

Domanda di brevetto per invenzione industriale dal titolo:

“FILTRO SOLARE FISICO COSTITUITO DA IDROSSIAPATITE SOSTITUITA IN UNA MATRICE ORGANICA”

\*\*\*\*\*

### CAMPO DELL'INVENZIONE

La presente invenzione si riferisce ad un filtro solare di tipo fisico, formato da particelle di idrossiapatite sostituita con ioni titanio e/o ferro in una matrice organica costituita da un polimero biocompatibile.

### STATO DELLA TECNICA

È noto che le radiazioni solari, e in particolare la componente ultravioletta (UV) dello spettro di queste radiazioni, sono responsabili di degradazioni fotochimiche di vario tipo. Queste possono riguardare dissolvenza e invecchiamento di vernici, tessuti e rivestimenti plastici, ma soprattutto alterazioni dei tessuti cutanei nell'uomo, fino potenzialmente all'insorgenza di cancro della pelle; l'esposizione acuta e cronica ai raggi UV può infatti portare a scottature, fotoinvecchiamento, fotoimmunosoppressione e fotocarcinogenesi, che sono di grande preoccupazione per i giovani e in particolare i bambini.

La radiazione UV comprende la parte dello spettro di lunghezze d'onda tra 100 e 400 nm, che sono ulteriormente suddivise in UVC (100-290 nm), UVB (290-320 nm) e UVA (320-400 nm). L'esposizione alle radiazioni UVC è di scarso interesse pratico, in quanto lunghezze d'onda inferiori ai 290 nm vengono assorbite dall'ozono atmosferico e non raggiungono la superficie terrestre, mentre l'esposizione ai raggi UVA e UVB è considerata inevitabile.

Per prevenire o mitigare gli effetti negativi dell'esposizione ai raggi UV, si possono impiegare i cosiddetti filtri solari, composizioni fluide che possono essere distribuite sulla parte che si intende proteggere e che contengono componenti in grado di ridurre la quantità di radiazione UV che raggiunge la parte stessa; per questa loro caratteristica, i filtri solari sono anche comunemente indicati come creme solari. Anche se, come detto, l'esposizione ai raggi UV può causare fenomeni di degradazione in manufatti e prodotti industriali, nel resto della descrizione verrà fatto riferimento alle applicazioni nella protezione cutanea, data l'importanza di queste ultime; resta comunque inteso che i filtri solari qui descritti possono trovare

applicazione anche in altri settori.

I filtri solari possono essere suddivisi in due classi principali: a) filtri chimici o biologici, in cui i componenti attivi nella fotoprotezione sono molecole organiche capaci di assorbire i raggi UV; e b) filtri UV fisici o inorganici, comprendenti barriere fisiche che riflettono la radiazione. Tra i componenti fotoprotettivi di tipo chimico, quello che trova più largo impiego è il composto 1-(4-metossifenil)-3-(4-tert-butilfenil)-propano-1,3-dione, comunemente indicato coi nomi d'uso metossidibenzoilmetano butile o avobenzone, mentre tra i composti ad attività fisica si possono citare in particolare  $\text{TiO}_2$  e  $\text{ZnO}$ .

I filtri solari attualmente presenti sul mercato non sono però esenti da criticità; i punti dibattuti relativamente al loro uso sono legati ai loro componenti e agli effetti della distribuzione di questi nell'ambiente, così come al loro degrado in seguito all'esposizione alla luce solare e all'effetto dei prodotti di degrado. Per esempio, vengono studiati gli effetti sulla pelle (ad esempio, irritazione e sensibilizzazione) e la penetrazione cutanea dei componenti delle creme; gli effetti estrogenici dei filtri UV chimici; l'attività fotocatalitica e fotodegradazione per esposizione a radiazioni UV; e la carenza di vitamina D causata da un uso eccessivo di creme solari, che determina un insufficiente assorbimento di radiazioni UV da parte della pelle.

L'attività fotocatalitica (terzo punto citato sopra) è una caratteristica indesiderata di qualsiasi protezione solare, dal momento che potrebbe portare alla generazione di radicali liberi e di altre specie reattive che possono essere essi stessi la causa di alcuni dei problemi di salute associati all'esposizione ai raggi UV; al riguardo, si veda per esempio l'articolo "Current Sunscreen Controversies: A Critical Review" M. E. Burnett et al., *Photodermatology Photoimmunology and Photomedicine*, 2011, 27(6): 58–67.

Questo inconveniente è associato non solo ai filtri UV chimici, per esempio contenenti come principio attivo il composto avobenzone, che sono noti a subire fotodegradazione, ma soprattutto all'uso di filtri UV fisici contenenti nanoparticelle di  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{SiO}_2$ ,  $\text{Fe}_x\text{O}_y$ ,  $\text{Mg}_x\text{O}_y$   $\text{ZnO}$ . È stato trovato che l'uso di questi composti in forma di nanoparticelle ne migliora l'efficacia, dando luogo ad un maggiore effetto di fotoprotezione, ma allo stesso è causa di possibili problemi di sicurezza legati alle proprietà fotocatalitiche sotto luce UV-visibile di questi minerali e alla loro ben

documentata capacità di generare radicali liberi reattivi per esposizione a radiazioni UV. Inoltre, a causa del crescente uso di creme solari di tipo fisico, sono state recentemente rilevate concentrazioni crescenti di nano particelle di  $\text{TiO}_2$  e  $\text{ZnO}$  nell'ambiente, soprattutto nelle acque costiere. Le nanoparticelle di  $\text{ZnO}$  esercitano effetti ecotossici sia in specie acquatiche che terrestri all'interno di una vasta gamma di taxa, e sopra certi livelli di concentrazione in ambienti naturali possono causare un rischio significativo per il biota ambientale; si veda, per esempio, l'articolo "Ecotoxicity of manufactured  $\text{ZnO}$  nanoparticles - A review" H. Ma et al., *Environmental Pollution*, 2013, 172, 76-85.

