:

- Posizione espressa come numero d'onda ν max;
- Intensità, che esprime l'altezza del picco di assorbimento (*strong, medium, weak*);
- La forma (*sharp, broad*).

Quando una molecola assorbe un fotone, ad una energia ben definita, si ha che il suo livello energetico passa da uno stato fondamentale ad uno eccitato.

La tecnologia FTIR (Fourier Transform Infrared Spectroscopy) utilizza un dispositivo meccanico chiamato interferometro di Michelson (Figura 6.2)

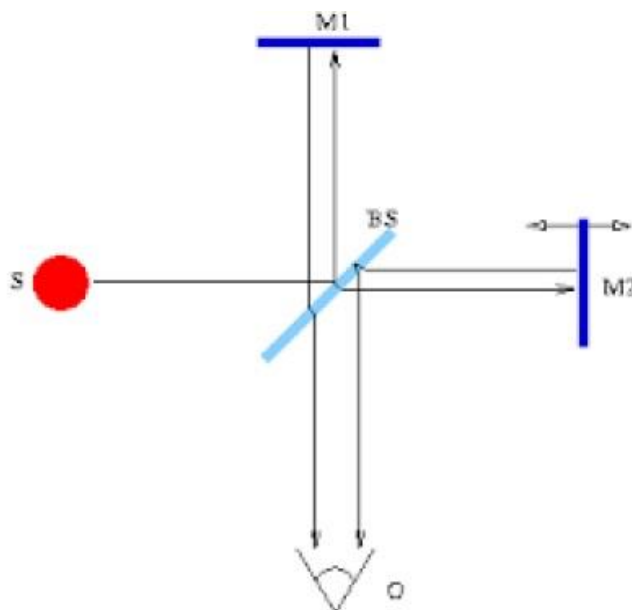


Figura 6.2: Schema rappresentativo di un interferometro di Michelson

L'interferometro permette la scansione di tutte le frequenze presenti nella radiazione IR generata dalla sorgente, originando una interferenza costruttiva o distruttiva con il raggio riflesso da uno specchio fisso, ottenendo un interferogramma che mostra la rappresentazione dell'intensità nel dominio del tempo [96]. Le prestazioni di questa tecnica sono elevate, ottenendo un miglior rapporto segnale/rumore tempi di analisi ridotti, ottenendo una luce diffusa ed un potere risolutivo costante lungo tutto lo spettro IR. I dati di assorbimento possono essere registrati in termine di trasmittanza percentuale o di assorbanza, attraverso le seguenti relazioni:

$$T\% = \frac{I_{trasmessa}}{I_{incidente}} * 100 \quad (6.1)$$

$$Abs = \log_{10}\left(\frac{I_{trasmessa}}{I_{incidente}}\right) \quad (6.2)$$

6.2 Modalità Riflettanza Totale Attenuata (ATR)

In questa tecnica la radiazione infrarossa passa attraverso un particolare cristallo, trasparente all'IR, che permette all'onda elettromagnetica di essere riflessa al suo interno molte volte. La superficie del campione è pressata sulla superficie superiore del cristallo (ZnSe o Ge), quindi la radiazione IR dallo spettrometro entra nel cristallo, si riflette

attraverso il cristallo e penetra all'interno del campione per qualche frazione di micron venendone in piccola parte assorbita (o attenuata). Dopo alcune riflessioni l'attenuazione dell'intensità del raggio IR è sufficiente ad essere rilevata dallo spettrofotometro, dandone uno spettro FT-IR in riflettanza totale attenuata (ATR). Quando un fascio di luce di propaga da un mezzo otticamente più denso ad uno meno denso esiste un angolo di incidenza, detto angolo critico, superato il quale si verifica il fenomeno della riflessione totale interna (figura 6.3). Nel mezzo a minore indice di rifrazione si crea una regione in cui è presente un'onda elettromagnetica (onda evanescente), che penetra nel mezzo per una frazione della sua lunghezza d'onda; all'aumentare della distanza cristallo/superficie campione l'onda evanescente decade in modo esponenziale [96]

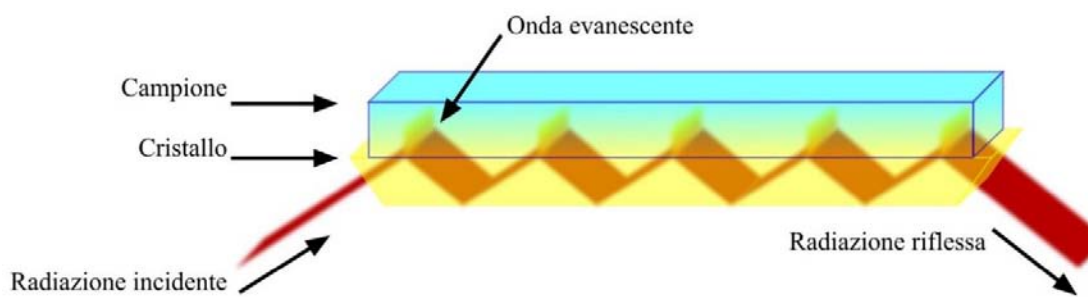


Figura 6.3: Schema rappresentativo di funzionamento della spettroscopia FTIR-ATR

Questa tecnica è molto usata per analisi delle superfici dei materiali e per la loro caratterizzazione, attraverso un buon contatto tra campione e cristallo. Inoltre, grazie alla creazione di una vasta banca dati di spettri FTIR-ATR di materiali di riferimento, è possibile confrontare lo spettro di un materiale incognito con una *library* che spesso fornisce una stretta corrispondenza con uno degli standard presenti. Questa tecnica richiede poca (o nessuna) preparazione del campione, non è distruttiva, ed è possibile eseguire delle reazioni chimiche durante il loro svolgersi senza perturbare il sistema. In questo lavoro è stato utilizzato uno spettrofotometro FTIR Jasco-4200 type A, effettuando misure sulle fibre dei bachi da seta, sulle membrane e sugli *scaffold*, in un range di 4500-400 cm^{-1} con una risoluzione di 2 cm^{-1} e una velocità di scanning pari a 2 mm/sec.

6.3 Spettroscopia Uv-Vis-NiR

La spettroscopia Uv-Vis-NiR è una tecnica spettroscopica di assorbimento molecolare, che sfrutta l'interazione di una radiazione elettromagnetica, tipicamente compresa tra 200-2500 nm, con una molecola organica per studiare i fenomeni associati all'assorbimento e all'emissione da parte delle molecole di quantità discrete di energia (quanti) capace di variarne l'energia potenziale, essa prescinde quindi dall'energia cinetica traslazionale che varia in maniera continua. L'assorbimento di quanti di energia provoca il passaggio di una molecola da un livello ad un altro eccitato, caratterizzato da un maggiore contenuto energetico. L'intensità della luce trasmessa attraverso il campione viene comparata con la radiazione incidente, e questo viene effettuato attraverso lo spettrofotometro. Il rapporto tra le due intensità è definito trasmittanza ed è legato all'assorbanza secondo l'equazione 6.1; 6.2. Lo spettrofotometro UV-Vis si può schematicamente suddividere nei seguenti componenti:

- sorgente di energia radiante nello spettro UV-Vis
- monocromatore, ha lo scopo di isolare un intervallo ristretto di radiazioni emesse centrato nella lunghezza d'onda di interesse
- cuvetta
- rivelatore

Un esempio di spettrofotometro UV-Vis è rappresentato in figura 6.4.

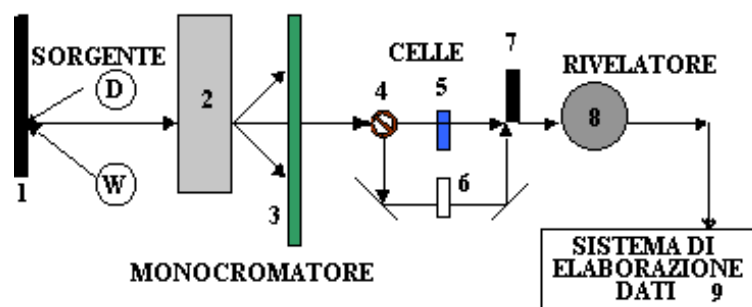


Figura 6.4: Rappresentazione schematica del funzionamento di uno spettrofotometro

La sorgente luminosa possono essere lampade a incandescenza al tungsteno, lampade al deuterio e allo xeno. Il fascio di luce incontra un monocromatore che scompone il singolo fascio di luce policromatica in più fasci di luce monocromatica attraverso l'utilizzo di specchi concavi e da reticoli in riflessione, permettendo così l'analisi dell'intensità in

funzione della lunghezza d'onda. Il fascio monocromatico colpisce successivamente il campione da analizzare, posto in cuvette trasparenti alla lunghezza d'onda alla quale si lavora. I rivelatori in fine elaborano il fascio di luce trasmesso attraverso dispositivi fotosensibili che sfruttano l'effetto fotoelettrico. Lo schema ottico può essere a singolo raggio oppure a doppio raggio, permettendo di fare analisi quantitative e qualitative. In questo lavoro è stato utilizzato uno spettrofotometro Jasco V-650, effettuando misure in assorbimento su soluzioni di EtOH-ZnO e DMSO-ZnO, che verranno discusse nel § capitolo 7, *Risultati e analisi*, in un range di 850-190 nm ad una velocità di scanning pari a 400 nm/min.

6.4 Spettroscopia di fluorescenza

La fluorescenza è un processo di decadimento radioattivo per cui una molecola assorbe radiazioni nel campo ultravioletto e le emette nel visibile, con una frequenza più bassa di quella iniziale. Quando una molecola assorbe un fotone si eccita e passa dal livello energetico fondamentale a quello eccitato, attraverso una transazione elettronica. All'interno di ogni stato eccitato sono presenti vari livelli vibrazionali. Attraverso urti con altre molecole, la molecola eccitata comincia a perdere energia vibrazionale fino a che raggiunge il più basso stato vibrazionale del livello eccitato. A questo punto la molecola decade a uno dei livelli vibrazionali dello stato fondamentale, emettendo in questo processo un fotone; avendo in parte già dissipato l'energia acquisita, il salto energetico $E' \rightarrow F$ sarà minore del salto $F \rightarrow E$ e quindi la radiazione sarà emessa con una frequenza minore di quella iniziale (spostamento di Stokes). Poiché nello stato fondamentale ci sono vari livelli vibrazionali, i fotoni emessi avranno energie differenti e di conseguenza anche le frequenze emesse saranno differenti. Per questa tecnica si utilizzano lampade allo xeno o a vapori di mercurio, un monocromatore e un rivelatore, posto ad un angolo di 90° rispetto al raggio di eccitazione; questi sono dei fotomoltiplicatori o fotodiodi (figura 6.5).

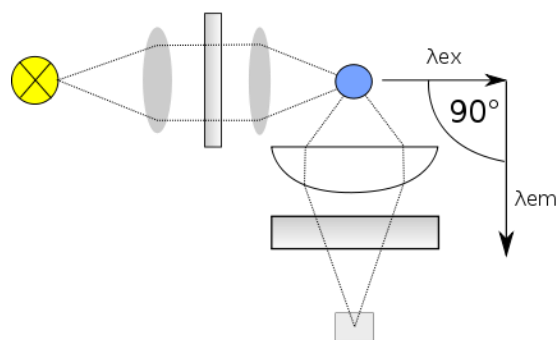


Figura 6.5: Rappresentazione schematica di uno Spettrofluorimetro

In questo lavoro è stato utilizzato uno spettrofluorimetro in emissione Jasco FP-6300 per l'analisi delle soluzioni di EtOH/ZnO e DMSO/ZnO, che verranno discusse nel § capitolo 7, *Risultati e analisi*, in un range di 400-750 nm, un'eccitazione di 340 nm, un'ampiezza della banda Ex di 2,5 nm ed Em di 5 nm.

6.5 Analisi Termiche – TGA/DSC

L'analisi termogravimetrica è una tecnica che consente un'analisi termica quantitativa di un campione, misurando nel tempo la variazione di massa di un campione di un materiale in funzione del tempo stesso o della temperatura, in condizioni di atmosfera controllata [97] (inerte, riducente od ossidante). Lo strumento che misura la variazione in peso del materiale è il termogravimetro, attraverso una variazione di temperatura, in conseguenza delle eventuali decomposizioni che il campione subisce in seguito a sviluppo di prodotti gassosi. Lo strumento è composto da una bilancia di estrema precisione, che determina il peso al variare del tempo, un forno, due crogioli rispettivamente per il campione e il riferimento, un sistema di ricircolo dei gas e un sistema di controllo della temperatura; attraverso queste considerazioni il campione viene riscaldato progressivamente dalla temperatura ambiente fino ad oltre 1000°C con rampe di salita di temperatura programmabili.

La calorimetria differenziale a scansione è una tecnica di analisi termica utilizzabile per misurare la temperatura e il flusso di calore associato alle transizioni che avvengono in un campione, le entalpie di fusione, le transizioni vetrose e le cinetiche di cristallizzazione dei materiali (polimerici, metallici e ceramici). Il principio di base di questa tecnica

consiste nel ricavare informazioni sul materiale riscaldandolo o raffreddandolo in maniera controllata. La DSC si basa sulla misura della differenza di flusso termico tra il campione in esame e uno di riferimento mentre i due sono vincolati ad una temperatura variabile definita da un programma prestabilito. Nella macchina vengono posti due crogioli identici scelti in modo da resistere alle temperature di prova, senza reagire con il campione in esame. Dopo aver chiusa la fornace ermeticamente si crea un'atmosfera inerte con un flusso continuo ed uniforme di Azoto, così da distribuire il calore in modo uniforme tra campione e riferimento. Le termocoppie raccoglieranno i dati di temperatura inviandoli ad un elaboratore, generando l'output attraverso software elaboratore. Durante la prova se il flusso necessario al riscaldamento del campione risulta maggiore di quello necessario al raffreddamento allora nel campione stanno avvenendo dei meccanismi endotermici, che vengono compensati dall'aumento di flusso. Viceversa, per meccanismi esotermici si avrà un flusso inferiore in quanto parte del calore viene fornito dalla reazione. Si può operare in endo-up o in endo-down; Nel primo caso, per la fusione (fenomeno endotermico) sul termogramma osserveremo un picco rivolto verso l'alto, corrispondente all'aumento del flusso di calore in quanto, oltre una certa T , l'agitazione molecolare è tale da vincere le forze di coesione nei cristalli i quali si rompono, fondendo, assorbendo calore. Per la cristallizzazione, fenomeno esotermico, osserveremo un picco rivolto verso il basso che corrisponde alla diminuzione del flusso di calore in quanto il composto, ricristallizzandosi, cede calore (figura 6.6)

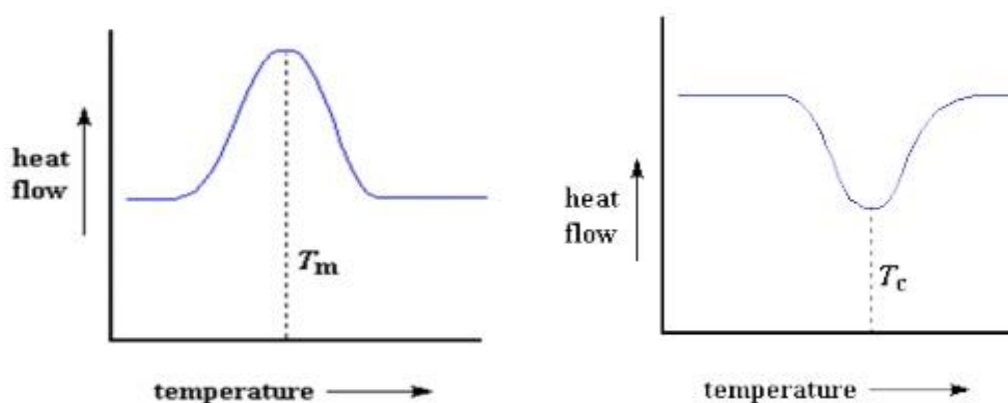


Figura 6.6: Rappresentazione del fenomeno di fusione e cristallizzazione

L'area sottesa al picco (ΔH) corrisponde alla quantità di calore assorbita o ceduta dal campione nell'intervallo considerato.

In questo lavoro è stato utilizzato uno strumento TGA/DSC 3+ STAR^e System MITTER TOLEDO. L'analisi delle nanoparticelle di ZnO ha previsto un riscaldamento di 10 °C/min da T = 25°C a T = 700°C in atmosfera di azoto.

6.6 Diffrazione a raggi X – XRD

La diffrazione a raggi X è una tecnica analitica utilizzata principalmente per l'identificazione di fase di un materiale cristallino e fornisce informazioni sulle dimensioni della cellula unitaria. Il fenomeno fisico alla base di questa tecnica è la diffrazione, fenomeno che avviene per ogni tipo di onda quando essa passa attraverso delle fenditure di dimensioni confrontabili con la sua lunghezza d'onda. È una tecnica non distruttiva utilizzata per l'analisi quantitativa e qualitativa dei materiali cristallini allo stato solido e si basa sull'interferenza costruttiva dei raggi X monocromatici sul campione. Questi raggi sono generati da un tubo a raggi catodici, filtrati per produrre radiazioni monocromatiche, collimati per concentrarsi e diretti verso il campione. Il reticolo cristallino è un sistema periodico avente distanze interatomiche dell'ordine degli Angstrom (10^{-10} m). In tale reticolo vi sono diversi piani che possono essere interessati dalla riflessione delle onde incidenti. L'interazione dei raggi incidenti con il campione produce interferenze costruttive quando le condizioni soddisfano la legge di Bragg $n\lambda=2d\sin\theta$. Questa legge mette in relazione la lunghezza d'onda della radiazione elettromagnetica con l'angolo di diffrazione e la distanza reticolare in un campione cristallino. I raggi X diffratti vengono quindi rilevati, elaborati e contati. Scansionando il campione in un intervallo di 2θ angoli, tutte le possibili direzioni di diffrazione del reticolo dovrebbero essere raggiunte a causa dell'orientamento casuale del materiale in polvere. La conversione dei picchi di diffrazione in d-spaziature consente l'identificazione del minerale perché ogni minerale ha un insieme di d-spaziature uniche. In genere, ciò si ottiene confrontando le d-spaziature con i modelli di riferimento standard. In figura 6.7 viene mostrata una rappresentazione schematica della diffrazione a raggi X.

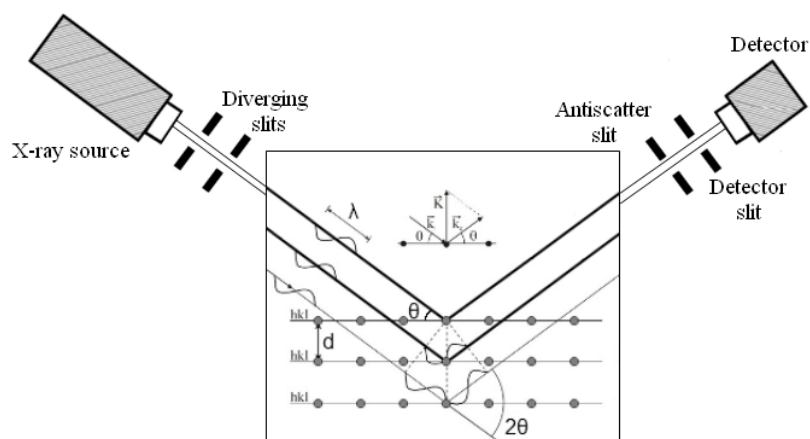


Figura 6.7: rappresentazione schematica XRD

Le misure sono state effettuate con un diffrattometro Philips PW1710 con geometria $\theta - 2\theta$, con una radiazione $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda=1.54060 \text{ \AA}$), filtrata a 30kV e 40mA, con un angolo di incidenza pari a 3° ed un angolo di avanzamento della rivelazione (grazing) pari a 0.05° . Questa tecnica è stata utilizzata per la caratterizzazione delle nanoparticelle di ZnO e del nanocomposito SF/zirconia.

6.7 Microscopio elettronico a scansione – SEM

Il microscopio elettronico a scansione (Scanning Electron Microscope –SEM) è uno strumento utilizzato per l'osservazione della superficie dei campioni. Il campione viene irraggiato con un sottile fascio di elettroni, chiamato “sonda elettronica”, emettendo degli elettroni secondari. Questo permette di ricostruire la topografia della superficie del campione effettuando una scansione bidimensionale di quest'ultimo attraverso la sonda elettronica, misurando il flusso di elettroni secondari generato. Un'altra modalità di osservazione del campione, sotto l'effetto della sonda elettronica, è quella della misurazione degli elettroni retrodiffusi (*backscattered electrons*) che permette di acquisire informazioni sugli strati più profondi del campione anche se a risoluzione ridotta. Il campione deve essere trattato al fine di poter resistere alle condizioni di vuoto spinto, necessario per la propagazione degli elettroni, e all'irraggiamento da parte della sonda elettronica. I campioni inoltre devono essere elettricamente conduttivi, almeno in superficie, e “messi a terra” per prevenire l'accumulo di carica elettrostatica. I campioni quindi vengono fissati al porta campioni (stub) tramite un adesivo di materiale conduttore

per garantire la “messa a terra” richiesta. In figura 6.8 viene mostrata una rappresentazione schematica del microscopio elettronico a scansione.

