



UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
DI PADOVA

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA  
**Dipartimento di Ingegneria Industriale DII**

Corso di Laurea Magistrale in Ingegneria dei Materiali

**Studio dell'attivazione basica di silicati per  
ottenimento di Bioceramici cellulari**

Relatore: Prof. Enrico Bernardo

Riccardo Sponchiado 1160139

Anno Accademico 2018/2019



## Sommario

La presente tesi illustra un metodo innovativo per la produzione di scaffold bioceramici utilizzati nell'ingegneria tissutale per la rigenerazione del tessuto osseo.

Il metodo, denominato gel casting, punta a semplificare il processo produttivo, facendo a meno di schiume polimeriche da replicazione o materiali sacrificali, ma sfruttando le proprietà reologiche di una dispersione acquosa di particelle ceramiche attivate tramite una base alcalina o un sale di ammonio (attivazione ibrida).

La superficie del Biovetro, soggetto ad attivazione basica, non si dissolve semplicemente, ma forma prodotti poco solubili in acqua quali composti C-S-H, gli stessi trovati nei cementi. Avvenuto lo schiumaggio, la 'malta vetrosa' gela in situ sostenendo la porosità introdotta direttamente tramite agitazione. Lo scaffold viene poi ultimato con la sinterizzazione.

In questa tesi si esplora la praticabilità di questo metodo su un range di materiali oltre che sui classici biovetri ormai noti in letteratura. Si valuta inoltre, il concetto di attivazione ibrida, e le implicazioni che ne derivano sulle proprietà del biomateriale.

I risultati mostrano come il gel casting sia un metodo efficace ed estendibile anche a ceramici a base di nitruro di silicio, per creare delle schiume con morfologia adeguata per uno scaffold e con distribuzione di porosità e interconnessioni possibilmente superiori ai valori ottenibili con altri metodi. L'attivazione ibrida è inoltre utilizzabile al posto dell'attivazione alcalina e mostra risultati incoraggianti quando si tratta di lasciare invariata la composizione originaria del biomateriale e preservare le sue caratteristiche di biocompatibilità, bioattività e biodegradabilità.



## Abstract

This thesis illustrates an innovative method for the production of bioceramic scaffolds used in tissue engineering for bone regeneration.

The method, called gel-casting, aims to simplify the production process by removing the use of any replication polymeric foams or sacrificial materials, and by exploiting the rheological properties of an aqueous dispersion of ceramic particles activated via an alkaline base or an ammonium salt (hybrid activation).

The surface of the Bioglass, subjected to basic activation, does not simply dissolve, but forms products that are not very soluble in water such as C-S-H compounds, the same found in cements. A foamed aqueous ceramic slurry undergoes in situ gelation, supporting the porosity introduced directly by stirring. The scaffold is then completed with sintering.

This thesis explores the practicability of this method on a range of materials as well as on the classic bioglasses known in literature. The concept of hybrid activation and its implications on the properties of the biomaterial are also evaluated.

The results show that gel casting is an effective method which can be extended to ceramics based on silicon nitride, in order to create foams with an appropriate morphology for a scaffold and with a distribution of porosity and interconnections whose values are possibly higher than those achievable with other methods. Hybrid activation can also replace alkaline activation and shows encouraging results when it comes to leaving the original composition of the biomaterial unchanged and preserving its characteristics of biocompatibility, bioactivity and biodegradability.



# Indice

<b>1</b>	<b>INTRODUZIONE</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>INTEGRAZIONE OSSEA DELLO SCAFFOLD</b>	<b>5</b>
2.1	Il tessuto osseo . . . . .	5
2.2	Le componenti cellulari del tessuto osseo . . . . .	7
2.2.1	Gli osteoblasti . . . . .	7
2.2.2	Gli osteoclasti . . . . .	8
2.2.2.1	L'anidrasi carbonica . . . . .	9
2.2.2.2	L'H <sup>+</sup> -ATPasi . . . . .	10
2.3	Il rimodellamento osseo . . . . .	10
2.4	Lo scaffold: integrazione in vitro e in vivo . . . . .	11
2.4.1	L'ingegneria tissutale . . . . .	11
2.4.2	Studi in vitro e in vivo . . . . .	12
2.4.2.1	Cristallinità . . . . .	13
2.4.2.2	Energia superficiale . . . . .	13
2.4.2.3	Rilascio di ioni calcio . . . . .	13
2.4.2.4	Velocità di dissoluzione . . . . .	13
2.4.2.5	Materiale . . . . .	14
2.4.2.6	Fattori biochimici . . . . .	16
<b>3</b>	<b>PROGETTAZIONE DI UNO SCAFFOLD BIOCERAMICO</b>	<b>19</b>
3.1	Requisiti fisici dello scaffold . . . . .	20
3.2	Solidi cellulari . . . . .	21
3.2.1	Proprietà meccaniche . . . . .	25
3.3	Bioceramici . . . . .	28
3.3.0.1	Bioceramici cristallini fosfatici . . . . .	28

3.3.0.2	Bioceramici cristallini silicatici . . . . .	29
3.3.1	Bioceramici ferrimagnetici per ipertermia . . . . .	30
3.3.2	Bioceramici contenenti nitruro di silicio . . . . .	30
3.3.3	Biovetri . . . . .	31
3.3.3.1	Biovetri silicatici . . . . .	32
3.3.3.2	Biovetri borati . . . . .	33
3.3.3.3	Biovetri fosfati . . . . .	34
3.3.4	Vetroceramiche bioattive . . . . .	34
3.4	Metodi per la creazione di uno scaffold . . . . .	36
3.4.1	Replicazione . . . . .	37
3.4.2	Modello sacrificale . . . . .	37
3.4.3	Schiumatura diretta . . . . .	37
3.4.4	Freeze casting . . . . .	38
3.4.5	Tecniche di manifattura additiva (AM) . . . . .	39
3.4.5.1	Stampa 3D (3DP) . . . . .	39
3.4.5.2	Sinterizzazione laser selettiva (SLS) . . . . .	39
3.4.5.3	Stereolitografia (SLA) . . . . .	40
3.4.5.4	Robocasting (RC) . . . . .	41
3.4.5.5	Elettrospinning: . . . . .	41
3.5	Gel-Casting . . . . .	43
3.5.1	Attivazione basica dei silicati . . . . .	43
3.5.2	Attivazione Ibrida . . . . .	46
3.5.3	Schiumaggio . . . . .	47
3.5.4	Sinterizzazione . . . . .	48
<b>4</b>	<b>MATERIALI E METODI</b>	<b>51</b>
4.1	Metodo di preparazione . . . . .	51
4.2	Materiali utilizzati . . . . .	52
4.2.1	Bioceramici e Biovetri . . . . .	52
4.2.1.1	47.5 B . . . . .	53
4.2.1.2	WDP - WDE . . . . .	53
4.2.1.3	SC45 . . . . .	53
4.2.1.4	UBE-SN10 e Yantai Tomley TM-B . . . . .	53
4.2.2	Basi . . . . .	54
4.2.2.1	Idrossido di sodio . . . . .	54



4.2.2.2	Tetraetilammonio idrossido . . . . .	54
4.2.3	Tensioattivi . . . . .	54
4.2.3.1	Triton X-100 . . . . .	54
4.3	Metodi di analisi . . . . .	54
4.3.1	Misure di densità e Porosità . . . . .	54
4.3.2	Prove di resistenza a compressione . . . . .	56
4.3.3	Microscopia ottica . . . . .	56
4.3.4	XRD (X-Ray Diffraction) . . . . .	56
4.3.5	FTIR (Fourier Transform Infrared Spectroscopy) . . . . .	58
<b>5</b>	<b>RISULTATI E DISCUSSIONE</b>	<b>61</b>
5.1	Biovetro 47.5b . . . . .	61
5.1.1	Gel Casting Inorganico . . . . .	61
5.1.2	Gel Casting - Attivazione Ibrida . . . . .	67
5.2	Biovetri WD . . . . .	71
5.2.1	WDP . . . . .	72
5.2.2	WDE . . . . .	76
5.3	Biovetro SC45 . . . . .	79
5.4	Bioceramiche a base di $Si_3N_4$ . . . . .	81
<b>6</b>	<b>Conclusioni</b>	<b>87</b>



# Capitolo 1

## INTRODUZIONE

I difetti nelle ossa e le loro ripercussioni nei disturbi della funzionalità scheletrica e muscolare sono diventati un grosso problema che la medicina si trova ad affrontare con maggiore frequenza, principalmente per l'aumento dell'età media della popolazione mondiale e per lo sviluppo sociale[125]. Ogni giorno, centinaia di operazioni chirurgiche sono effettuate per una varietà di casistiche: danni causati da traumi, la sempre più utilizzata chirurgia per la rimozione di tumori, stabilizzazione di tratti spinali e più in generale ortopedia, chirurgie maxillo-facciali e cranio-facciali; dei casi, molti non sono curati adeguatamente perché i difetti delle ossa che superano una dimensione critica non possono essere riparati tramite l'autonoma rigenerazione del tessuto osseo, nella pratica si ricorre al trapianto. *Autotrapianto* (donatore di sé stesso), *allograpianto* (donatore della stessa specie) e *xenotrapianto* (donatore da specie diversa) possono essere strategie utilizzate per la risoluzione del problema, l'innesto autologo è tuttora considerato lo standard per via dell'abilità nel supportare osteogenesi e osteoinduzione. Tuttavia, questa procedura ha i suoi più grandi limiti nella scarsa disponibilità di tessuto utilizzabile nel corpo del paziente, nella necessità di ulteriore chirurgia e nella morbidità che provoca nel sito donatore. Un'alternativa promettente e senza il problema della disponibilità è data da allograpianto e xenotrapianto, tuttavia, comparati al trapianto di tessuto autologo, sono caratterizzati da peggiori proprietà di osteoinduzione e velocità di integrazione; essendo non-self producono una risposta immunitaria dell'organismo che può portare a rigetto, oltre che al rischio di contaminazione e trasmissione di virus dal donatore. L'ingegneria tessutale trova una soluzione a questi problemi e lo fa puntando a rigenerare i tessuti. Con questo approccio, la rigenerazione del tessuto osseo è ottenuta combinando cellule dal corpo umano con scaffold di biomateriale: metalli, polimeri o ceramici che fanno da terreno di coltura per le nuove popolazioni di tessuto. Gli scaffold così prodotti devono poi interagire con le cellule e i mezzi di coltura dalla fase in vitro fino all'impianto; è necessario quindi che possano ospitare una quantità sufficiente di

cellule e supportarle per alcune settimane sino all'intervento.

Così come ogni materiale d'impianto, lo scaffold ideale deve garantire alcune proprietà:

- deve avere una struttura altamente porosa e altamente interconnessa; i pori devono infatti essere di una dimensione comparabile a quella dei capillari e delle cellule del tessuto osseo che la popoleranno successivamente, per garantire il trasporto di ossigeno, nutrienti e materiale di scarto dentro e fuori dallo scaffold. Se i pori sono troppo piccoli potrebbero bloccare il passaggio delle cellule, se troppo grandi possono diminuire l'effetto di generazione di nuovo tessuto non permettendo alle cellule di riempire i pori durante la proliferazione.
- deve essere *biocompatibile*: non deve perciò provocare reazioni tossiche o risposta infiammatoria in fase di inserimento nell'organismo, e la sua chimica superficiale, deve essere adatta per l'adesione, la proliferazione e la migrazione di cellule e proteine in vitro.
- deve essere *biodegradabile*: la degradazione graduale degli scaffold aiuta a fare spazio a nuovo tessuto e evita un secondo intervento chirurgico per la rimozione dell'impianto. La degradazione deve essere di una velocità compatibile con quella della formazione di nuovo tessuto, inoltre il debris prodotto della degradazione non deve essere tossico per l'organismo.
- deve essere *bioattivo*: formare un legame intimo con l'osso dell'ospite per prevenire movimenti e infiammazione nella zona di contatto.
- deve garantire sufficienti proprietà meccaniche: la struttura porosa non deve compromettere eccessivamente la resistenza del materiale. [7, 125]

La più grande difficoltà nel design di uno scaffold è quella di soddisfare tutte queste caratteristiche che sono per natura messe in competizione (struttura porosa e proprietà meccaniche ad esempio), ciò fa sì che si debba lavorare in una finestra di formulazioni e proprietà molto limitata. Recentemente molti ricercatori hanno proposto nuove alternative per materiali e metodi produttivi. Tra i materiali più ricercati per questa applicazione ci sono i materiali bioceramici o compositi di bioceramici, in particolare, i biovetri silicatici e i vetro-ceramici contenenti *apatite* e *wollastonite* sono frequentemente ricercati per l'applicazione. In aggiunta a tutte le caratteristiche di osteoproduttività, è possibile utilizzare altri materiali bioceramici opportunamente modificati che compiano un'azione ulteriore o siano utili per altri metodi terapeutici.

I bioceramici contenenti nitrato di silicio, noti per la loro biocompatibilità, sono già utilizzati per la creazione di una grande varietà di applicazioni biomediche. Nell'ambiente biologico è stato osservato che il nitrato di silicio esibisce una carica superficiale altamente negativa, che può stimolare la concentrazione superficiale di ioni calcio e la precipitazione di apatite; oltre che, data la carica

negativa della superficie della maggior parte delle specie batteriche, fungere anche da antibatterico. [102][102]

Un'altra importante applicazione che riguarda i materiali vetro-ceramici è data dall'utilizzo dell'ipertermia: l'induzione di un surriscaldamento di materiali magnetici all'interno dell'ambiente biologico è utilizzata per la distruzione del cancro. In questo caso si preparano dei composti bioceramici all'interno dei quali è presente una frazione di ossido di ferro. Una volta in sito, il materiale viene surriscaldato tramite un campo magnetico variabile fino a circa 45 °C, questa temperatura è distruttiva per il tumore mentre la maggior parte dei tessuti sani non ne risentono. [22]

Per finire, la tecnica di creazione dello scaffold è fondamentale per valutarne poi la produzione in larga scala e la commercializzazione[7]. Diverse tecniche sono state utilizzate per la produzione di scaffold. Tra queste sono ad esempio l'impregnazione di spugne polimeriche, la stampa 3d e l'utilizzo di microsferiche polimeriche. Tutte queste tecniche richiedono altri materiali polimerici o particolari apparecchiature per la produzione dello scaffold.

Questa tesi si propone di studiare una tecnica semplificata per la produzione di bioceramici cellulari denominata *gel-casting*. La tecnica consiste nell'attivazione basica della polvere di biomateriale. La parte silicatica infatti forma composti C-S-H, simili a quelli trovati nel cemento, che conferiscono pseudoplasticità all'impasto; in questo modo è possibile effettuare lo schiumaggio diretto e la successiva essiccazione e sinterizzazione dello scaffold.

Il suddetto metodo produttivo viene testato in una varietà di materiali: biovetri silicatici e nel sistema *wollastonite-diopside*, bioceramici a base di nitrato di silicio e vetro ceramici *ferrimagnetici*. Le proprietà finali dello scaffold verranno verificate analizzandone la struttura e la chimica.



## Capitolo 2

# INTEGRAZIONE OSSEA DELLO SCAFFOLD

### 2.1 Il tessuto osseo

Date le sue caratteristiche di durezza e resistenza meccanica, il tessuto osseo si distingue da altri tipo di tessuto connettivo e svolge le funzioni strutturali e di sostegno. Le peculiari proprietà sono dovute alla grande quantità di cristalli di sali minerali a base di fosfati calcio che fanno esercitare all'osso anche un'importante funzione metabolica come riserva di calcio e fosforo per l'intero organismo.

La matrice extracellulare del tessuto osseo è formata principalmente da una parte inorganica: circa 69% di *apatite* [ $Ca_5(PO_4)_3$ ]; di questa, la componente più importante consiste in cristalli aghiformi di lunghezza pari a 20-40 nm e spessore 1.5-3 nm di *idrossiapatite* [ $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ ], le componenti minori sono invece *carbonatoapatite* e *fluoroapatite*. Assieme alla matrice inorganica è presente anche una parte organica, circa il 22%, per la maggior parte composta da fibre di *collagene*, il restante 9% è composto da acqua.

La disposizione e le dimensioni delle fibre di collagene determinano la varietà del tessuto osseo: *fibroso (primario)* o *lamellare (secondario)*. Il tessuto osseo fibroso è caratterizzato da lunghe fibre di collagene che si intrecciano in tutte le dimensioni, è il primo tessuto osseo ad essere depositato, sia nello sviluppo che nei processi riparativi; successivamente viene sostituito con tessuto osseo lamellare: una forma più ordinata del tessuto osseo che comprende la maggior parte delle ossa, in esso, collagene e *osteociti* sono disposti in modo ordinato a creare le cosiddette lamelle ossee che a seconda di come sono disposte formano il tessuto lamellare semplice, costituito da un numero limitato di lamelle parallele e il tessuto lamellare osteonico, dove le lamelle si dispongono in for-

ma concentrica attorno al *canale di Havers*. Gli osteoni, costituiti da 8-10 lamelle concentriche, costituiscono l'unità fondamentale delle ossa lunghe e sono funzionare indipendentemente gli uni dagli altri. Per finire, nella struttura dell'osso sono presenti delle lacune ossee: piccole cavità nella matrice minerale all'interno delle quali sono contenuti gli osteociti; le lacune sono collegate tra loro da canalicoli ossei che creano un network di cavità utile per gli scambi metabolici e gassosi con il sangue.