Le nanoparticelle di  $\text{TiO}_2$  sembrano mostrare livelli inferiori di tossicità sul fitoplancton marino rispetto a quelle di  $\text{ZnO}$ , anche se sono state trovate esprimere un effetto ecotossico su alghe e dafnie.

Un altro problema collegato all'uso di filtri UV a base di nanoparticelle inorganiche riguarda la penetrazione epidermica di queste ultime in seguito all'applicazione topica di crema solare. Lo strato corneo si è rivelato una barriera efficace per impedire l'ingresso di nanoparticelle di  $\text{ZnO}$  e  $\text{TiO}_2$  negli strati più profondi della pelle sana, ma in caso di pelle danneggiata o malata si osserva un maggior grado di penetrazione. Inoltre, alcuni studi hanno evidenziato che forme micronizzate di biossido di titanio e ossido di zinco (le quali, riducendo le dimensioni delle particelle all'ordine di grandezza dei nanometri, consentono di schermare radiazioni a bassa lunghezza d'onda quali gli UV ma non la luce visibile), utilizzate per evitare qualsiasi effetto bianco (whitening effect) indesiderato nelle creme solari, possono determinare un aumento della penetrazione del filtro fisico negli strati più interni dell'epidermide, dove può innescare reazioni di stress ossidativo con conseguente deplezione del collagene, fotoinvecchiamento e fotocarcinogenesi; al riguardo, si veda per esempio l'articolo "Toxicity and penetration of  $\text{TiO}_2$  nanoparticles in airless mice and porcine skin after subchronic dermal exposure", Jianhong Wu et al., *Toxicology letters* 191 (2009) 1-8.

Le principali preoccupazioni destinate dall'impiego di nanoparticelle di  $\text{TiO}_2$  e  $\text{ZnO}$  nei filtri UV fisici sono quindi legate alla loro potenziale fototossicità e alla loro penetrazione, con conseguenti effetti sistemici e di bioaccumulazione, negli esseri umani come in altri organismi.

È quindi ancora sentita nel settore l'esigenza di avere a disposizione componenti attivi per creme solari che siano esenti dai problemi sopra evidenziati, o comunque li presentino in misura ridotta rispetto ai materiali oggi utilizzati.

Scopo della presente invenzione è di fornire un materiale fotoattivo per l'impiego in filtri solari con ridotte caratteristiche di fototossicità e penetrazione cutanea.

### SOMMARIO DELL'INVENZIONE

Questo scopo viene raggiunto con la presente invenzione, che in un suo primo aspetto riguarda una composizione comprendente una matrice organica costituita da molecole polimeriche, sulle quali sono legate nanoparticelle di idrossiapatite sostituita da ioni titanio e/o ferro, in cui il fosforo è parzialmente sostituito dal titanio, in quantità compresa tra 8 e 50% atomico rispetto al fosforo, e/o in cui il calcio è parzialmente sostituito dal ferro, in quantità compresa tra 2 e 40% atomico rispetto al calcio, e in cui la quantità della matrice organica è compresa tra 5 e 60% in peso e la quantità di idrossiapatite sostituita è compresa tra 35 e 90% in peso, la restante parte essendo costituita da acqua.

In un suo secondo aspetto, l'invenzione riguarda il procedimento per ottenere detta composizione.

### BREVE DESCRIZIONE DELLE FIGURE

La Fig. 1 mostra microfotografie al microscopio elettronico di vari campioni di composizione dell'invenzione.

La Fig. 2 mostra lo spettro di diffrazione di raggi X di polveri di tre campioni di composizione dell'invenzione.

Le Figg. 3.A e 3.B mostrano, rispettivamente, gli spettri di riflettanza e assorbimento della luce UV-visibile da parte di campioni di composizione dell'invenzione.

### DESCRIZIONE DETTAGLIATA DELL'INVENZIONE

L'invenzione viene di seguito descritta in dettaglio con riferimento alle Figure.

L'idrossiapatite è il composto di formula  $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$ , spesso riportata anche come dimero  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , che riflette la presenza di due unità base nella cella elementare del cristallo. Il composto esiste in natura come minerale (in cui lo ione ossidrile può essere parzialmente sostituito da ioni cloro, fluoro o carbonato),

ed è anche il costituente minerale delle ossa umane e animali. Il composto è indicato in letteratura anche con l'abbreviazione HA, dall'inglese hydroxyapatite, che verrà usata anche nel presente testo.

Gli inventori hanno verificato che l'idrossiapatite presenta caratteristiche tali da consentire lo sviluppo di nuovi filtri solari sicuri, poiché accanto alla sua elevata biocompatibilità rispetto a ZnO e TiO<sub>2</sub>, la sua banda di assorbimento/riflessione della radiazione UV può essere estesa e modulata nell'intervallo desiderato introducendo opportuni ioni droganti nella sua struttura cristallina.

Nel suo primo aspetto l'invenzione riguarda una composizione comprendente una matrice organica in cui sono presenti, come elemento fotoattivo, nanoparticelle di idrossiapatite sostituita da ioni titanio e/o ferro, come sopra indicato.

Con il termine nanoparticelle, nella presente invenzione si intende riferirsi a particelle la cui dimensione massima non supera i 500 nm; in particolare, è stato osservato che le nanoparticelle ottenute secondo il procedimento dell'invenzione hanno generalmente dimensioni non superiori a circa 200 nm.

La matrice deve inoltre naturalmente essere innocua per la superficie da proteggere, e nel caso della pelle deve quindi essere non-tossica e garantire valori di pH fisiologici (pH leggermente acido, indicativamente tra 4,2 e 5,6) nel prodotto finito. Gli inventori hanno trovato che matrici organiche adatte possono essere scelte tra acido polilattico, collagene, alginato di sodio, polietilenglicoli (PEGs), chitosano, particelle lipidiche solide (SLP) e, in particolare, gelatine di cui è nota la biocompatibilità.