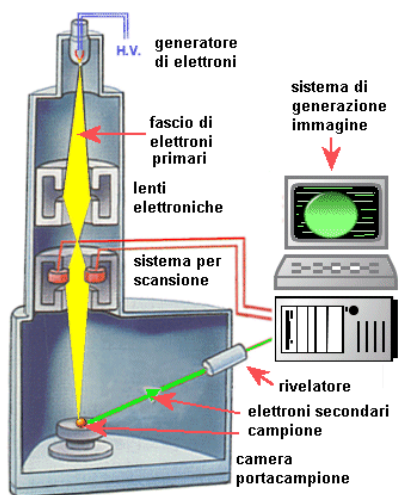


Figura 6.8: Rappresentazione schematica SEM

Gli elettroni del fascio vengono generati in cima alla colonna della sorgente di elettroni e vengono emessi quando la loro energia termica supera l'energia di emissione del materiale che costituisce la sorgente. Questi elettroni vengono quindi accelerati ed attratti da un anodo a carica positiva. L'intera colonna e gli altri componenti del microscopio sono sottovuoto, mentre la sorgente di elettroni è sigillata all'interno di una camera, per preservare il vuoto e proteggerla da contaminazioni, vibrazioni o rumore, ottenendo così un'immagine ad alta risoluzione. Il fascio di elettroni raggiungerà così il campione, scansionandolo e seguendo un determinato pattern. Spesso questa tecnica è associata alla spettroscopia EDX (*Energy Dispersive X-Ray Analysis*) che indica una metodica analitica strumentale che sfrutta l'emissione di raggi X generati da un fascio elettronico accelerato incidente sul campione. Tale strumentazione è solitamente costituita da un microscopio elettronico a scansione SEM-EDX. Tale analisi sfrutta l'emissione di raggi X di determinata lunghezza d'onda, obbedendo ad una approssimazione della legge di Lambert-Beer. È una metodica non distruttiva e permette di analizzare campioni solidi che abbiano le seguenti caratteristiche:

- Stabilità nelle condizioni operative di bassa pressione e bombardamento elettronico

- Il campione deve essere un conduttore elettronico; in caso contrario si effettua uno *sputtering* di oro o carbonio sulla superficie, in modo da avere rispettivamente informazioni strutturali o chimiche

In questo lavoro sono state analizzate le fibre dei bozzoli che hanno seguito delle diete diverse. La microscopia sulle fibre è stata effettuata con un ESEM (enviromental SEM) con elettroni secondari backscattered, e con un EDX.

6.8 Plasma accoppiato induttivamente – ICP

Il plasma accoppiato induttivamente è una sorgente di atomizzazione usata nella spettroscopia di emissione e nella ICP-MS. La scarica viene indotta senza contatto tra gli elettrodi in una corrente di argon che sale attraverso un tubo di quarzo, posto all'interno di una spirale stimolata da un generatore di radiofrequenze. Quest'ultime creano un campo magnetico all'interno della spirale e nella corrente di argon, inducendo così una corrente circolare nel conduttore (argon) che serve a riscaldarlo. La presenza di una scintilla o un arco voltaico permette di dare inizio alla scarica ICP, che assorbe energia dal campo magnetico, trasformando l'argon in un plasma stabile la cui temperatura è di 10000 K; il campione viene così introdotto nebulizzato dal tubo centrale della torcia tramite flusso di argon che funge da carrier (figura 6.9). Questa tecnica può essere abbinata alla spettrometria di massa al fine di determinare diverse sostanze inorganiche metalliche e non metalliche, presenti in concentrazioni anche di circa una parte per miliardo (ppb). In questo caso la torcia al plasma produrrà la ionizzazione del campione, mentre lo spettrometro di massa separerà e rivelerà gli ioni prodotti.

La tecnica ICP è stata impiegata per rilevare la presenza di Zn nelle fibre di seta prodotte dai bachi mediante dieta artificiale con nanoparticelle.

Le fibre di seta sgommate sono state caratterizzate attraverso due protocolli: il protocollo 1 (P1) prevede un trattamento delle fibre a 60°C e digestione con 10mL di 14.4 mol/L HNO₃. Le diverse concentrazioni di elementi metallici nelle fibre sono state determinate usando una temperatura di nebulizzazione di 2 °C e una potenza di radiofrequenza di 1500W. Tutte le misure sono state ripetute tre volte e quindi mediate. Il protocollo 2 (P2) prevede una dissoluzione a caldo ed ha un LOD di 20 volte inferiori a P1 [130].

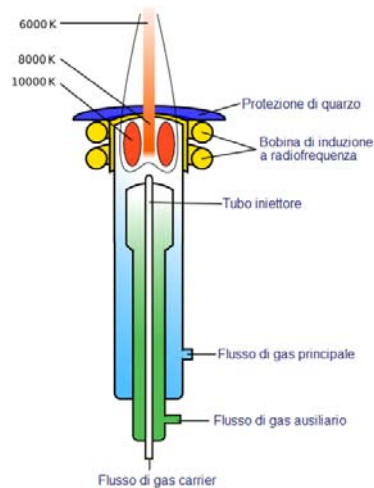


Figura 6.9: rappresentazione schematica del funzionamento dell'ICP

6.9 Analisi porosità

È stata effettuata una prova per il calcolo della porosità secondo protocollo utilizzando come liquido l'esano [128]. Questo riesce a permeare attraverso la struttura degli *scaffolds* senza causare rigonfiamenti o restringimenti della matrice di fibroina. Gli *scaffolds* in SF essiccati vengono immersi in un certo quantità in volume di esano (V_1) in un cilindro graduato per 5 minuti. Il volume totale dell'esano e dello *scaffold* impregnato di esano (V_2) viene successivamente misurato. In fine si rimuove dal cilindro graduato lo *scaffold* impregnato di liquido, registrando il volume residuo di esano (V_3). Il volume totale dello scaffold è

$$V = (V_2 - V_1) + (V_1 - V_3) = V_2 - V_3 \quad (6.3)$$

$V_2 - V_1$ è il volume dello scaffold polimerico mentre $V_1 - V_3$ è il volume dell'esano dentro lo scaffold. La porosità di quest'ultimo (ε) sarà

$$\varepsilon(\%) = (V_1 - V_3) / (V_2 - V_3) * 100 \quad (6.4)$$

6.10 Prove meccaniche

Sono state svolte delle prove meccaniche di trazione monoassiale per le membrane, grazie alle caratteristiche omogenee ed isotrope del campione. Nel primo caso le prove sono state svolte da uno strumento messo a punto dai tecnici del dipartimento di Ingegneria Industriale dell'Università degli Studi di Padova e da un apposito elaboratore di calcolo

collegato al macchinario. La caratterizzazione dei provini è avvenuta attraverso due settaggi diversi del macchinario come spiegato nel § Capitolo 7 – *Risultati e analisi*.

In figura 6.10 viene mostrata la geometria del campione e le dimensioni utilizzate per la prova

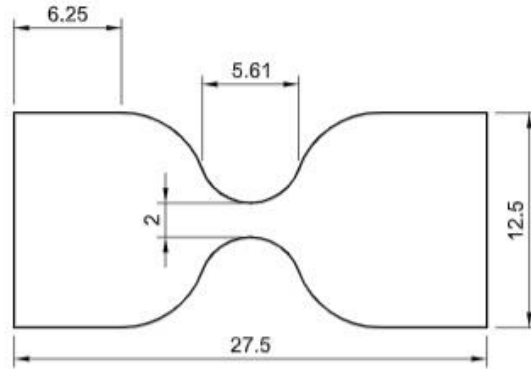


Figura 6.10: geometria e dimensioni del provino

CAPITOLO 7

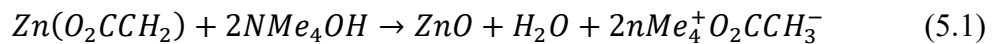
Risultati e analisi

Nel seguente capitolo vengono riportate le analisi effettuate e i risultati ottenuti per le due tipologie di nanocompositi studiati, seta/ZnO e Seta/ZrO₂. Nella prima parte verrà affrontata la sintesi delle nanoparticelle di ZnO e la loro caratterizzazione, al fine di valutare l'effettivo incorporamento all'interno delle fibre filate dai banchi mediante l'approccio di *feeding engineering* affrontato nel capitolo § Capitolo 1, *La Seta* – 1.4 Funzionalizzazione della seta – *Feeding Engineering*. Nella seconda parte del capitolo verrà affrontata la caratterizzazione dei nanocompositi a base di seta/zirconia, nella forma di film *free standing* e *scaffolds* porosi ottenuti rispettivamente attraverso tecniche di *solvent casting* e liofilizzazione.

7.1 Nanocompositi Seta/ZnO mediante *feeding engineering*

7.1.1 Nanoparticelle di Ossido di Zinco

Le nanoparticelle sintetizzate secondo il protocollo riportato nel § Capitolo 5 – *Materiali e metodi*, sono ottenute a partire da una soluzione di zinco acetato diidrato (Zn(Oac))₂·2H₂O e dimetilsolfossido (DMSO), rispettivamente precursore e solvente, in presenza di un'altra soluzione di tetrametilammonio idrossido (N(CH₃)₄OH·5H₂O ed etanolo; la presenza del TMAH garantisce un pH basico equilibrando la reazione verso la formazione di nuclei di ZnO in un volume costante secondo le seguenti reazioni:



La soluzione di sintesi risulta stabile, senza fenomeni di precipitazione. La stabilità è permessa per effetto elettrostatico, grazie alla presenza del sale di tetrametilammonio. Al fine di ottenere una mole di zinco idrossido, precursore dei nuclei di ZnO, bisogna avere 1 mole di zinco acetato e 2 moli di TMAH. In questa sintesi per evitare fenomeni di

aggregazione delle nanoparticelle, è stato utilizzato un rapporto molare di TMAH/Zn(Ac)₂ = 1.8 molare, basato sugli studi precedentemente riportati [52]. È inoltre possibile calcolare la resa della reazione attraverso la seguente relazione

$$Resa (\%) = \frac{Quantità\ ottenuta\ in\ gr}{Quantità\ teorica\ in\ gr} * 100 \quad (5.3)$$

In tabella 7.1 vengono riassunti i valori ottenuti durante la sintesi delle nanoparticelle di ZnO secondo la ricetta utilizzata e messa a punto da Marta Dai Prè. [132]

Tabella 7.1: valori riassuntivi di sintesi

Reagenti	Zn(Ac) ₂ ·2H ₂ O	ZnO
Massa [gr]	0,5	
MW [g/mol]	219,48	81,38
n [mol]	0,0023	
Massa Teorica [gr]		0,185
Massa Effettiva [gr]		0,170
Resa [%]		91,75

Lo zinco acetato e lo zinco ossido sono in rapporto stechiometrico 1:1, conoscendo il peso molecolare dello ZnO è stata calcolata la massa teorica di ZnO = 185mg. Da analisi DTA/TGA è stata trovata la massa totale pari a 170,1 mg. Considerando una soluzione di 30 mL è stata calcolata la resa totale della reazione pari al 91.75%. [132]

In questo lavoro è stato effettuato uno scale up dello studio sopra citato, partendo da una massa iniziale di precursore dello zinco 4 volte maggiore. In tabella 7.2 vengono riassunti i valori teorici ottenuti durante la sintesi delle nanoparticelle al fine di calcolare la resa di reazione.

Tabella 7.2: valori riassuntivi di sintesi e calcolo della resa

Reagenti	Zn(Ac) ₂ ·2H ₂ O	ZnO
Massa [gr]	2	
MW [g/mol]	219,48	81,38
n [mol]	0,0091	
Massa Teorica [gr]		0,742
Massa Effettiva [gr]		0,664
Resa [%]		89,54

La massa effettiva delle nanoparticelle di ZnO ottenuta è pari a 0,84gr e sottraendo il 20% del contributo della parte organica dall'analisi termica TGA effettuata, come mostrato in figura 7.1, si ottiene una massa effettiva pari a 0.664gr, ottenendo una resa dell'89,54%. Le due rese sono quasi identiche tra loro, confermando la solidità della sintesi utilizzata in termini di resa.

7.1.2 Analisi termica TGA-DSC

In figura 7.1 si riportano gli andamenti ottenuti dalle analisi TGA/DSC effettuate sulle nanoparticelle di ZnO sintetizzate, così da investigare la presenza di sostanze organiche presenti con le particelle, come ad esempio solvente di sintesi residuo, precursore non reagito o ligandi organici sulla superficie delle nanoparticelle dopo il processo di lavaggio.

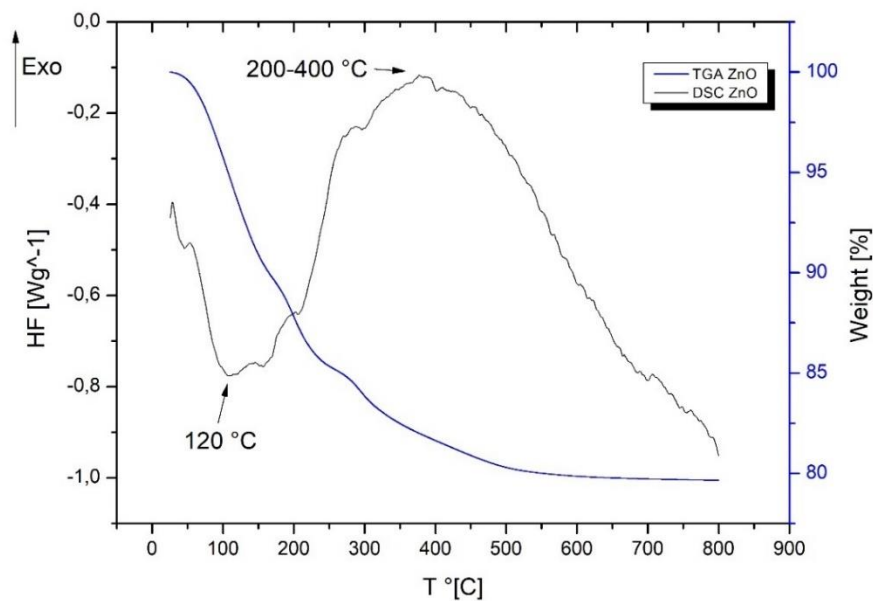


Figura 7.1: TGA/DSC nanoparticelle di Ossido di Zinco

La prima perdita in peso osservata nel grafico della TGA, pari al 10%, è presente ad una temperatura di 120°C dovuta alla evaporazione di acqua cristallizzata, come confermato dall'andamento endotermico della DSC a 120°C. La seconda perdita in peso, pari al 12%, appare in un range di temperatura compreso tra i 180-220 °C, dovuta alla decomposizione

dello zinco acetato non reagito, mentre a 300°C la perdita in peso è di circa il 17%, per poi stabilizzarsi al 20%, attribuibile alla decomposizione dei gruppi acetati. Questo andamento viene confermato dalla curva DSC, che mostra un largo picco esotermico ad una temperatura compresa tra i 200-400 °C [129].

7.1.3 Caratterizzazione ottica e cristallina delle ZnO NPs

Si sono effettuate analisi di assorbimento UV-VIS e spettrofotoluminescenza per caratterizzare le soluzioni colloidali di ZnO ottenute. Gli spettri sono stati raccolti sia sulla soluzione di sintesi (in solvente DMSO), sia sulla soluzione in etanolo, ottenuta dopo precipitazione e successiva ridispersione delle nanoparticelle. La scelta di ridisperdere le nanoparticelle in etanolo è stata dettata dalla necessità di utilizzare un solvente volatile, miscibile con acqua, che non interferisse con l'alimentazione dei banchi da seta, ma che permettesse comunque di avere un'adeguata dispersione evitando fenomeni di aggregazione.

La caratterizzazione ottica della soluzione colloidale in DMSO, prima della ridispersione in etanolo, mostra un adsorbimento iniziale nel vicino UV a 347nm, a causa del band gap dello ZnO. In figura 7.2 viene mostrato lo spettro ottenuto sottraendo a quello della soluzione lo spettro del solvente.

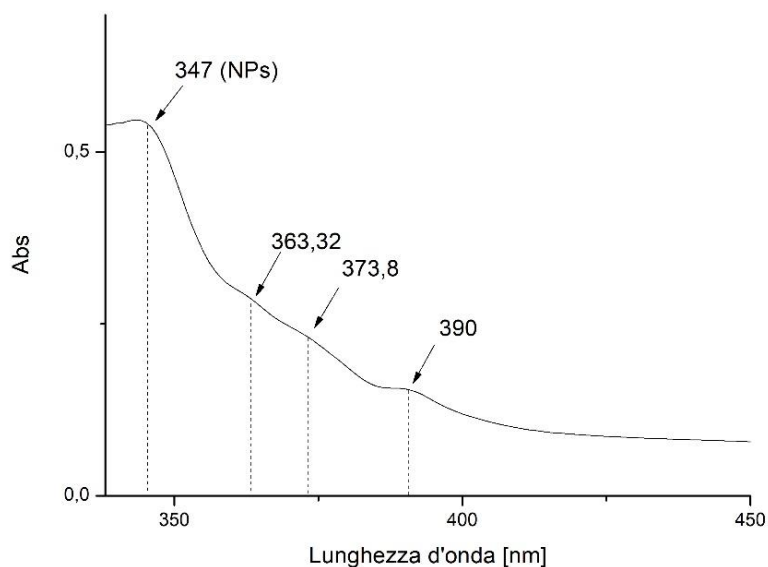


Figura 7.2: differenza fra lo spettro di assorbimento della soluzione di ZnO NPs e lo spettro del solvente DMSO

L'inizio dell'assorbimento del ZnO bulk è compreso nell'intervallo 3.2-3.4 eV (390-370 nm): in questo senso l'assorbimento della soluzione colloidale ad energie più alte è legato ad effetti di dimensioni quantistiche (*quantum size effect*). Lo spettro di assorbimento mostra diversi picchi possibile indicazione del fatto che la soluzione non è monodispersa ma presenta più popolazioni di particelle. Lo spettro ottenuto in questo lavoro presenta delle differenze rispetto a quello ottenuto dalla sintesi di riferimento, in cui veniva mostrato un unico picco ben definito, confermando una buona dispersione delle nanoparticelle già prima della precipitazione e ridispersione [132]; questo fenomeno può essere stato causato dallo *scale-up* della sintesi rispetto a quella di riferimento.

In figura 7.3 viene mostrato lo spettro di assorbimento per la soluzione colloidale ridispersa in etanolo: anche in questo caso lo spettro mostra un chiaro adsorbimento iniziale nel vicino UV a causa del band gap dello ZnO, ma la fase di precipitazione e ridispersione in etanolo ha permesso di eliminare le fasi disperse, come confermato dall'unico picco.

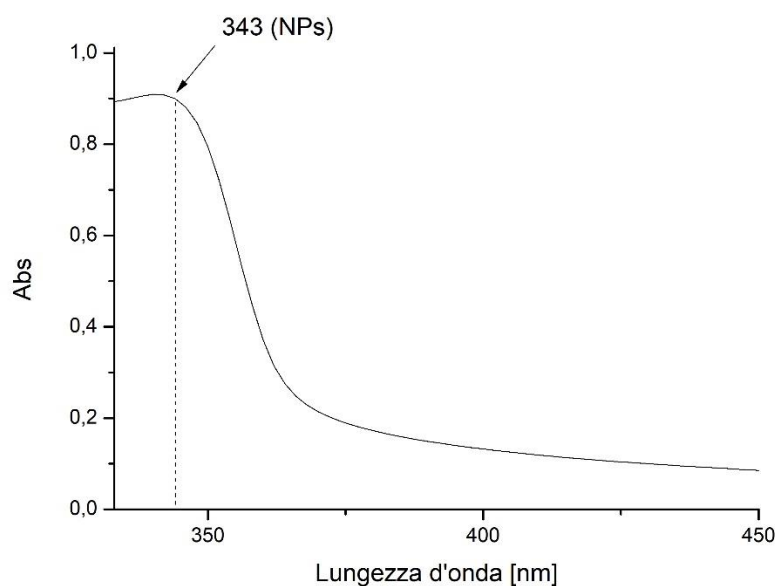


Figura 7.3: differenza tra lo spettro di assorbimento della soluzione di ZnO NPs e lo spettro del solvente EtOH

Il picco di assorbimento delle nanoparticelle in etanolo è massimo alla lunghezza di 343 nm, corrispondente ad un'energia da band-gap di 3.64 eV, che indica che le nanoparticelle sono più piccole. In questo lavoro si registra una differenza tra i due spettri (figura 7.2 e

7.3) derivante dallo scarso controllo della nucleazione e accrescimento probabilmente causato dallo *scale-up* della soluzione di partenza;

Gli spettri di luminescenza per le soluzioni di ZnO NPs in DMSO e per le soluzioni di ZnO NPs in EtOH vengono mostrati rispettivamente in figura 7.4 e 7.5.