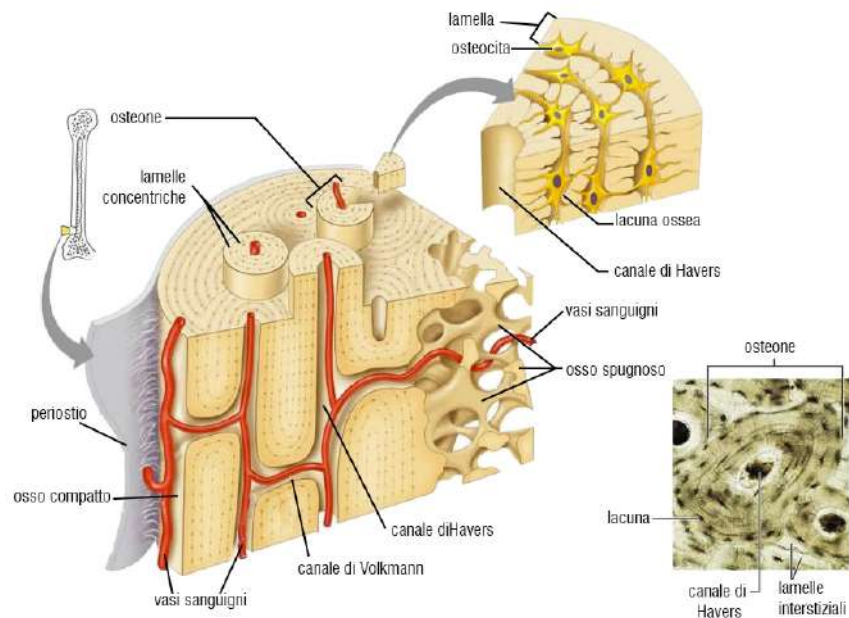


Figura 2.1.1: La tipica struttura dell'osso

Nella struttura ossea sono presenti inoltre due parti di tessuto connettivo non mineralizzato denominate periostio ed endostio; esse sono note per avere delle proprietà osteogeniche. Il Periostio ricopre la superficie ossea nelle zone dove non è presente la cartilagine (articolazioni), da esso dipartono i vasi sanguigni e le *fibre di Sharpey*, che ancorano l'osso al periostio. La parte interna del periostio è denominata strato cambiale, nell'adulto questo strato è costituito da numerose cellule connettivali che all'occorrenza possono trasformarsi in osteoblasti. L'endostio è invece un sottile strato connettivale che riveste le cavità midollari e i canali di Havers, le sue cellule hanno capacità emopoietiche e di produzione ossea, sia nello sviluppo che in seguito.[8]



## 2.2 Le componenti cellulari del tessuto osseo

Nel tessuto osseo sono presenti quattro tipi di cellule. Le prime tre provengono dalle *cellule staminali mesenchimali*, sono *preosteoblasti*, *osteoblasti* e *osteociti*; esse rappresentano le tre fasi dell'osteoblasto, che, nel processo di formazione dell'osso si trasforma dalla proliferazione dei preosteoblasti e finita la deposizione di tessuto osseo si trasforma in osteocita, esso risiede nelle lacune ossee e tramite dei prolungamenti si connettono agli altri osteociti. L'ultimo tipo di cellula è l'osteoclasto, questa volta proveniente dalle cellule staminali emopoietiche, il suo ruolo è quello della degradazione della sostanza fondamentale, poi sostituita da tessuto osseo.

Per una comprensione adeguata del modo in cui un impianto osseo si integra in vivo, è necessario comprendere il meccanismo del rimodellamento osseo, che nel tempo è responsabile del riassorbimento dello scaffold e della rigenerazione dell'osso; questo meccanismo è attuato principalmente da due tipi di cellule: osteoclasti e osteoblasti.

### 2.2.1 Gli osteoblasti

Gli osteoblasti sono le cellule deputate alla sintesi della matrice intercellulare del tessuto osseo e della sua mineralizzazione, hanno una dimensione media di  $20 \mu m$  e tendono ad associarsi e formare lamine a ridosso delle superfici ossee in via di formazione. Oltre che alla creazione del nuovo tessuto osseo, gli osteoblasti partecipano alla fase di rimodellamento anche innescando il meccanismo di riassorbimento della matrice ossea sia direttamente, producendo enzimi proteolitici in grado di sciogliere il collagene (*collagenasi*, secreta sotto forma di *procollagenasi* e attivata dalla *plasmina*), sia indirettamente, producendo fattori solubili in grado di richiamare gli osteoclasti. Tra i fattori prodotti dagli osteoblasti sono di notevole importanza il TGF- (transforming growth factor) che funge da stimolante per gli osteoblasti stessi e le BMPs (bone morphogenetic proteins) che sono in grado di modulare la proliferazione dei preosteoblasti, di promuovere la loro trasformazione in osteoblasti e di incrementare il metabolismo degli osteoblasti. Anche la mineralizzazione del tessuto è promossa da molecole secrete dagli osteoblasti, una corretta deposizione di sostanza minerale è effetto della combinazione di vari fattori. Si ritiene che il processo sia iniziato da componenti fibre di collagene o da molecole della sostanza fondamentale a contatto con esse, la presenza di cristalli di idrossiapatite inoltre, presenti già nello stadio di osso fibroso, stimola la precipitazione di nuovi cristalli. Le molecole secrete dagli osteoblasti che controllano il processo di deposizione del tessuto mineralizzato sono l'osteonecina e l'osteocalcina che rispettivamente favoriscono e inibiscono la formazione di cristalli di idrossiapatite. Gli osteoblasti, alla fine del processo di deposizione del nuovo tessuto osseo, rallentano la loro attività metabolica e si trasformano in osteociti.

### 2.2.2 Gli osteoclasti

Gli osteoclasti sono le cellule deposte al riassorbimento osseo. Cellule giganti polinucleate della dimensione di 100-200  $\mu m$  che possono presentare anche 50-100 nuclei al loro interno. Gli osteoclasti non provengono dal tessuto osseo, bensì sono della stessa famiglia dei globuli bianchi. I preosteoclasti sono trasportati dal flusso sanguigno fino alle zone dove deve avvenire il riassorbimento osseo, qui si fondono per divenire osteoclasti attivi e cominciare a disgregare la matrice ossea. Il processo di riassorbimento comincia con l'adesione dell'osteoclasto alla superficie ossea del tessuto che deve essere riassorbito, a seguito dell'azione erosiva effettuata dalla cellula si forma la cosiddetta lacuna di Howship. Perimetralmente alla lacuna, per contenere le attività erosive, è presente la zona chiara: un anello di citoplasma astrutturato contenente diversi filamenti di actina [119, 78] dalle funzioni contrattili. Al suo interno è presente l'orletto increspato, una zona composta da una serie di lamelle citoplasmatiche di diverso spessore e lunghezza che ampliano notevolmente la superficie di contatto. In aggiunta a ciò, queste zone contengono anche proteine quali vinculina, talina, and  $\alpha$ -actinina, che riconoscono le integrine della matrice ossea tramite il citoscheletro. I nuclei e gli organelli risiedono nell'altro lato della cellula, nel citoplasma.

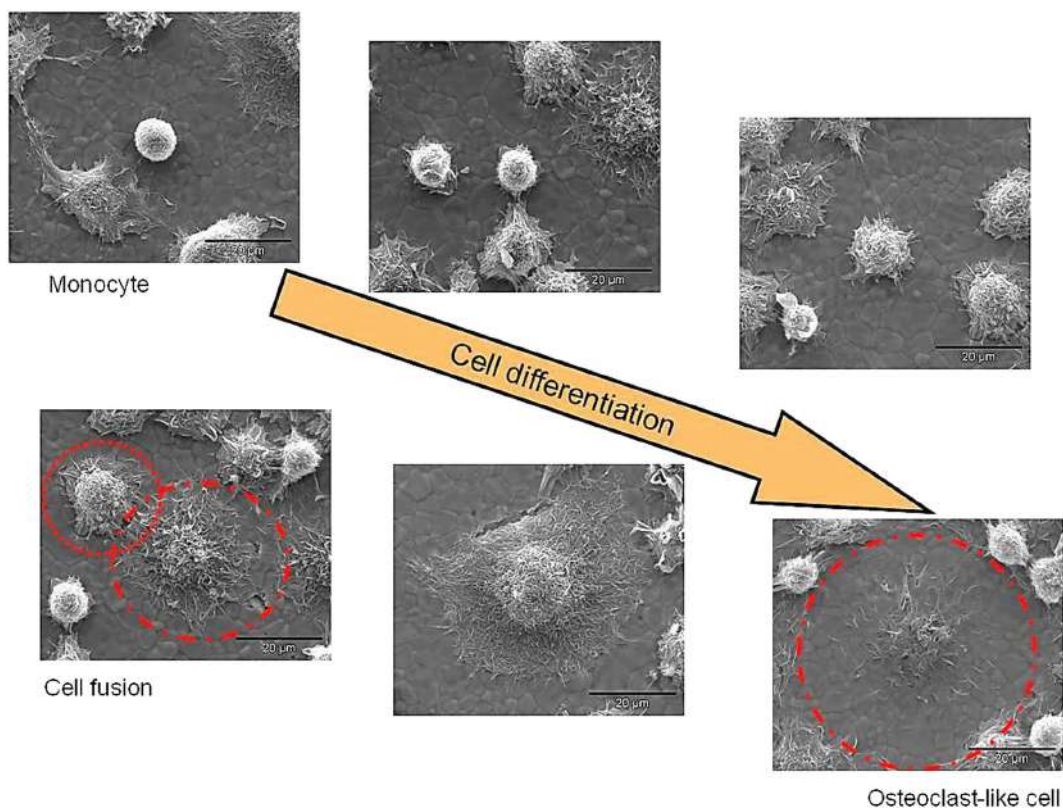


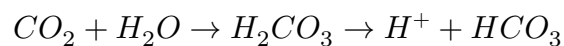
Figura 2.2.1: sviluppo dell'osteoclasto in una superficie di idrossiapatite [41]

L'azione degli osteoclasti è finemente regolata da due ormoni: *paratormone* e *calcitonina*. Il paratormone aumenta la quantità di osteoclasti oltre che mobilitare il calcio della superficie ossea e aumentare la calcemia; la calcitonina fa funzione di inibitore, staccando dalla superficie ossea gli osteoclasti e riducendo appunto la calcemia.

Una volta formato l'orletto increspato, gli osteoclasti possono divenire attivi e cominciare il processo di acidificazione e riassorbimento della superficie ossea. L'intimo contatto creato tra la matrice e la zona chiara fa sì che l'azione dell'osteoclasto dia diretta verso la superficie nel verso corretto. L'anidrasi carbonica e l' $H^+$ -ATPasi sono gli aspetti chiave dell'acidificazione della matrice ossea [66].

### 2.2.2.1 L'anidrasi carbonica

Studi microscopici hanno verificato la presenza di anidrasi carbonica negli osteoclasti [56]. L'anidrasi carbonica è responsabile della generazione di acido carbonico tramite idratazione dell'anidride carbonica.



Le pompe localizzate sulla membrana del'orletto increspato trasportano attivamente i protoni, derivati dalla disociazione dell'acido carbonico e di altri acidi di origine metabolica. L'estrusione di  $H^+$  mediante i vacuoli di  $H^+$ -ATPasi è bilanciata dallo scambio di  $Cl^-/HCO_3^-$ ; questo previene un'alcalinizzazione interna dovuta alla perdita di protoni.

L'abbassamento di PH che ne consegue porta alla dissoluzione di cristalli di Apatite.

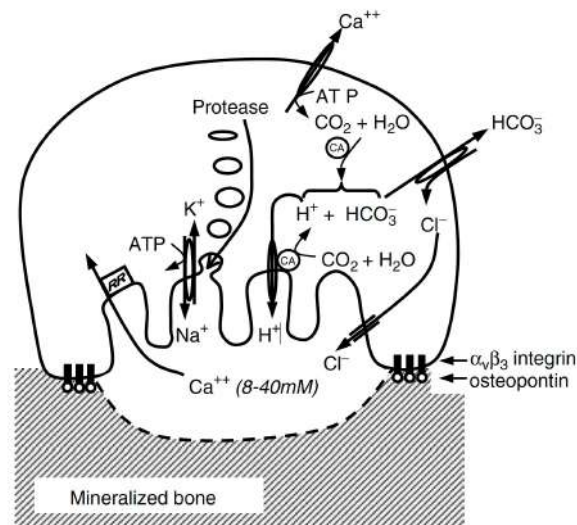


Figura 2.2.2: Acidificazione della matrice e proteolisi dell'osteoclasto. Il contatto tra l'osteoclasto e la matrice attuato dalle integrine provoca la formazione dell'orletto increspato e il posizionamento delle proteine atte allo spostamento di ioni. L'anidrasi carbonica nell'orletto increspato fornisce  $H^+$  ai vacuoli per l' $H^+$ -ATPasi [66].

### 2.2.2.2 L' $H^+$ -ATPasi

L'anidrasi carbonica facilita la produzione di protoni e acido carbonico, tuttavia non può fungere da pompa. L'ATPasi vacuolare è una proteina transmembrana presente nell'orletto increspato che trasporta nella lacuna di howship i protoni e l' $HCO_3^-$

L'osteoclasto libera, inoltre, enzimi lisosomiali che a basso PH distruggono la matrice organica del tessuto e altri enzimi quali l'attivatore della plasmina che attiva la plasmina e per suo tramite la collagenasi prodotta dagli osteoblasti.

## 2.3 Il rimodellamento osseo

Il cosiddetto rimodellamento osseo (bone remodeling) consiste in un continuo rinnovo del tessuto osseo primario, attraverso la formazione di tessuto osseo secondario (osso cortico, osteonico), in funzione di numerosi fattori e segnali ambientali che operano sia a livello locale che sistemico. Il processo ha inizio con la comparsa ed attivazione di osteoclasti in una porzione d'osso, corticale o trabecolare; l'attività di tali cellule determina il riassorbimento, tramite l'escavazione nell'osso di

un canale con diametro e lunghezza tipiche rispettivamente di 200 e 4000  $\mu m$  e con velocità media di circa 40  $\mu m/giorno$ . Contemporaneamente, nella cavità che viene formandosi vi è una forte tendenza alla vascolarizzazione che fornisce sostentamento alle cellule circostanti. La fase di riassorbimento dura dai 30 ai 50 giorni ed il vuoto viene riempito in progressione centripeta da osteoidi, ovvero da porzioni d'osso non mineralizzato, depositati dagli osteoblasti in un lasso temporale che può raggiungere i 150 giorni. Gli osteoblasti che rimangono intrappolati nel nuovo materiale osteoide cambiano aspetto e funzioni, trasformandosi in osteociti e rimangono collegati ai propri vicini attraverso i canalicoli. L'osteoido Haversiano che circonda il vaso sanguigno viene gradualmente mineralizzato, sin quasi a sostituire l'intero volume d'osso che era stato riassorbito. Generalmente le proprietà dell'osso secondario, che risulta dal normale processo di rimodellamento, sono inferiori a quelle dell'osso primario. Il rimodellamento sembra comunque essere importante soprattutto per la riparazione dei danni a livello microscopico che andrebbero altrimenti accumulandosi nell'osso maturo. Esso sembra inoltre avere un ruolo nel mantenimento degli equilibri del livello di calcio nel sangue.

## 2.4 Lo scaffold: integrazione in vitro e in vivo

Nonostante l'evoluzione delle tecnologie biomediche, la sostituzione di tessuto danneggiato rimane un problema cruciale per la medicina moderna. L'insufficienza di donatori e materiale da una parte (limita la possibilità di attuare trapianti provenienti da individui della stessa specie e dallo stesso individuo) e il problema dell'incompatibilità, del rigetto e del rischio di infezione dall'altra (difficoltà nell'utilizzare tessuto artificiale e proveniente da altre specie), rendono complessa la risoluzione del problema. Degno di nota è anche il fatto che spesso è tuttora l'utilizzo di impianti artificiali sia concepito come *bridge to transplant* e non come *destination therapy*, costringendo il paziente a una moltitudine di interventi nel tempo per sostituirli.

### 2.4.1 L'ingegneria tessutale

La risoluzione di questo problema potrebbe venire dall'ingegneria tessutale; definita come «una tecnica interdisciplinare che applica i principi e i metodi dell'ingegneria e delle scienze biologiche con l'obiettivo di comprendere le relazioni fondamentali tra struttura e funzione nei tessuti sani e malati dei mammiferi e di sviluppare sostituti biologici in grado di ripristinare, mantenere o migliorarne le funzioni».[114]

Componenti chiave dell'ingegneria dei tessuti sono cellule, scaffold, e segnali che stimolano la crescita (proteine). Gli scaffold di biomateriale sono generalmente seminati con cellule e occasionalmente con fattori biochimici o sottoposti a stimoli biofisici in un bioreattore [88].

Questi scaffold seminati con cellule sono sottoposti a una cultura di differenziazione pre-impianto in vitro per sintetizzare i tessuti e quindi trapiantati o direttamente impiantati in sito, utilizzando i sistemi propri del corpo, in cui la rigenerazione dei tessuti è indotta in vivo.

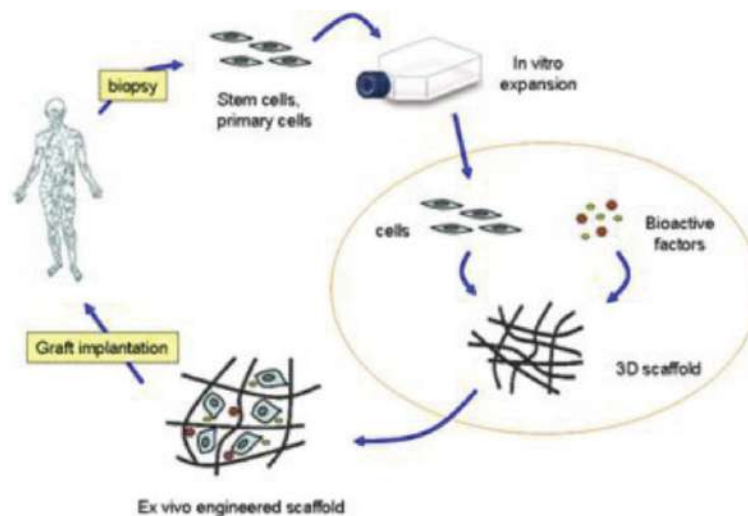


Figura 2.4.1: Approcci dell'ingegneria tissutale con uno scaffold di biomateriale [7]

## 2.4.2 Studi in vitro e in vivo

Colture e esperimenti in vitro sono effettuati, oltre che per colonizzare la cellula e renderla impiantabile in vivo, anche per verificare quali caratteristiche dello scaffold e quali fattori di adesione producano un terreno di coltura migliore per le cellule ossee.