Come detto, il componente fotoattivo della composizione dell'invenzione è una idrossiapatite modificata, in cui una quantità compresa tra 8 e 50% atomico del fosforo è sostituita da titanio, e/o una quantità compresa tra 2 e 40% atomico del calcio è sostituita da ferro. L'HA sostituita dell'invenzione è caratterizzata da un ridotto grado di cristallinità rispetto all'HA non sostituita, a causa degli effetti di distorsione della struttura cristallina indotti dalla presenza degli ioni droganti e dell'interazione con la matrice polimerica durante il processo di formazione del materiale composito, oggetto del brevetto, che ne ostacola accrescimento e maturazione.

La composizione contiene inoltre bassi valori percentuali in peso di acqua,

generalmente inferiori al 5%.

Le particelle di HA contenute nella composizione dell'invenzione hanno dimensioni nanometriche per cui ovviano alla problematica dell'effetto "whitening"; inoltre essendo in stretta relazione strutturale con la matrice organica e quindi parte di particelle composite di dimensioni maggiori, hanno anche un basso potere penetrante nei confronti dell'epidermide.

Per l'applicazione come filtro solare, previa eventuale addizione di acqua, la composizione dell'invenzione viene poi generalmente miscelata ad altri componenti tipici dei prodotti commerciali per la protezione dalle radiazioni solari, come creme e oli che ne consentono una distribuzione omogenea sulla pelle, oli profumati, o componenti impermeabilizzanti per rendere la crema resistente in caso di immersione in acqua.

Il secondo aspetto dell'invenzione è relativo al procedimento per preparare la composizione sopra descritta.

La dispersione delle nanoparticelle di HA nella matrice non avviene per miscelamento meccanico di particelle di HA preformate nella matrice organica, ma tramite un procedimento cosiddetto di "biomineralizzazione", in cui le nanoparticelle di HA vengono prodotte direttamente all'interno della matrice stessa.

Nel processo di biomineralizzazione la matrice organica riveste un ruolo fondamentale rappresentando il substrato su cui avviene la deposizione della fase inorganica. Le matrici polimeriche scelte per il processo dell'invenzione sono ricche di cariche negative o positive; queste cariche interagiscono selettivamente con i cationi, principalmente il  $\text{Ca}^{2+}$ , o gli anioni, principalmente il  $\text{PO}_4^{3-}$ , presenti in soluzione, e guidano e condizionano la crescita della fase inorganica. In questo modo le matrici polimeriche controllano la nucleazione, l'orientamento, la cristallizzazione e la morfologia delle particelle di idrossiapatite, svolgendo prevalentemente un ruolo di inibitori della cristallizzazione. Come risultato di questo processo, l'idrossiapatite è nucleata sulla matrice organica ed in stretta relazione strutturale con essa.

Il procedimento dell'invenzione comprende le operazioni di:

- a) predisporre una soluzione acquosa contenente un precursore di calcio e di almeno un sale di ferro (II) e almeno un sale di ferro (III);

- b) predisporre una soluzione idroalcolica di un precursore di titanio;
- c) predisporre una soluzione acquosa, contenente il costituente della matrice organica, di un composto di fosforo solubile in acqua;
- d) aggiungere simultaneamente e lentamente le soluzioni dei precursori di titanio e di composto di fosforo/matrice organica alla soluzione contenente il precursore di calcio;
- e) lasciare reagire il sistema ad una temperatura compresa tra temperatura ambiente e 70 °C per un tempo compreso tra 1 e 5 ore;
- f) sottoporre a trattamento di liofilizzazione il prodotto ottenuto come risultato dell'operazione e).

Come risulterà evidente al tecnico del ramo, le operazioni sopra indicate sono state indicate con lettere da a) ad f) per poterle identificare chiaramente, ma ciò non comporta che dette operazioni debbano essere eseguite necessariamente nell'ordine indicato, e in particolare le operazioni a), b) e c) possono essere realizzate in qualunque ordine.

Le operazioni a), b) e c) consistono nella preparazione delle soluzioni dei precursori di calcio/ferro, di titanio e di fosforo (quest'ultima contenente il costituente della matrice organica).

Per la preparazione della soluzione acquosa del precursore di calcio (operazione a) si impiegano un suo sale o, preferibilmente, l'idrossido,  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ . A questa soluzione si aggiungono un precursore di Fe (II) ed un precursore di Fe (III) in rapporto molare 1:1; precursori preferiti del ferro sono i suoi nitrati e, in particolare, i suoi cloruri,  $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  e/o  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ .

Composti preferiti per la preparazione della soluzione del precursore di titanio (operazione b) sono i suoi cloruri ed alcossidi, in particolare l'isopropossido (noto anche come isopropilato),  $\text{Ti}(-\text{O}-\text{CH}(\text{CH}_3)_2)_4$ ; nel caso dell'impiego degli alcossidi, questi vengono preferibilmente prima solubilizzati in un alcool o in una miscela idroalcolica (l'alcol impiegato è preferibilmente lo stesso il cui radicale è presente nel composto).

Il composto usato per la preparazione della soluzione del precursore del fosforo (operazione c) è un composto solubile di fosforo, che può essere un sale (per esempio fosfato di ammonio) ma preferibilmente è un acido fosforico, e più

preferibilmente l'acido ortofosforico,  $\text{H}_3\text{PO}_4$ .

La formazione dell'idrossiapatite può avvenire in linea di principio per reazione tra sali solubili che portano in soluzione gli ioni  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{PO}_4^{3-}$ ; in questo caso, si scelgono sali i cui controioni non danno interferenze con la composizione finale, come  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (nitrato come controione dello ione calcio) e  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  (ammonio come controione dello ione fosfato). La reazione preferita è però quella in cui si impiegano  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  e  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , perché la neutralizzazione dell'acido con la base dà acqua come unico sottoprodotto ed è particolarmente veloce. Nel seguito si farà quindi riferimento in particolare a questa reazione.