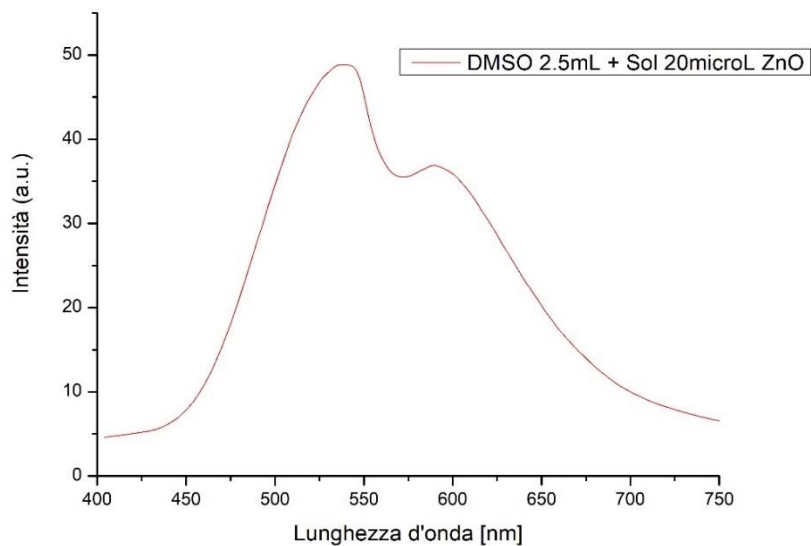


Figura 7.4: PL DMSO contenente una soluzione di ZnO

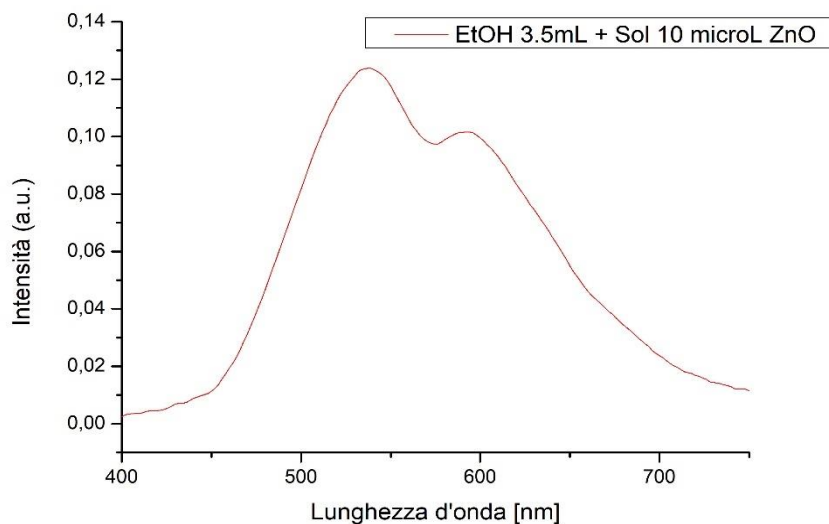


Figura 7.5: PL EtOH contenente una soluzione di ZnO

I due spettri sembrerebbero mostrare due picchi di luminescenza principale a circa 539 nm e 591 nm, corrispondente rispettivamente all'energia fotonica di 2.30 eV e 2.1 eV. La

mancanza di segnale tra 539 e 591 nm è originato da un fenomeno chiamato “anomalia di Wood” che dipende dal reticolo usato nel monocromatore nello spettrofluorimetro. È possibile affermare quindi che in realtà c’è un unico picco di emissione “da difetti” ad una lunghezza di 500-600 nm, che indica la presenza di molti difetti superficiali come gruppi insaturi.

Infine, si è verificata la struttura cristallina delle NPs sintetizzate e si sono stimate le dimensioni medie dei cristalliti. Dal pattern XRD mostrato in figura 7.6 è stato possibile identificare i picchi caratteristici agli angoli di scattering ($2\theta^\circ$) di 31.88, 34.46, 36.28, 47.51, 56.69 corrispondenti alla riflessione dei piani cristallini 100, 002, 101, 102, 110, e indicativi di una fase esagonale con struttura cristallina della wurtzite [125].

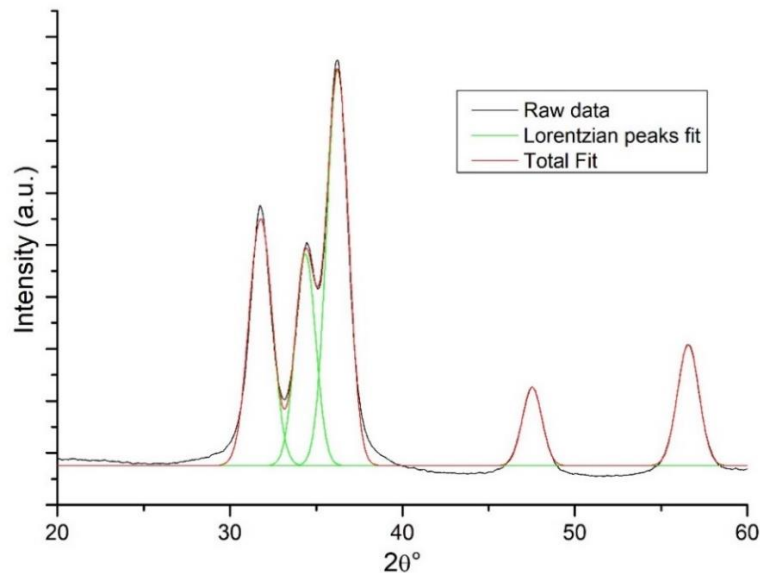


Figura 7.6: modello XRD delle ZnO NPs sintetizzati a 40°C per un 1 ora.

Attraverso l’equazione di Debye-Sherrer (formula 7.1) è stato calcolato il diametro medio delle nanoparticelle, pari a $D = (5,88 \pm 0.5)$

$$D = \frac{K\lambda}{B\cos\theta} \quad (7.1)$$

D = dimensione grani [nm]

K = 0.9 (costante di Sherrer)

$\lambda = 0.15406$ [nm]

θ = posizione picco [rad]

In tabella 7.3 si riportano i valori ottenuti considerando i cinque picchi registrato nello spettro, la media e la corrispondente deviazione standard.

Tabella 7.3: Valori per il calcolo del diametro medio

Posizione Picco 2 theta	FWHM	Dimensione Cristallita D [nm]
31,78017	1,58602	5,20794
34,37658	1,39933	5,94261
36,24054	1,49093	5,60645
47,52926	1,32407	6,55577
56,57438	1,47655	6,10993
Media		5,88454
Deviazione Standard		0,50986

Si è calcolata una dimensione media di 5.88nm rispetto a quanto riportato per la sintesi di riferimento pari a $D = (6.3 \pm 0.5)$ nm.

7.1.1 Dieta dei bachi

Durante la dieta effettuata nei bachi da seta è stata eliminata la tesi con ZnO durante la muta I-II perché le larve mostravano segni di “sofferenza”, mortalità e ritardo nello sviluppo, causando un ritardo della muta di 2 giorni. La somministrazione della dieta è stata ripresa su larve adulte al V stadio: sono state svolte le analisi su 15 larve per replica per tesi. In tabella 7.4 e 7.5 vengono mostrati i risultati ottenuti alla filatura del bozzolo per le rispettive diete utilizzate, come espresso § Capitolo 5 – *Materiali e metodi*.

Tabella 7.4: Valori ottenuti al V stadio di muta

	TESI	PB±ds (g)	PC±ds (g)	RESA±ds (%)	MORTALITA' (%)
♀	CTRL 25%	1.209±0.181 a	0.205±0.022 a	17.06±1.49 a	0
	+EtOH	1.127±0.224 a	0.142±0.063 b	12.96±5.44 b	33.3
	+ZnO/EtOH	0.688±0.125 b	0.081±0.030 b	11.54±2.42 ab	84.4

Tabella 7.5: Valori ottenuti al V stadio di muta

	TESI	PB±ds (g)	PC±ds (g)	RESA±ds (%)
♂	CTRL 25%	1.158±0.217 a	0.217±0.036 a	18.82±1.31 a
	+EtOH	1.107±0.239 a	0.147±0.047 b	13.70±4.85 b
	+ZnO/EtOH	0.506±0.096 b	0.044±0.019 c	8.43±2.23 b

Dove PB = Peso del bozzolo (seta+animale), PC = Peso corteccia (solo seta), PC/PB = resa percentuale in seta.

In figura 7.7 e 7.8 viene mostrato l'andamento dei risultati ottenuti

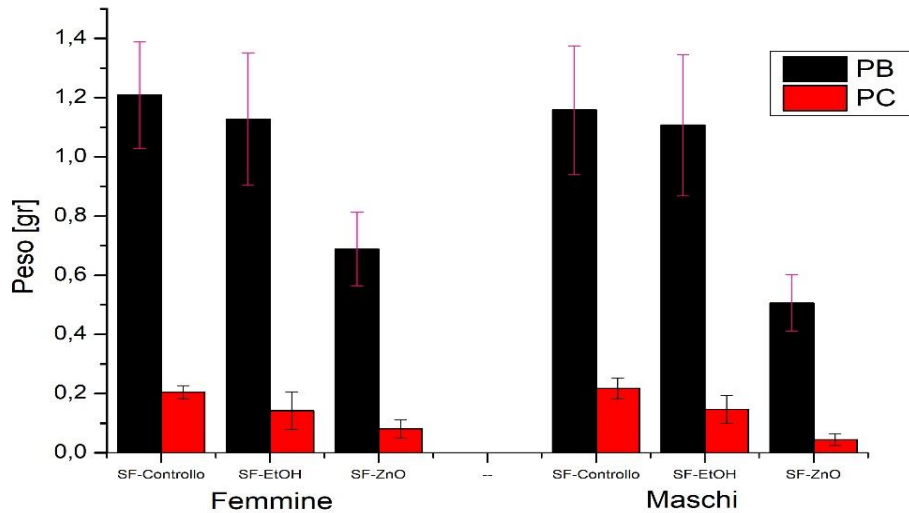


Figura 7.7: Peso in grammi per le fibre dei bozzoli SF-Controllo, SF-EtOH ed SF-ZnO

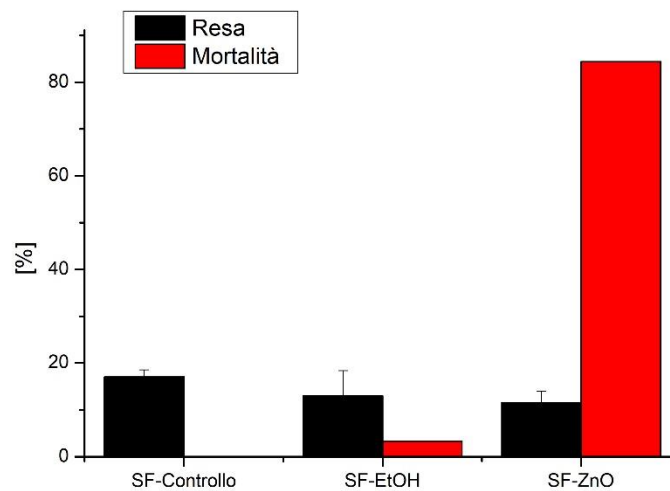


Figura 7.8: Resa percentuale e mortalità percentuale dei bachi SF-Controllo, SF-EtOH ed SF-ZnO

Nella tesi SF-Controllo non è stata riscontrata alcuna mortalità, ma solo qualche bozzolo doppio in linea con quanto accade normalmente. La tesi SF-EtOH ha evidenziato una sofferenza da parte delle larve riscontrate sia in termini di mortalità sia in termini di mancata produzione. Nella tesi con ZnO la mortalità è molto elevata, e la scarsa

produzione della seta mostra una chiara sofferenza da parte delle larve. Questo può essere dovuto all'utilizzo di DMSO e al TMAH nella sintesi delle ZnO NPs, oppure può essere legato alla dimensione molto piccola delle nanoparticelle che presentano elevata area superficiale e difetti quali insaturi che possono interagire maggiormente con i tessuti biologici [76].

7.1.2 Caratterizzazione delle fibre ottenute dai bachi

Sono stati confrontati i bozzoli e le fibre di seta ottenute dai bachi che hanno seguito una dieta normale (controllo), una dieta contenente l'aggiunta di etanolo ed un'altra contenente delle ZnO NPs. In figura 7.9 vengono confrontate le dimensioni dei bozzoli e le loro caratteristiche di luminescenza attraverso lampada UV (365 nm). È evidente che i bozzoli che hanno seguito una dieta contenente ZnO NPs hanno una dimensione più piccola rispetto a quelli che hanno seguito una dieta normale (controllo) e una dieta a base di solo etanolo. Il confronto attraverso lampada UV non ha fornito informazioni utili in quanto i bozzoli non presentano differenze probabilmente dovuto all'assenza delle nanoparticelle o ad una bassa concentrazione di quest'ultime per essere rilevate con tale tecnica. Lo scopo delle caratterizzazioni effettuate sulle fibre è stato quello di verificare se le NPs fossero presenti e se comportassero evidenti modifiche della struttura chimica secondaria della proteina (FTIR) o della morfologia (SEM).

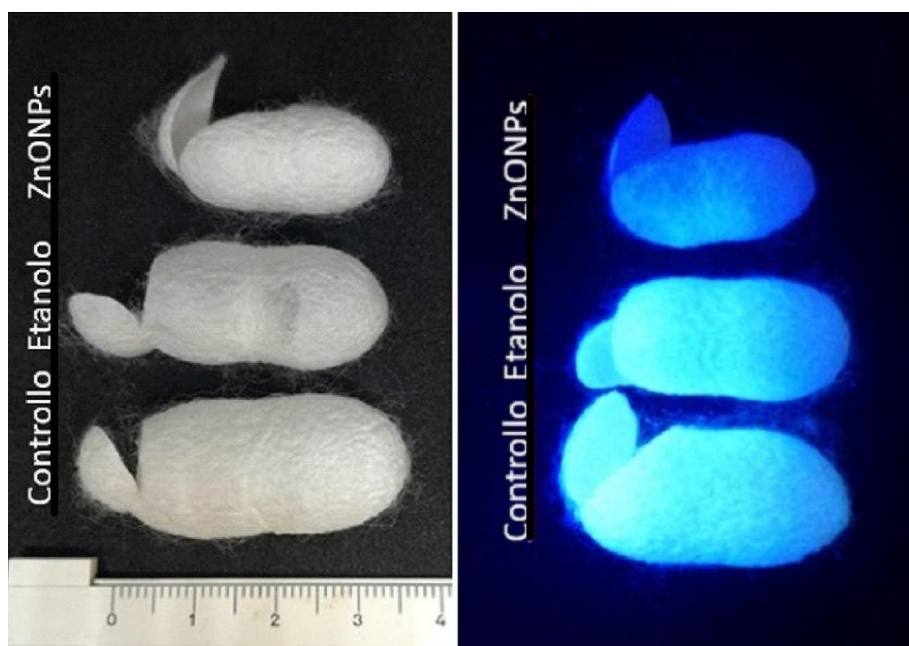


Figura 7.9: a) dimensione dei bozzoli a confronto; b) luminescenza dei bozzoli a confronto

Per verificare variazioni della struttura secondaria della seta nel nanocomposito, per effetto dell'introduzione delle nanoparticelle e dell'interazione con esse, è stata effettuata l'analisi FTIR-ATR. Vengono studiati i picchi caratteristici della seta di tre diversi gruppi, rispettivamente l'ammide I (stretching legame C=O), ammidine II (stretching legame C-N), e ammidine III (stretching legame C-N e deformazione del legame N-H), come mostrato in tabella riassuntiva 7.6 [128,129, 137].

Tabella 7.6: valori riassuntivi delle posizioni dei picchi

Numero d'onda [cm⁻¹]	Assegnazione
1515-1520 ^d o 1263 ^e	Beta-Sheets
1540 ^d o 1230 ^e	Random coil / alfa-elica
1605 – 1615 ^c	(Tyr) Catena Laterale
1616-1621 ^c	Aggregati Beta/ Beta-sheets (deboli) ^a
1622-1627 ^c	Beta-sheets (forti) ^a
1628-1638 ^c	Beta-sheets (forti) ^b
1639 – 1655 ^c	Random coils
1656-1662 ^c	Alpha-elica
1663-1696 ^c	Beta-turns
1697-1703 ^c	Beta-sheets (deboli) ^a

**(^a) Beta-sheets intermolecolari. (^b) Beta-sheets Intramolecolari.
 © Ammidine II. (^d) Ammidine II. (^e) Ammidine III.**

In figura 7.10. Vengono comparate le SF-controllo con le SF-ZnO assimilate dalle larve.

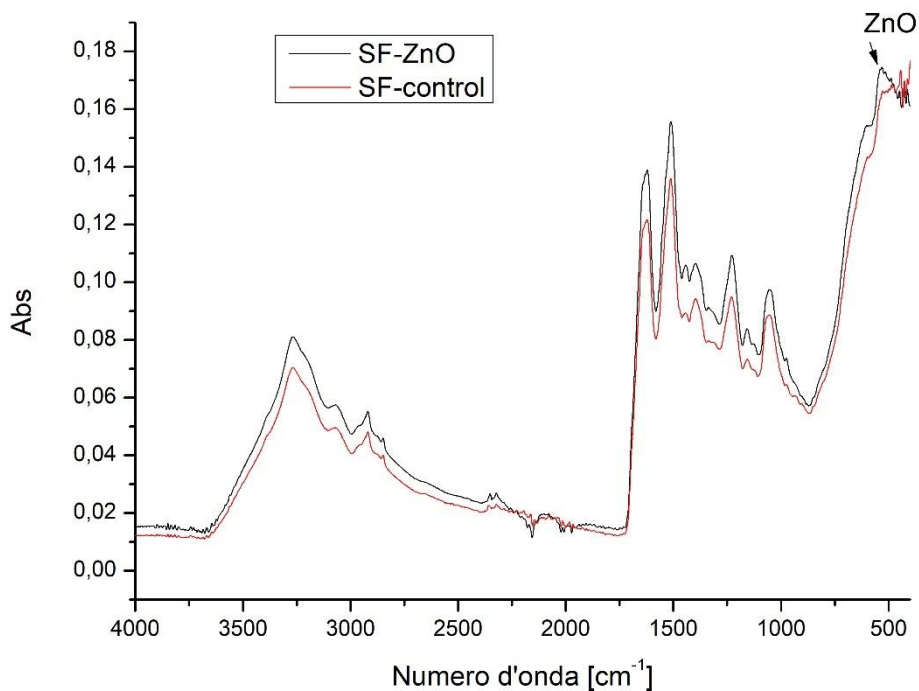


Figura 7.10: FTIR-ATR della SF-controllo e della SF-ZnO dopo sgommatura

Gli spettri SF-ZnO e quelli di SF-controllo presentano uno spettro quasi identico; i picchi intensi della fibroina di seta mascherano quelli delle ZnO NPs. Una piccola differenza si può osservare ad un picco di 523 cm^{-1} nella sovrapposizione dei due spettri, che può essere attribuita alla modalità di stiramento dello ZnO, come dichiarato in letteratura [126,127]. I picchi di assorbimento caratteristici della SF si trovano nella regione di 1625 cm^{-1} (ammide I), 1528 cm^{-1} (ammide II), 1230 cm^{-1} (ammide III) e 1064 cm^{-1} (ammide IV) [128].

I picchi di assorbimento caratteristici della SF-controllo sgommata e della SF-ZnO NPs sgommata, relative all'ammide I e II, vengono mostrati in figura 7.11.

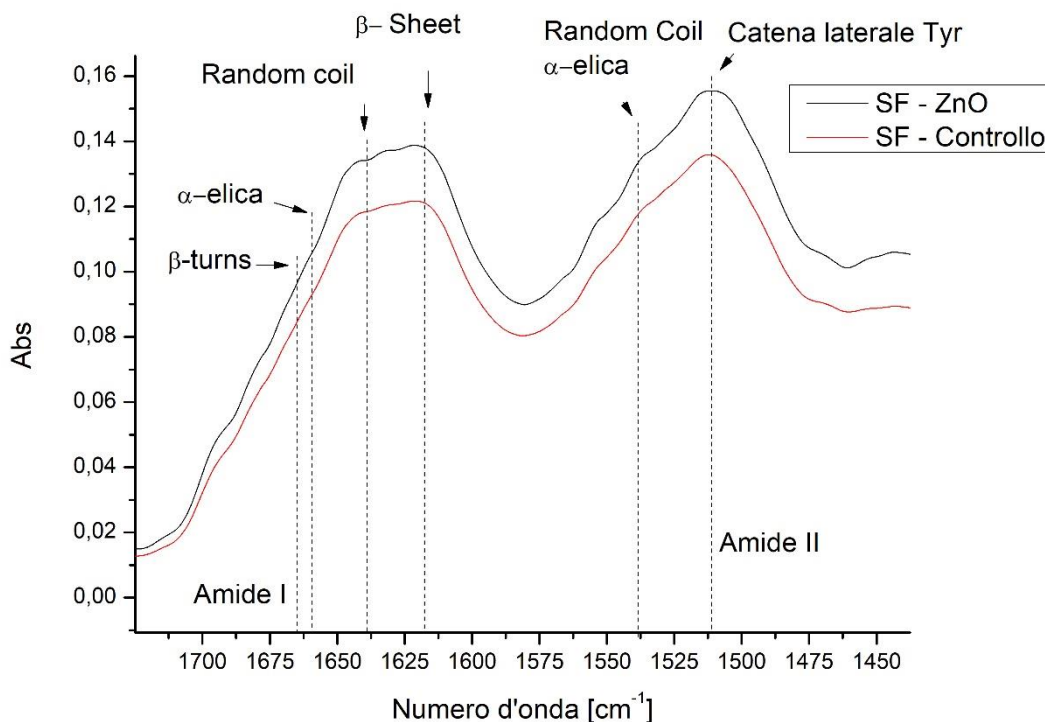


Figura 7.11: Confronto degli spettri di assorbimento tra SF-controllo e la seta/ZnO dopo degumming.