Spesso, piccoli campioni di biomateriale poroso dalle dimensioni regolari sono seminati del necessario e osservati per tempi lunghi in modo da verificare l'adesione delle cellule e gli step successivi, come ad esempio la capacità degli osteoclasti di riassorbire la superficie e l'adsorbimento degli osteoblasti alla superficie.

I materiali sostitutivi di tessuto osseo utilizzati per gli impianti ortopedici devono essere tali da essere gradualmente riassorbiti e sostituiti da nuovo osso. È generalmente accettato che il tessuto osseo possa essere riassorbito solo dagli osteoclasti, e che gli osteoclasti degradino materiali bioat-

tivi. [121] Uno studio ha indicato che l'apatite può essere riassorbita solo dagli osteoclasti e non è suscettibile alla fagocitosi da parte dei macrofagi.[105].

Le caratteristiche del substrato influenzano la capacità di riassorbimento degli osteoclasti e quindi la possibilità di rilascio di CA e P nel mezzo di coltura e la successiva capacità di legare chimicamente con il tessuto osseo del paziente[63], mediata dall'apparizione di cristalli di idrossiapatite in seguito a una serie di reazioni che comportano l'attività degli osteoblasti.

#### 2.4.2.1 Cristallinità

In uno studio del 2005 [139], svolto su degli scaffold di biovetro sintetico del sistema  $SiO_2 - CaO - MgO - P_2O_5$  con differenti gradi di cristallinità, si evidenzia come la cristallinità sia un fattore importante per la capacità di riassorbimento degli osteoclasti perchè influenza la solubilità del substrato e quindi la capacità di creare siti attivi di Ca e P. Anche le **dimensioni della grana cristallina** influenzano la dissoluzione degli osteoclasti, diversi studi [112, 40] hanno dimostrato che vetro-ceramici di idrossiapatite e solfato tricalcico con grana cristallina più piccola stimolano proliferazione e dissoluzione degli osteoclasti.

#### 2.4.2.2 Energia superficiale

L'adesione degli osteoclasti dipende dalla presenza di specifiche proteine adesive extracellulari e dalle proprietà superficiali di un biomateriale. Si è osservato infatti che le cellule sono più stimolate ad aderire a superfici con una forte energia superficiale (idrossiapatite) piuttosto che in materiali con energia superficiale più bassa.[105]

#### 2.4.2.3 Rilascio di ioni calcio

Degli studi effettuati in confronto tra diversi materiali mostrano come l'alta concentrazione di ioni  $Ca^{2+}$  inibisca lo sviluppo dell'osteoclasto; l'eccessiva concentrazione è portata da substrati di materiale che si disciolgono velocemente [118].

#### 2.4.2.4 Velocità di dissoluzione

Come già detto, impianti effettuati su difetti ossei dalle dimensioni notevoli, devono avere la capacità di essere riassorbiti in un certo tempo. Una degradazione dello scaffold troppo lenta potrebbe inibire la formazione di nuovo tessuto osseo, d'altra parte, una dissoluzione chimica nel mezzo di coltura troppo veloce potrebbe non lasciare tempo sufficiente per la rigenerazione dell'osso in vivo.

Il tempo di degradazione ottimale è fonte di discussione in letteratura, tuttavia si possono studiare diversi materiali concentrandosi su questa caratteristica principalmente. Solitamente si scelgono materiali che non si sciolgono o che hanno limitata solubilità nel mezzo di coltura, in modo da lasciare la degradazione all'azione degli osteoclasti. Il solfato tricalcico ad esempio ha una velocità di dissoluzione più alta rispetto alla velocità di degradazione degli osteoclasti, per questo il suo utilizzo è circoscritto a una frazione del materiale base per lo scaffold [43][118].

#### 2.4.2.5 Materiale

I materiali più utilizzati come sostituti del tessuto osseo sono fosfato  $\beta$ -tricalcico e idrossiapatite. Entrambi mostrano un'alta biocompatibilità e osteoconduttività[44]. Oltre alle bioceramiche basate su calcio e fosforo, molti materiali basati su vetri silicatici e vetro ceramiche sono studiati come scaffold [107, 54, 76, 15]. Il vetro bioattivo 45S5 Bioglass®, ad esempio, è un materiale inorganico amorfo contenente Ca, Na, P, Si e O, che in bulk mostrano una velocità di dissoluzione lenta. Studi in vivo hanno mostrato come i biovetri siano degradabili con un meccanismo che unisce l'azione cellulare alla dissoluzione chimica [98, 86]. Un altro studio in vivo, svolto con tre diversi tipi di biovetro tra cui quest'ultimo ne valuta il riassorbimento [127]. Gli autori conclusero che il 45S5 Bioglass® mostrasse la più alta energia di legame con il tessuto osseo oltre che velocità di assorbimento, risultati rari tra i biovetri. Studi successivi infatti [130, 93] mostrarono gli effetti del silicio nel processo di riassorbimento: alti quantitativi di Si ( $> 25 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) nel terreno di coltura inibiscono l'espressione del RANK provocando una diminuzione dell'osteoclastogenesi e un'impersibilità nella formazione della lacuna di riassorbimento.

Il comortamento degli osteoclasti venne studiato anche in una quantità di vetri derivati da processo sol-gel (SG600-SG1100), interessante il fatto che indipendentemente dal diverso grado cristallinità che ne influenza la velocità di riassorbimento, le lacune vennero osservate su tutti i campioni di questo tipo [139]. Altri studi in vitro sono stati effettuati su vetri contenenti wollastonite e apatite producendo risultati positivi [61]; l'osservazione notevole però riguarda il particolare meccanismo che spiega come i biovetri possano legarsi alla superficie ossea tramite uno strato di apatite formato nella superficie del vetro.



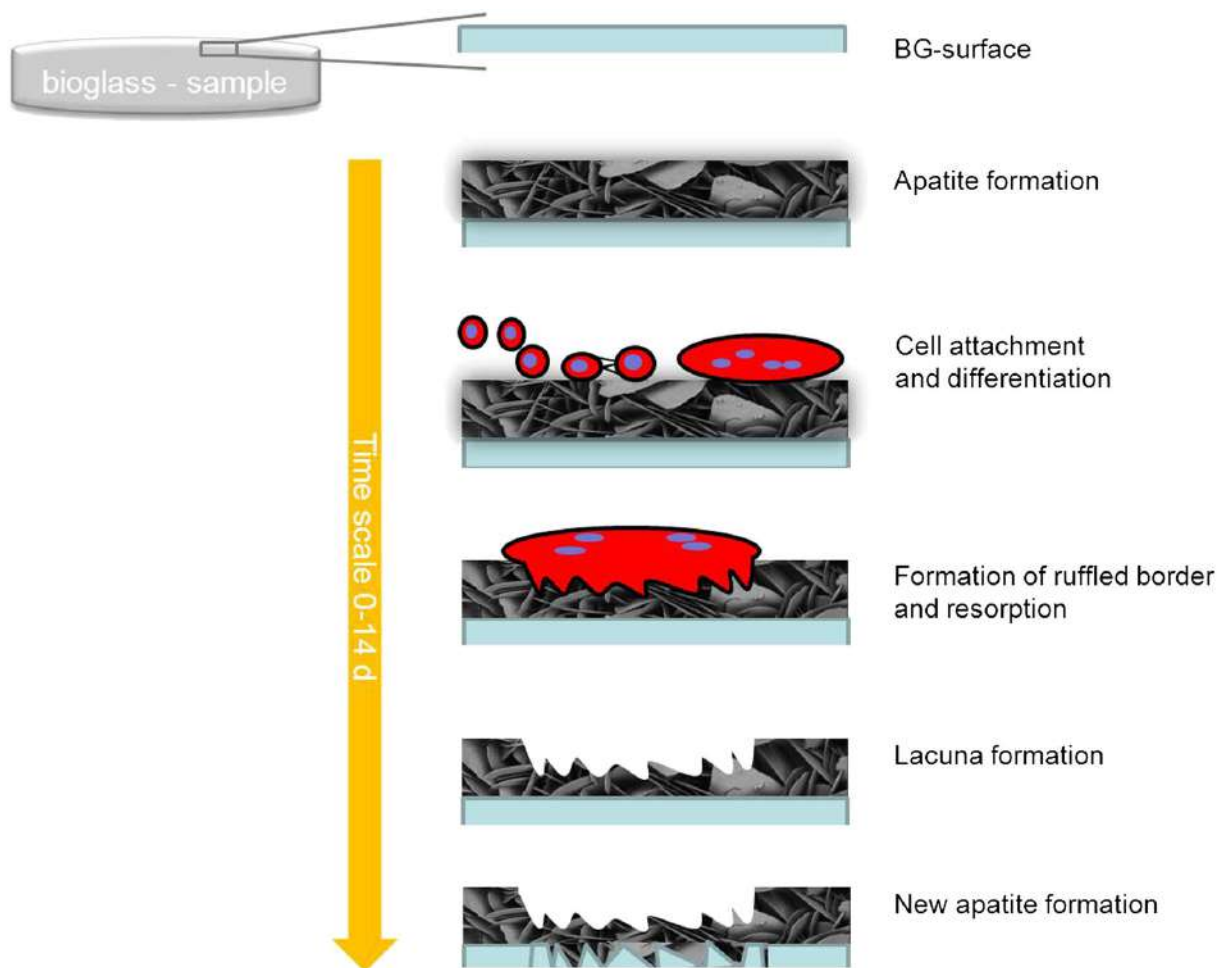


Figura 2.4.2: Progressi schematici dell'attivazione delle cellule di osteoclasti e della formazione di lacune sulla superficie del vetro bioattivo: formazione di strati ossei in superficie, attaccamento cellulare di cellule precursori e osteoclastogenesi (fusione cellulare e differenziazione), formazione di bordo arruffato e riassorbimento dello strato osseo, formazione di lacuna e, infine, nuova formazione di apatite con lo stesso spessore [41]

Vi è, tuttavia, un lavoro estremamente limitato pubblicato sull'interazione tra cellule di osteoclasti e scaffalature 3D bioattive in vetro e vetro-ceramica, che viene identificato come un'area che richiede ulteriori sforzi di ricerca.

Una volta attuata la dissoluzione superficiale del tessuto, gli osteoblasti possono entrare in gioco e cominciare il loro processo di trasformazione della matrice ossea, il processo si svolge in fondamentalmente in tre step:

1. proliferazione degli osteoblasti e sintesi della matrice extracellulare

2. maturazione e organizzazione della matrice
3. mineralizzazione della matrice

Dalla qualità dell'adesione dipendono i successivi step del processo [8]. Le interazioni tra gli osteoblasti e gli scaffold dipendono essenzialmente dalle caratteristiche della superficie in termini di morfologia, composizione chimica e energia superficiale.

Dal punto di vista morfologico la **rugosità** è sicuramente uno dei fattori più valutati; in letteratura ci sono numerosi contributi volti alla definizione di un valore ottimale [16, 117, 9] in particolare il lavoro di Suzuki et al. si spinge a trovare una correlazione tra rugosità e rimodellamento osseo [117]. La rugosità ha degli effetti anche nella differenziazione di monociti in osteoblasti, si è osservato [40] che gli osteoclasti preferiscono differenziarsi in superfici lisce, anche se l'effetto della dissoluzione non varia di molto.

Le stesse considerazioni sull'energia superficiale e sulla idrofobicità/idrofilicità della superficie fatte per gli osteoclasti hanno in genere valore anche per gli osteoblasti.

Un aspetto molto studiato riguarda invece l'adsorbimento alla superficie di proteine o di sequenze peptidiche ridotte (peptide mimicry<sup>1</sup>) che aumentano in grado di adesione delle cellule del tessuto osseo.

#### 2.4.2.6 Fattori biochimici

Le proteine considerate attualmente per la modificazione chimica della superficie degli scaffold bioceramici sono i fattori di crescita (e relative proteine) e le proteine di adesione (e relativi peptidi) [9]. Tra i fattori di crescita collegati al tessuto osseo più studiati e utilizzati si annoverano le BMPs (bone morphogenic proteins) e i fattori di crescita denominati TGF (transforming growth factors) in particolare il TGF- $\beta$ , la BMP-2 e la BMP-7. Le BMPs hanno dimostrato la loro efficacia nell'aumentare l'adesione degli osteoblasti alla superficie dello scaffold rispetto al riferimento [32, 135]; è stato scoperto inoltre che la BMP-7 supporta la formazione ossea e influenza la degradazione della ceramica [109] ed è stato confermato l'effetto di BMP-2 anche in scaffold di biovetro [125].

Tra le proteine di adesione citate precedentemente la più promettente è rappresentata dal tripeptide RGD contenuto in diverse proteine; è stato provato che gli osteoblasti aderiscono a questa sequenza attraverso un meccanismo che coinvolge le integrine di membrana [8]. La sequenza RGD

---

<sup>1</sup>la peptide mimicry offre la possibilità di individuare frammenti delle proteine native in grado di mantenere, almeno in parte, l'attività biologica propria della proteina intera. Brevi sequenze peptidiche possono essere sintetizzate per via chimica in grandi quantità e purificate fino ad elevati gradi di omogeneità. I peptidi sono economicamente più accessibili, possono essere conservati più a lungo e più facilmente delle proteine da cui derivano, in quanto più stabili e in genere maggiormente solubili in ambiente acquoso. Inoltre, possono essere opportunamente modificati per aumentarne la stabilità rispetto alla degradazione proteolitica.

tuttavia non sembra influenzare parecchio l'attività cellulare, l'uso in combinazione di vari fattori biochimici potrebbe essere il modello chiave per la modificazione della superficie; si è osservato un risultato massimizzante per quanto riguarda il rimodellamento cellulare con l'uso simultaneo di BMP-7 e sequenza RGD che contemporaneamente stimolano adesione cellulare e attività dell'osteoblasto [39].



## Capitolo 3

# PROGETTAZIONE DI UNO SCAFFOLD BIOCERAMICO

L'ingegneria tissutale è emersa come un approccio in rapida evoluzione per superare il svantaggio dei trattamenti classici rigenerando i tessuti danneggiati, anziché sostituirli. Questo approccio porta allo sviluppo di scaffold 3D da utilizzare come sostituti biologici, per ripristinare, mantenere o migliorare i tessuti difettosi [95].

Sono stati proposti vari biomateriali, appartenenti a diverse classi: metallici, polimerici e ceramici. Sebbene gli scaffold metallici porosi siano considerati come gli impianti più adatti per l'ingegneria dei tessuti perché resistenti nelle aree soggette a carico, hanno alcuni svantaggi fondamentali legati al loro essere non biodegradabili, al rischio di rilascio di ioni tossici, al rischio di corrosione e usura e al controllo dell'architettura porosa [20]. A volte infatti si ricorre a coating di bioceramici per aumentarne la biocompatibilità.

Anche i polimeri sono studiati per la produzione di scaffold; materiali come l'acido polilattico[3], acido poliglicolico [5], poliuretano [60] e numerosi copolimeri [85, 120]. gli scaffold polimeri naturali hanno un'eccellente bioattività, biodegradabilità ma scarse proprietà meccaniche. Queste caratteristiche li rendono eccezionali per l'ingegneria dei tessuti molli, ma di scarso utilizzo per quelli con funzione strutturale e scheletrica.

Gli svantaggi di metalli e polimeri portano allo sviluppo di nuovi tipi di materiali che limitano la produzione di debris e possono essere progettati per avvicinarsi il più possibile alle proprietà e alla composizione tessuto osseo. Tali materiali devono essere meccanicamente più resistenti dei polimeri e svolgere un ruolo critico fornendo stabilità meccanica che sostiene la struttura prima della sintesi della nuova matrice ossea da parte delle cellule. I materiali designati per questo scopo sono chiamati bioceramici.

Il materiale di base, che può essere un biovetro, una vetro-ceramica o un bioceramico deve essere polverizzato e lavorato con vari procedimenti in modo da ottenere un solido cellulare avente struttura e resistenza adeguate all'applicazione.

### 3.1 Requisiti fisici dello scaffold

Nella progettazione di uno scaffold bioceramico si devono tenere in conto tutte le caratteristiche che fanno sì che esso si possa trasportare da una coltura in vitro all'impianto in vivo. Siccome i materiali ceramici sono fragili, generalmente le applicazioni non saranno in posizioni di carico; tuttavia nell'ingegneria tessutale si cerca sempre di replicare ciò che succede in natura e cioè riprodurre in vitro tutte i possibili tessuti nel corpo [95].

Le seguenti caratteristiche giocano un ruolo fondamentale nella progettazione dello scaffold bioceramico:

1. **Macrostruttura:** è importante determinare e poter riprodurre la geometria della parte di tessuto da sostituire.
2. **Proprietà meccaniche:** lo scaffold deve garantire resistenza sufficiente per il tempo necessario alla rigenerazione del tessuto. Usando come linee guida le proprietà meccaniche native dell'osso, la resistenza dovrebbe essere di centinaia di megapascal con microstrutture ordinate per simulare l'anisotropia dell'osso. E' inoltre necessario capire come la degradazione dell'osso influenzerà l'andamento della resistenza. [71]
3. **Porosità, dimensione dei pori e interconnettività:** la dimensione dei pori è un aspetto di fondamentale importanza per stimolare la crescita delle cellule all'interno delle porosità dello scaffold e la formazione di nuovo tessuto osseo [77, 21], mentre la porosità e l'interconnessione tra i pori sono molto importanti per mantenere un'adeguata distribuzione spaziale delle cellule; per farle sopravvivere, proliferare e migrare all'interno dello scaffold. In particolare, una porosità di almeno il 60% e altamente interconnessa porta una corretta diffusione dei nutrienti e dei gas [138, 124]. È interessante notare che i pori con dimensioni inferiori a 1  $\mu\text{m}$  sono appropriati per interagire con le proteine e sono i principali responsabili della formazione di uno strato simile all'apatite a contatto con fluidi del sangue. Pori di dimensioni da 1 a 20  $\mu\text{m}$  sono importanti nello sviluppo cellulare. Pori di dimensioni comprese tra 100 e 1000  $\mu\text{m}$  sono essenziali per garantire l'apporto di nutrienti, la rimozione dei rifiuti metabolici e favorire la crescita di tessuto osseo. Infine, la presenza di pori di dimensioni maggiori di 1000  $\mu\text{m}$  svolge un ruolo importante nella funzionalità dell'impianto [123, 87, 125].