Come detto, nella soluzione del precursore di fosforo viene disciolto il costituente della matrice organica in cui saranno presenti le particelle di HA. In questo caso, a differenza di calcio, fosforo, titanio e ferro, non si parla di "precursore", perché il componente organico disciolto in soluzione è lo stesso che costituirà la matrice finale.

Le concentrazioni delle soluzioni di Ca impiegate per la reazione di sintesi dell'HA sostituita sono tipicamente nell'intervallo 50-150 mg/mL per la soluzione di Ca, tra 75 e 110 mg/mL per quella di P, tra 12 e 100 mg/mL per quella del titanio e tra 10 e 45 mg/mL per quella di Fe.

Le quantità dei precursori di Ca, Ti e Fe sono calcolate in modo da risultare adatte ad ottenere il rapporto stechiometrico desiderato tra questi tre elementi; nel caso di impiego di  $\text{H}_3\text{PO}_4$  come precursore del fosforo, questo viene generalmente aggiunto in quantità molarie comprese tra circa 0,5 e 0,7 volte rispetto alle moli del precursore del calcio. Il calcolo della quantità di precursori dei diversi metalli e del fosforo dipende dal particolare grado di sostituzione del calcio desiderato nell'idrossiapatite sostituita finale, ed è alla portata del chimico medio.

Nell'operazione d) le soluzioni dei precursori di Ti e di P/matrice organica vengono aggiunte simultaneamente alla soluzione contenente i precursori di Ca e Fe. In questa operazione si realizza la neutralizzazione (salificazione), ad opera dell'acido fosforico, della soluzione di  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  inizialmente basica; gli ioni presenti nell'ambiente di reazione interagiscono con le molecole della matrice polimerica e simultaneamente vengono incorporati nella struttura di idrossiapatite in formazione come conseguenza della reazione. La miscela risultante viene lasciata reagire per



un tempo generalmente compreso tra 1 e 5 ore, preferibilmente sotto agitazione, ad una temperatura compresa tra T ambiente e 70 °C (operazione e).

Con questo processo, le nanoparticelle di HA sostituita si formano direttamente sulle catene polimeriche della matrice organica. La formazione all'interno della matrice determina anche l'ottenimento delle dimensioni nanometriche; le nanoparticelle di HA sostituita solo con Ti o con Ti e Fe hanno forma sferoidale, o comunque dimensioni omogenee nelle tre direzioni spaziali e comprese tra circa 10 e 200 nm; viceversa, le nanoparticelle di HA sostituita solo con Fe hanno morfologia a bacchetta, con un asse maggiore di lunghezza compresa tra circa 100 e 200 nm, e assi minori di lunghezza compresa tra circa 20 e 30 nm.

L'ultima operazione del procedimento, la liofilizzazione, avviene impiegando attrezzature e secondo procedure note nel settore.

L'invenzione verrà ulteriormente descritta dalla seguente parte sperimentale, comprensiva della descrizione delle modalità di esecuzione delle prove di caratterizzazione, e degli esempi di produzione di varie forme di materiale composito dell'invenzione e misurazione delle loro proprietà.

### **Metodi e strumentazione**

#### **Analisi chimica**

Il contenuto di Ca, Ti, Fe, e P nei campioni prodotti è stato determinato con uno spettrometro al plasma ad accoppiamento indotto (ICP-OES Liberty 200, Varian, Clayton del Sud, Australia), che impiega lunghezze d'onda di 422,673 nm (Ca), 334,941 nm (Ti), 259,940 nm (Fe) e 213,618 nm (P). Le soluzioni per l'analisi ICP sono state preparate sciogliendo 20 mg di campione in una soluzione diluita HNO<sub>3</sub>/HCl.

La quantità di Fe<sup>2+</sup> è stata misurata con un metodo colorimetrico basato sull'utilizzo di ortofenantrolina (1,10-fenantrolina, Merck, purezza 99%), descritto nell'articolo "Intrinsic magnetism and hyperthermia in bioactive Fe-doped hydroxyapatite", Tampieri A. *et al.*, (2012) *Acta biomaterialia*, 8(2), 843-851.

Brevemente, il metodo è basato sulla rilevazione a 510 nm tramite spettrofotometria UV-Visibile (Spettrometro Lambda 35 UV/VIS, Perkin Elmer) del complesso rosso-arancio [(C<sub>12</sub>H<sub>8</sub>N<sub>2</sub>)<sub>3</sub>Fe]<sup>2+</sup> stabile nell'intervallo di pH 4-5. Per la

misura, 20 mg di polvere vengono disciolti in 0,8 ml di H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Aldrich, purezza 96% in peso) dopo aver verificato che l'acido solforico non alteri la concentrazione del complesso di Fe<sup>2+</sup> almeno nel tempo necessario per effettuare l'analisi; si aggiungono poi 10 mL di tampone di sodio acetato (0,1 M, pH = 4) e quindi si aggiunge il volume di una soluzione di ortofenantrolina allo 0,2% in peso necessario per ottenere un rapporto molare nominale Fe<sup>2+</sup>:ortofenantrolina a 1:3. Il volume della soluzione finale viene portato a 50 ml con acqua Millipore. L'aggiunta di ortofenantrolina viene effettuata immediatamente dopo la dissoluzione del campione con acido solforico, e la soluzione è analizzata 15 minuti dopo l'aggiunta dell'ortofenantrolina.

La quantità di Fe<sup>3+</sup> viene determinata per differenza tra la quantità totale di Fe (determinata mediante ICP) e la quantità di Fe<sup>2+</sup> determinata da UV-VIS col metodo sopra descritto.

#### Analisi diffrattometrica

La composizione di fasi di ciascun campione è stata determinata mediante diffrazione di raggi X (XRD) con un diffrattometro D8 Advance (Bruker, Karlsruhe, Germania) dotato di un rivelatore sensibile alla posizione Lynx-eye utilizzando radiazione Cu K $\alpha$  ( $\lambda = 1,54178 \text{ \AA}$ ) generata a 40 kV e 40 mA. Gli spettri XRD sono stati registrati nel campo  $2\theta$  10-80° con un passo ( $2\theta$ ) di 0,04° e un tempo di conteggio di 0,5 secondi. In caso di una valutazione quantitativa delle composizioni di fasi e parametri di cella, è stato usato un passo di 0,02°.