Gli spettri mostrano dei picchi caratteristici rispettivamente a 1664 cm^{-1} appartenente alla conformazione β -turns, 1658 cm^{-1} appartenente alla conformazione α -elica, 1640 cm^{-1} appartenente alla conformazione *Random Coils*, e a 1620 cm^{-1} dovuto alla presenza di β -sheets intermolecolari dell'ammide I, mentre per l'ammide II troviamo un picco caratteristico a 1537 cm^{-1} , caratteristico della conformazione *Random coil*/ α -elica, e un picco caratteristico a 1515 cm^{-1} , indicativo del cambio strutturale dalla conformazione di *random coil* a β -sheets [131]. L'ammide I è quella più sensibile alla variazione di struttura secondaria da *random coils* a β -sheets e viceversa; tale struttura inoltre influenza la solubilità in acqua del campione, infatti un maggior contenuto di fibroina in configurazione β -sheets comporta una minore solubilità in acqua. Il confronto tra gli spettri delle fibre SF-Controllo e le fibre seta-ZnO non mostrano particolari differenze, quindi è possibile pensare che l'eventuale presenza di ZnO NPs, seppur in piccole quantità, influenzi poco il grado di β -sheets. Questo è stato investigato attraverso un'analisi di calcolo ottenuta con la *Fourier self-deconvolution (FSD)* degli spettri FTIR dell'ammide I, espressi in figura 7.12 e 7.13

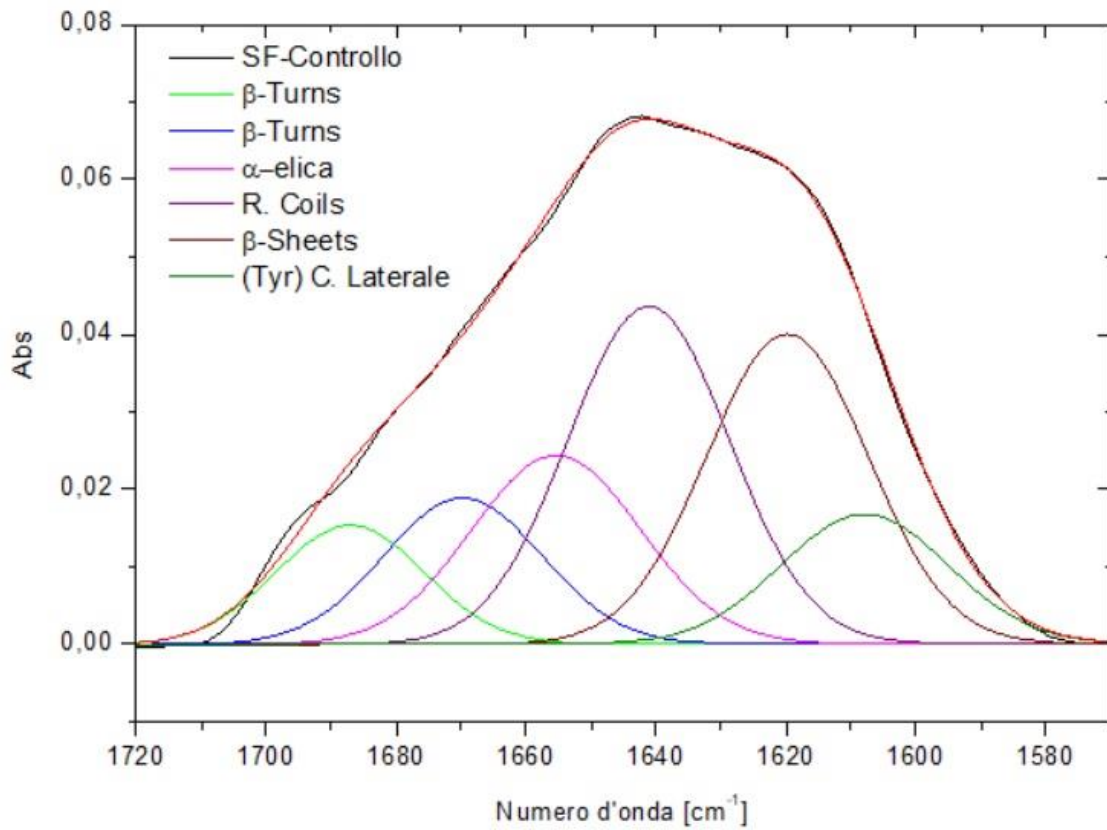


Figura 7.12: FSD dello spettro di assorbimento dell'ammide I delle SF-controllo

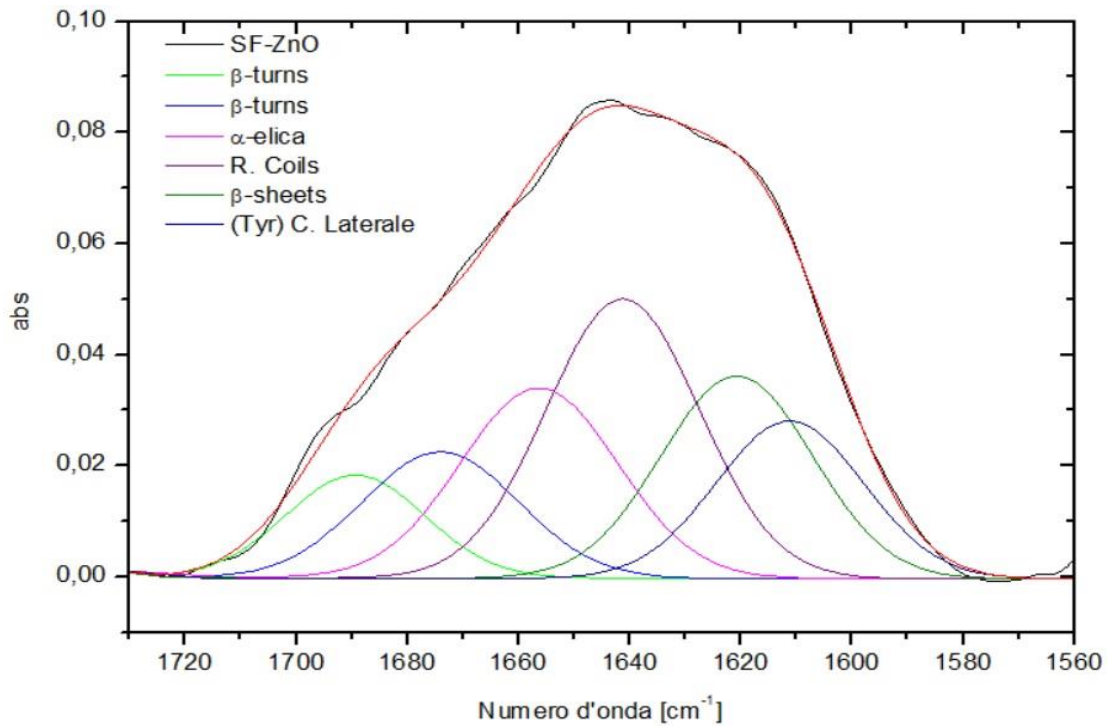


Figura 7.13: FSD dello spettro di assorbimento dell'ammide I delle SF-ZnO

È stato possibile calcolare il contenuto di β -sheets all'interno della struttura delle fibre di seta, come mostrato in figura 7.14

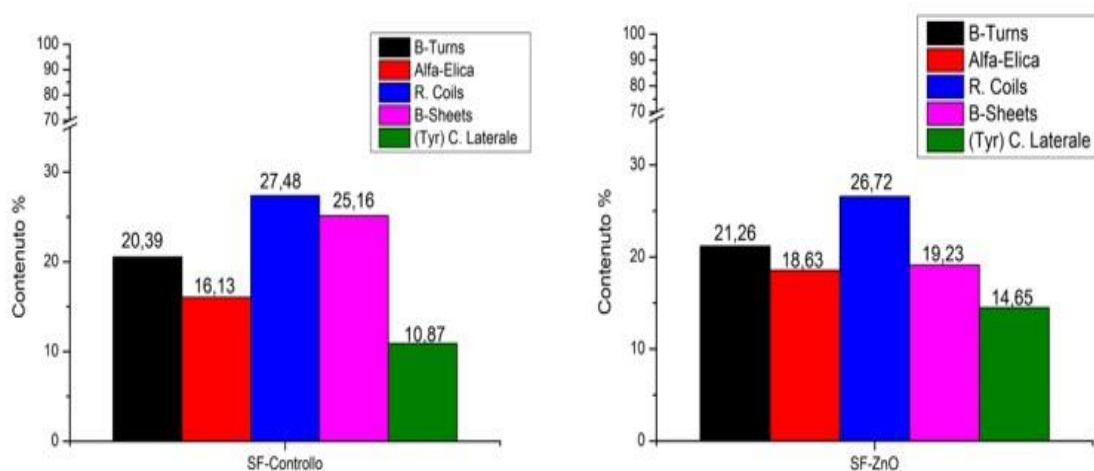
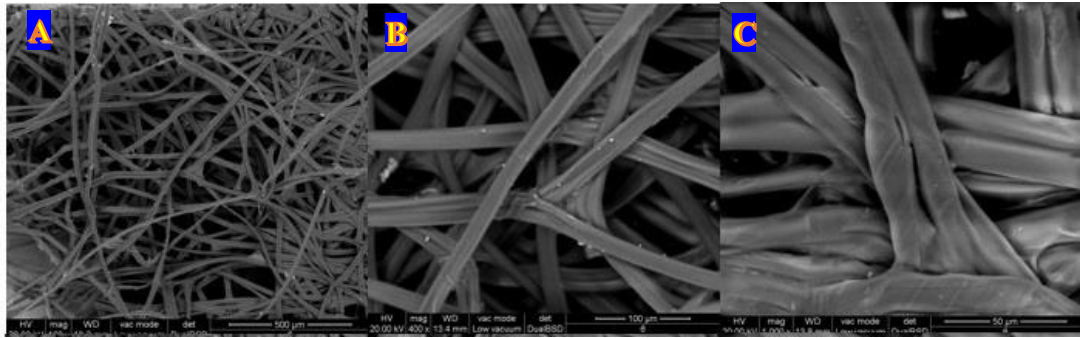


Figura 7.14: contenuto percentuale dei β -sheets all'interno della struttura delle fibre dopo sgommatura

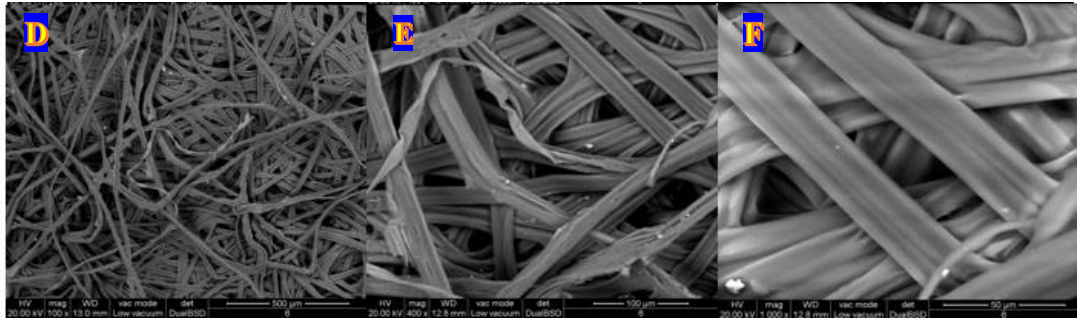
I grafici mostrano una variazione quasi nulla per la conformazione β -turns, α -elica e *Random Coils* tra le SF-Controllo e le SF-ZnO. Si nota invece una diminuzione del contenuto dei β -sheets e un aumento della conformazione (Tyr) Catena laterale nelle fibre SF-ZnO rispetto alle SF-Controllo, causato probabilmente dall'effetto della dieta seguita dai bachi da seta.

In figura 7.15 vengono mostrate le immagini al SEM e gli EDX delle SF-Controllo, SF-Etanolio ed SF-ZnO

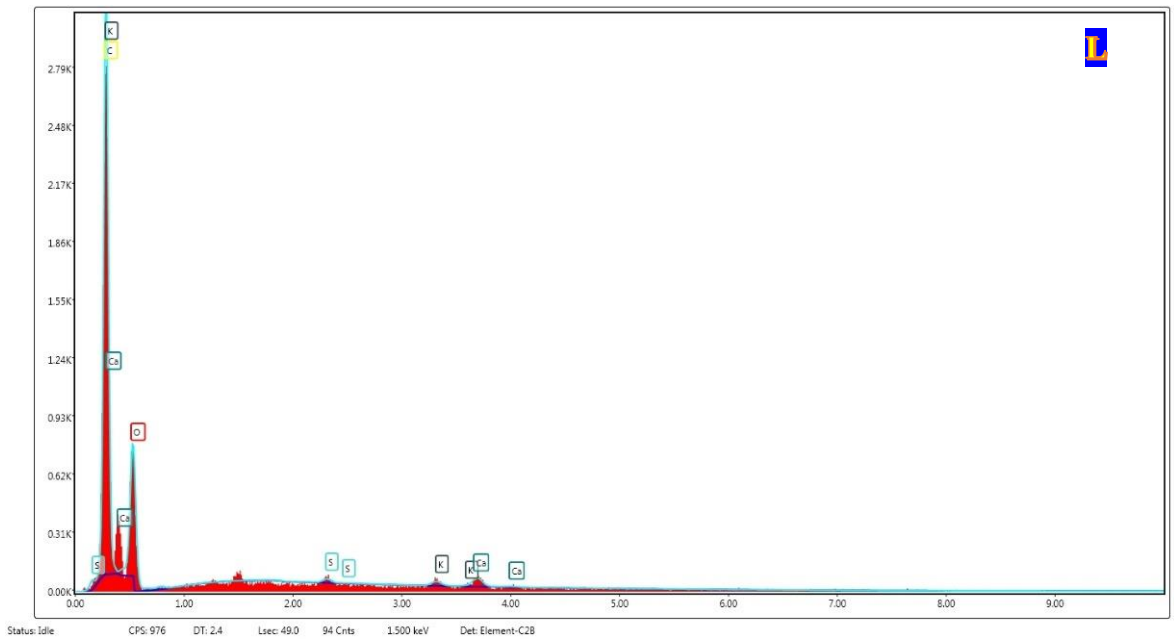
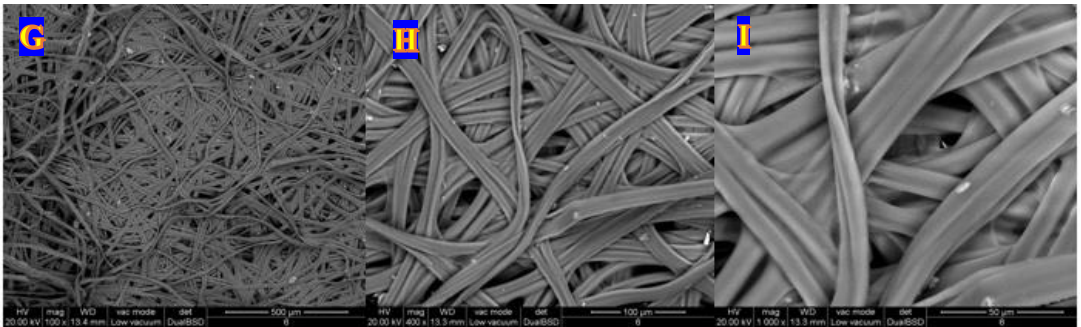
Control



Ethanol



ZnO NPs



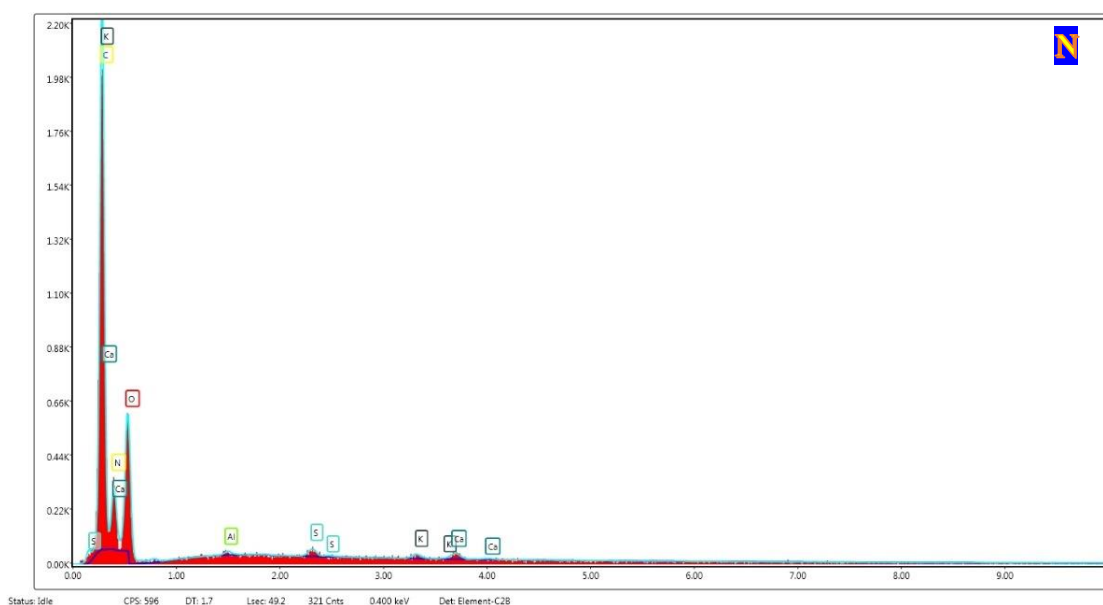
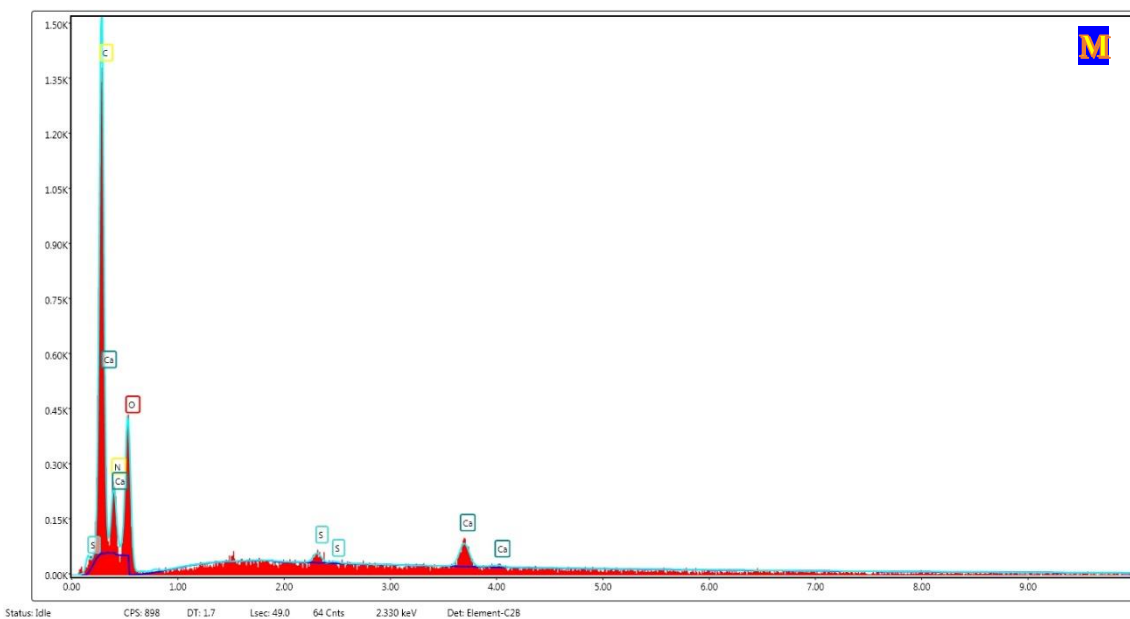


Figura 7.15: immagini al SEM; [A], [B], [C], FS-controllo rispettivamente a 100x, 400x e 1000x; [L] EDX FS-Controllo; [D], [E], [F] FS-Etanolo rispettivamente a 100x, 400x e 1000x; [M] EDX SF-Etanolo; [G], [H], [I] SF-ZnO rispettivamente a 100x, 400x e 1000x; [N] EDX SF-ZnO.

A, B e C si riferiscono ai bozzoli di seta pura (SF-controllo) non sgommati, D, E ed F ai bozzoli di seta ottenute attraverso *feeding* di solo etanolo (SF-etanolo) non sgommati, mentre G, H ed I ai bozzoli di seta non sgommati ottenute attraverso *feeding* delle ZnO NPs. È stato calcolato il diametro medio delle fibre dei bozzoli analizzati al SEM, come espresso in figura 7.16

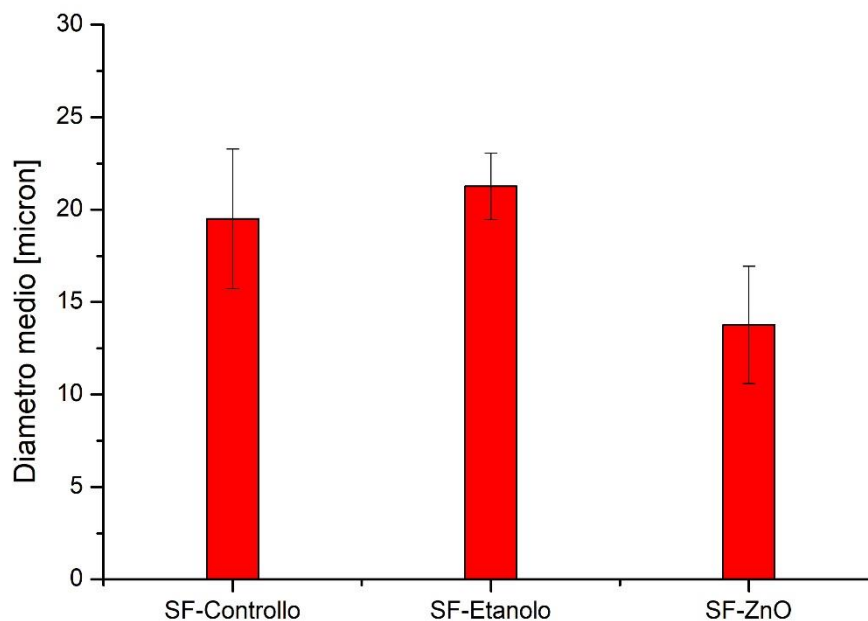


Figura 7.16: Diametro medio e deviazione standard delle fibre SF-Controllo, SF-Etanolo ed SF-ZnO.