## 3.2 Solidi cellulari

Un solido cellulare è costituito da una rete interconnessa di colonne o pareti che formano i bordi e contornano la cella. La struttura cellulare può svilupparsi in due dimensioni, tramite degli array affiancati di figure geometriche regolari, questo tipo di struttura viene chiamato honeycomb o struttura 2D. In alternativa e più generalmente, la struttura cellulare si sviluppa come impaccamento di poliedri in tre dimensioni e viene denominata schiuma. se le celle della schiuma hanno delle pareti, si parla di schiuma a celle chiuse, se invece solo gli spigoli dei poliedri sorreggono la struttura si parla di schiuma a celle aperte.

La più importante caratteristica strutturale di un solido cellulare è la sua densità relativa, definita come:

$$\rho_{rel} = \frac{\rho_{geom}}{\rho_{bulk}}$$

dove  $\rho_{geom}$  è la densità geometrica della schiuma, che viene ottenuta come il rapporto tra la massa della schiuma e il suo volume esterno, e  $\rho_{bulk}$  è la densità del solido di cui è costituita (densità reale), ovvero il rapporto tra la massa della schiuma e il volume della sola parte solida (bulk material). La frazione di spazio libero nei pori viene chiamata porosità e può essere calcolata come:

$$f_{PT} = 1 - \frac{\rho_{geom}}{\rho_{bulk}} = 1 - \rho_{rel}$$

La dimensione delle celle ha effetti sulla densità e sulla porosità e assieme alla loro forma è un parametro che influenza gran parte delle proprietà meccaniche. Per quanto riguarda quest'ultimo parametro, infatti, celle equiassiche implicano proprietà isotrope, mentre celle più allungate o appiattite conferiscono al materiale proprietà che dipendono dalla loro orientazione. È necessario, poi, fare importanti distinzioni topologiche. Nelle schiume risulta essenziale discriminare tra porosità chiuse, ottenute da celle le cui facce sono sigillate e separano celle vicine con pareti simili a membrane, o porosità aperte, ottenute da celle interconnesse tra loro. Si vedrà in seguito che la differenza percentuale di porosità aperte ( $f_{PA}$ ) e chiuse ( $f_{PC}$ ) può influenzare le proprietà dello scaffold.

Le celle delle schiume possono assumere una varietà di forme che si devono unire per riempire lo spazio, senza distorcersi solo le celle prismatiche possono effettivamente riempire lo spazio. Le celle quindi devono generalmente distorcersi per ottenere un impaccamento maggiore, inoltre la maggior parte delle schiume risulta da combinazioni di varie tipologie di celle diverse per numero di spigoli e pareti.

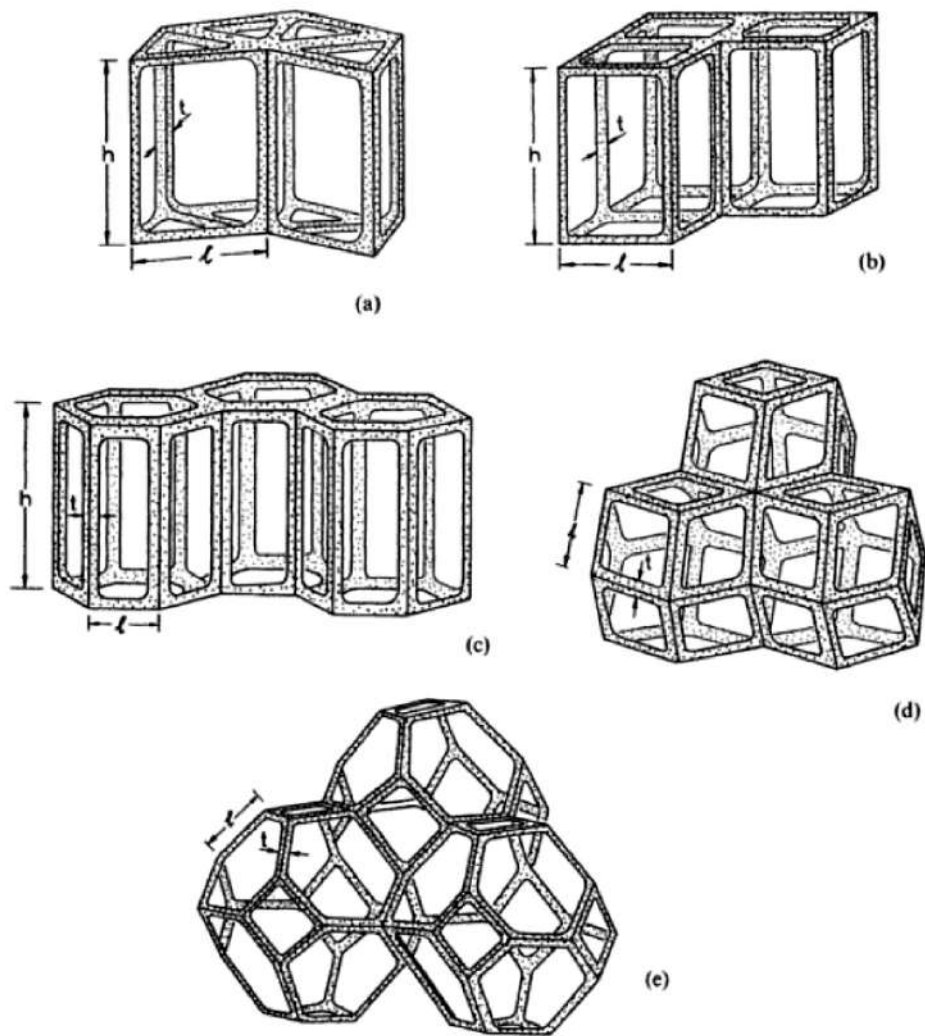


Figura 3.2.1: impaccamento dei poliedri per riempire lo spazio: (a) prismi triangolari, (b) prismi rettangolari, (c) prismi esagonali, (d) dodecaedro rombico, (e) tetracaidecaedro. [58]



Tuttavia, tutti i tipi di schiume obbediscono a precise regole topologiche, che ne permettono la caratterizzazione.

Da un punto di vista geometrico è utile pensare ad una struttura cellulare come ad un insieme di vertici, collegati da spigoli che identificano facce, le quali a loro volta racchiudono le celle.

$Z_e$  (edge connectivity) definisce il numero di spigoli che si incontrano ad un vertice ed è solitamente uguale a quattro per le schiume,

$Z_f$  (face-connectivity) è il numero di facce che si incontrano in uno spigolo ed è in genere pari a tre per le schiume. I numeri di vertici  $V$ , di spigoli  $E$ , di facce  $F$  e di celle  $C$  sono legati dalla legge di Eulero, che per grandi aggregati di celle si esprime come:

$$-C + F - E + V = 1$$

Questi numeri dipendono comunque sempre da come viene prodotta la schiuma e da quali forze danno forma alle celle.

Per quanto riguarda la dimensione delle celle, le schiume possono contenere unità aventi dimensioni in range più o meno ampi. La dispersione nelle dimensioni non implica necessariamente anisotropia, ma sia la dispersione che l'anisotropia dipendono da come il materiale viene prodotto.

In molti processi produttivi viene generato un gas sovrassaturo in modo che si separi dal liquido. Le bolle di gas che nucleano e crescono hanno inizialmente una forma sferica, che poi diventa poliedrica non appena le bolle cominciano ad interagire tra di loro. Se le bolle nucleano tutte in punti casuali nel liquido e crescono con la stessa velocità, allora la struttura iniziale che si genera viene chiamata schiuma di Voronoi. Il poliedro caratteristico costituisce la cella, centrata nel punto di nucleazione della stessa e contenente tutti i punti dello spazio più vicini al proprio punto di nucleazione rispetto a quelli delle altre celle. Le celle riempiono lo spazio e sono casuali, molte sono di forma spigolosa e hanno una media di 15.54 facce. La generazione casuale di punti di nucleazione può essere considerata anche con casualità nel tempo oltre che nello spazio.

Una maggiore uniformità e regolarità può essere ottenuta considerando punti di nucleazione casuali ma aventi una distanza maggiore di una determinata distanza di esclusione. Questa distanza può dipendere da vari parametri: per esempio nel caso di strutture naturali generate dalla costruzione competitiva operata da organismi marini (coralli, spugne) o insetti (strutture a nido d'ape), il fattore determinante è la grandezza dell'organismo, per cui due unità non possono nucleare ad una distanza minore di questa.

La crescita competitiva non è l'unica causa che influenza la forma delle celle. Tra gli ulteriori fattori da considerare c'è ad esempio la tensione superficiale. Quando quest'ultima è la forza modellante che domina nel processo ed è isotropa, la struttura diventa quella che minimizza l'area superficiale

a parità di volume di cella e pertanto in una schiuma le facce si incontreranno a  $120^\circ$ . La curvatura delle facce in generale dipende dalla differenza di pressione  $p$  secondo la relazione:

$$\Delta p \propto \gamma \left( \frac{1}{r_1} + \frac{1}{r_2} \right)$$

dove  $\gamma$  è la tensione superficiale e  $r_1, r_2$  sono i raggi principali di curvatura. Se le celle sono di uguale forma e grandezza, allora  $p = 0$  e il requisito di cui sopra è soddisfatto da un impaccamento ordinato di celle tetracaidecaedriche. Una volta che le celle entrano in contatto, l'aumento di dimensione è dovuto alla diffusione del gas da una cella a quella adiacente. È possibile dimostrare che celle con maggiore numero di facce tendono a crescere a discapito di celle con numero di facce minore, mentre celle con numero di facce pari a 14 tendono a rimanere immutate. Di conseguenza si ottiene una struttura disomogenea e diversa sia da quella di Voronoi che da quella iniziale ottenuta considerando la sola tensione superficiale.

Ulteriori forze che influenzano la forma e la dimensione delle celle sono quelle viscosive. Quando una cella si ingrandisce, infatti, le pareti della cella vengono tirate e il liquido drenato dalla cella. Questo drenaggio viene ostacolato da alte viscosità, che possono generare forze superiori alla tensione superficiale, dando vita a strutture non in equilibrio (con facce che non si incontrano a  $120^\circ$ ). Alcune schiume potrebbero risultare anisotrope a causa della produzione di bolle in fase liquida che tendono a risalire per le forze di galleggiamento ma vengono allungate dalle forze viscosive. In molti materiali cellulari naturali la struttura può essere invece determinata da direzioni di crescita, direzioni degli stress applicate durante la crescita o esigenze meccaniche dovute all'adattamento all'ambiente. Generalmente una cella con numero di facce maggiore della media è circondata da celle con un numero di facce inferiore. È stato osservato che esiste una correlazione matematica tra il numero di facce  $f$  di una cella e il numero medio di facce  $\bar{g}$  delle sue  $f$  celle vicine, chiamata legge di Aboav-Weaire:

$$\bar{g} = 13 + \frac{14}{f}$$

che vale in tre dimensioni ma che tuttavia approssima ragionevolmente la realtà solo quando  $\bar{f} = 14$ . In ogni caso rimane un dato di fatto che maggiore è il numero di facce di una cella, minore è in media quello delle celle adiacenti.

Lo studio della topologia ha, infine, prodotto un'ulteriore relazione che lega il volume  $V$  di una cella poliedrica con il numero delle sue facce, detta legge di Lewis (generalizzata da Rivier per tre dimensioni):

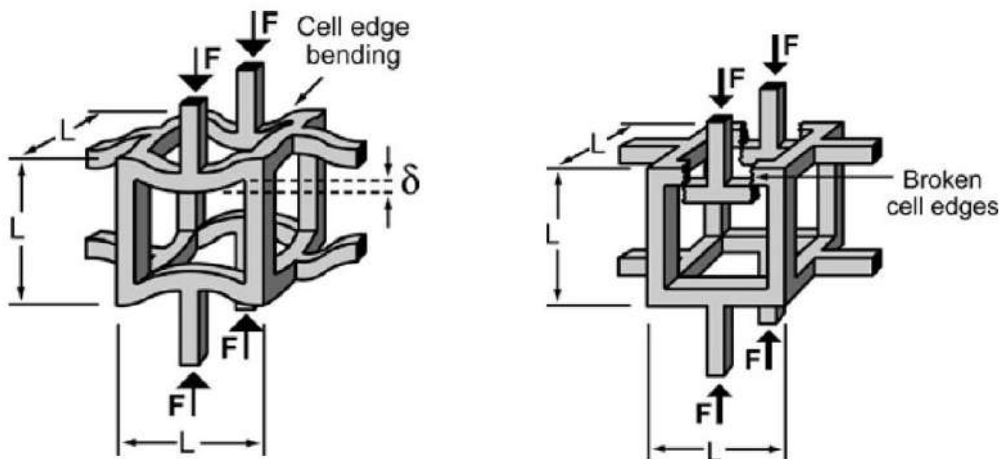
$$\frac{V(f)}{V(\bar{f})} = \frac{f - f_0}{\bar{f} - f_0}$$

dove  $V(\bar{f})$  è il volume di una cella con un numero medio di facce  $\bar{f}$  e  $f_0$  è una costante circa uguale a 3. In particolare si osserva che il volume varia linearmente con  $f$ .

Queste relazioni conducono alla conclusione che, durante il processo di ingrossamento delle celle, quelle più grandi e con maggiore numero di lati tendono a aumentare di dimensioni a discapito delle celle adiacenti più piccole, che tenderanno a scomparire in assenza di una forza che contrasta il fenomeno. Questo è dovuto, appunto, all'associazione tra differenza di pressione tra celle adiacenti e grandezza delle celle e porta ad un progressivo aumento della dispersione di quest'ultima. [58]

### 3.2.1 Proprietà meccaniche

Nella maggior parte dei casi di test e utilizzo, le schiume, in particolare quelle ceramiche, vengono sottoposte a sollecitazioni di compressione. La meccanica di deformazione delle schiume può essere di due tipi [111]: dominata dalla flessione (bending-dominated) o dominata dall'allungamento (stretch-dominated).



(a) Flessione degli spigoli di cella (b) Cedimento per frattura degli spigoli di cella

Figura 3.2.2: Comportamento a compressione di schiume con struttura a bassa connettività con meccanica di deformazione dominata dalla flessione.

In una schiuma con struttura a bassa connettività caricata a compressione, ciò che accade è la flessione degli spigoli delle celle e il successivo cedimento attraverso tre possibili meccanismi: deformazione plastica a flessione degli spigoli (materiali duttili), imbozzamento (buckling) degli spigoli (schiume elastomeriche) e frattura in successione degli spigoli (materiali fragili). Generalmente i tre meccanismi competono tra di loro e predomina quello che richiede il minor stress; in particolare l'ultimo meccanismo è predominante nel cedimento dei materiali ceramici.

Per strutture con questo comportamento è possibile dimostrare un legame tra i moduli elastici della schiuma e del materiale e la densità relativa. In particolare vale la seguente relazione, dove il modulo elastico della schiuma è  $E$  e il moduloelastico del solido di cui è composta è  $E_{bulk}$ :

$$\frac{E}{E_{bulk}} \propto \left( \frac{\rho_{geom}}{\rho_{bulk}} \right)^2 = \rho_{rel}^2$$

Se  $\rho_{geom} = \rho_{bulk}$  deve essere  $E = E_{bulk}$  quindi ci si aspetta una costante di proporzionalità molto vicina all'unità. Lo stress  $\sigma_c$  alla quale la schiuma collassa per frattura degli spigoli, invece, è legato alla tensione di rottura del materiale  $\sigma_{c,bulk}$  dalla relazione:

$$\frac{\sigma_c}{\sigma_{c,bulk}} \propto \left( \frac{\rho_{geom}}{\rho_{bulk}} \right)^{\frac{3}{2}} = \rho_{rel}^{\frac{3}{2}}$$

La costante di proporzionalità è circa uguale a 0.2. Un'ulteriore relazione molto utile per caratterizzare e classificare la resistenza della schiuma è quella che lega la  $\sigma_c$  alla tensione di rottura a flessione del materiale  $\sigma_{f,bulk}$ :

$$\frac{\sigma_c}{\sigma_{f,bulk}} \propto 0.2 \left( \frac{\rho_{geom}}{\rho_{bulk}} \right)^{\frac{3}{2}} = 0.2 \rho_{rel}^{\frac{3}{2}}$$

Come già accennato in precedenza il comportamento della schiuma dipende anche dal fatto che le porosità siano aperte o meno e poiché le relazioni appena viste valgono solo per materiali che contengono solamente porosità aperte, è necessario correggerle, per un caso generale, aggiungendo un fattore  $\phi$  che tiene conto del contributo aggiunto dalle facce delle celle e prende in considerazione il rapporto tra la frazione di materiale presente negli spigoli e la frazione di materiale presente nelle facce:

$$\frac{E}{E_{bulk}} \approx \phi^2 \rho_{rel}^2 + (1 - \phi) \rho_{rel}$$

$$\frac{\sigma_c}{\sigma_{f,bulk}} \approx 0.2(\phi \rho_{rel})^{\frac{3}{2}} + (1 - \phi) \rho_{rel}$$

Per quanto riguarda una schiuma con comportamento dominato dall'allungamento la dipendenza dalla densità relativa dei rapporti tra i moduli e tra le tensioni a rottura è dierente, poiché il collasso di un materiale fragile avviene per frattura a trazione/compressione degli spigoli (non più a flessione). Le relazioni sono pertanto:

$$\frac{E}{E_{bulk}} \propto \left( \frac{\rho_{geom}}{\rho_{bulk}} \right) = \rho_{rel}$$

$$\frac{\sigma_c}{\sigma_{c,bulk}} \propto \left( \frac{\rho_{geom}}{\rho_{bulk}} \right) = \rho_{rel}$$

Le costanti di proporzionalità sono di difficile determinazione poiché dipendono rispettivamente dal tipo di struttura e nella dal fatto che il processo di rottura è di tipo stocastico. Tuttavia dal confronto tra i due differenti comportamenti è possibile trarre importanti conclusioni: si nota che in generale schiume che seguono il secondo comportamento hanno, a parità di densità relativa, valori di moduli elastici e tensioni di frattura più alti rispetto a quelle del primo tipo e pertanto sono più adatte per applicazioni strutturali con basso peso.