#### Analisi SEM

La morfologia dei campioni è stata analizzata mediante un microscopio elettronico a scansione (SEM, FEI Quanta 200, Eindhoven, Olanda) e la composizione elementare è stata valutata con spettroscopia a dispersione di raggi X (EDX). I campioni sono stati montati su supporti in alluminio con nastro di carbonio. Per le misure EDX sono state utilizzate una tensione di accelerazione di 10/12 kV e una distanza di lavoro di 10 mm.

#### Analisi termogravimetrica

Il contenuto di carbonato è stato valutato su campioni essiccati mediante analisi termogravimetrica (TGA) utilizzando uno strumento Stanton STA 1500 (Stanton, London, UK). Per ogni prova, circa 10 mg di apatite sono stati pesati in un

crogiolo di platino e riscaldati da temperatura ambiente a 1100 °C sotto flusso di azoto, con una velocità di riscaldamento di 10 °C/min ed usando allumina come standard di riferimento. Il contenuto di  $\text{CO}_3^{2-}$  è stato valutato in base alla perdita di peso osservata tra 550 e 950 °C (intervallo rilevante per la decomposizione dei carbonati da HA, come descritto nell'articolo "The cooperative effect of size and crystallinity degree on the resorption of biomimetic hydroxyapatite for soft tissue augmentation", Lafisco, M. et al., (2010), The International journal of artificial organs, 33 (11), 765-774).

#### Riflessione e assorbimento UV-Vis

Gli spettri di assorbanza UV-Vis dei campioni sono stati ottenuti sospendendo 5 mg di polvere in 5 mL di acqua Millipore, dopo di che la soluzione è stata misurata con uno spettrofotometro UV-VIS (LAMBDA 35, Perkin Elmer). Per la determinazione degli spettri di riflettanza, lo spettrofotometro è stato dotato di una sfera di integrazione (Labsphere RSA-PE-20). Brevemente, circa 50 mg di polvere del campione sono stati introdotti in un portacampione che è stato poi collocato nella fessura della sfera integratrice. L'apparecchiatura è stata calibrata con uno standard Spectralon (Labsphere SRS-99-010), e gli spettri di riflettanza sono stati raccolti nell'intervallo di lunghezze d'onda 280-800 nm.

#### Determinazione del potenziale zeta e della dimensione delle particelle

Dimensioni e potenziale  $\zeta$  dei campioni sono stati misurati tramite light scattering dinamico (DLS) con uno strumento Zetasizer Nano ZS (Malvern, Worcestershire, UK). I campioni sono stati sospesi in acqua ad una concentrazione di 0,1 mg/ml.

Per la misura della distribuzione dimensionale, sono state usate cuvette di quarzo di piccolo volume (105.251-QS; Hellma, Müllheim, Germania). Ogni misura è costituita da prove di 30 secondi ciascuna, e per ogni campione sono state eseguite quattro misure. Dai risultati di queste misure viene anche calcolato l'indice di polidispersità (PDI) dei campioni.

Il potenziale  $\zeta$  è stato determinato come mobilità elettroforetica tramite velocimetria Doppler laser usando celle elettroforetiche usa-e-getta (DTS1061; Malvern, Worcestershire, UK). Sono state effettuate 20 prove da 3 s ciascuna per ogni misura.

### Abbreviazioni

Negli esempi che seguono vengono utilizzate le seguenti abbreviazioni:

HA:	Idrossiapatite
Ti(iOPr) <sub>4</sub> :	Tetraisopropilato di titanio
FeHA:	Idrossiapatite parzialmente sostituita con titanio e ferro
TiHA:	Idrossiapatite parzialmente sostituita con titanio
FeTiHA:	Idrossiapatite parzialmente sostituita con ferro e titanio

### ESEMPIO 1

Questo esempio si riferisce alla preparazione di una composizione di gelatina biomineralizzata con nanoparticelle di TiHA.

3,32 grammi di gelatina di pelle di maiale (Italgelatine) sono diluiti in 83 ml di acqua Millipore a 45 °C per ottenere una soluzione al 4% in peso di gelatina. A questa soluzione sono stati aggiunti 3,46 g di acido fosforico (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, soluzione acquosa all'85% in peso) diluiti in 30 ml di acqua Millipore. A parte è stata preparata una soluzione di Ti(iOPr)<sub>4</sub>, miscelando 2,20 g del composto con 15 ml di isopropanolo (purezza > 99,7%). La soluzione di acido fosforico/gelatina e quella di Ti(iOPr)<sub>4</sub> sono state aggiunte goccia a goccia ad una sospensione ottenuta disperdendo 3,90 g di Ca(OH)<sub>2</sub> (purezza 97%) in 100 mL di acqua Millipore a 45 °C.

La miscela risultante è stata lasciata reagire sotto agitazione 2 ore a 45 °C, e poi a riposo a temperatura ambiente per ulteriori 2 ore. La frazione solida formata è stata rimossa per centrifugazione e lavata ripetutamente con acqua. Alla fine, il campione così ottenuto è stato portato a -40 °C e liofilizzato. Questo campione è denominato Gel-TiHA. Le microfotografie SEM identificate come C e D in Fig. 1 mostrano, a due diversi ingrandimenti, le particelle di questo campione; come si vede dalle immagini, il campione Gel-TiHA è costituito da particelle con dimensioni simili nelle tre direzioni spaziali, comprese tra circa 100 e 200 nm.

### ESEMPIO 2

Questo esempio si riferisce alla preparazione di una composizione di gelatina biomineralizzata con nanoparticelle di FeHA.