I valori del diametro medio delle fibre presentano una certa omogeneità per i bachi che non hanno seguito una dieta normale (SF-Controllo) e per quelli che hanno seguito una dieta a base di etanolo (SF-Etanolo), ottenendo rispettivamente un diametro medio $D_{\text{SF-Controllo}} = (19.50 \pm 3.77)$ e $D_{\text{SF-Etanolo}} = (21.26 \pm 1.79)$. Le fibre dei bozzoli SF-ZnO presentano un diametro medio inferiore rispetto alle precedenti, pari a $D_{\text{SF-ZnO}} = (13.76 \pm 3.17)$; questo può essere dovuto ad una sofferenza nella digestione dell'alimentazione da parte dei bachi, in accordo con una diminuzione dei bozzoli come da figura 7.9. Gli EDX (L, M ed N), che mostrano il numero di conteggi rilevati per ogni elemento, presentano dei picchi simili tra loro senza mostrare l'elemento Zn. Questo può essere dovuto al fatto che la percentuale di ZnO presente nelle fibre è sotto il limite di rilevazione dello strumento, ragion per cui si è scelto di effettuare l'analisi ICP per verificare l'effettivo inglobamento delle NPs nella seta da parte del baco.

I campioni di seta sono stati divisi in due parti e trattati con due protocolli diversi di digestione (§ Capitolo 5 – *Materiali e metodi*), con l'obiettivo di ottimizzare le analisi. In tabella 7.7 vengono riassunti i valori della prova ICP-MS seguendo il secondo protocollo P2 [130].

Tabella 7.7: valori ottenuti dalla prova ICP

Campione	Ppm Zn	Procedura
SF-controllo	15,3	P2
SF-ZnO	34,4	P2

I risultati mostrano un aumento della percentuale di Zn che va da 15.3, per le SF-controllo, a 34.4 per le SF-ZnO. L'aggiunta delle NPs nelle fibre si vede in modo significativo anche se la seta contiene già di suo una quantità alta di ione Zn come fondo [130]. La percentuale di quest'ultimo nelle fibre dei bachi da seta non trattate può variare dai 3.5 ai 13 ppm [130,135], valore che si discosta da poco da quello ottenuto in questo lavoro e che potrebbe dipendere da diversi fattori strettamente legati all'ambiente di crescita in cui si trovano. Ad oggi non è stata effettuata alcuna ricerca sull'utilizzo di ZnO NPs nella dieta dei bachi da seta su cui poter effettuare un confronto dei dati ottenuti in questo studio; sono stati svolti dei lavori inerenti al *feeding* di una soluzione colloidale contenente Al NPs [134] ottenendo dei valori nelle fibre rispettivamente di 11 ppm per le fibre non trattate e di 35 ppm per le fibre dei bachi che hanno seguito la dieta a base di Al. Questo risultato è in accordo con quanto trovato in questo lavoro e potrebbe essere una prova della veridicità dei dati ottenuti.

7.2 Caratterizzazione dei nanocompositi SF-ZrO₂

Sono state effettuate le caratterizzazioni meccaniche ed ottiche delle membrane SF-ZrO₂, prendendo in considerazione una concentrazione in volume di seta come riportato in tabella 5.2. In questo paragrafo verranno messi a confronto i campioni attraverso l'analisi FTIR-ATR prima e dopo i test meccanici, valutando il comportamento delle ZrO₂ NPs all'interno della struttura della fibroina di seta e sulle eventuali modifiche nella conformazione dei *β-sheets*. Successivamente verranno caratterizzati gli *scaffolds* evidenziando le varie differenze in funzione del contenuto delle ZrO₂ NPs attraverso analisi FTIR e di porosità [128].

7.2.1 Caratterizzazione delle membrane SF-ZrO₂

Le prove meccaniche sono state svolte attraverso un pretensionamento del campione di 0.1 N settando una deformazione massima (di fine corsa) $\epsilon = 5$ mm con una velocità di

trazione di 0.5 mm/s per ogni attuatore [133]. In tutte le prove, visto le caratteristiche igroscopiche e l'assenza di utilizzo di plastificanti dei campioni, i provini sono stati posti in ambiente ad umidità controllata pari al 90% prima della prova di trazione. Sono stati effettuati dei test di trazione monoassiale sfruttando così le caratteristiche di omogeneità e di isotropia del nanocomposito. In figura 7.17 e 7.18 viene mostrata la prova di trazione effettuata a 0.5 mm/s per ogni attuatore dei campioni di SF 100% ed SF90%-ZrO₂10%

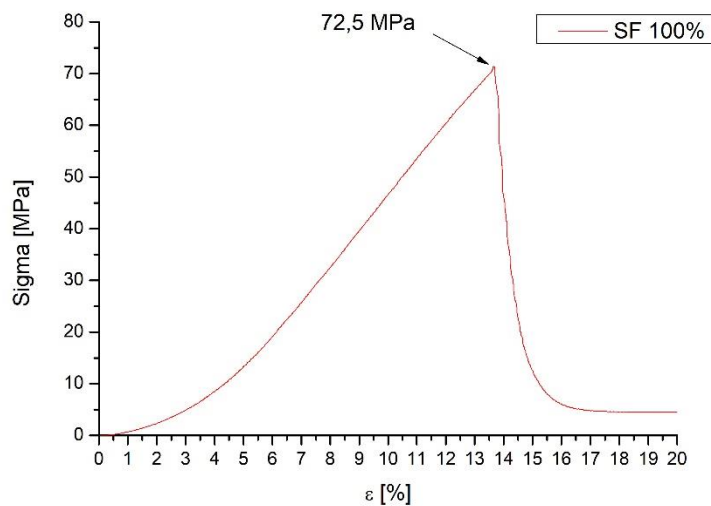


Figura 7.17: andamento prova trazione σ - ϵ del campione SF-100%

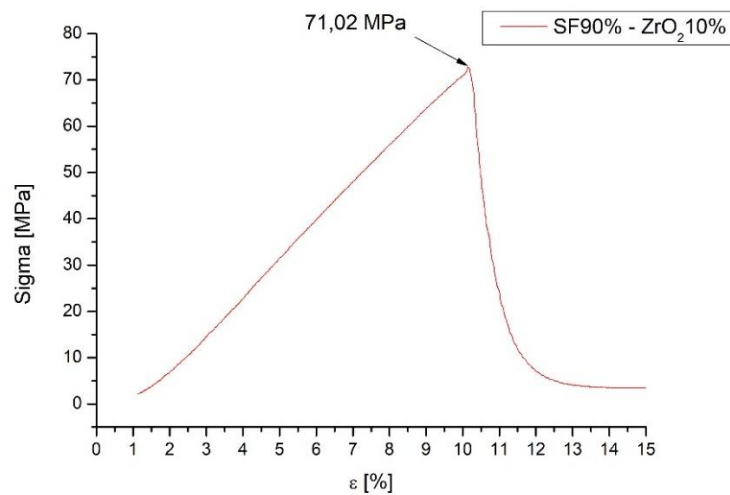


Figura 7.18: andamento prova trazione σ - ϵ del campione SF90% - ZrO₂10%

Le curve sforzo-deformazione mostrano un comportamento fragile del materiale, ottenendo due valori del carico di rottura simili, ma una diminuzione della deformazione del campione che va dal 13,7% per il campione SF al 10,24% per il campione contenente

il 10% di ZrO₂ NPs. È stato calcolato il modulo elastico attraverso la pendenza della retta che interpola i punti tra il 6 e il 10% di deformazione; in tabella 7.8 vengono riassunti i valori principali per tale prova

Tabella 7.8: valori riassuntivi della prova a trazione uniassiale svolta a 0.5 mm/s per ogni attuatore

Provino	Spessore	Modulo E [Mpa]	ε [%]	UTS [Mpa]
SF	0,204	688,58	13,7	72.5
90% SF – 10% ZrO ₂	0,164	778,24	10,24	71.02

Tale metodo non ha fornito informazioni approfondite sul comportamento meccanico del materiale dovuto all'elevata velocità di trazione, pari a 0.5 mm/s, e ad un pretensionamento del provino, pari a 0.1N, che hanno causato la rottura di quest'ultimo dopo pochi secondi dall'inizio della prova.

In figura 7.19 viene mostrato lo spettro di assorbimento delle membrane sopra citate

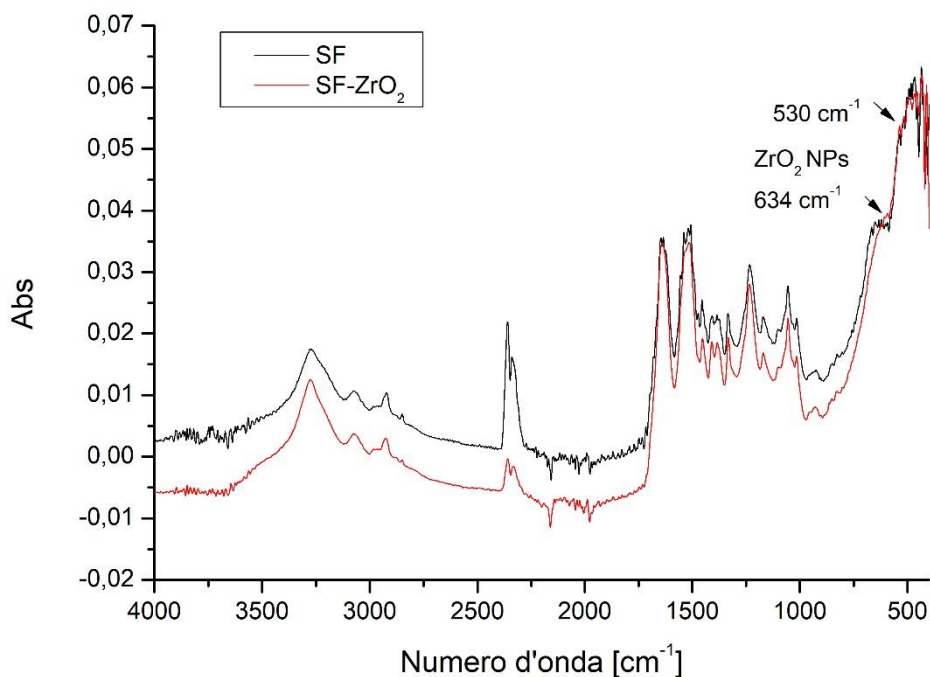


Figura 7.19: FTIR-ATR membrane SF ed SF-ZrO₂

È stato ampiamente dimostrato che i picchi relativi della zirconia si trovano a 705, 634 e 530 cm⁻¹: i primi due dovuti alla vibrazione del legame Zr-O-Zr mentre l'ultimo dovuto

alla vibrazione del legame Zr-OH [136]. Nel nostro caso l'individuazione a 530 cm^{-1} è mascherato da un rumore di fondo dello strumento utilizzato, mentre a 634 cm^{-1} è possibile notare un leggero picco caratteristico delle nanoparticelle. Lo spettro caratteristico dell'ammide I e II viene mostrato in figura 7.20

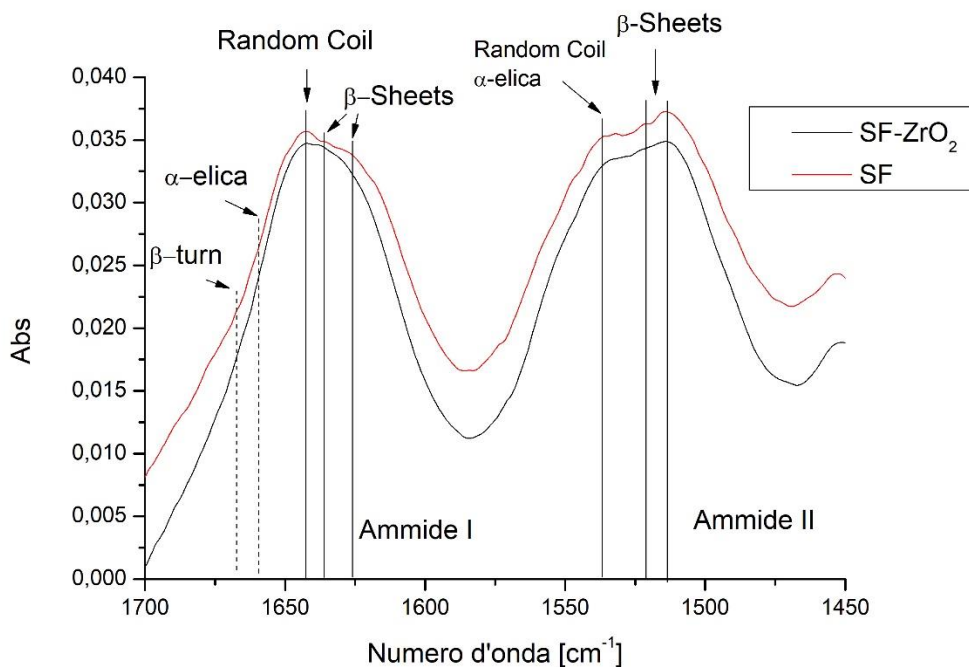


Figura 7.20: FTIR-ATR membrane SF ed SF-ZrO₂ – Ammide I e II

Lo spettro di assorbimento in figura 7.20 mostra, per l'ammide I, dei picchi di assorbimento a 1667 cm^{-1} per la conformazione β -turn, 1660 cm^{-1} per la conformazione σ -elica, 1642 cm^{-1} per la conformazione *Random Coils*, 1635 cm^{-1} caratteristici dei β -sheets (forti) intermolecolari e a 1625 cm^{-1} relativi ai β -sheets (deboli). Per l'ammide II invece troviamo i picchi caratteristici del *Random Coil/aelica* a 1540 cm^{-1} e quelli relativi alla conformazione β -sheets nel range $1515\text{-}1520\text{ cm}^{-1}$. Al fine di valutare l'influenza delle ZrO₂ NPs sulla struttura della seta, e quindi sulla quantità dei β -sheets, è stata effettuata la *Fourier Self-Deconvolution (FSD)* [130,137] espressa nei grafici 7.21 e 7.22

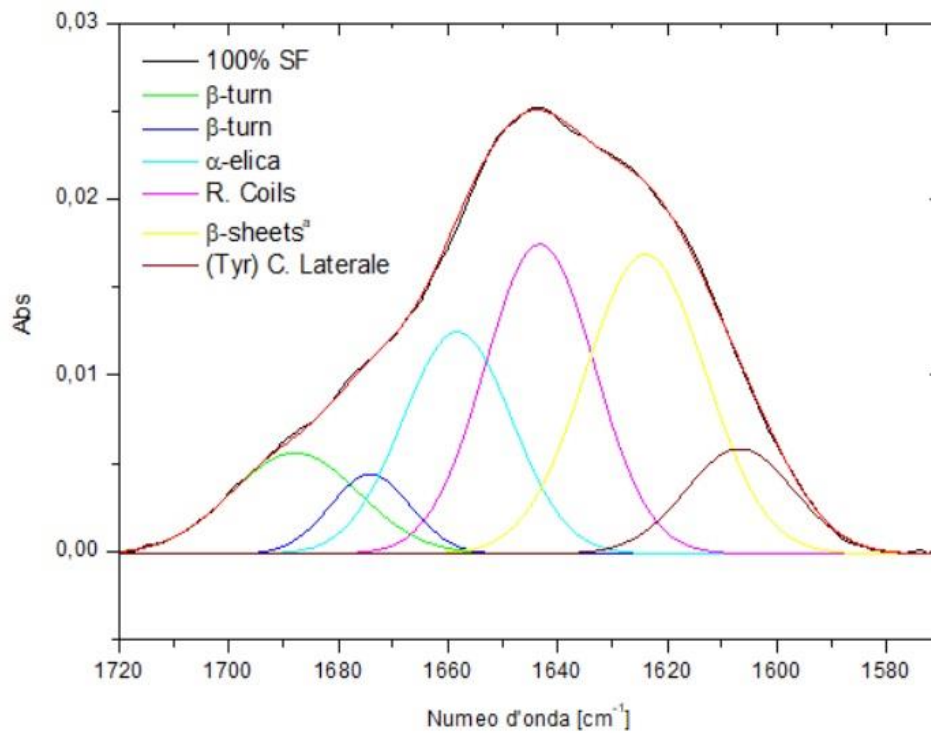


Figura 7.21: FSD dell'ammide I del campione SF

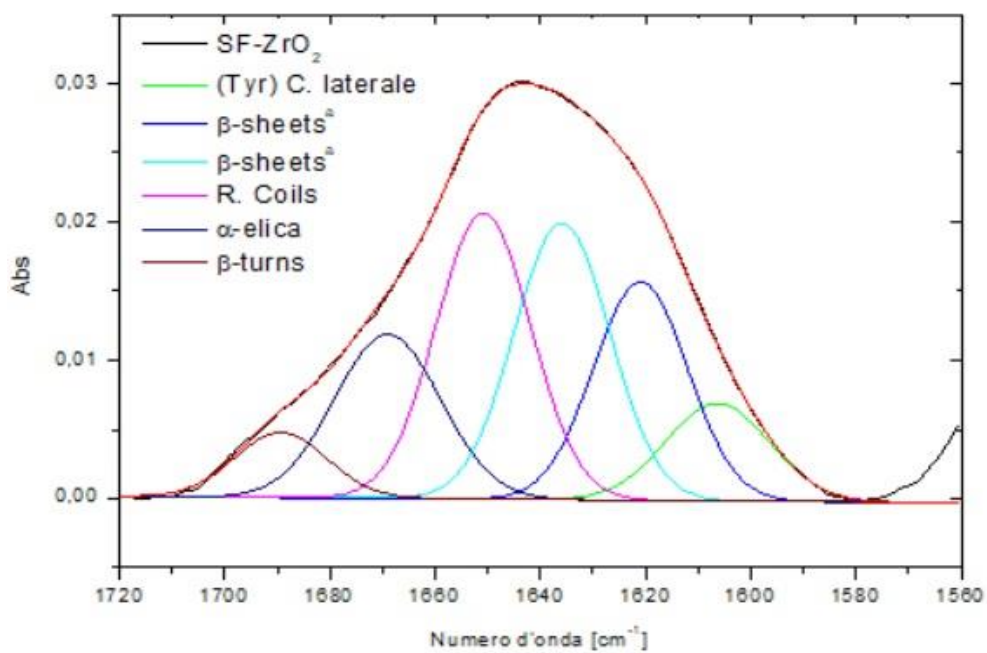


Figura 7.22: FSD dell'ammide I del campione SF-ZrO₂

Attraverso questa analisi è stato possibile dare delle informazioni sul grado di cristallinità, e quindi sulla quantità percentuale dei *β-sheets* per i due campioni, espressi in figura 7.23

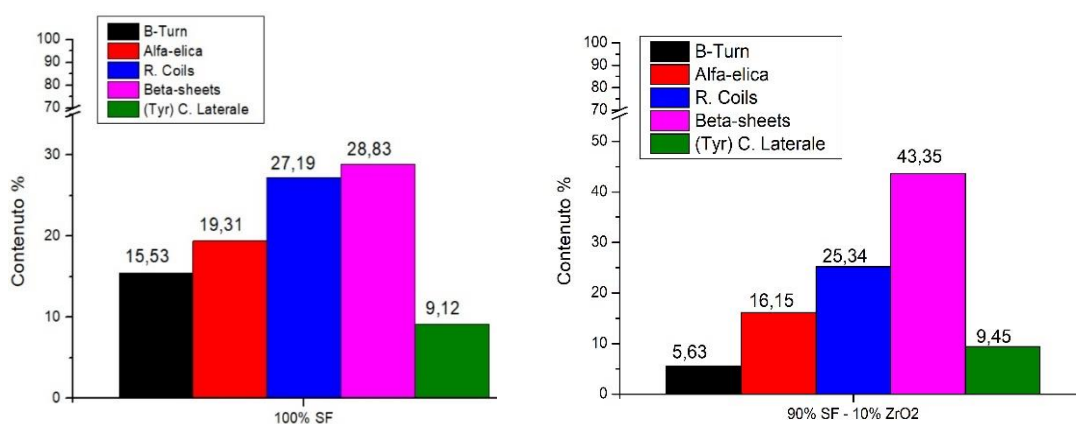


Figura 7.23: Contenuto della conformazione *Random Coil* e β -sheets nelle membrane

L'utilizzo delle ZrO_2 NPs ha permesso una diminuzione della conformazione β -turn dal 15.53 al 5.63%, una diminuzione della conformazione α -elica dal 19.31 al 16.15%, una diminuzione della concentrazione dei *Random Coil* dal 27.19% al 25.34%, una variazione nulla della concentrazione (Tyr) catena laterale e di conseguenza un aumento del contenuto dei β -sheets dal 28.83% al 43.35%, aumentando il grado di cristallinità del nanocomposito 90%SF-10% ZrO_2 . Questo risultato è in accordo con quanto espresso in letteratura [130] ed è inoltre in accordo con i valori della prova meccanica svolta, infatti da tabella 7.8 è possibile notare un aumento del modulo elastico per il provino 90%SF-10% ZrO_2 da 688.58 Mpa a 778.24 Mpa e una diminuzione della deformazione dal 13.7% al 10.24%, rendendo il nanocomposito contenente le nanoparticelle più rigido (modulo elastico maggiore) e fragile.