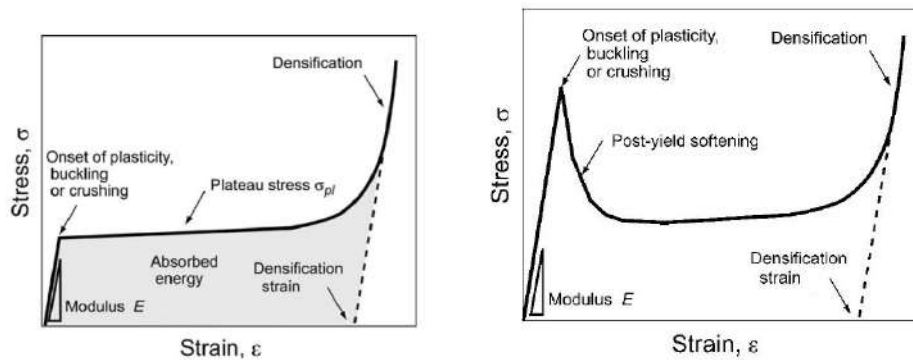


Figura 3.2.3: Curve sforzo-deformazione per schiume con differente comportamento meccanico. A sinistra per schiuma con comportamento dominato dalla flessione, a destra per schiuma con comportamento dominato dall'allungamento

Come è possibile osservare dalla figura che mostra le curve sforzo/deformazione per entrambi i comportamenti, quelle del secondo tipo, a seguito della prima frattura, sono soggette ad un collasso marcato dovuto alle modalità di deformazione, mentre le prime hanno un plateau più uniforme. Pertanto quest'ultime sono più indicate per applicazioni in cui viene richiesto assorbimento e dissipazione di energia (ad esempio per zone di carico più alto).

Per determinare con maggiore accuratezza la relazione tra comportamento del materiale e comportamento della schiuma ovviamente è possibile utilizzare modelli matematici avanzati e particolarizzati per ogni diversa struttura. Tuttavia i risultati preliminari presentati possono essere utili per una prima stima della resistenza di una schiuma con composizione nota.

### 3.3 Bioceramici

Gli scaffold Bioceramici presentano molte caratteristiche positive come la bioattività, la biocompatibilità, la biodegradabilità, e una struttura rigida (alto modulo di Young) [30], tuttavia sono per la maggior parte fragili e presentano difficoltà di modellazione. Selezionare il materiale corretto vuol dire affinare tutti i parametri in modo da ottenere un risultato equilibrato.

Le bioceramiche possono essere classificate in tre gruppi come indicato nella seguente tabella:

Gruppi	Fasi
1. Bioinerti	es. Ossido di alluminio ( $Al_2O_3$ ), Ossido di zirconio ( $ZrO_2$ ).
2. Bioattivi	es. Idrossiapatite Sinterizzata ad alta temperatura ( $s - HA$ ), biovetri
3. Biodegradabili	es. Idrossiapatite Sinterizzata a bassa temperatura ( $u - HA$ ), Solfato tricalcico ( $\alpha - TCP$ e $\beta - TCP$ ), Solfato tetracalcico ( $TTCP$ ), Solfato ottacalcico ( $OCP$ )

#### 3.3.0.1 Bioceramici cristallini fosfatici

Vari fosfati calcici ( $CaPs$ ) specialmente idrossiapatite ( $HA$ ), fosfato tricalcico ( $\beta - TCP$ ) e fosfato di calcio bifasico,  $BCP$  (mix di  $HA$  e  $\beta - TCP$ ) sono stati a lungo studiati come materiali per la rigenerazione ossea. Il tessuto osseo mineralizzato è in maggior parte formato da  $HA$  ( $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ ), quindi è utile per gli scaffold essere formati da  $HA$  e  $\beta - TCP$  in modo che la struttura cristallina sia simulata nel migliore dei modi [29, 73], e quindi che lo scaffold sia biocompatibile e induca il rimodellamento osseo.

I bioceramici fosfatici possiedono una lunga storia di utilizzo come materiali per impianti ossei, la prima applicazione di successo fu riportata nel lontano 1920 da Albee [6], molti anni dopo i sistemi di  $HA$  e  $\beta - TCP$  diventano materiali largamente utilizzati nell'ingegneria tissutale.

Il fosfato tricalcico ( $TCP$ ,  $Ca_3(PO_4)_2$ ) è il fosfato biodegradabile per eccellenza; presenta polimorfismo, nelle sue forme conosciute  $\beta$ ,  $\alpha$  e  $\alpha'$  stabili rispettivamente da temperatura più bassa a più alta. [36]

L'idrossiapatite ( $HA$ ) è conosciuta per la sua bioattività, biocompatibilità, non tossicità, non produzione di risposta infiammatoria e biodegradabilità. in comparazione con il  $\beta - TCP$ , l' $HA$  degrada più lentamente, seguendo questo ordine:  $OCP > \alpha - TCP > \beta - TCP > u - HA >> s - HA$  [133] e dopo l'impianto si converte poco a poco in una struttura simile a quella ossea [89]. Allo stesso grado di porosità, gli scaffold di  $\beta - TCP$  mostrano spesso minore resistenza meccanica degli scaffold di  $HA$ , limitando le loro applicazioni a situazioni senza grossi carichi [104]. La

velocità di degradazione e le altre proprietà, si controllano nella pratica variando le proporzioni di *HA* e  $\beta$ -*TCP* nel *BCP*. varie ricerche hanno osservato come l'aggiunta di dopanti nei mix di *CaPs* possono controllare la biocompatibilità, il comportamento in sinterizzazione, le velocità di dissoluzione e le proprietà meccaniche [20, 92].

### 3.3.0.2 Bioceramici cristallini silicatici

Storicamente è stata considerata condizione per la bioattività la presenza, nella formulazione del bioceramico, sia di *CaO* che di  $P_2O_5$  che sono i principali componenti dell'idrossiapatite [101]. Al contrario, il lavoro di Ohura et al [96] ha osservato che anche i sistemi *CaO* -  $SiO_2$ , con basso contenuto o senza  $P_2O_5$ , sono in grado di formare uno strato di idrossiapatite nella superficie; suggerendo la possibilità di ottenere bioceramici in questo sistema. Con queste osservazioni, Nonami et al. [91, 94] e De Aza et al. [37, 38] hanno dimostrato che due materiali policristallini: la wollastonite e il diopside, sono bioattivi.

La Wollastonite ( $CaSiO_3$ ), nella sua forma sinterizzata ad alta temperatura (pseudowollastonite) mostra nella sua struttura ioni calcio facilmente rimovibili da protoni provenienti dal plasma sanguigno, ciò suggerisce la possibilità della precipitazione di uno strato di HA in superficie. La formazione dello strato di HA nella pseudowollastonite è stata osservata appunto dal lavoro di De Aza et al. [37, 38] che studiando questo materiale in vitro e in vivo hanno confermato la sua bioattività escludendo fenomeni significanti di citotossicità.

Il Diopside ( $CaMgSi_2O_6$ ) è stato studiato in modo approfondito nei lavori di Nonami et al. [91, 94] che hanno dimostrato che questo materiale presenta alta resistenza agli acidi, buone proprietà meccaniche e assenza di citotossicità in vitro e in vivo, ma soprattutto che anche il Diopside è in grado di formare uno strato superficiale di HA quando in presenza di una soluzione contenente fosfati. Ciò fa sì che gli impianti in vivo possano rapidamente formare un legame con il tessuto osseo, facendo del diopside un materiale bioattivo.

L' Akermanite ( $Ca_2MgSi_2O_7$ ), di recente, ha ricevuto maggiore attenzione grazie alle sue proprietà meccaniche controllabili e alla velocità di degradazione [131, 79]. In studi precedenti, le cellule staminali e gli osteoblasti derivati dal midollo o dal tessuto adiposo hanno mostrato buone attività di proliferazione e osteogenesi sull'akermanite rispetto al  $\beta$ -*TCP* [116, 83, 131, 132, 122]. I recenti studi mostrano che questo particolare bioceramico potrebbe mostrare caratteristiche da sostituto di tessuto osseo migliori del  $\beta$ -*TCP*. Tuttavia il meccanismo per cui l'akermanite risulta bioattiva è ancora sconosciuto e oggetto di studio.

### 3.3.1 Bioceramici ferrimagnetici per ipertermia

L'ipertermia indotta da magneti è una tecnica per distruggere cellule cancerogene utilizzando un campo magnetico. La temperatura dei tessuti cancerosi può essere portata fino a 42-46°C tramite riscaldamento indiretto prodotto da vari tipi di materiali magnetici sottoposti al campo. una volta nel tumore, questi materiali si riscaldano sotto effetto di campo magnetico alternato (dovuto a differenti processi di isteresi), portando alla distruzione del materiale tumorale.

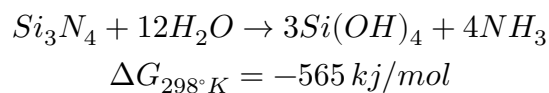
La maggior parte dei prodotti ferro-, ferri- e superparamagnetici sono adatti a questo tipo di applicazione, a patto che siano biocompatibili. La capacità di aumentare la temperatura dipende dalle proprietà del materiale utilizzato, come l'anisotropia magnetica e della struttura cristallina, la dimensione delle particelle e la struttura.

Vari materiali sono stati testati per l'applicazione, tra i quali alcuni materiali vetro ceramici [97, 19].

Tra di questi sono presenti alcuni vetro ceramici come ad esempio il biovetro SC45, contenente in totale il 41% di ossidi di ferro ( 14%  $FeO$  e 31%  $Fe_2O_3$ ), con cui possono essere creati degli scaffold con proprietà magnetiche e di ipertermia personalizzabili a seconda dell'applicazione. [22]

### 3.3.2 Bioceramici contenenti nitrato di silicio

Il nitrato di silicio come bioceramico non-ossido offre diversi vantaggi diversamente dai comuni bioceramici utilizzati come scaffold, la sua alta resistenza meccanica, resistenza all'usura e stabilità chimica danno la possibilità di creare scaffold affidabili anche per le applicazioni soggette a carichi. Molti studi infatti studiano la forma solida del nitrato di silicio come sostituto alle protesi metalliche del ginocchio [12, 13, 45]. Anche in forma porosa, che assomiglia di più a quella del tessuto osseo il nitrato di silicio è correntemente utilizzato nella chirurgia, per esempio come impianto spinale, dove mostra caratteristiche di biocompatibilità simili al titanio. oltre alle proprietà meccaniche il nitrato di silicio ha mostrato grandi caratteristiche di batterio-lisi. In presenza di umidità, sulla superficie del nitrato di silicio c'è un forza motrice termodinamica limitata dalla diffusione per convertire nitrato di silicio in acido silicico e ammoniaca come mostrato di seguito [17]:



Il rilascio di ammoniaca e acido silicico aumenta il pH a  $\approx 8,5$ , che impedisce l'adesione dei batteri.



Allo stesso tempo non si sono osservati cambiamenti degni di nota nella proliferazione cellulare [102]

### 3.3.3 Biovetri

I biovetri furono scoperti da Larry L. Hench nel periodo tra il 1969 e il 1971. Nel tentativo di risolvere il problema che avevano i biomateriali polimerici e metallici che allora erano utilizzati negli impianti, cioè il rigetto, Hench formulò un'ipotesi che gli permise di ottenere gli stanziamenti per la sua ricerca:

*« Il corpo umano rigetta metalli e polimeri sintetici formando tessuto fibroso perchè il tessuto vivo non è composto dagli stessi materiali. Il tessuto osseo contiene Idrossiapatite (HA), dunque se un materiale è in grado di formare un layer di HA sulla sua superficie in vivo, potrebbe non essere rigettato »*

Grazie a questa ipotesi, che al giorno d'oggi potrebbe sembrare obsoleta, Hench utilizzò i diagrammi ternari di fase  $Na_2O - CaO - SiO_2$  per formulare le prime tre composizioni per il suo progetto che successivamente saranno testate in vivo portando i risultati che oggi si conoscono [62].

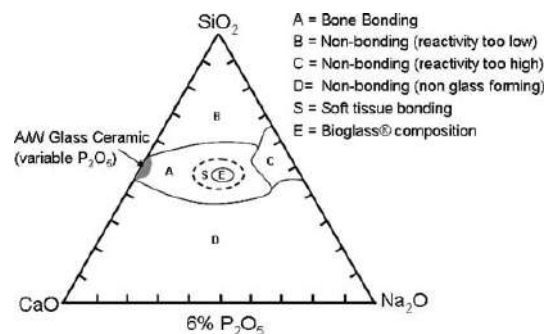


Figura 3.3.1: Diagrammi di composizione per i biovetri che legano con il tessuto osseo, La regione S è quella dei biovetri con maggiore bioattività che legano sia all'osso che al tessuto morbido.

In questo modo si giunse per la prima volta alla composizione del biovetro 45S5, che mostrava una forte tendenza a formare idrossiapatite e legare in modo stabile con il tessuto osseo.

I biovetri hanno già mostrato la loro eccellenza come promettenti materiali per la produzione di scaffold data la loro particolare tendenza allo stimolare la crescita di cellule ossee, legandosi sia al tessuto morbido che a quello mineralizzato [129], la loro abilità nel ricostituire i siti difettosi nel tessuto osseo e la loro controllabilità nella velocità del processo di degradazione in vivo. La composizione dello scaffold di biovetro e la sua microstruttura sono fondamentali per determinare

la velocità di conversione in un materiale HA-simile material, le sue proprietà meccaniche e la risposta al contatto con cellule ossee.

Recentemente sono stati sviluppati biovetri dopati con varie sostanze quali *Cu*, *Zn* e *Sr* in modo da promuovere una più sana crescita in vivo [68]. Questi tipi di biovetri hanno mostrato una tendenza alla promozione dell'angiogenesi (sviluppo di vasi sanguigni) [104, 59] e guarigione delle ferite nei tessuti morbidi [104]. Queste spiccate capacità dei biovetri hanno permesso di fare a meno dell'uso di costosi fattori di crescita per stimolare l'angiogenesi e l'adesione cellulare [104].

La tabella successiva riassume la composizione dei vetri bioattivi più noti [104].

Composizione wt%	45S5	13-93	6P53B	58S	70S30C	13-93B1	13-93B3	$P_{50}C_{35}N_{15}$
$Na_2O$	24.5	6.0	10.3	0	0	5.8	5.5	9.3
$K_2O$	0	12.0	2.8	0	0	11.7	11.1	0
$MgO$	0	5.0	10.2	0	0	4.9	4.6	0
$CaO$	24.5	20.0	18.0	32.6	28.6	19.5	18.5	19.7
$SiO_2$	45.0	53.0	52.7	58.2	71.4	34.4	0	0
$P_2O_5$	6.0	4.0	6.0	9.2	0	3.8	3.7	71.0
$B_2O_3$	0	0	0	0	0	19.9	56.6	0

### 3.3.3.1 Biovetri silicatici

Il biovetro chiamato 45S5 è storicamente riconosciuto come un materiale biocompatibile, biodegradabile e bioassorbibile. La composizione del vetro 45S5 45%  $SiO_2$ , 6%  $P_2O_5$ , 24.5%  $CaO$ , 24.5%  $Na_2O$ . Il basso contenuto di  $SiO_2$  (<55%  $SiO_2$ ), l'alto contenuto di modificatori quali  $Na_2O$  e  $CaO$  e l'alto rapporto  $CaO/P_2O_5$  contribuiscono alla bioattività del 45S5. L'innesto in vivo dello scaffold e la formazione del layer di HA (idrossi-carbon-apatite, HA con carbonio sostituito) sulla superficie contribuiscono significativamente all'adesione degli osteoblasti. La processabilità di questo vetro tuttavia mostra una particolare difficoltà nel produrre degli scaffold 3D date le sue scarse proprietà meccaniche e la sua biodegradabilità [73], il vetro infatti sottoposto a sinterizzazione in flusso viscoso, cristallizza facilmente; aspetto detrimental per la sua bioattività [82]. Recentemente è stato scoperto che sinterizzando il vetro a una temperatura molto alta (>950°C), la fase cristallizza e produce un biovetro dalle alte proprietà meccaniche. In più si converte in un fosfato di calcio amorfo e biodegradabile in un ambiente biologico alla temperatura corporea [31].

Questo processo lo rende un materiale per scaffold molto promettente che incorpora sia proprietà meccaniche che biodegradabilità in un solo prodotto [29].

Un'altra complicazione nell'uso del 45S5 e di altri biovetri è l'influenza che la loro degradazione può portare nell'ambiente biologico. L'aumento della concentrazione di ioni come  $Ca^{2+}$  e  $Na^+$  e del pH avviene, particolarmente durante i primi stage in vivo quando la velocità di degradazione è più alta [69, 70, 134, 54]. Gli effetti biologici di questi cambiamenti sono difficili prevedere dagli esperimenti in vitro. Inoltre, il ruolo biologico di queste specie solubili, la loro tossicità e la loro rimozione sono spesso un processo non chiaramente compreso.

Un altro vetro bioattivo, denominato 13-93 [25, 24] è basato sulla composizione del 45S5, ma con una quantità di  $SiO_2$  più alta e altri ossidi modificatori, come  $K_2O$  e  $MgO$ . Gli scaffold di 13-93 sono stati approvati per applicazioni in vivo in UE. Questo biovetro ha caratteristiche che gli permettono una migliore lavorazione, data la larga finestra di sinterizzazione (tra Temperatura di transizione vetrosa e Temperatura di cristallizzazione), può avvenire un maggiore addensamento in sinterizzazione senza andare incontro alla formazione di fase cristallina. Negli studi in vivo non si sono viste grosse differenze rispetto al 45S5, tuttavia, il biovetro 13-93 degrada e forma il layer di HA più lentamente del riferimento.