Per la mineralizzazione di gelatina con FeHA, è stato seguito un procedimento simile a quello dell'Esempio 1. Brevemente, 4,2 g di acido fosforico sono stati mescolati a 100 ml di una soluzione di gelatina di pelle di maiale al 4% in peso. A

parte sono state preparate due soluzioni di sali di ferro, aggiungendo ad 8 ml di acqua Millipore per ognuna, rispettivamente, 1,25 g di  $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (purezza > 99,0%) e 1,74 g di  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (purezza > 99,0%). È stata infine preparata una sospensione di precursore di calcio miscelando 4,72 g di  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  con 100 mL di acqua Millipore a 45 °C. Le due soluzioni di sali di ferro sono state versate simultaneamente nella sospensione di  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ , e immediatamente dopo è stata aggiunta goccia a goccia la soluzione di acido fosforico/gelatina. Alla fine della reazione di neutralizzazione, il campione solido ottenuto è stato recuperato per centrifugazione, lavato ripetutamente con acqua, portato a -40 °C e liofilizzato. Questo campione è denominato Gel-FeHA. Le microfotografie SEM identificate come E e F in Fig. 1 mostrano, a due diversi ingrandimenti, le particelle di questo campione; come si vede dalle immagini, il campione Gel-FeHA è costituito da particelle con morfologia aghiforme, con un asse maggiore di lunghezza compresa tra circa 100 e 200 nm, e assi minori di lunghezza compresa tra circa 20 e 30 nm.

### **ESEMPIO 3**

Questo esempio si riferisce alla preparazione di una composizione di gelatina biomineralizzata con nanoparticelle di FeTiHA.

Per la mineralizzazione di gelatina con FeTiHA, si sono combinate le due procedure descritte per l'ottenimento di Gel-TiHA e Gel-FeHA. Brevemente, 4,2 g di acido fosforico sono stati mescolati con 30 mL di acqua Millipore e di seguito con 125 mL di una soluzione di gelatina di pelle di maiale al 4% in peso. La soluzione del precursore di titanio è stata ottenuta miscelando 3,15 g di  $\text{Ti}(\text{iOPr})_4$  con 15 ml di isopropanolo. La sospensione di precursore del calcio è stata preparata aggiungendo 4,72 g di  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  ad 100 mL di acqua Millipore a 45 °C. Sono state preparate due soluzioni di precursori di ferro, sciogliendo in 8 ml di acqua Millipore per ognuna, rispettivamente 1,2 g di  $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  e 1,65 g di  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ . Le due soluzioni dei precursori del ferro sono state versate in quella del precursore di calcio, e immediatamente dopo alla miscela così ottenuta sono state aggiunte goccia a goccia le due soluzioni di acido fosforico/gelatina e di  $\text{Ti}(\text{iOPr})_4$ . Alla fine della reazione di neutralizzazione, il campione solido ottenuto è stato recuperato per centrifugazione, lavato ripetutamente con acqua, portato a -40 °C e liofilizzato. Questo campione è denominato Gel-FeTiHA. Le microfotografie SEM identificate

come A e B in Fig. 1 mostrano, a due diversi ingrandimenti, le particelle di questo campione; come si vede dalle immagini, il campione Gel-FeTiHA è costituito da particelle con morfologia e dimensioni simili a quelle del campione Gel-TiHA.

#### **ESEMPIO 4**

Sui campioni preparati negli Esempi 1-3 sono state svolte analisi di termogravimetria ed ICP per determinarne la composizione chimica.

Con le analisi termogravimetriche viene determinata la composizione dei campioni in termini di % in peso di acqua, gelatina e frazione minerale. I contenuti di acqua e gelatina sono stati calcolati dalle perdite di peso che si verificano rispettivamente nell'intervallo 25-110 °C e 120-1000 °C, attribuendo la massa residua alla HA sostituita. I risultati di queste analisi sono riportati in Tabella 1.

**Tabella 1**

<b>Componente</b>	<b>Gel-TiHA</b> (% peso componenti)	<b>Gel-FeHA</b> (% peso componenti)	<b>Gel-FeTiHA</b> (% peso componenti)
HA	73,61	81,68	77,52
Gelatina	20,93	13,82	17,21
Acqua	2,16	2,26	2,50

I valori di quantità di acqua sono risultati molto simili nei tre campioni; le quantità di gelatina e di HA hanno invece mostrato maggiori variazioni nei diversi campioni.

La composizione chimica della parte minerale (HA sostituita) è stata misurata con l'analisi quantitativa ICP, in termini di rapporti atomici tra i vari elementi; i risultati delle prove sono riassunti in Tabella 2.

**Tabella 2**

	Ca/P	Fe/Ca	Ti/Ca	(Ca+Fe)/P	Ca/(P+Ti)	Fe <sup>2+</sup> /Fe <sup>3+</sup>
<b>Gel-TiHA</b>	1,90 ± 0,2	/	0,15 ± 0,03	/	1,48 ± 0,10	/
<b>Gel-FeHA</b>	1,33 ± 0,1	0,33 ± 0,08	/	1,77 ± 0,13	/	1:1
<b>Gel-FeTiHA</b>	1,35 ± 0,1	0,21 ± 0,05	0,21 ± 0,05	1,63 ± 0,05	1,05	1:1

In generale, tutti i campioni mostrano un valore del rapporto atomico Ca/P molto diverso rispetto a quello della HA pura (rapporto teorico 1,67): i valori di questo rapporto sono inferiori al teorico e simili tra loro nei campioni Gel-FeHA Gel-FeTiHA (rispettivamente 1,33 e 1,35), mentre quello del campione Gel-TiHA, 1,90, è sensibilmente superiore al teorico.

Il rapporto Ti/Ca atomico del campione Gel-TiHA è in accordo con la quantità di titanio nominalmente introdotta durante la sua preparazione, mentre il rapporto atomico Ca/(P+Ti) si discosta da quello Ca/P della HA stechiometrica.