7.2.2 Caratterizzazione degli scaffold prodotti tramite *freeze-dry* e liofilizzazione

Sono stati sintetizzati diversi campioni a diverse concentrazioni di zirconia come presente in tabella 5.3. È stata investigata la fattibilità della sintesi e sono state riscontrate diverse criticità nella realizzazione dei campioni durante la fase di liofilizzazione per tutti i campioni. È stata riscontrata la rottura di tutti i campioni contenenti una concentrazione superiore al 10% di ZrO_2 e una difficoltà nel sintetizzare i campioni 100%SF e 90%SF-10% ZrO_2 . In figura 7.24 viene mostrata un'immagine ottenuta al microscopio ottico del provino 70%SF-30% ZrO_2 soggetto a rottura.

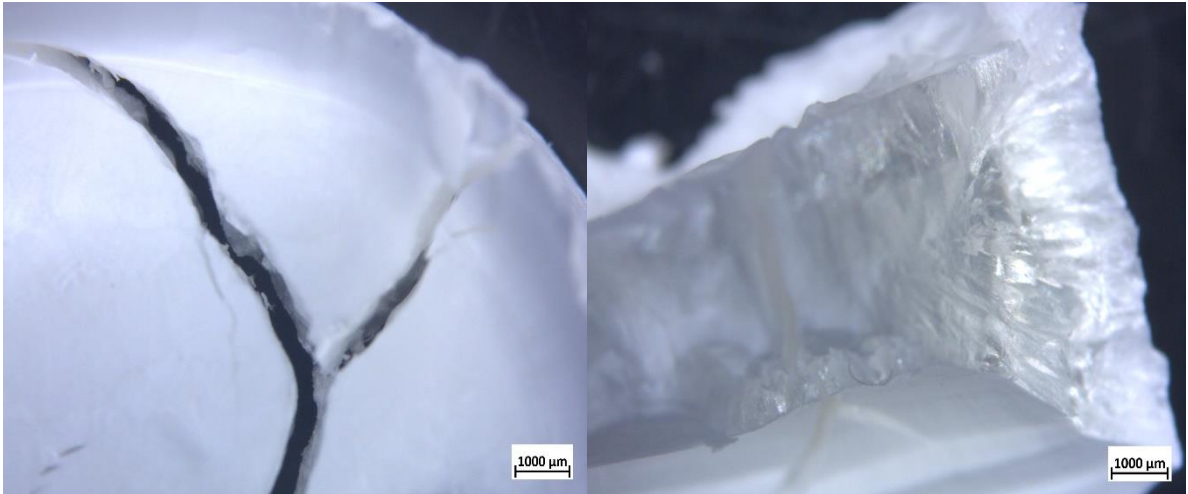


Figura 7.24: Provino 70%SF-30%ZrO₂ soggetto a rottura

In assenza di un numero minimo di provini adeguati a effettuare delle prove meccaniche sono state svolte delle analisi FTIR-ATR sui campioni 100%SF e 90%SF-10%ZrO₂ al fine di valutare il comportamento della ZrO₂ nella struttura della seta, espressi in figura 7.25.

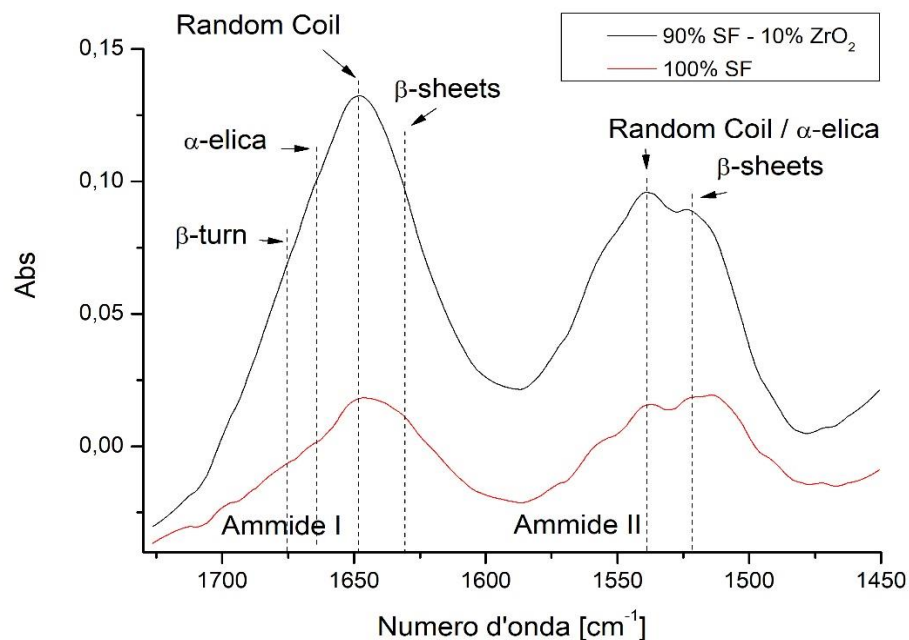


Figura 7.25: FTIR-ATR per i campioni 100%SF e 90%SF-10%ZrO₂

Gli spettri mostrano per l'ammide I dei picchi caratteristici a 1675 cm⁻¹ per la conformazione β -turn, 1660 cm⁻¹ per la conformazione α -elica, 1646 cm⁻¹ per la

conformazione *Random Coil* e 1630 cm^{-1} per la conformazione β -sheets intramolecolari (forti). Per l'ammide II invece i picchi caratteristici sono a 1541 cm^{-1} per la conformazione *Random Coil*/ α -elica, e a 1520 cm^{-1} per i β -sheets. L'analisi FSD [130,139], riportate in figura 7.26 e 7.27, ha permesso di ottenere delle informazioni sulla presenza della conformazione β -sheets all'interno della struttura del nanocomposito.

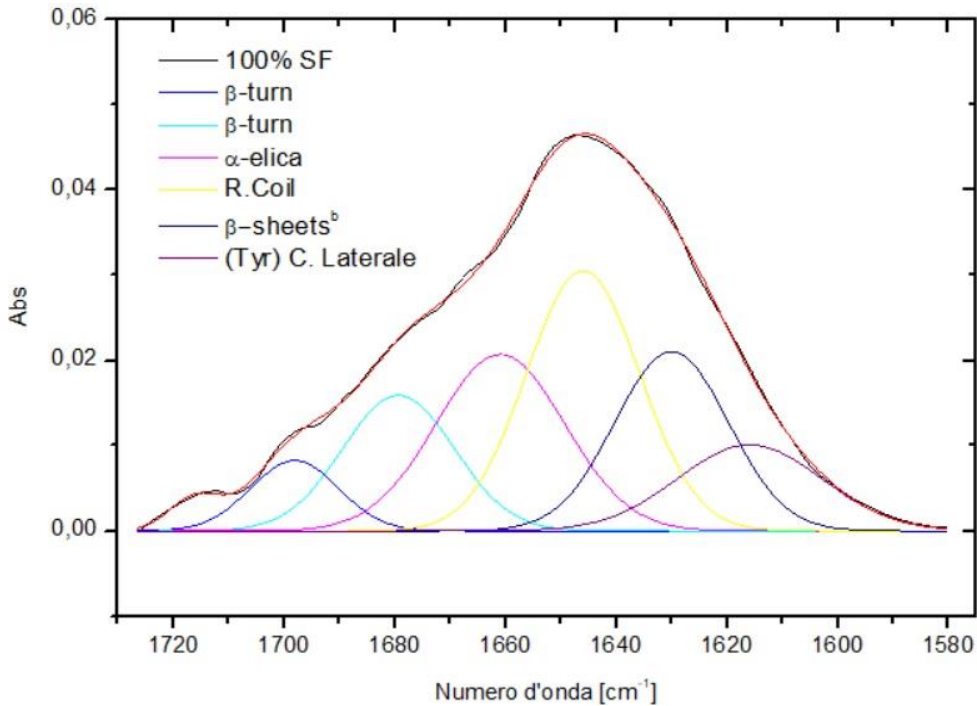


Figura 7.26: FSD amide I del campione 100% SF liofilizzato

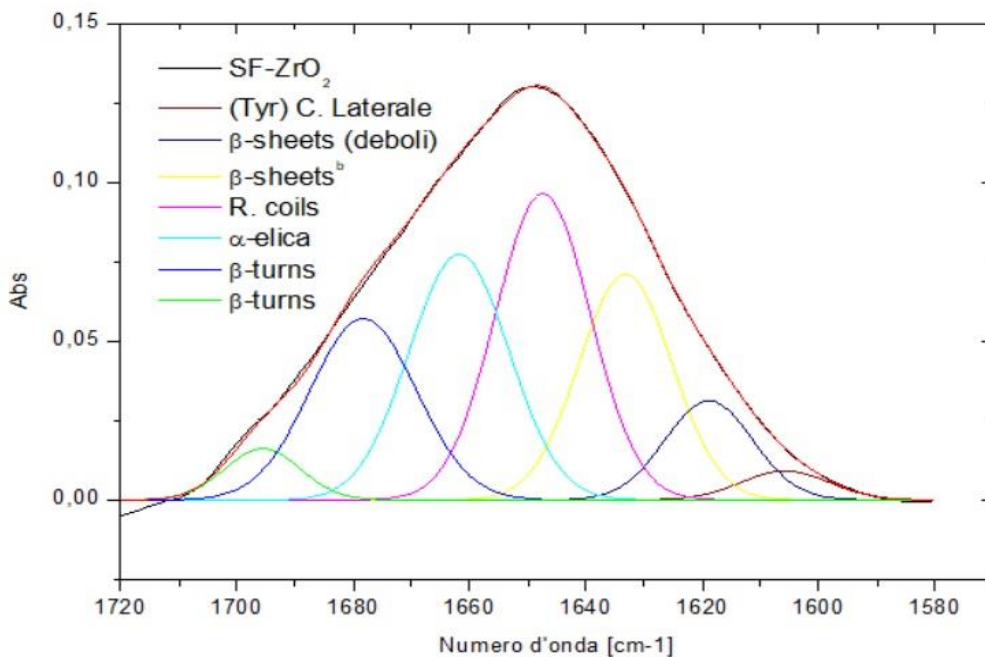


Figura 7.27: FSD amide I del campione 90%SF-10%ZrO₂ liofilizzato

Anche in questo caso è stato possibile affermare che la presenza delle ZrO₂ NPs ha influenzato la struttura della seta, ottenendo un aumento percentuale della conformazione β -sheets dal 19.23% per il campione 100% SF al 27.28% per il campione contenente le ZrO₂ NPs, come si evince in figura 7.28. Inoltre, c'è stata una leggera diminuzione della conformazione *Random Coil* dal 27.87% al 26.71%, una diminuzione della concentrazione della tirosina (Tyr) C. laterale e un leggero aumento della conformazione α -elica dal 21.55% al 22.53%, e dei β -turn dal 20.19% al 21.18%

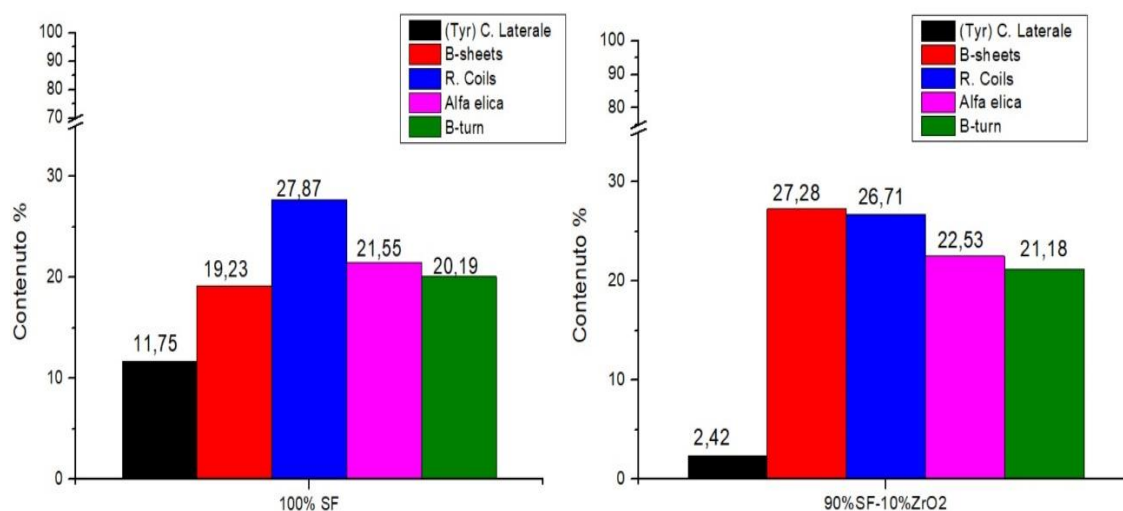


Figura 7.28: Contenuto di β -sheets per i campioni 100%SF e 90%SF-10%ZrO₂ liofilizzati

In figura 7.29 viene mostrato un campione ottenuto mediante *freeze-dry* e liofilizzazione

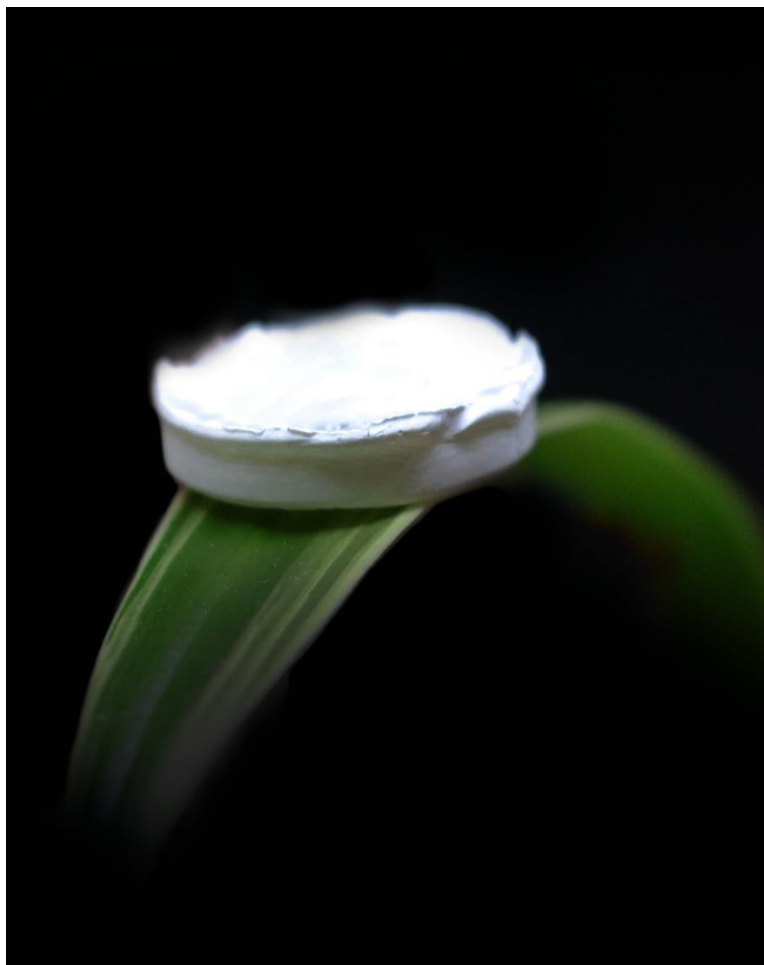


Figura 7.29: Campione 100% SF ottenuto mediante *freeze-dry* e successiva liofilizzazione

7.2.3 Caratterizzazione degli *scaffolds* sintetizzati attraverso *solvent casting*

Sono stati sintetizzati dei campioni, modulando la concentrazione delle ZrO_2 NPs, come espresso in tabella 5.4. È stata investigata la fattibilità della sintesi dei nanocompositi attraverso *solvent casting* al fine di valutare eventuali criticità nella realizzazione dei campioni, ottenendo esito positivo per tutti i campioni presi in esame. In figura 7.30 viene mostrata un immagine ottenuta al microscopio ottico, evidenziando la struttura porosa dello *scaffold* 100%SF.

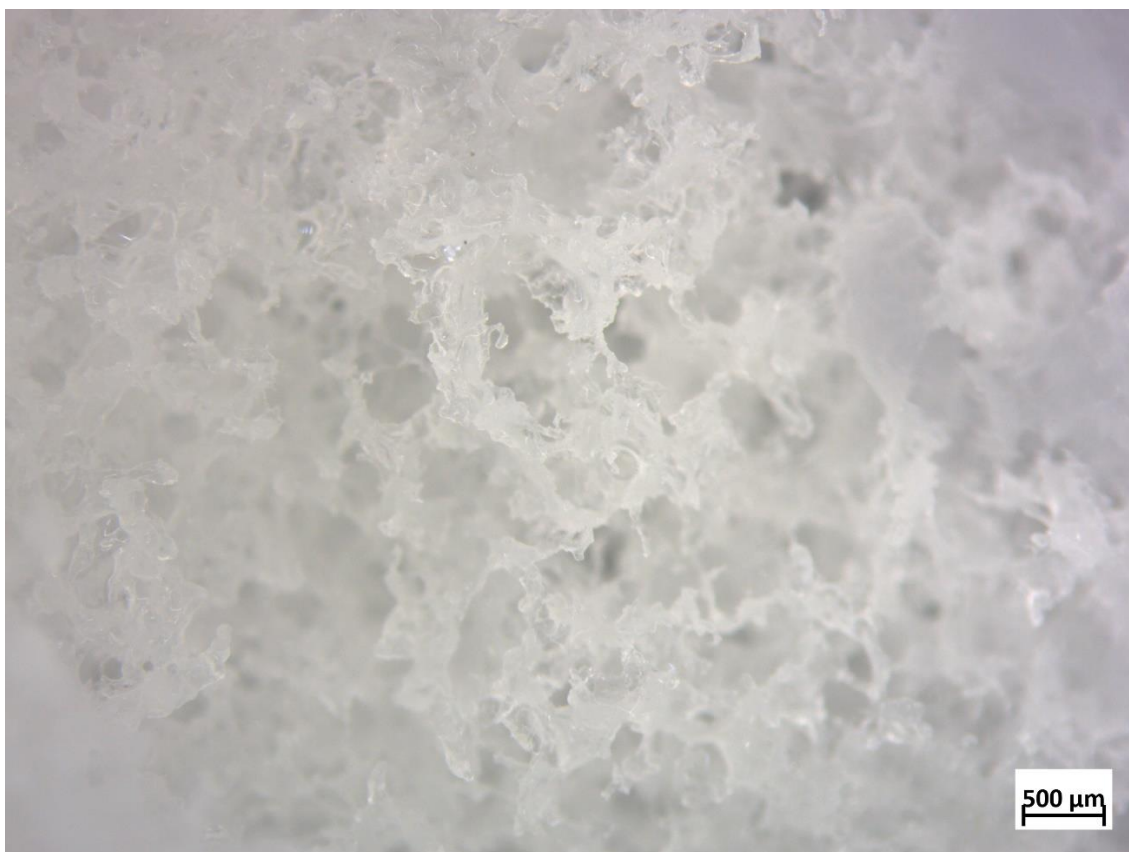


Figura 7.30: Struttura porosa del campione 100%SF

Un dato molto importante per questo tipo di struttura è il calcolo della porosità. È stata investigata la porosità della struttura ottenuta attraverso *liquid displacement method* come da protocollo [128], ottenendo dei valori espressi in tabella 7.9

Tabella 7.9: Valori di porosità ottenuti attraverso protocollo

Campione	V1 [mL]	V2 [mL]	V3 [mL]	W [mg]	Porosità [%]
100%SF	5	5,25	4,5	47,2	66,67
90%SF - 10%ZrO2	5	5,2	4,25	74,2	78,95

Mantenendo la concentrazione della seta all'6% w/w, la porosità dipende dalla dimensione dei pori e quindi dalla quantità di sale utilizzato come agente porogeno. La quantità di quest'ultimo può essere scelta o rapportandolo alla massa della fibroina di seta utilizzato oppure in base alla massa totale del nanocomposito. In questo lavoro è stato rapportato il sale seguendo il protocollo [128], tenendo costate il rapporto 25:1 rispetto alla massa della seta utilizzata. Questa scelta è stata fatta in quanto l'utilizzo della seconda

modalità ha comportato delle criticità nella realizzazione del nanocomposito contenente le ZrO_2 NPs. L'aumento della porosità per il campione contenente le nanoparticelle potrebbe essere dovuta all'interferenza di quest'ultime nella formazione di un network continuo di seta. In figura 7.31 viene mostrato un campione 100%SF ottenuto attraverso la tecnica *solvent casting*