### 3.3.3.2 Biovetri borati

Diversi studi hanno osservato che i vetri bioattivi borati o borosilicati promuovono la proliferazione e la differenziazione cellulare in vitro, nonché l'infiltrazione dei tessuti in vivo [104]. I vetri bioattivi borati si degradano più velocemente dei biovetri 45S5. Si convertono completamente in un materiale simile ad HA a causa della loro bassa stabilità chimica [69]. Vi è preoccupazione per la possibile tossicità del boro rilasciato nella soluzione come ione borato  $(BO_3)^{3-}$  [104]. Alcuni biovetri borati sono stati giudicati tossici per le cellule, quando osservati in colture statiche in vitro, effetto che si riduce quando invece si osservano in colture dinamiche. Il Biovetro denominato 13-93B3, con composizione uguale al 13-93 ma con tutto il contenuto di silice sostituito da  $B_2O_3$ , è tossico per alcune colture cellulari in vitro, mentre quanto impiantato in vivo non ha mostrato tossicità ma buona osteogenicità [54].

Il tasso di degradazione può essere controllato manipolando la composizione del vetro [69]; il vetro 13-93 con  $SiO_2$  sostituita solo parzialmente con  $B_2O_3$  (biovetro borosilicato) porta una variazione importante della velocità di degradazione rispetto al 13-93. Lavorando in questo modo, è teoricamente possibile ingegnerizzare un vetro con una velocità di degradazione simile a quella di rigenerazione del tessuto osseo [104].

I biovetri borati hanno anche mostrato ottimi risultati per utilizzi come substrati per il rilascio di medicinali nelle infezioni delle ossa [54].

### 3.3.3.3 Biovetri fosfati

Questo tipo di biovetri sono basati sull'ossido formatore  $P_2O_5$  che forma delle strutture dove  $CaO$  e  $Na_2O$  si comportano come modificatori. Mostrano un'affinità chimica con l'ambiente biologico dovuta agli ioni presenti nella fase minerale organica del tessuto osseo. La degradabilità di questo vetro può essere controllata modificandone la composizione. La sua flessibilità ha reso gli scaffold di questo materiale potenziali biomateriali riassorbibili per l'ingegneria dei tessuti. [104]

### 3.3.4 Vetroceramiche bioattive

Per vetroceramica si intende un materiale ottenuto tramite parziale cristallizzazione di un vetro amorfo attraverso trattamento termico. La cristallizzazione deve essere controllata affinché il materiale policristallino che viene ottenuto abbia il giusto grado di cristallizzazione e omogeneità. La principale differenza con un materiale ceramico tradizionale è che quest'ultimo viene ottenuto mediante sinterizzazione di specie cristalline, mentre le vetroceramiche solidificano amorse e cristallizzano successivamente tramite un processo di devettrizzazione [99].

Il miglioramento delle proprietà meccaniche dei biovetri, generalmente determinato dalla parziale cristallizzazione, unito alla bioattività delle fasi cristalline silicatiche e fosfatiche, ha spinto la ricerca sulle vetro ceramiche, che oltre alla possibilità di un impiego come sostituti ossei in situazioni di carico portano un miglioramento della lavorabilità, apprezzato ad esempio per applicazioni dentali [57, 65].

La vetroceramica apatite-wollastonite di Kokubo e la vetroceramica Biosilicate® sono gli esempi principali di "bioceramica" cristallizzata a sinterizzazione. Il primo è significativo per il tentativo di produrre una vetroceramica con una fase cristallina (apatite) che presenta evidenti somiglianze con la frazione minerale dell'osso (ossifluoro-apatite nella vetroceramica, idrossiapatite nell'osso naturale)[80, 64]. Il secondo mostra invece come piccoli cambiamenti nella formulazione del vetro 45S5 in modo da controllare il bilancio cristallizzazione/bioattività possano dare risultati notevoli. Il 45S5, come già discusso, mostra come principale svantaggio la piccola finestra di sinterizzazione che gli permette di rimanere completamente amorfo [51, 100, 34]. Una piccola variazione dei rapporti degli ossidi del 45S5 lo fa diventare Biosilicate® (23.75 wt%  $Na_2O$ , 23.75%  $CaO$ , 48.5%  $SiO_2$ , 4%  $P_2O_5$ ) la cui cristallizzazione, come nella vetroceramica di kokubo mostra la formazione di una fase silicatica e una fosfatica ( $Na_2CaSi_2O_6$  e  $NaCaPO_4$ ). Numerosi studi in vitro

e in vivo hanno mostrato come il Biosilicate® quasi totalmente cristallizzato mostri bioattività e osteointegrazione comparabili a quelle del 45S5 [34].

Il delicato bilancio tra flusso viscoso e cristallizzazione nel trattamento termico agisce come un ulteriore parametro per modificare le caratteristiche dello scaffold. Da una parte il flusso viscoso tende a richiudere i micropori e ottenere una struttura più densa, dall'altra la cristallizzazione 'congela' il flusso viscoso permettendo di mantenere la struttura macroporosa dello scaffold [126, 48].

### 3.4 Metodi per la creazione di uno scaffold

Per creare un microambiente per l'adesione e la proliferazione cellulare, un punto chiave è ottenere una struttura porosa con proprietà meccaniche adeguate. L'osso naturale ha dimensioni dei pori distribuite in un'ampia gamma, che vanno da diversi nanometri a centinaia di micrometri [72]. Questa variabilità di dimensioni dei pori soddisfa i requisiti per una normale crescita dei tessuti. Le dimensioni dei pori nell'intervallo 150–800  $\mu\text{m}$  impediscono la crescita del tessuto osseo e dei vasi sanguigni. Tuttavia, le dimensioni dei pori nell'intervallo 10–100  $\mu\text{m}$  sono utili per la crescita dei capillari, lo scambio di nutrienti e l'escrezione dei prodotti di scarto. I nano pori conferiscono una superficie specifica più ampia e una quantità maggiore di siti attivi di adesione. Sono ottimi per la formazione di apatite e l'adesione di proteine o osteoblasti [84]. Al contempo, sono importanti per la regolazione dell'adesione cellulare e la proliferazione.

Sono disponibili una moltitudine di tecniche di fabbricazione per produrre scaffold bioceramici con diverse caratteristiche architettoniche. Esistono due tipi principali di tecniche di fabbricazione: tecniche convenzionali e tecniche avanzate. Le tecniche convenzionali per la fabbricazione di strutture porose includono principalmente la replica; il modello sacrificale; e schiumatura diretta come mostrato in Figura 3.4.1.

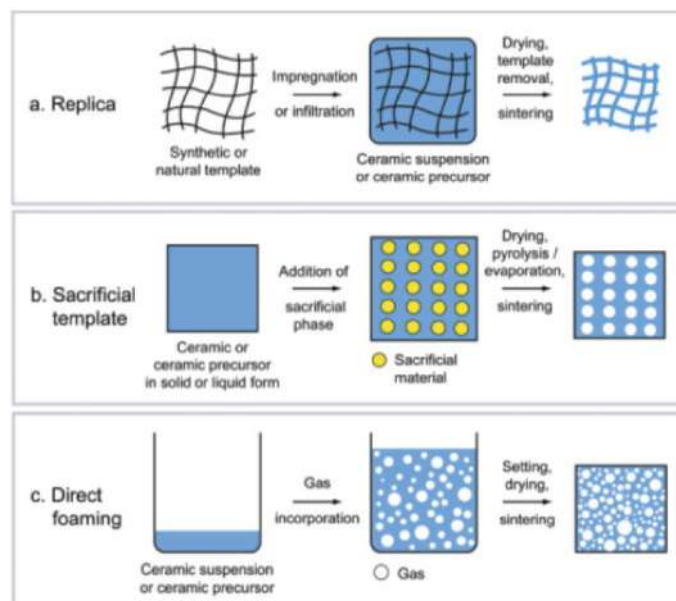


Figura 3.4.1: Schema delle tecniche tradizionali degli scaffold bioceramici [77]

### **3.4.1 Replicazione**

La tecnica della replica impiega un modello sintetico o naturale impregnato di una sospensione bioceramica. Dopo l'essiccazione, il modello viene rimosso creando così una replica della struttura del modello originale. Molte strutture cellulari sintetiche e naturali possono essere utilizzate come modelli per fabbricare ceramiche macroporose attraverso la tecnica della replica [115].

### **3.4.2 Modello sacrificale**

Il metodo del modello sacrificale incorpora una sorta di formatore di pori o materiale sacrificale per fungere da segnaposto all'interno della polvere ceramica o del liquame. Una volta formato il verde, il materiale sacrificale viene rimosso per lasciare i pori vuoti. Questo metodo porta a scaffold porosi che replicano il negativo del modello sacrificale originale, al contrario della morfologia positiva ottenuta dalla tecnica di replica sopra descritta [115].

### **3.4.3 Schiumatura diretta**

La schiumatura diretta è un processo in cui le bolle di gas sono incorporate in una sospensione bioceramica e, una volta che l'impasto viene fissato ed essiccato, la ceramica trattiene i pori sferici risultanti. Per ottenere schiume di ceramica ad alta resistenza, gli oggetti essiccati vengono quindi sinterizzati ad alte temperature. La porosità totale della schiuma ottenuta è proporzionale alla quantità di gas incorporata nella sospensione o nel mezzo liquido durante il processo di schiumatura. Le dimensioni dei pori dipendono dalla plasticità dell' impasto schiumato prima dell'essiccazione [115].

### 3.4.4 Freeze casting

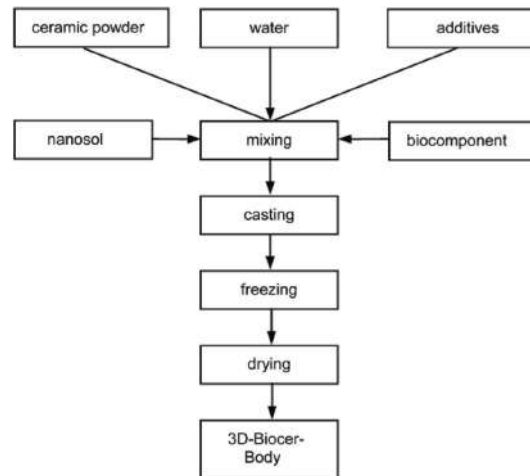


Figura 3.4.2: operazioni del processo di freeze casting [78]

La freeze casting è considerata una delle tecniche più promettenti per la fabbricazione di strutture porose. Utilizza la crescita di cristalli di ghiaccio in una sospensione di ceramica per formare i pori. È una tecnica semplice per produrre parti porose ceramiche o polimeriche di forma complessa. In questa tecnica, una sospensione ceramica viene versata in uno stampo e quindi congelata. Il solvente congelato funge da legante temporaneo per tenere insieme il verde. La parte deformata viene sottoposta a liofilizzazione (freeze drying) sotto vuoto per sublimare il solvente congelato, evitando le sollecitazioni e il restringimento che potrebbero causare cricche e deformazioni durante la normale essiccazione. Dopo l'essiccazione, le parti vengono sinterizzate per ottenere uno scaffold con una microstruttura porosa complessa e spesso anisotropa e resistenza e rigidità adeguate. Controllando la direzione della direzione di crescita dei cristalli di ghiaccio, è possibile conferire un orientamento preferenziale alla porosità nei prodotti finali [42].

Recentemente, sono state proposte le tecniche avanzate di additive-manufacturing (AM), la prototipazione rapida (RP) e l'elettrospinning per la fabbricazione di scaffold bioceramici porosi. Hanno diversi potenziali benefici rispetto alle tecniche tradizionali quali la facilità di riproduzione, la precisione e il controllo delle proprietà necessarie .



### 3.4.5 Tecniche di manifattura additiva (AM)

Le tecniche AM sono definite come tecniche di modellazione solida in forma libera (solid free-form (SFF) manufacturing). Sono tecniche precise e riproducibili per controllare le dimensioni interne dei pori, la porosità, l'interconnettività, le prestazioni meccaniche e le dimensioni complessive degli scaffold per ingegneria dei tessuti [66, 136]. Sulla base di immagini 3D programmate tramite software CAD, gli scaffold vengono riprodotti deponendo strato per strato il materiale bioceramico nella posizione corretta per replicare l'architettura precedentemente disegnata [28]. Uno dei requisiti principali delle tecniche AM è l'utilizzo di un metodo automatizzato ad alta produttività che dia la possibilità di produrre costrutti specifici per i pazienti; in questo modo la prototipazione rapida può essere potenzialmente utilizzata per fabbricare tessuti personalizzati [67]. I vantaggi della tecnologia AM sono numerosi, ad esempio la versatilità del software CAD consente la fabbricazione delle parti desiderate senza la necessità di costosi stampi, e il processo viene solitamente eseguito in pochi passaggi.

Le tecniche AM più rilevanti nella progettazione di scaffold 3D per l'ingegneria dei tessuti sono la stampa 3D (3DP), la sinterizzazione laser selettiva (SLS), la stereolitografia (SLA), il robocasting (RC) e la modellazione a deposizione fusa (FDM). In figura è mostrata schematicamente ciascuna tecnica basata su RP [27].

#### 3.4.5.1 Stampa 3D (3DP)

La testina a getto di questo dispositivo estrude goccioline di un fluido legante su un letto di polvere. Questo processo viene ripetuto per ogni strato fino al completamento dello scaffold; successivamente avviene la rimozione della polvere rimanente. È un metodo utilizzato per creare scaffold da utilizzare nell'ingegneria dei tessuti. Uno dei vantaggi importanti di questo metodo è che il letto di polvere non bagnata dal legante supporta ogni strato successivo. La fragilità delle parti ottenute è considerata uno svantaggio [26, 14].

#### 3.4.5.2 Sinterizzazione laser selettiva (SLS)

La sinterizzazione laser selettiva (SLS) è un processo di manifattura additiva che consente di generare parti 3D complesse solidificando strati successivi di materiale in polvere uno sopra l'altro. La solidificazione si ottiene fondendo o sinterizzando aree selezionate degli strati di polvere usando l'energia termica fornita attraverso un raggio laser. Un sistema di deflessione del raggio guida il raggio su ogni strato in base alla corrispondente sezione trasversale della parte calcolata da un modello CAD. Un sistema di deposizione in polvere viene utilizzato per depositare i successivi

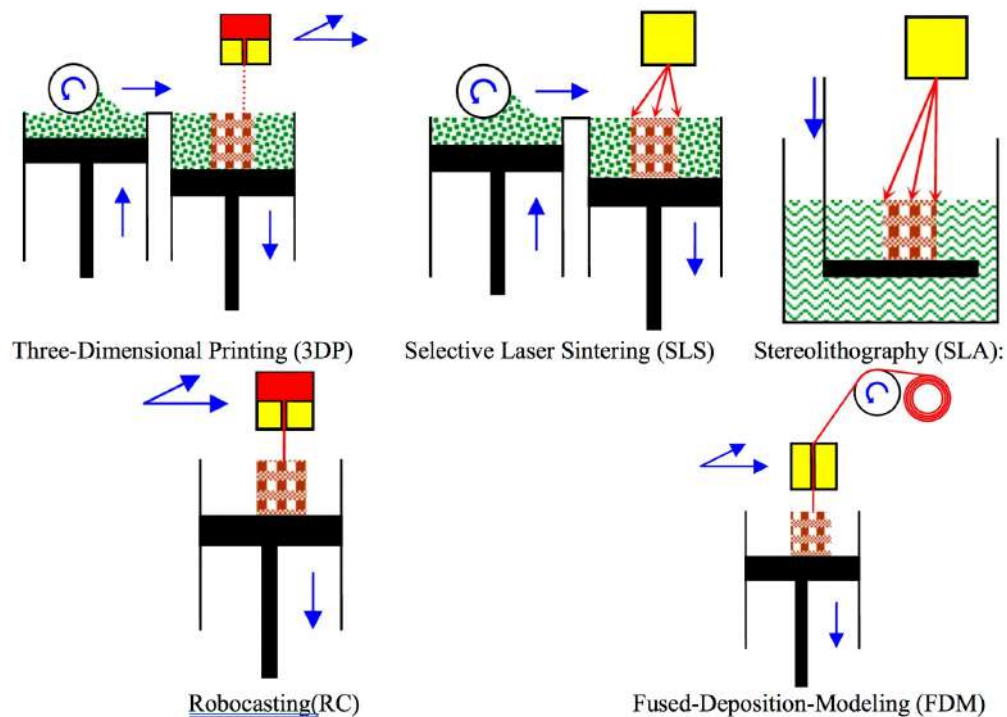


Figura 3.4.3: tecniche avanzate di produzione degli scaffold [93]

strati sottili di polveri (in genere 0,1-0,3 mm di spessore) in un contenitore dell'edificio prima che tale strato venga sinterizzato al laser [81].