Nel campione Gel-FeTiHA, il rapporto atomico Ti/Ca (0,21) risulta maggiore rispetto a quello del campione Gel-TiHA, e anche superiore a quello derivabile dalla quantità nominale di titanio introdotto durante la sintesi (15 mol% rispetto al Ca). Inoltre, in questo campione è stato misurato un rapporto atomico Ca/(P+Ti) molto basso, pari a 1,05; ciò può essere attribuito alla sostituzione di Ca con ioni Fe, come confermato dal rapporto atomico (Ca+Fe)/P di 1,63, valore vicino a quello di HA stechiometrica. Questi dati suggeriscono la presenza di una fase secondaria di TiO<sub>2</sub>.

Infine, il campione Gel-FeHA mostra un maggior contenuto relativo di Fe rispetto a Gel-FeTiHA: il rapporto atomico Fe/Ca nei due campioni risulta essere rispettivamente 0,33 e 0,21. Come conseguenza, anche i valori del rapporto atomico (Ca+Fe)/P risultano più alti per Gel-FeHA (1,77) che per Gel-FeTiHA (1,63). Il rapporto Fe<sup>2+</sup>/Fe<sup>3+</sup> per entrambi i campioni risulta invece in completo accordo con le quantità dei due ioni nominalmente introdotte durante la sintesi.

### **ESEMPIO 5**

Sui tre campioni preparati negli Esempi 1-3 sono state svolte analisi di diffrazione a raggi X delle polveri (XRD). Tutti e tre gli spettri sono riportati in Fig. 2, sfalsati tra loro lungo l'asse verticale per poterli distinguere: lo spettro relativo al campione Gel-FeTiHA è quello inferiore in figura, quello relativo a Gel-TiHA è intermedio, e quello relativo a Gel-FeHA è nella parte superiore della figura.

I profili XRD mostrano, per tutti e tre i campioni, unicamente la presenza di una fase cristallina che può essere identificata come HA: le posizioni dei picchi corrispondono a dati di letteratura attribuibili (tramite indici di Miller, indicati in figura) a questo composto. Non si identifica alcuna fase cristallina secondaria; in base a questa osservazione, si può concludere che la fase di  $\text{TiO}_2$ , la cui presenza è dedotta dalle analisi chimiche dell'esempio 4, è amorfa. Naturalmente non sono stati rilevati picchi di diffrazione imputabili alla gelatina, essendo questo un polimero organico amorfo.

I picchi di tutti e tre i diffrattogrammi sono mal risolti, con una bassa intensità relativa rispetto al fondo, ed un basso rapporto tra altezza e larghezza a metà altezza, specialmente nel caso di Gel-FeTiHA. Queste caratteristiche dei picchi sono indicazione di basso grado di cristallinità del materiale. Ciò può essere ascritto a vari fattori. In primo luogo, la bassa temperatura di biomineralizzazione non consente un riarrangiamento atomico a favore di strutture maggiormente cristalline, termodinamicamente più stabili. Un secondo fattore è la presenza della gelatina: i polimeri organici amorfi possono indirizzare il processo di mineralizzazione verso fasi a bassa cristallinità, come noto nel settore. Infine, la presenza degli ioni di ferro e/o titanio durante la biomineralizzazione, in cui si forma il reticolo cristallino, ha l'effetto di distorcere il reticolo stesso portando così ad un aumento delle zone disordinate e determinare la formazione di HA scarsamente cristallina.

### **ESEMPIO 6**

Sono stati misurati i valori di diametro idrodinamico (Hd), indice di polidispersità (PDI) e potenziale  $\zeta$  dei campioni preparati negli Esempi 1-3, con gli strumenti e metodi descritti in precedenza.

I risultati sono riportati in Tabella 3.



**Tabella 3**

<b>Campione</b>	<b>Hd (nm)</b>	<b>PDI</b>	<b>Potenziale <math>\zeta</math> (mV)</b>
<b>Gel-TiHA</b>	531,3 $\pm$ 7,9 nm	0,17 $\pm$ 0,05	3,12 $\pm$ 0,2 mV
<b>Gel-FeHA</b>	552,0 $\pm$ 34,7 nm	0,47 $\pm$ 0,03	- 15,1 $\pm$ 1,4 mV
<b>Gel-FeTiHA</b>	421,9 $\pm$ 19,4 nm	0,10 $\pm$ 0,06	-10,4 $\pm$ 0,7 mV

I valori di Hd registrati mediante diffrazione della luce sono molto superiori rispetto a quelli rilevati mediante analisi SEM; questi valori sono di centinaia di nanometri per ogni campione, con valori simili per Gel-TiHA e Gel-FeHA (531,3 nm e 552,0 nm, rispettivamente), e solo leggermente inferiore per Gel-FeTiHA (421,9 nm). Questa differenza è dovuta al fatto che per l'analisi SEM i campioni sono stati sospesi in etanolo e poi essiccati mediante una lampada a infrarossi su matrice di allumina, mentre per l'analisi DLS è stato necessario preparare una sospensione. In questo modo, mentre con il SEM è stato possibile determinare la dimensione delle singole particelle secche, il risultato ottenuto con l'analisi DLS determina la dimensione delle particelle nel mezzo acquoso, fornendo informazioni aggiuntive sul comportamento delle particelle di gelatina mineralizzate in acqua. Come ben noto in letteratura, particelle di dimensioni nanometriche tendono ad aggregarsi quando sono sospese in mezzi acquosi, per cui i valori ottenuti da DLS non sono relativi a singole particelle, ma ad aggregati delle stesse.

### **ESEMPIO 7**

Sono state misurate le proprietà di assorbimento e riflessione di luce UV-Vis della composizione dell'invenzione, con gli strumenti e metodi descritti in precedenza. I risultati sono riportati in Fig. 3. La Fig. 3.A riporta gli spettri di riflettanza dei campioni, in termini di percentuale di radiazione riflessa in funzione della lunghezza d'onda; gli spettri di assorbanza sono riportati in Fig. 3.B, in unità arbitrarie (a.u.), in funzione della lunghezza d'onda.