Figura 7.31: Campione 100%SF ottenuto mediante tecnica *Solvent Casting*

CAPITOLO 8

CONCLUSIONI E SVILUPPI FUTURI

In questo lavoro di tesi è stata svolta la sintesi e la caratterizzazione di nanocompositi a matrice di seta. La prima fase della ricerca si è concentrata quindi sulla produzione di nanoparticelle di ossido di zinco che, grazie alle sue caratteristiche di luminescenza sotto forma di *Quantum Dots*, alle proprietà antibatteriche e di non tossicità, sono state utilizzate come *feeding* per il baco da seta attraverso opportuni protocolli. La sintesi delle nanoparticelle di ZnO è stata svolta seguendo uno *scale-up* del protocollo utilizzato, effettuando una caratterizzazione preliminare: l'analisi XRD ha mostrato la presenza della struttura cristallina della wurtzite, ottenendo una dimensione delle nanoparticelle di circa 5 nm; l'analisi FTIR delle nanoparticelle in DMSO ha mostrato una cattiva monodispersione e quindi la presenza di più popolazioni di particelle dovuto allo *scale-up*; questo è stato superato attraverso precipitazione e ridispersione in etanolo delle nanoparticelle; l'analisi spettrofluorimetrica ha mostrato un unico picco di emissione "da difetti" ad una lunghezza di 500-600 nm, indicando la presenza di molti difetti superficiali come gruppi insaturi, mentre attraverso la TGA-DSC è stato possibile calcolare la riduzione in peso delle nanoparticelle, ottenendo una resa di reazione comparabile con quanto visto in letteratura. Dopo aver effettuato il *feeding* sono state analizzati i bozzoli attraverso una comparazione visiva al fine di valutarne le dimensioni, con successiva analisi SEM-EDX e di luminescenza attraverso lampada UV. È stato constatato che i bachi che hanno seguito una dieta contenente le ZnO NPs presentavano una dimensione dei bozzoli inferiore rispetto a quelli che hanno seguito una dieta normale mentre l'analisi SEM ha dimostrato un diametro inferiore per le fibre SF-ZnO. Gli EDX non hanno rilevato il contenuto dell'elemento Zn mentre dall'analisi di luminescenza non sono apparse differenze tra i bozzoli in esame. Successivamente sono state analizzate attraverso tecnica FTIR-ATR le fibre della seta sgommate, mostrando un picco caratteristico a 523 cm^{-1} attribuita alla modalità di stiramento dello ZnO. Questa tecnica mostra anche lo spettro di assorbimento caratteristico della fibroina di seta evidenziando i picchi relativi all'ammide I, II e III. Tale tecnica ha permesso di identificare le conformazioni presenti per l'ammide I, nel range $1700\text{-}1580\text{ cm}^{-1}$, confermando la

presenza dei β -turn, α -elica, *Random Coil* e β -sheets. La *Fourier self-deconvolution* ha permesso di ottenere delle informazioni sul contenuto dei β -sheets e quindi sul grado di cristallinità tra le fibre SF-Controllo ed SF-ZnO: in quest'ultime si registra un calo della conformazione β -sheets rispetto alle prime e un aumento della tirosina (catena laterale). Le analisi precedentemente citate non hanno permesso di confermare la presenza delle ZnO NPs, ragion per cui si è scelto di effettuare l'ICP per verificare l'effettivo inglobamento delle NPs nella seta da parte del baco; i risultati hanno permesso, grazie alle informazioni ottenute dalle precedenti caratterizzazioni, di confermare la presenza delle ZnO NPs nelle fibre dei bozzoli SF-ZnO.

La seconda fase della ricerca si è concentrata sullo studio e la realizzazione di strutture a base di fibroina di seta attraverso l'aggiunta di nano particelle di zirconia. Sono stati prodotti dei nanocompositi sottoforma di film *free-standing* e *scaffolds*, ottenuti attraverso tecnica di *solvent casting* e *freeze-dry* con successiva liofilizzazione. I film sono stati caratterizzati attraverso prova di trazione monoassiale, grazie alla loro proprietà di omogeneità ed isotropia, e tramite analisi FTIR-ATR; le curve sforzo-deformazione hanno mostrato un comportamento fragile del materiale, ottenendo dei valori simili di carico di rottura, ma una diminuzione della deformazione del campione 90%SF-10%ZrO₂ rispetto a quello di sola seta. Questo andamento, dovuto alla presenza delle nanoparticelle di ZrO₂, viene confermato attraverso l'analisi FTIR-ATR. Quest'ultima infatti ha permesso di identificare i picchi caratteristici della fibroina della seta e della zirconia, calcolando in fine il contenuto percentuale dei β -sheets tra i due campioni in esame attraverso la *Fourier self-deconvolution*. È stato possibile confermare un aumento del contenuto dei β -sheets per il campione 90%SF-10%ZrO₂, aumentando il grado di cristallinità, in accordo con quanto espresso in letteratura, e rendendo il nanocomposito contenente le nanoparticelle più rigido (modulo elastico maggiore) e fragile. È stata investigata la realizzazione degli *scaffolds* ottenuti mediante *freeze-dry* e liofilizzazione, e per i campioni ottenuti mediante tecnica *solvent casting*: i primi hanno mostrato una criticità nella realizzazione dei campioni contenente una concentrazione di ZrO₂ NPs superiore al 10% con conseguente rottura di tutti i campioni dopo liofilizzazione, a differenza di quelli ottenuti con l'agente porogeno che ha portato all'ottenimento dei provini anche con percentuali superiori al 10% in volume di ZrO₂. L'analisi FTIR-ATR e successiva deconvoluzione dei picchi caratteristici dell'ammide I, per i campioni

ottenuti attraverso *freeze-dry* e successiva liofilizzazione, ha permesso di ottenere informazioni sull'influenza delle nanoparticelle utilizzate nella struttura della seta, ottenendo anche in questo caso un aumento del contenuto percentuale dei β -sheets. In fine è stata valutata la porosità dei campioni prodotti attraverso *solvent casting*, tramite l'utilizzo di esano, ottenendo un aumento della porosità per il campione contenente le nanoparticelle; questo potrebbe essere dovuto all'interferenza delle nanoparticelle di ZrO_2 nella formazione di un network continuo di seta. La messa a punto della sintesi degli scaffolds e la completa caratterizzazione in programma di quest'ultimi, come il calcolo della porosità, dei test meccanici, termici ed ottici, non sono state effettuate a causa della pandemia dovuto alla presenza del COVID-19.

Sviluppi futuri per la ricerca nel campo del *Feeding Engineering* attraverso l'utilizzo delle ZnO NPs devono prevedere l'utilizzo di una sintesi *green* di quest'ultime, al fine di minimizzare il tasso di mortalità dei bachi e massimizzare l'assimilazione della dieta già nei primi stadi di muta. Inoltre, si dovrebbe procedere ad una analisi meccanica delle fibre, comparandone le proprietà di resistenza con le fibre ottenute attraverso una dieta normale, al fine di poter investigare gli ipotetici campi di applicazioni in campo biomedico.

Sarebbe auspicabile un'analisi più approfondita dei nanocompositi seta/zirconia al fine di migliorarne la processabilità ed effettuare una completa caratterizzazione. Le proprietà di leggerezza, legate alle loro proprietà meccaniche, di bio compatibilità e di bio degradabilità, possono portare alla realizzazione di dispositivi in campo biomedico; in questo senso sarebbe consigliabile effettuare uno studio sulla sintesi di *scaffolds* a base di fibroina di seta/zirconia/chitosano, così da sfruttare la grande aria superficiale offerta dai pori che possono comportarsi come mezzo di deposito per la proliferazione cellulare per favorire l'osteogenesi mediante produzione di idrossiapatite.

Bibliografia

- [1]. Enciclopedia Treccani, Vers. Online <http://www.treccani.it/enciclopedia/seta/>
- [2]. Lemaire, C. & Minet, J., *The Bombycoidea and their Relatives*, in Kristensen, N. P. (Ed.) - *Handbuch der Zoologie / Handbook of Zoology, Band 4: Arthropoda - 2. Hälfte: Insecta - Lepidoptera, moths and butterflies*, Kükenthal, W. (Ed.), Fischer, M. (Scientific Ed.), Teilband/Part 35: Volume 1: Evolution, systematics, and biogeography, ristampa 2013, Berlino, New York, Walter de Gruyter, 1999 [1998]
- [3]. Murphy, A.R. & Kaplan, D.L. *Biomedical application of chemically modified silk fibroin*. J. Mat. Chem. 19, 6443-6450 (2009).
- [4]. X. Wang, E. Wenk, A. Matsumoto, L. Meinel, C. Li and D. L. Kaplan, *Silk microspheres for encapsulation and controlled release*, J. Control. Release, 2007,117,360-370;
- [5]. Sofia, S., McCarthy, M.B., Gronowicz, G. & Kaplan, D.L. *Functionalized silk-based biomaterials for bone formation*, J. Biomed. Mat Res. 54,239-148 (2001);
- [6]. G. H. Altaman, F. Diaz, C. Jakuba, T. Calabro, R. L. Horan, J. Chen, H. Lu, J. Richmond, D.L. Kaplan, *Silk-based biomaterials*, biomaterials (2003)
- [7]. Zhou CZ, Confalonieri F, Medina N, Zivanovic Y, Esnault C, Yang T, Jacquet M, Janin J, Duguet M, Perasso R, Li ZG *Nucleic Acids Res.* 2000 Jun 15; 28(12):2413-9.
- [8]. Kaplan DL, Mello SM, Arcidiacono S, Fossey S, *Senecal KWM. In: Protein based materials*. McGrath KKD, editor. Boston: Birkhauser; 1998. pp. 103–131.
- [9]. Altman GH, Diaz F, Jakuba C, Calabro T, Horan RL, Chen J, Lu H, Richmond J, Kaplan DL - *Silk-based biomaterials*. Biomaterials. 2003 Feb; 24(3):401-16
- [10]. Dal Pra I, Freddi G, Minic J, Chiarini A, Armato U. *Biomaterials*. 2005 May; 26(14):1987-99.
- [11]. Nazarov R, Jin HJ, Kaplan DL, *Porous 3-D scaffolds from regenerated silk fibroin*. Biomacromolecules. 2004 May-Jun; 5(3):718-26

- [12]. Gage LP, Manning RF J, *Internal structure of the silk fibroin gene of Bombyx mori. I The fibroin gene consists of a homogeneous alternating array of repetitious crystalline and amorphous coding sequences.* Biol Chem. 1980 Oct 10; 255(19):9444-50.
- [13]. Gulrajani ML (1992) *Degumming of silk Rev Prog Coloration* 22 79-89
- [14]. Tetsuo Asakura, Rena Sugino, Juming Yao, Hidehiko Takashima, Raghuvansh Kishore, *Comparative Structure Analysis of Tyrosine and Valine Residues in Unprocessed Silk Fibroin (Silk I) and in the Processed Silk Fiber (Silk II) from Bombyx mori Using Solid-State C, N, and H NMR,* Biochemistry 2002, 41, 13, 4415-4424;
- [15]. Williams, D. F. (1987). *Definitions in Biomaterials. Proceedings of a Consensus Conference of the European Society for Biomaterials,* Chester, England, March 3–5, 1986, Vol. 4, Elsevier, New York.
- [16]. Ratner, B. Hoffmann A.S., Schoen F.J., Lemons, J.E., “*Biomaterials Science. An introduction to materials in medicine*”. Academic Press. San Diego (1996).
- [17]. Gage LP., Manning RF, *Internal structure of the silk fibroin gene of B.mori,* *Journal of Biological Chemistry* (1980), 255, 9444-9450;
- [18]. Minoura N., Tsukada M., Nagura M., *Physico-chemical properties of silk fibroin membrane as a biomaterial,* *Biomaterials* (1990), 11, 430-434;
- [19]. Arai, T.; Freddi, G.; Innocenti, R.; Tsukada, M. *Biodegradation of Bombyx mori silk fibroin fibers and films.* J. Appl. Polym. Sci. 2004, 91, 2383-2390.
- [20]. Naira, L.S.; Laurencina, C.T. *Biodegradable polymers as biomaterials.* Prog. Polym. Sci. 2007, 32, 762-798.
- [21]. Cao Y. e Wang B., *Biodegradation of silk biomaterials,* *International Journal of Molecular Sciences* (2009), 10, 1514-1524;
- [22]. C. Vepari, D.L. Kaplan, *Silk as biomaterial,* *Progress in Polymer Science* (2007), 32, 991-1007;
- [23]. Hu Tao, D.L. Kaplan, G. Omenetto – *Silk Materials – A road to Sustainable High Technology* Adv. Mater. 2012, 24, 2824–2837
- [24]. V. Renugopalakrishnan and Randolph V. Lewis – *Bionanotechnology – proteins to Nanodevices.*

- [25]. Shao, Z.; Vollrath, F. Materials: *Surprising strength of silkworm silk*. Nature 2002, 418, 74
- [26]. Wang, Q.; Wang, C.; Zhang, M.; Jian, M.; Zhang, Y. *Feeding single-walled carbon nanotubes or graphene to silkworms for reinforced silk fibers*. Nano Lett. 2016, 16, 6695–6700
- [27]. Cheng, L.; Huang, H.; Chen, S.; Wang, W.; Dai, F.; Zhao, H. *Characterization of silkworm larvae growth and properties of silk fibres after direct feeding of copper or silver nanoparticles*. Mater. Des. 2017, 129, 125–134.
- [28]. Wang, Q.; Chen, Q.; Yang, Y.; Shao, Z. *Effect of various dissolution systems on the molecular weight of regenerated silk fibroin*. Biomacromolecules 2012, 14, 285–289.
- [29]. Zhang, P.; Lan, J.; Wang, Y.; Huang, C.Z. *Luminescent golden silk and fabric through in situ chemically coating pristine-silk with gold nanoclusters*. Biomaterials 2015, 36, 26–32.
- [30]. Meng, M.; He, H.; Xiao, J.; Zhao, P.; Xie, J.; Lu, Z. *Controllable in situ synthesis of silver nanoparticles on multilayered film-coated silk fibers for antibacterial application*. J. Colloid Interface Sci. 2016, 461, 369–375.
- [31]. Iizuka, T.; Sezutsu, H.; Tatematsu, K.I.; Kobayashi, I.; Yonemura, N.; Uchino, K.; Nakajima, K.; Kojima, K.; Takabayashi, C.; Machii, H. *Colored fluorescent silk made by transgenic silkworms*. Adv. Funct. Mater. 2013, 23, 5232–5239.
- [32]. Kim, D.W.; Lee, O.J.; Kim, S.-W.; Ki, C.S.; Chao, J.R.; Yoo, H.; Yoon, S.-I.; Lee, J.E.; Park, Y.R.; Kweon, H. *Novel fabrication of fluorescent silk utilized in biotechnological and medical applications*. Biomaterials 2015, 70, 48–56.
- [33]. Tansil, N.C.; Koh, L.D.; Han, M.Y. *Functional silk: Colored and luminescent*. Adv. Mater. 2012, 24, 1388–1397.
- [34]. Nisal, A.; Trivedy, K.; Mohammad, H.; Panneri, S.; Sen Gupta, S.; Lele, A.; Manchala, R.; Kumar, N.S.; Gadgil, M.; Khandelwal, H. *Uptake of Azo dyes into silk glands for production of colored silk cocoons using a green feeding approach*. ACS Sustain. Chem. Eng. 2013, 2, 312–317.
- [35]. Wang, J.T.; Li, L.L.; Zhang, M.Y.; Liu, S.L.; Jiang, L.H.; Shen, Q. *Directly obtaining high strength silk fiber from silkworm by feeding carbon nanotubes*. Mater. Sci. Eng. C 2014, 34, 417–421.

- [36]. Cai, L.; Shao, H.; Hu, X.; Zhang, Y. *Reinforced and ultraviolet resistant silks from silkworms fed with titanium dioxide nanoparticles*. ACS Sustain. Chem. Eng. 2015, 3, 2551–2557
- [37]. Wu, G.H.; Song, P.; Zhang, D.Y.; Liu, Z.Y.; Li, L.; Huang, H.M.; Zhao, H.P.; Wang, N.N.; Zhu, Y.Q. *Robust composite silk fibers pulled out of silkworms directly fed with nanoparticles*. Int. J. Biol. Macromol. 2017, 104, 533–538.
- [38]. Tansil, N.C.; Li, Y.; Teng, C.P.; Zhang, S.; Win, K.Y.; Chen, X.; Liu, X.Y.; Han, M.Y. *Intrinsically colored and luminescent silk*. Adv. Mater. 2011, 23, 1463–1466
- [39]. Malay, A.D.; Sato, R.; Yazawa, K.; Watanabe, H.; Ifuku, N.; Masunaga, H.; Hikima, T.; Guan, J.; Mandal, B.B.; Damrongsakkul, S. *Relationships between physical properties and sequence in silkworm silks*. Sci. Rep. 2016, 6, 27573.
- [40]. Keten, S.; Xu, Z.; Ihle, B.; Buehler, M.J. *Nanoconfinement controls stiffness, strength and mechanical toughness of [beta]-sheet crystals in silk*. Nat. Mater. 2010, 9, 359–367
- [41]. Zhou, L.; Chen, X.; Shao, Z.; Huang, Y.; Knight, D.P. *Effect of metallic ions on silk formation in the mulberry silkworm, Bombyx mori*. J. Phys. Chem. B 2005, 109, 16937–16945.
- [42]. Koh, L.D.; Cheng, Y.; Teng, C.P.; Khin, Y.W.; Loh, X.J.; Tee, S.Y.; Low, M.; Ye, E.; Yu, H.D.; Zhang, Y.W. *Structures, mechanical properties and applications of silk fibroin materials*. Prog. Polym. Sci. 2015, 46, 86–110.
- [43]. Somashekarappa, H.; Annadurai, V.; Sangappa; Subramanya, G.; Somashekar, R., *Structure-property relation in varieties of acid dye processed silk fibers*. Mater. Lett. 2002, 53 (6), 415-420.
- [44]. H. J. Jin, S. V. Fridrikh, G. C. Rutledge, D. L. Kaplan, *Biomacromolecules* 2002, 3, 1233.
- [45]. X. Q. Jiang, J. Zhao, S. Y. Wang, X. J. Sun, X. L. Zhang, J. Chen, D. L. Kaplan, Z. Y. Zhang, *Biomaterials* 2009, 30, 4522.
- [46]. S. Ghosh, S. T. Parker, X. Wang, D. L. Kaplan, J. A. Lewis, *Adv. Funct. Mater.* 2008, 18, 1883.
- [47]. H. Perry, A. Gopinath, D. L. Kaplan, L. Dal Negro, F. G. Omenetto, *Adv. Mater.* 2008, 20, 3070

- [48]. Hadis Morkoc and Umit Ozgur – *Zinc Oxide – Fundamentals, materials and Device Technology* – Wiley-VCH 2007
- [49]. Chennupati Jagadish, Stephen J. Pearton - *Zinc Oxide Bulk, Thin Films and Nanostructures_ Processing, Properties, and Applications* - Elsevier Science (2006)
- [50]. Kelly sooklal, Brian S. Cullum, S. Michael Angel, and Catherine J. Murphy, *Photophysical Properties of ZnS Nanocluster with spatially Localized Mn²⁺*, The journal of physical Chemistry 100 (1996), no. 11, 4551-4555.
- [51]. Haibo Zeng, Guotao Duan, Yue Li, Shikuan Yang, Xiaoxia Xu, and Weiping Cai, *Blue Luminescence of ZnO Nanoparticles Based on Non-Equilibrium Processes: Defect Origins and Emission Controls*, advanced Functional Materials 20 (2010), no. 4, 561-572.
- [52]. Nick S Norberg, Kevin R Kittilstved, James E Amonette, Ravi K Kukkadapu, Dana a Schwartz, and Daniel R Gamelin, *Synthesis of colloidal Mn²⁺:ZnO quantum dots and high-TC ferromagnetic nanocrystalline thin films.*, Journal of the American Chemical Society 126 (2004), no. 30, 9387-98.
- [53]. S. O. Kucheyev, J. E. Bradby, J. S. Williams, C. Jagadish, M. V. Swain, *Appl. Phys. Lett.* 80 (2002) 956.
- [54]. V. A. Coleman, J. E. Bradby, C. Jagadish, P. Munroe, Y. W. Heo, S. J. Pearton, D. P. Norton, M. Inoue, M. Yano, *Appl. Phys. Lett.* 86 (2005) 203105.
- [55]. S. Desgreniers, *Phys. Rev. B* 58 (1996) 11425.
- [56]. J. E. Jaffe, A. C. Hess, *Phys. Rev. B* 48 (1993) 7903.
- [57]. Landolt-Börnstein, O. Madelung (Eds.), New Series, Group III: Solid State Physics, Low Frequency Properties of Dielectric Crystals: Piezoelectric, Pyroelectric and Related Constants, vol. 29b, Springer, Berlin, 1993.
- [58]. E. E. Tokarev, I. B. Kobayakov, I. P. Kuz'mina, A. N. Lobachev, G. S. Pavo, *Sov. Phys. Soild State* 17 (1975) 629.
- [59]. M. Catti, Y. Noel, R. Dovesi, *J. Phys. Chem. Solids* 64 (2003) 2183.
- [60]. A. D. Corso, M. Posternak, R. Resta, A. Baldereschi, *Phys. Rev. B* 50 (1994) 10715.