### 3.4.5.3 Stereolitografia (SLA)

La stereolitografia (SLA) è un ulteriore tipo di tecnologia AM, ampiamente utilizzata nel campo dell'ingegneria dei tessuti. In questo caso, la produzione dell'oggetto si basa sulla solidificazione di una resina liquida mediante fotopolimerizzazione. Un laser è focalizzato su una profondità specifica in una vasca di resina, causando polimerizzazione localizzata (e quindi solidificazione). La solidificazione viene ripetuta strato per strato fino a quando non viene riprodotto l'oggetto 3D. Nella stampa SLA, l'energia impartita dal laser è fondamentale ed è influenzata dalla potenza della sorgente luminosa, dalla velocità di scansione, dal tempo di esposizione e dalla quantità di polimero e fotoiniziatore. Il principale vantaggio di SLA la stampa è la sua versatilità, poiché dei farmaci possono essere miscelati con il fotopolimero prima della stampa, e rimanere intrappolati nelle matrici solidificate. La SLA è anche superiore ad altre tecniche 3DP in termini di risoluzione (20  $\mu\text{m}$  rispetto a 50-200  $\mu\text{m}$  per altre tecnologie di fabbricazione). [128]

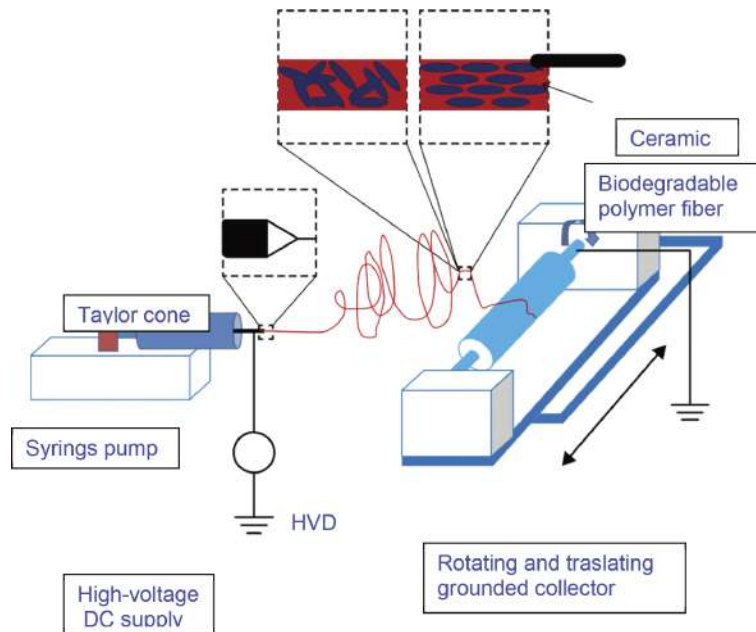


Figura 3.4.4: schematiche di un proceso di elettrospinning [7]

#### 3.4.5.4 Robocasting (RC)

Il robocasting è una tecnica AM basata sull'estrusione, che utilizza sospensioni (inchiostri) simili a paste dall'alto contenuto di solido per costruire strutture 3D attraverso una deposizione a livelli effettuata da un estrusore cilindrico. Parametri reologici critici per la stampa includono la viscosità apparente, lo stress di snervamento e il modulo elastico dell'inchiostro. Un inchiostro con proprietà reologiche appropriate deve essere in grado di fluire attraverso l'estrusore (ovvero bassa viscosità ad alto stress) ma anche di ritenere la forma al momento della deposizione. Per raggiungere questo obiettivo, le polveri di partenza sono solitamente sciolte in acqua con l'aggiunta di un disperdente anionico per ottenere una sospensione concentrata. La sospensione fluida ottenuta viene quindi coagulata aggiungendo opportune concentrazioni di sali o specie cationiche, oppure di cambiando il pH della sospensione in modo da trasformarla in una pasta estrudibile [50].

#### 3.4.5.5 Elettrospinning:

Viene utilizzato l'elettrospinning per produrre nano/microfibre mediante il passaggio di una soluzione di materiali polimerici o compositi ceramici/polimerici attraverso un campo elettrico, la procedura è schematizzata in figura 3.4.4. Le fibre solide sono prodotte da getti elettrificati ad alta tensione. Queste fibre vengono continuamente allungate a causa della repulsione elettrostatica tra

le cariche superficiali e l'evaporazione del solvente. Questa tecnica consente di ottenere scaffold ad alta superficie specifica, che simulano la scala dimensionale delle proteine fibrose presenti nella matrice extra cellulare naturale [137, 35]. Uno dei grandi interessi in questa metodologia è la capacità di produrre facilmente materiali per l'ingegneria dei tessuti per le applicazioni che prevedono di rilascio di farmaci [4].

Le tecniche avanzate danno la possibilità di produrre scaffold altamente precisi e replicabili, tuttavia richiedono apparecchiature importanti, dipendono dal comportamento della polvere o dalla reologia della miscela che si va a stampare. Con gli scaffold prodotti tramite RP poi, è difficile replicare la struttura naturale del tessuto osseo e altri aspetti come la microporosità e la distribuzione della porosità. Tra le tecniche tradizionali poi, la tecnica della replica e del materiale sacrificale fanno uso di materiali non ceramici che in fase di sinterizzazione vengono rimossi, è un aspetto di notevole importanza limitare il materiale residuo polimerico che rimane all'interno dello scaffold, che potrebbe far mancare la biocompatibilità o sviluppare infezioni. L'utilizzo di una struttura spugnosa ricoperta di materiale ceramico richiede inoltre un'attenzione maggiore allo sviluppo delle proprietà meccaniche, se durante la sinterizzazione non c'è scorrimento, le cavità precedentemente occupate dalla spugna polimerica nei montanti rimangono vuote riducendo in modo significativo le proprietà meccaniche. utilizzando materiale sacrificale si rischia poi di ottenere una bassa interconnettività con passaggi troppo piccoli tra un poro e l'altro.

## 3.5 Gel-Casting

Una strategia per ottenere scaffold altamente porosi con montanti generalmente più densi è quella del gel-casting. Il metodo produce combinazioni di macro e microporosità. A partire dal all'inizio degli anni 2000, il gel casting è stato ampiamente applicato alle formulazioni sol-gel [10, 113]. Il metodo consiste nell'incorporazione di bolle d'aria nell'impasto con l'aiuto di tensioattivi, mediante agitazione meccanica ("schiumatura diretta") nelle prime fasi della gelificazione (stato sol). Il mantenimento della struttura porosa si effettua con il progressivo indurimento (transizione allo stato di gel). Ricerche approfondite, condotte in particolare da Jones e Hench [74, 75], hanno dimostrato che la struttura porosa può essere controllata, operando su molte variabili, come la chimica di vetro e i tensioattivi. Le sospensioni gelificate altamente porose vengono convertite in scaffold bioceramici mediante un trattamento di sinterizzazione, causando anche il burn-out di qualsiasi frazione organica.

Nei paragrafi successivi saranno affrontati nel dettaglio i meccanismi che entrano in gioco nella tecnica.

### 3.5.1 Attivazione basica dei silicati

L'attivazione basica sta attualmente ricevendo un crescente interesse nel settore della ceramica. Solitamente, materiali attivati da alcali, generalmente noti come "geopolimeri", sono prodotti attraverso la reazione di un silicato di alluminio con un solvente basico, che è tipicamente una soluzione acquosa concentrata di un idrossido alcalino [103] ma anche di una base organica [47]. Queste materie prime producono un gel simile alla zeolite, costituito da un rete tridimensionale amorfa o cristallina di alluminosilicato [103]. La rete presenta il legame tra  $SiO_4$  e  $AlO_4$  tetraedrici, quest'ultimo formatosi in presenza di ioni alcalini negli spazi circostanti, per la compensazione della carica. Gli ioni alcalini rimangono sostanzialmente "intrappolati" nella rete di alluminosilicato, per ottenere un equilibrio ottimale  $Al_2O_3 / SiO_2$  nelle materie prime che consente prodotti chimicamente stabili.

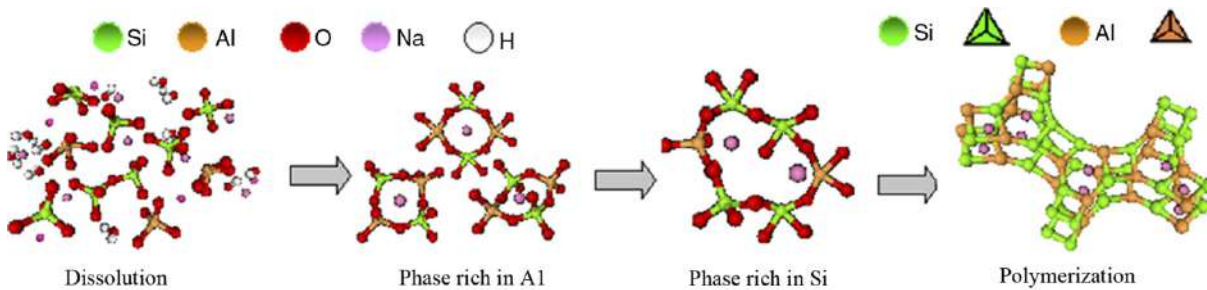


Figura 3.5.1: modello proposto per la formazione di N-A-S-H [46]

Un gel si forma, comunque, anche da formulazioni con diversi equilibri  $Al_2O_3/SiO_2$ ; ad esempio, le formulazioni ricche di  $CaO$  non producono un gel simile alla zeolite, ma forniscono un prodotto di condensazione che è un gel simile alla tobermorite, data l'analogia con i prodotti dell'idratazione del cemento [103]. Di conseguenza, il termine "polimero inorganico" potrebbe apparire più appropriato per identificare i prodotti, essendo indipendente dalla struttura del gel [103]. Il concetto di attivazione degli alcali e di "polimerizzazione inorganica" può essere applicato anche ai biovetri. Vetri con composizione chimica ingegnerizzata (vetri in alluminio silicato) possono essere usati come precursori per materiali simili ai geopolimeri [55, 110] da utilizzare come nuovi leganti per la costruzione, secondo la formazione di gel di sodio alumino-silicato idrato (N – A – S – H) e gel di calcio alluminio-silicato idrato (C – A – S – H). Con adeguati equilibri molecolari tra diversi ossidi, sia la resistenza che la stabilità chimica possono essere ottimizzate.

Nel lavoro di Bernardo et al. [108] del 2017 è stato studiato il comportamento reologico di un miscuglio attivato contenente il 65 wt% di vetro soda-lime, mantenuto a una temperatura di  $75^\circ C$  e analizzato ogni ora, le curve reologiche risultanti sono riportate in figura 3.5.2 :

Il miscuglio ottenuto tramite attivazione alcalina presenta caratteristiche reologiche di shear thinning, il suo comportamento può essere descritto dalla legge di Herschel–Bulkley:

$$\tau = \tau_0 + k\dot{\gamma}^n$$

dove  $\tau$  rappresenta lo shear stress,  $\dot{\gamma}$  lo shear rate,  $\tau_0$  lo yield stress,  $k$  l'indice di consistenza e  $n$  l'indice di flusso. Per  $n < 1$  il fluido risulta di tipo non newtoniano e pseudoplastico.

La sospensione, preparata dopo solo 3 ore di agitazione meccanica (prima della gelificazione) presenta un ciclo tixotropico stretto e bassa viscosità, entrambe interpretate come indicazioni di una buona dispersione delle particelle. Non appena inizia il processo di gelificazione, il ciclo tixotropico diviene gradualmente più grande e la viscosità aumenta; l'interazione tra i componenti della sospensione causa un incremento della viscosità, con una diminuzione dell'indice di flusso. Con un tempo di curing di solo 1 ora non è possibile ottenere una schiuma dalla struttura cellulare adeguata;

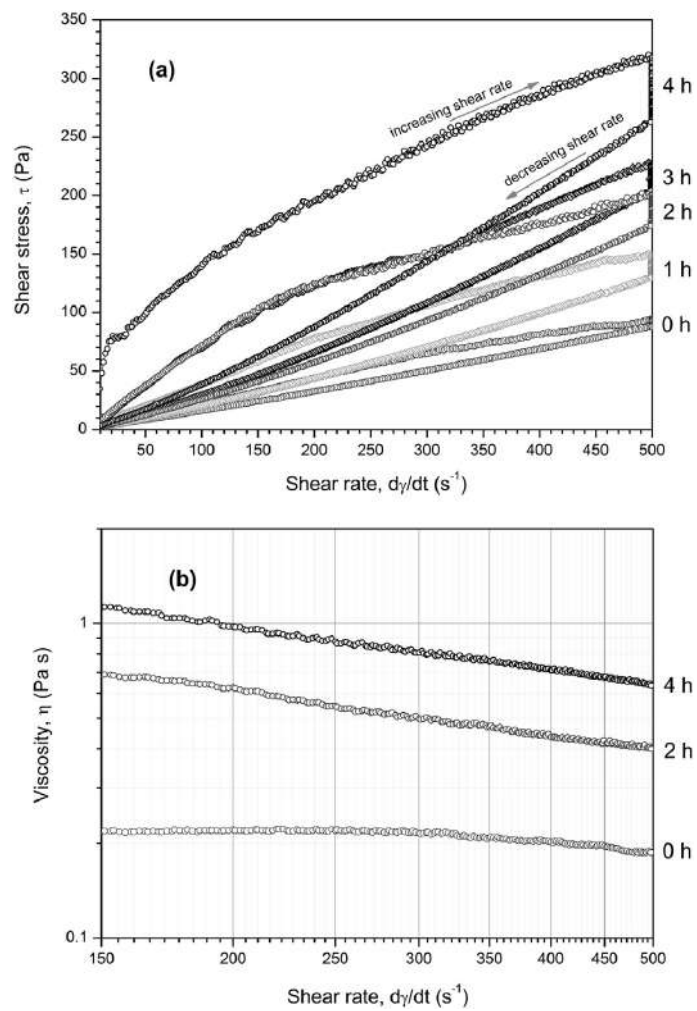


Figura 3.5.2: a) curve reologiche di sospensione 65 wt% di vetro soda-lime a diversi tempi di gelazione b) andamento della viscosità per tempi di curing selezionati [108]

le bolle d'aria introdotte tramite agitazione meccanica coalescono rapidamente e raggiungono la superficie. Al contrario, con un tempo di curing di almeno 2 ore, il passaggio dalla continua agitazione meccanica (elevato shear rate) a agitazione meccanica interrotta (shear rate uguale a zero), determina un aumento della viscosità che impedisce la coalescenza delle bolle. Questo comportamento risulta evidente osservando i profili della viscosità. Se si considera la viscosità ( $\eta$ ) come rapporto tra shear stress ( $\tau$ ) e shear rate ( $\dot{\gamma}$ ) si ottiene:

$$\eta = \frac{\tau}{\dot{\gamma}} = K\dot{\gamma}^{n-1}$$

che può essere riscritto come:

$$\text{Log}\eta = \text{Log}K + (n - 1)\text{Log}\dot{\gamma}$$

La linearità tra viscosità e velocità di taglio, in scala logaritmica, è confermato dalla stessa figura 3.5.2b. Possiamo notare la differenza tra la miscela subito dopo l'attivazione degli alcali (praticamente a fluido newtoniano, con  $1 - n \approx 0$ , cioè  $n \approx 1$ , corrispondente a un quasi linea orizzontale) e dopo 2 ore di curing ( $n - 1 \approx -0,4$ , cioè  $n \approx 0,6$ ). Dopo una stagionatura prolungata, la miscela corrisponde effettivamente, ad un fluido pseudoplastico di Bingham: dal momento che il'interazione tra i gel formati sulla superficie di particelle di vetro è particolarmente intenso, lo shear rate può aumentare solo dopo che lo shear stress ha superato una soglia ("yield stress") di circa 50 Pa. Con lo sforzo di taglio al di sopra di questa soglia, la diminuzione della viscosità con aumento della velocità di taglio è simile a quello per un tempo di curing di 2 ore (La figura 3.5.2b in realtà si riferisce ad un intervallo di valori di shear rate sopra lo yield stress).

### 3.5.2 Attivazione Ibrida

L'attivazione Alcalina è un processo molto efficace per formare di una fase legante inorganica, tuttavia il surplus di ossidi alcalini portati dal NaOH può portare a una modifica della composizione con ripercussioni nell'attività biologica dello scaffold e nel suo comportamento nella cristallizzazione. Come spiegato in precedenza, la cristallizzazione, negli scaffold di biovetro riduce la capacità degli osteoblasti di aderire alla superficie dello scaffold e quindi allo scaffold di integrarsi in vivo e rigenerare il tessuto osseo [139]. E' stato inoltre osservato inoltre che l'attivazione alcalina nei biovetri può portare a spostare e allargare il picco esotermico di cristallizzazione verso temperature più basse [49].

La soluzione potrebbe arrivare dall'attivazione ibrida [47] dove si utilizza il concetto di gelazione del vetro per inclusione in una soluzione basica, ma senza modificarne la composizione tramite



l'utilizzo di Sali di Ammonio:

- Tetra metil ammonio idrossido (TMAH)
- Tetra etil ammonio idrossido (TEAOH)

Tra i due composti si preferisce il tetra etil ammonio idrossido, perche non presenta tossicità, caratteristica invece del tetra metil ammonio idrossido <sup>1</sup>.

### 3.5.3 Schiumaggio

Nella produzione di scaffold con il metodo del gel casting la schiumatura diretta viene effettuata con l'aiuto di un surfattante che funge da agente schiumante. Un surfattante, presente in minori concentrazione riduce la tensione superficiale di un liquido o aumenta la sua stabilità colloidale inibendo la coalescenza delle bolle [90]. In questa tesi il surfattante utilizzato è di tipo non ionico, tramite un agitazione vigorosa della miscela (2000 rpm) si possono introdurre delle bolle d'aria. Il surfattante è composto da una testa idrofilica e una coda idrofobica e per formare le bolle d'aria creerà delle micelle disponendosi come in figura:

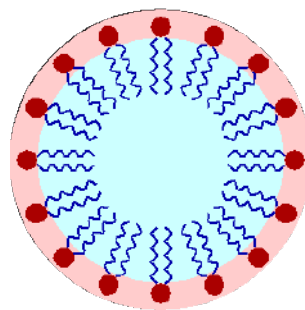


Figura 3.5.3: surfattante non ionico

Il comportamento reologico che cambia con il tempo di curing dopo l'iniziale agitazione della miscela può essere visto come un parametro per regolare la dimensione della porosità nella microstruttura delle schiume. Sempre dal lavoro di Sernardo et al. è possibile osservare l'effetto di uno schiumaggio a diversi tempi di curing: la viscosità aumentata riduce infatti la coalescenza delle bolle d'aria, come è possibile osservare nella seguente figura:

---

<sup>1</sup>si noti che il materiale puro è tossico, mentre il prodotto, come ottenuto e cioè in soluzione 1M non presenta particolari rischi, per eliminare ogni dubbio si sceglie il TEOH.