I profili di riflettanza di Gel-FeHA e Gel-FeTiHA sono simili tra loro, con una capacità di riflettanza relativamente bassa (circa 20%) a lunghezze d'onda nell'intervallo di 280-500 nm, seguita da un aumento graduale fino a raggiungere il 60% della luce riflessa intorno ai 650 nm di lunghezza d'onda. Il profilo di riflettanza di Gel-TiHA è invece molto diverso, con una zona di media riflettanza tra 280 e 320

nm, seguita da un rapido aumento fino a raggiungere la massima riflettanza (90%) ai circa 350 nm; dopo questo valore di picco, la riflettanza diminuisce lentamente, senza però mai scendere sotto valori di circa 65% (a 800 nm).

Anche relativamente al comportamento in assorbimento, Gel-FeHA e Gel-FeTiHA hanno profili simili, con valori massimi registrati a 280 nm, seguiti da un punto di flesso a circa 360 nm e quindi rapida diminuzione fino a circa 400 nm, dopo di che il valore di assorbimento rimane essenzialmente costante in tutto il campo visibile. Il campione Gel-TiHA, invece, in tutto l'intervallo di misurazione mostra bassi valori di assorbimento, con un profilo che diminuisce in maniera quasi lineare all'aumentare della lunghezza d'onda.

Questi risultati dimostrano che Gel-TiHA ha ottime proprietà di riflettanza nell'intervallo UVA (massima riflettanza a 350 nm) ed è in grado di riflettere la radiazione anche nella gamma UVB (valori di riflettanza mai inferiori al 65%). Gel-FeHA e Gel-FeTiHA hanno invece buone proprietà di assorbimento nella gamma UVB. Queste proprietà rendono Gel-TiHA un filtro fisico efficiente per una composizione per protezione solare, mentre Gel-FeHA e Gel-FeTiHA possono essere utilizzati in combinazione con il primo per estendere e aumentare la gamma di protezione e l'efficacia di protezione dei filtri solari nell'intervallo UVB.

## RIVENDICAZIONI

1. Composizione per la preparazione di filtri solari fisici, comprendente una matrice organica costituita da molecole polimeriche, sulle quali sono legate nanoparticelle di idrossiapatite sostituita da ioni titanio e/o ferro, in cui il fosforo è parzialmente sostituito dal titanio in quantità compresa tra 8 e 50% atomico rispetto al fosforo, e/o in cui il calcio è parzialmente sostituito dal ferro in quantità compresa tra 2 e 40% atomico rispetto al calcio, e in cui la quantità della matrice organica è compresa tra 5 e 60% in peso e la quantità di idrossiapatite sostituita è compresa tra 35 e 90% in peso, la restante parte essendo costituita da acqua.
2. Composizione secondo la rivendicazione 1, in cui il composto che costituisce la matrice organica è scelto tra acido polilattico, collagene, alginato di sodio, polietilenglicoli (PEGs), chitosano, particelle lipidiche solide (SLP) e gelatine.
3. Composizione secondo una qualunque delle rivendicazioni 1 o 2 in cui dette particelle di idrossiapatite hanno dimensioni comprese tra 10 e 200 nm.
4. Procedimento per la preparazione di una composizione secondo una qualunque delle rivendicazioni da 1 a 3, che comprende le operazioni di:
  - a) predisporre una soluzione acquosa contenente un precursore di calcio e di almeno un sale di ferro (II) e almeno un sale di ferro (III);
  - b) predisporre una soluzione idroalcolica di un precursore di titanio;
  - c) predisporre una soluzione acquosa, contenente il costituente della matrice organica, di un composto di fosforo solubile in acqua;
  - d) aggiungere simultaneamente e lentamente le soluzioni dei precursori di titanio e di composto di fosforo/matrice organica alla soluzione contenente il precursore di calcio;
  - e) lasciare reagire il sistema ad una temperatura compresa tra temperatura ambiente e 70 °C per un tempo compreso tra 1 e 5 ore;
  - f) sottoporre a trattamento di liofilizzazione il prodotto ottenuto come risultato dell'operazione e),in cui le nanoparticelle di idrossiapatite sostituita da ioni titanio e/o ferro si generano direttamente sulle molecole polimeriche della matrice organica durante il procedimento.

5. Procedimento secondo la rivendicazione 4, in cui nella soluzione dell'operazione a) si impiegano, come precursore di calcio, un suo sale o l'idrossido ( $\text{Ca(OH)}_2$ ), e in cui lo ione calcio ha una concentrazione compresa tra 50 e 150 mg/mL, e i precursori di ferro sono impiegati in rapporto molare 1:1 con una concentrazione complessiva di ioni ferro compresa tra 10 e 45 mg/mL.
6. Procedimento secondo la rivendicazione 5, in cui il precursore di calcio è  $\text{Ca(OH)}_2$  e in cui i precursori di ferro (II) e ferro (III) sono i cloruri, rispettivamente  $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ .
7. Procedimento secondo una qualunque delle rivendicazioni da 4 a 6, in cui nella soluzione dell'operazione b), come precursore del titanio, si impiega l'isopropossido ( $\text{Ti(-O-CH(CH}_3)_2)_4$ ) e la soluzione ha una concentrazione compresa tra 12 e 100 mg/mL di titanio.
8. Procedimento secondo una qualunque delle rivendicazioni da 4 a 7, in cui nella soluzione dell'operazione c), come precursore del fosforo si impiega un suo sale o un acido fosforico, e la soluzione ha una concentrazione compresa tra 75 e 110 mg/mL di fosforo.
9. Uso di una composizione secondo una qualunque delle rivendicazioni da 1 a 3 per la preparazione di un filtro solare di tipo fisico.

RIASSUNTO

La presente invenzione si riferisce ad una composizione per protezione dalla radiazione solare, costituita da una matrice organica, preferibilmente una gelatina, e nanoparticelle di idrossiapatite modificata con la sostituzione di parte del fosforo con titanio, e di parte del calcio con ferro.