- [61]. Landolt-Börnstein, O. Madelung (Eds.), New Series, Group III: *Solid State Physics, Low Frequency Properties of Dielectric Crystals: Elastic Constants*, vol. 29a, Springer, Berlin, 1993.
- [62]. Kucheyev, S.O., Bradby, J.E., Williams, J.S., Jagadish, C. and Swain, M.V. (2002) *Applied Physics Letters*, 80, 956.
- [63]. P. K. Mishra, H. Mishra, A. Ekielski, S. Talegaonkar, and B. Vaidya, “*Zinc oxide nanoparticles: a promising nanomaterial for biomedical applications,*” *Drug Discovery Today*, vol. 22, no. 12, pp. 1825–1834, 2017.
- [64]. M. D. Newman, M. Stotland, and J. I. Ellis, “*The safety of nanosized particles in titanium dioxide- and zinc oxidebased sunscreens,*” *Journal of the American Academy of Dermatology*, vol. 61, no. 4, pp. 685–692, 2009.
- [65]. A. Kolodziejczak-Radzimska and T. Jesionowski, “*Zinc oxide—from synthesis to application: a review*” *Materials*, vol. 7, no. 4, pp. 2833–2881, 2014.
- [66]. S. Sahoo, M. Maiti, A. Ganguly, J. J. George, and A. K. Bhowmick, “*Effect of zinc oxide nanoparticles as cure activator on the properties of natural rubber and nitrile rubber,*” *Journal of Applied Polymer Science*, vol. 105, no. 4, pp. 2407–2415, 2007.
- [67]. A. Hatamie, A. Khan, M. Golabi et al., “*Zinc oxide nanostructure-modified textile and its application to biosensing, photocatalysis, and as antibacterial material,*” *Langmuir*, vol. 31, no. 39, pp. 10913–10921, 2015.
- [68]. F. X. Xiao, S. F. Hung, H. B. Tao, J. Miao, H. B. Yang, and B. Liu, “*Spatially branched hierarchical ZnO nanorod-TiO₂ nanotube array heterostructures for versatile photocatalytic and photoelectrocatalytic applications: towards intimate integration of 1D-1D hybrid nanostructures,*” *Nanoscale*, vol. 6, no. 24, pp. 14950–14961, 2014.
- [69]. J. W. Rasmussen, E. Martinez, P. Louka, and D. G. Wingett, “*Zinc oxide nanoparticles for selective destruction of tumor cells and potential for drug delivery applications,*” *Expert Opinion on Drug Delivery*, vol. 7, no. 9, pp. 1063–1077, 2010.
- [70]. Z. Y. Zhang and H. M. Xiong, “*Photoluminescent ZnO nanoparticles and their biological applications,*” *Materials*, vol. 8, no. 6, pp. 3101–3127, 2015.

- [71]. S. Kim, S. Y. Lee, and H. J. Cho, “*Doxorubicin-wrapped zinc oxide nanoclusters for the therapy of colorectal adenocarcinoma,*” *Nanomaterials*, vol. 7, no. 11, p. 354, 2017.
- [72]. Reddy KM, Feris K, Bell J, Wingett DG, Hanley C, Punnoose A (2007) *Selective toxicity of zinc oxide nanoparticles to prokaryotic and eukaryotic systems.* *Appl Phys Lett* 90 (21):2139021–2139023
- [73]. Jeng HA, Swanson J (2006) *Toxicity of metal oxide nanoparticles in mammalian cells.* *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng* 41(12):2699–2711
- [74]. Gojova A, Guo B, Kota RS, Rutledge JC, Kennedy IM, Barakat AI (2007) *Induction of inflammation in vascular endothelial cells by metal oxide nanoparticles: effect of particle composition.* *Environ Health Perspect* 115(3):403–409
- [75]. Deng XY, Luan QX, Chen WT et al (2009) *Nanosized zinc oxide particles induce neural stem cell apoptosis.* *Nanotechnology* 20(11):115101
- [76]. Jones N, Ray B, Ranjit KT, Manna AC (2008) *Antibacterial activity of ZnO nanoparticle suspensions on a broad spectrum of microorganisms.* *FEMS Microbiol Lett* 279(1):71–76
- [77]. Yeo, J.; Lee, K.; Lee, Y.; Kim, S.Y. *Simple preparation and characteristics of silk fibroin microsphere.* *Eur. Polym. J.* 2003, 39, 1195–1199.
- [78]. Wenk, E.; Wandrey, A.J.; Merkle, H.P.; Meinel, L. *Silk fibroin spheres as a platform for controlled drug delivery.* *J. Control. Release* 2008, 132, 26–34.
- [79]. Gupta, V.; Aseh, A.; Rios, C.N.; Aggarwal, B.B.; Mathur, A.B. *Fabrication and characterization of silk fibroin-derived curcumin nanoparticles for cancer therapy.* *Int. J. Nanomed.* 2009, 4, 115–122.
- [80]. Kim, M.K.; Lee, J.Y.; Oh, H.; Song, D.W.; Kwak, H.W.; Yun, H.; Um, I.C.; Park, Y.H.; Lee, K.H. *Effect of shear viscosity on the preparation of sphere-like silk fibroin microparticles by electrospraying.* *Int. J. Biol. Macromol.* 2015, 79, 988–995.
- [81]. Yu Qi, Hui Wang, KaiWei, Ya Yang, Ru-Yue Zheng, Ick Soo Kim and Ke-Qin Zhang, *A Review of Structure Construction of Silk Fibroin Biomaterials from Single Structures to Multi-Level Structures* *Int. J. Mol. Sci.* 2017, 18, 237

- [82]. C. Piconi, G. Maccauro, *Zirconia as a ceramic biomaterial*, *Biomaterials* 20 (1999) 1-25;
- [83]. J.D. Cawley, *Binary Oxide Ceramics: Al₂O₃, ZrO₂, Structure and Properties*
- [84]. C. Piconi, *Oxide Ceramics for Biomedical Applications*, *Encyclopedia of Materials: Science and Technology* ISBN: 0-08-0431526 pp. 6595±6601
- [85]. K. Bhowmick, M. Bhattacharya, S. Mitra, K. D. Kumar, P. K. Maji, A. Choudhury, J. J. George, and G. C. Basak, *Morphology–Property Relationship in Rubber-Based Nanocomposites: Some Recent Developments*, *Advanced Rubber Composites*, Springer, 2011, pp. 1–83;
- [86]. Tesi magistrale in Ingegneria dei Materiali, *Nanocompositi di fibroina di seta e zirconia*, Università degli Studi di Padova – Isacco Soligo
- [87]. Pedro Henrique Cury Camargo, Kestur Gunduppa Satyanarayana, Fernando Wypych, *Nanocomposite: Synthesis, Structure, Properties and New Application Opportunities*, in *Materials Research*, vol. 12, 2009, pp. 1-39.
- [88]. Kamigaito, O, *What can be improved by nanometer composites?* *J. Jpn. Soc. Powder Powder Metall.* 38:315-21, 1991 in Kelly, A, *Concise encyclopedia of composites materials*, Elsevier Science Ltd, 1994.
- [89]. Yasser Zare, *Study of Nanoparticle Aggregation/agglomeration in polymer particulate nanocomposites by mechanical properties*, in *Composites*, A 84, 2016, pp. 158-164.
- [90]. D. N. Rockwood, R. C. Preda, T. Yücel, X. Wang, M. L. Lovett and D. L. Kaplan, *Nat. Protoc.*, 2011, 6, 1612.
- [91]. Ander Reizabal, Sergio Gonçalves, Ricardo Brito-Pereira, c Pedro Costa, Carlos M. Costa, Leyre Perez-Alvarez, ab Jose Luis Vilas-Vilelaaband Senentxu Lanceros-Mendez, *Optimized silk fibroin piezoresistive nanocomposites for pressure sensing applications based on natural polymers*, *Nanoscale Adv.*, 2019, 1, 2284
- [92]. F. Lucas, J. T. B. Shaw, and S. G. Smith, *I. The Amino Acid Composition of Various Fibroins and its Significance in Relation to their Crystal Structure and Taxonomy* *J. Mol. Biol.* (1960) 2, 339-349
- [93]. Subhas Kundu, *Silk Biomaterials for Tissue Engineering and Regenerative Medicine*

- [94]. Garvie, R. C., & Nicholson, P. S. (1972). *Phase Analysis in Zirconia Systems. Journal of the American Ceramic Society*, 55(6), 303–305.
- [95]. Piconi, C. and Maccauro, G. (1999) *Zirconia as a Ceramic Biomaterial. Biomaterials*, 20, 1-25.
- [96]. E. Perking, *Technical note FT-IR spectroscopy*;
- [97]. Materiale didattico e appunti - *Caratterizzazione dei materiali*, prof.ssa Calliari Irene;
- [98]. Claus F. Klingshirn, Bruno K. Meyer, Andreas Waag, Axel Hoffmann, Jean Geurts (auth.) - *Zinc Oxide from Fundamental Properties Towards Novel Applications*-Springer series in Material Science
- [99]. Chennupati Jagadish, Stephen J. Pearton - *Zinc Oxide Bulk, Thin Films and Nanostructures Processing, Properties, and Applications*-Elsevier Science (2006)
- [100]. Hadis Morkoç, 220_mit Özgür - *Zinc Oxide Fundamentals, Materials and Device Technology*-Wiley-VCH (2009)
- [101].] Navin Kumar Mogha et al, *Biocompatible ZrO₂- reduced graphene oxide immobilized AChE biosensor for chlorpyrifos detection*, *Materials and Design* 111 (2016) 312–320
- [102]. Jiancheng Zhanga, Da Huangb, Shuifeng Liua, Xianming Donga, Yiheng Lic, Hongwu Zhangb, Zijun Yanga, Qisheng Sua, Wenhua Huangb, Wenxu Zhenga,, Wuyi Zhoua; *Zirconia toughened hydroxyapatite biocomposite formed by a DLP 3D printing process for potential bone tissue engineering*. *Journal of Energy Chemistry*
- [103]. Zhengpei Miao, Pei Hu, Chuanye Nie, Huan Xie, Wenli Fu, Qing Li, *ZrO₂ nanoparticles anchored on nitrogen-doped carbon nanosheets as efficient catalyst for electrochemical CO₂ reduction*
- [104]. Saleh Zidan, Nikolaos Silikas, Abdulaziz Alhotan, Julfikar Haider and Julian Yates; *Investigating the Mechanical Properties of ZrO₂-Impregnated PMMA Nanocomposite for Denture-Based Applications*, *Materials* 2019, 12, 1344
- [105]. Fang WangS. S. Jyothirmayee Aravind, Hao WuJ oseph, Forsy Venkat Venkataraman, Kandalam, Ramanujachary, Xiao Hu, *Tunable green graphene-silk biomaterials: Mechanism of protein-based nanocomposites*, *Materials Science and Engineering C* 79 (2017) 782-739

- [106]. Brian D. Lawrence, Mark Cronin-Golomb, Irene Georgakoudi, David L. Kaplan, Fiorenzo G. Omenetto; *Bioactive Silk Protein Biomaterial Systems for Optical Devices*. *Biomacromolecules* 2008, 9, 4, 1214-1220
- [107]. H. Tao, S. M. Siebert, M. A. Brenckle, R. D. Averitt, M. Cronin-Golomb, D. L. Kaplan, F. G. Omenetto, *Appl. Phys. Lett.* 2010, 97.
- [108]. J. P. Mondia, J. J. Amsden, D. Lin, L. D. Negro, D. L. Kaplan, F. G. Omenetto, *Adv. Mater.* 2010, 22, 4596.
- [109]. Johari, N., Madaah Hosseini, H. R., & Samadikuchaksaraei, A. (2020). *Mechanical modeling of silk fibroin/TiO₂ and silk fibroin/fluoridated TiO₂ nanocomposite scaffolds for bone tissue engineering*. *Iranian Polymer Journal*.
- [110]. Liang Huang, Chun Li, Wenjing Yuan and Gaoquan Shi; *Strong composite films with layered structures prepared by casting silk fibroin-graphene oxide hydrogels*; *Nanoscale*, 2013, 5, 3780
- [111]. Ribeiro, M.; de Moraes, M.A.; Beppu, M.M.; Garcia, M.P.; Fernandes, M.H.; Monteiro, F.J.; Ferraz, M.P. *Development of silk fibroin/nanohydroxyapatite composite hydrogels for bone tissue engineering*. *Eur. Polym. J.* 2015, 67, 66–77
- [112]. Tamara Posati, Valentina Benfenati, Anna Sagnella, Assunta Pistone, Morena Nocchetti, Anna Donnadio, Giampiero Ruani, Roberto Zamboni and Michele Muccini; *Innovative Multifunctional Silk Fibroin and Hydroxycalcite Nanocomposites: A Synergic Effect of the Components*; pubs.acs.org/biomac.
- [113]. Jian Huang, Lin Liu, and Juming Yao, *Electrospinning of Bombyx mori Silk Fibroin Nanofiber Mats Reinforced by Cellulose Nanowhiskers*; *Fibers and Polymers* 2011, Vol.12, No.8, 1002-1006
- [114]. R. Xiang, T. Jiao, L. Yan, G. Ma, L. Liu, L. Dai, J. Li, H. Mohwald, X. Yan, *ACS appl. Mater. interfaces* 7 (2015) 24733-24704
- [115]. W. Sheng, J. Liu, S. Liu, Q. Lu, D. L. Kaplan, H. Zhu, *J. Mater. Chem. B* 2 (2014) 7394-7402.
- [116]. J. Cao, C. Lu, J. Zhuang, M. Liu, X. Zhang, Y. Yu, Q. Tao, *Angew. Chem. Int. Ed.* 56 (2017) 8795–8800.
- [117]. M.D. Golinska, M.K. Wlodarczyk-Biegun, M.W. Werten, M.A.C. Stuart, F.A. de Wolf, R. de Vries, *Biomacromolecules* 15 (2014) 699–706

- [118]. A.E. Way, L. Hsu, K. Shanmuganathan, C. Weder, S.J. Rowan, *ACS Macro Lett.* 1 (2012) 1001–1006.
- [119]. X. Zhang, Y. Wang, J. Zhao, M. Xiao, W. Zhang, C. Lu, *ACS Sustain. Chem. Eng.* 4 (2016) 4321–4327.
- [120]. M. Vural, Y. Lei, A. Pena-Francesch, H. Jung, B. Allen, M. Terrones, M.C. Demirel, *Carbon* 118 (2017) 404–412.
- [121]. M. Wang, X. Tian, R.H. Ras, O. Ikkala, *Adv. Mater. Interfaces* 2 (2015) 1500080
- [122]. L. Montero de Espinosa, W. Meesorn, D. Moatsou, C. Weder, *Chem. Rev.* 117 (2017) 12851–12892.
- [123]. M.V. Biyani, E.J. Foster, C. Weder, *ACS Macro Lett.* 2 (2013) 236–240.
- [124]. Gu F., Wang S.F., Lu M.K., Zhou G.J., Xu D., and Yuan D.R. *Langmuir.*, 20: 3528 (2004).
- [125]. Senthilkumar, S.; Rajendran, K.; Banerjee, S.; Chini, T.K.; Sengodan, V. *Influence of Mn doping on the microstructure and optical property of ZnO. Mater. Sci. Semicond. Process.* 2008, 11, 6–12.
- [126]. Djaja, N.F.; Montja, D.A.; Saleh, R. *The effect of Co incorporation into ZnO nanoparticles. Adv. Mater. Phys. Chem.* 2013, 3, 33–41.
- [127]. Min, B.-M., Jeong, L., Lee, K. Y., & Park, W. H. (2006). *Regenerated Silk Fibroin Nanofibers: Water Vapor-Induced Structural Changes and Their Effects on the Behavior of Normal Human Cells. Macromolecular Bioscience*, 6(4), 285–292.
- [128]. Ung-Jin Kim, Jaehyung Park, Hyeon Joo Kim, Masahisa Wada, David L. Kaplan; *Three- dimensionall aqueous-derived biomaterial scaffolds from silk fibroin; Biomaterials* 26 (2005) 2775 2785
- [129]. Noluthando Mayedwa, Ali Talha Khalil, Nametso Mongwaketsi, Nolubabalo Matinise, Zabta Khan Shinwari and Malik Maaza; *The Study of Structural, Physical and Electrochemical Activity of Zno Nanoparticles Synthesized by Green Natural Extracts of Sageretia Thea; Nano Research & Application* ISSN 2471-9838 (2017)
- [130]. Lan Cheng, Huiming Huang, Jingyou Zeng, Zulan Liu, Xiaoling Tong 1 , Zhi Li ,Hongping Zhao, and Fangyin Dai, *Effect of Different Additives in Diets on*

- Secondary Structure, Thermal and Mechanical Properties of Silkworm Silk Materials* 2019, 12, 14
- [131]. Xiao Hu, Karen Shmelev, Lin Sun, Eun-Seok Gil, Sang-Hyug Park, Peggy Cebe, and David L. Kaplan, *Regulation of Silk Material Structure by Temperature-Controlled Water Vapor Annealing*, *biomacromolecules* 2011, 12, 1686-1696
- [132]. Marta Dai Prè, *Nanocomposites for optical applications*, Tesi di dottorato – Università degli Studi di Padova
- [133]. Lingyue Cai, Huili Shao, Xuechao Hu, and Yaopeng Zhang; *Reinforced and Ultraviolet Resistant Silks from Silkworms Fed with Titanium Dioxide Nanoparticles* *ACS Sustainable Chem. Eng.* 2015, 3, 2551–2557
- [134]. Muyu Yan, Xiaohong Ma, Yijun Yang, Xi Wang, Weng-Chon Cheong, Zhenhong Chen, Xianghui Xu, Yanjie Huang, Chao Lian, Shuo Wang and Yadong Li, *Biofabrication Strategy for Functional Fabrics*, Supportin information
- [135]. Qingsong Liu, Xin Wang, Xiaoyin Tan, Xiaoqian Xie, Haonan Dong, Xinning Li, Yi Li, Ping Zhao and Qingyou Xia; *Disruption of the Metal Ion Environment by EDTA for Silk Formation Affects the Mechanical Properties of Silkworm Silk*, *Int. J. Mol. Sci.* 2019, 20, 3026
- [136]. S. Gowri, R. Rajiv Gandhi, M. Sundrarajan, *Structural, Optical, Antibacterial and Antifungal Properties of Zirconia Nanoparticles by Biobased Protocol*, *J. Mater. Sci. Technol.*, 2014, 30(8), 782e790;
- [137]. Xiao Hu, David Kaplan, and Peggy Cebe; *Determining Beta-Sheet Crystallinity in Fibrous Proteins by Thermal Analysis and Infrared Spectroscopy*; *Macromolecules* 2006, 39, 6161-6170

RINGRAZIAMENTI

Desidero ringraziare il mio relatore, il professore Alessandro Martucci, per avermi dato la possibilità di svolgere questo lavoro di tesi come coronamento del mio percorso di laurea magistrale. Un particolare ringraziamento anche al mio correlatore, la dottoressa Elena Colusso, per la serietà e il supporto fornitomi durante questo percorso importante.

Un ringraziamento particolare va ai ragazzi dell'auletta laureandi ed in particolare a Sponchiado, con il quale ho condiviso momenti di studio alternati ad attimi di sana ignoranza di fronte un caffè. Un grazie ai dottorandi ed in particolare a Michele e Denise per aver avuto la pazienza di fornirmi delle informazioni utili durante le mie prove, per aver condiviso dei momenti di distrazione a pranzo, per un aperitivo o poco prima della lezione di Lindy Hop.

Alla Family - Bounce Swing Lovers, da tutti gli allievi, passando per gli insegnanti e tutto lo staff con cui ho passato e condiviso dei momenti indimenticabili in questi ultimi anni e che porterò sempre nel cuore.

Agli "amici e colleghi del nord", a Mattia Giacomini per esserci sempre stato come un fratello da quanto ho iniziato questo percorso, a Maurizio, Alessia, Edo, Ilaria, Carlos, Anan, Suleiman, Alessandra, Josi, Sara e Ludovica con cui ho condiviso dei momenti meravigliosi.

Un ringraziamento a Martina per essere la sorella che non ho mai avuto.

Ai miei coinquilini Chen e Neko per avermi sopportato e per aver condiviso con me attimi di quotidianità. Un grazie particolare a Mattia Giordano per esserci stato nei miei momenti più importanti degli ultimi anni, per aver condiviso prelibatezze Campane e Siciliane, per aver condiviso gioie e dolori, per avermi supportato e sopportato come un fratello.

A tutte quelle persone che hanno lasciato la loro traccia nella mia vita, che mi hanno fatto crescere come persona e come uomo condividendo degli attimi che non dimenticherò mai.

Un ringraziamento agli amici di una vita, Gaspare, Giuseppe G. Giuseppe M. Luciano, Francesco, Roberto e a tutti quelli che continuano ad esserci al "ritorno a casa".

Un ringraziamento a tutti i miei parenti che porto sempre nel cuore.

Un ringraziamento ai miei cari genitori, Giovanni e Mirella, fonte di serenità, di consigli, di amore e che sono stati sempre al mio fianco in questo duro percorso anche se si trovavano a più di mille chilometri di distanza. Un ringraziamento ai miei fratelli Michelangelo e Danilo a cui non ho mai smesso di pensare, voler bene ed ammirare in questi anni di lontananza, a Michela e alla mia dolce nipotina che porto sempre nel cuore. Uno speciale ringraziamento va ai miei nonni che, anche se non ci sono più, non mi hanno mai lasciato da solo.

Con amore e grande affetto, Grazie.