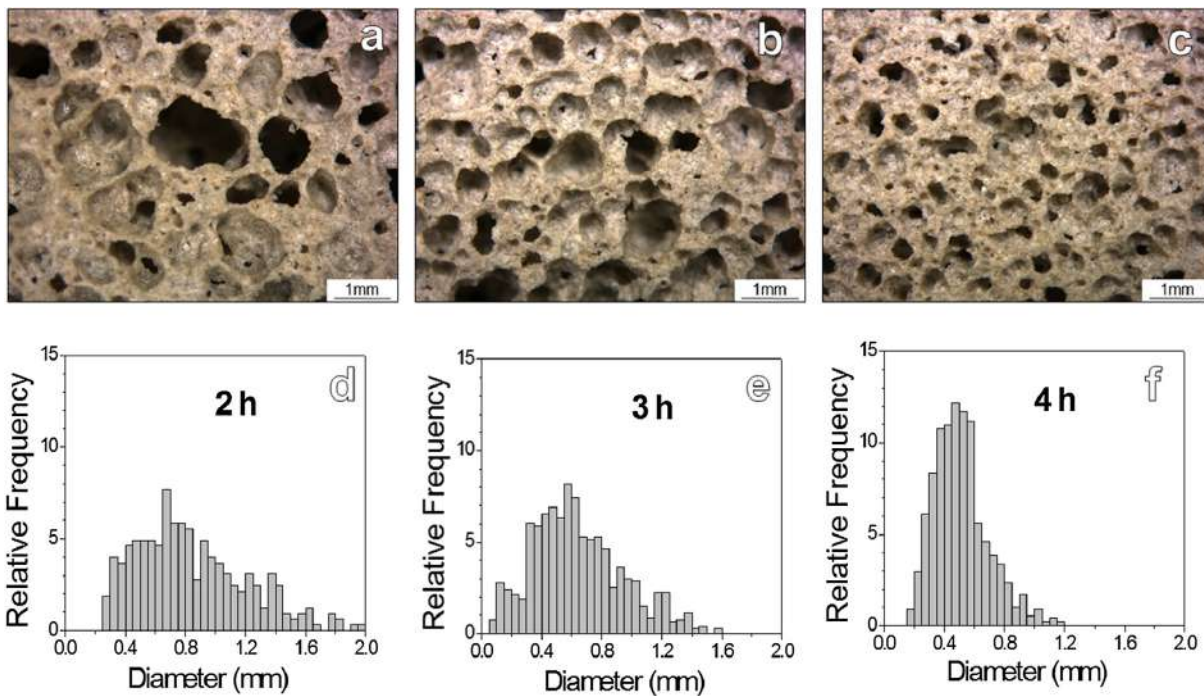


Figura 3.5.4: dettagli della microstruttura e distribuzione della dimensione dei pori dopo diversi tempi di curing [108]

### 3.5.4 Sinterizzazione

La sinterizzazione svolge un ruolo fondamentale nel gel casting, permette infatti di consolidare la microstruttura e rendere lo scaffold rigido e resistente. La sinterizzazione tuttavia porta flusso viscoso, il flusso viscoso potrebbe compromettere la struttura porosa, distruggendo i pori, occludendoli o cristallizzando parte del materiale vetroso, nelle applicazioni dove si desidera avere uno scaffold completamente amorfo. La temperatura di sinterizzazione deve quindi essere valutata per ciascun materiale in base alle analisi termiche, deve essere una temperatura superiore alla temperatura di transizione vetrosa  $T_g$  ma inferiore a quella di cristallizzazione  $T_x$  in modo da trattare termicamente lo scaffold senza andare in contro a fenomeni di cristallizzazione. [11]

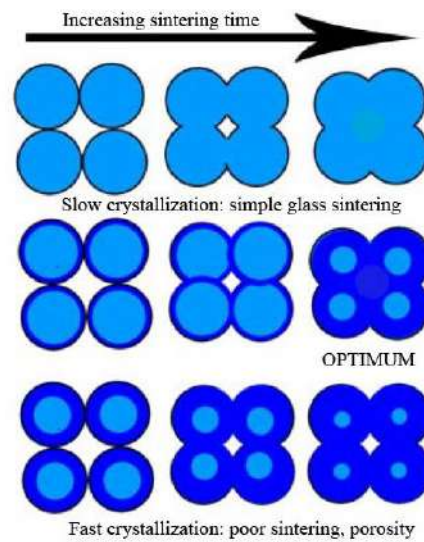


Figura 3.5.5: Sinterizzazione in usso viscoso con equilibrio o prevalenza di fenomeni di cristallizzazione o densificazione

Il trattamento termico ha un altro ruolo importante nel processo, che è quello di provocare il burn-out e l'evaporazione dei componenti organici portati dal tensioattivo utilizzato, sarà quindi necessario aggiungere uno o più step all'interno del trattamento termico, a basse temperature, molto inferiori a  $T_g$ . [11]



# Capitolo 4

## MATERIALI E METODI

### 4.1 Metodo di preparazione

Le polveri bioceramiche sono introdotte in una soluzione acquosa basica. Le polveri sono poi sottoposte a attacco alcalino per 3h e opzionale periodo di curing (generalmente da 1h a 2h a tappo chiuso a 40°C) per conferire una corretta reologia all'impasto. Dopodichè l'impasto viene schiumato aggiungendo alla miscela il 4% in peso di TRITON X-100. Si procede alla solidificazione della schiuma a 40° e tappo aperto per 24h e la successiva sinterizzazione per ottenere lo scaffold bioceramico.

Il processo è riassunto nella seguente tabella di flusso.

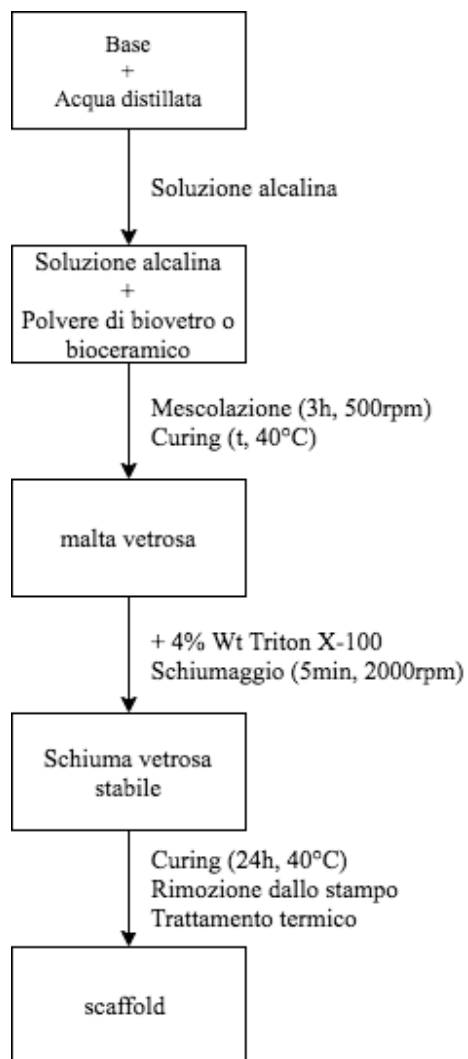


Figura 4.1.1: tabella di flusso per processo gel-casting

## 4.2 Materiali utilizzati

### 4.2.1 Bioceramici e Biovetri

Tutte le bioceramiche utilizzate sono state utilizzate dopo essere state polverizzate con granulometrie  $<75 \mu m$ .

#### 4.2.1.1 47.5 B

Il vetro 47.5B è un biovetro silicatico di composizione  $47.5\text{wt}\% \text{SiO}_2 - 10\text{wt}\% \text{Na}_2\text{O} - 10\text{wt}\% \text{K}_2\text{O} - 10\text{wt}\% \text{MgO} - 20\text{wt}\% \text{CaO} - 2.5\text{wt}\% \text{P}_2\text{O}_5$ .

Questo biovetro è stato sviluppato da Verné et al. per venire in contro a quello che è uno dei più grandi svantaggi del vetro 45S5, cioè la scarsa lavorabilità: la temperatura di transizione vetrosa ( $T_g$ ) e la temperatura di inizio cristallizzazione ( $T_x$ ) sono infatti molto vicine nel 45S5, in questo modo è impossibile raggiungere la completa sinterizzazione senza devetrificare il materiale. Il vetro 47.5B offre una finestra di sinterizzazione più ampia: ( $T_x - T_g = 260^\circ\text{C}$ ) che permette di avere un materiale adatto alla produzione di scaffold Amorfi [53].

Uno studio comparativo tra vetroceramica derivata da CEL2 e 45S5 ha tuttavia dimostrato che la cinetica di formazione dell'apatite del primo è più veloce, portando a uno strato superficiale più spesso di idrossiapatite [106].

#### 4.2.1.2 WDP - WDE

I bioceramici WD (wollastonite  $\text{CaSiO}_3$  - diopside  $\text{CaMgSi}_2\text{O}_6$ ) utilizzati nelle prove sono il WDP e il WDE, entrambi appartengono al sistema  $\text{CaO} - \text{MgO} - \text{SiO}_2$ . Il Vetro WDP ha un rapporto molare  $\text{CaO} : \text{MgO} : \text{SiO}_2$  di  $2 : 1 : 3$ , che in linea teorica porta a una composizione del 50 mol% wollastonite e 50 mol% diopside, piccole quantità di  $\text{Na}_2\text{O}$  e  $\text{P}_2\text{O}_5$  sono state aggiunte per ridurre la temperatura di liquidus. Il vetro WDE contiene invece solo gli ossidi principali, le cui proporzioni sono state corrette a quelle dell'eutettico Wollastonite-Diopside, come risultato si ottengono un rapporto  $\text{CaO} : \text{MgO} : \text{SiO}_2$  di  $2 : 0.96 : 0.96$ ; e concentrazioni del 52 mol% Wollastonite e 48 mol% diopside.[49]

#### 4.2.1.3 SC45

Il bioceramico SC45 è una vetro-ceramica ferrimagnetica con composizione: 24.7 SiO<sub>2</sub>, 13.5 Na<sub>2</sub>O, 13.5 CaO, 3.3 P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, 14 FeO and 31 Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (wt%) sviluppata da Bretcanu et al. [22] per produrre scaffold per applicazioni di ipertermia.

#### 4.2.1.4 UBE-SN10 e Yantai Tomley TM-B

UBE-SN10 e Yantai Tomley TM-B sono due polveri ad alta purezza di  $\text{Si}_3\text{N}_4$  provenienti da due diversi produttori. Sono state mescolate in rapporto 70 wt%  $\text{Si}_3\text{N}_4$  e 30 wt%  $\text{CaSiO}_3$ , per poter eseguire il metodo del gel casting.

## 4.2.2 Basi

### 4.2.2.1 Idrossido di sodio

NaOH di ACS Reagent grade, Honeywell-Fluka utilizzato in soluzioni in acqua distillata 1.0 M e 2.5M

### 4.2.2.2 Tetraetilammonio idrossido

$(C_2H_5)_4N(OH)$  in soluzione acquosa 1.0 M, Sigma-Aldrich

## 4.2.3 Tensioattivi

### 4.2.3.1 Triton X-100

Poliossietilene octil fenil etere  $C_{14}H_{22}O(C_2H_4O)_n$ ,  $n = 9 - 10$ , Sigma-Aldrich, Gillingham, UK, è un comune surfattante non ionico utilizzato spesso in applicazioni biochimiche.

## 4.3 Metodi di analisi

### 4.3.1 Misure di densità e Porosità

La densità geometrica  $\mu_{geom}$ , come già accennato in precedenza, è il rapporto tra la massa  $m$  di un materiale e il suo volume geometrico esterno  $V_{geom}$ . Per un provino di forma cubica il volume esterno può essere determinato semplicemente misurandone le tre dimensioni spaziali (lunghezza, larghezza, altezza) e moltiplicandole tra loro.

Se dal volume geometrico viene sottratto quello non occupato dal materiale nelle porosità aperte si ottiene il volume apparente  $V_{app}$ . Dividendo la massa per questo volume si ottiene la densità apparente  $\mu_{app}$ . Questa densità è stata misurata utilizzando un picnometro ad elio (AccuPyc1330, Micromeritics, Nacross, GA) che sfrutta l'infiltrazione di un gas inerte all'interno delle porosità aperte. Questa tecnica si basa sul cambiamento di pressione che una stessa quantità di gas effettua quando riempie a temperatura costante due spazi differenti. Il campione viene innanzitutto sigillato in un compartimento dello strumento (camera del campione) con volume  $V_1$  noto, dove viene fatta successivamente entrare una certa quantità di gas inerte (elio) fino al raggiungimento dell'equilibrio (diffusione completa del gas all'interno del campione). In seguito la pressione  $P_1$  viene misurata e il gas viene fatto espandere in un'altra camera (camera di riferimento) sempre di volume conosciu-



to  $V_2$ . Al raggiungimento dell'equilibrio la pressione  $P_2$  viene misurata nuovamente e le camere vengono svuotate [2, 1].

$V_{app}$ , calcolato direttamente dallo strumento, è dato da:

$$V_{app} = V_1 + \frac{V_2}{1 - P_1/P_2}$$

Si noti che, poiché vale  $P_1 > P_2$ , il secondo termine della somma è sempre negativo.

Il picnometro è uno strumento molto usato per il fatto che fornisce una misura abbastanza rapida e accurata con un metodo di tipo non distruttivo [1,2].

La densità assoluta del materiale  $\rho_{bulk}$  (eliminando il contributo al volume dato da ogni tipo di porosità) è stata misurata inserendo sempre all'interno del picnometro le polveri macinate del campione (ottenute al termine delle prove distruttive). La differenza tra le tre densità è schematizzata in Figura:

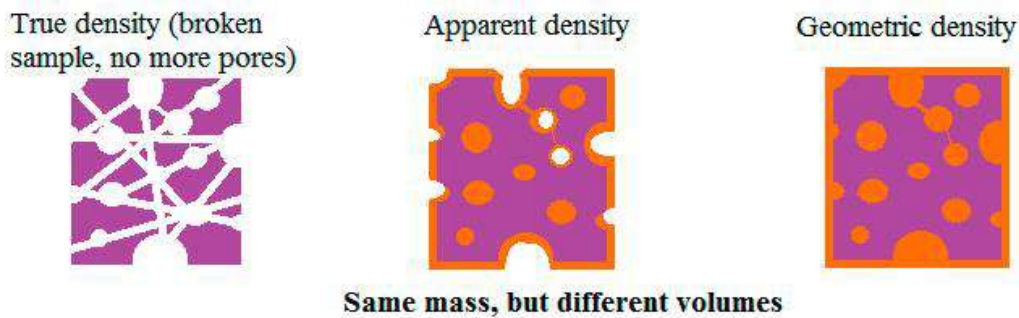


Figura 4.3.1: Rappresentazione schematica della differenza tra densità geometrica, apparente e assoluta: in viola il volume della sola fase solida, in arancione il volume aggiuntivo considerato nella determinazione di densità apparente e geometrica.

Misurati i valori delle densità è possibile calcolare la frazione di porosità. Come già indicato in precedenza, la porosità totale  $f_{PT}$  viene calcolata con la relazione di cui sopra. Le porosità  $f_{PA}$  e  $f_{PC}$  sono invece calcolate come:

$$f_{PA} = 1 - \frac{\rho_{geom}}{\rho_{app}}$$

$$f_{PC} = f_{PT} - f_{PA} = \rho_{geom} \left( \frac{1}{\rho_{app}} + \frac{1}{\rho_{bulk}} \right)$$

### 4.3.2 Prove di resistenza a compressione

La resistenza a compressione delle schiume viene misurata inserendo i provini in una pressa (Instron 1121) che li comprime con una velocità prestabilita (1 mm/min da normativa) e registra la forza che il campione oppone alla cella di carico. Le curve forza/tempo che si ottengono inserendo i dati in un grafico possono essere trasformate in curve sforzo/deformazione moltiplicando il tempo per la velocità di discesa della cella di carico e dividendo la forza per l'area di contatto del campione con la pressa.

### 4.3.3 Microscopia ottica

La superficie dei campioni sia di verde che di cotto è stata sottoposta ad analisi al microscopio ottico (ZEISS Stemi 2000-C con fotocamera AxioCam ERc 5s), che sfrutta la riflessione della luce sul campione raccolta poi da un sistema di lenti che ingrandiscono l'immagine. Gli ingrandimenti utilizzati sono  $0.5 \times 1.6$ ,  $1 \times 1.6$ ,  $2 \times 1.6$  e  $4 \times 1.6$ , per l'analisi delle immagini è stato utilizzato il software open source ImageJ.

### 4.3.4 XRD (X-Ray Diffraction)

La diffrattometria dei raggi X è una tecnica di caratterizzazione utilizzata per identificare la struttura delle fasi cristalline di cui è composto un materiale. I raggi X sono onde elettromagnetiche della stessa natura della luce che possiedono una lunghezza d'onda compresa tra 0.05 e 0.25 nm e alta energia. Quando la radiazione interagisce con la materia e la sua lunghezza d'onda è dell'ordine delle distanze interatomiche della fase cristallina, allora si hanno fenomeni di diffrazione, ovvero di combinazione tra riflessione e interferenza della radiazione. Ciò accade perché quando un raggio interagisce con la superficie del materiale, può essere riflesso sia dal piano superficiale, sia da quelli sottostanti. Pertanto le onde riflesse (che hanno stessa lunghezza d'onda ma cammini differenti) si possono trovare in fase tra di loro e quindi dar luogo a interferenza costruttiva (intensità maggiore) oppure fuori fase e dar luogo a interferenza distruttiva (intensità diminuisce). L'intensità dell'onda diffratta dipende quindi dalle distanze tra i piani cristallini  $d$ , dall'angolo di incidenza della radiazione e dalla lunghezza d'onda della radiazione. Le grandezze sono legate dalla legge di Bragg, rappresentata in Figura:

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

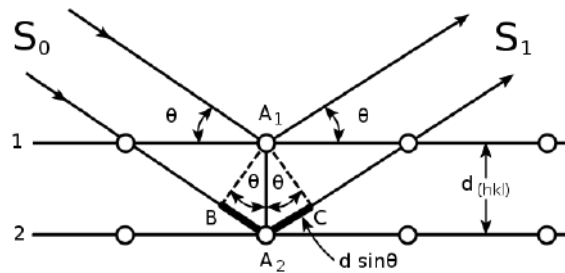


Figura 4.3.2: Rappresentazione grafica del fenomeno della diffrazione e della legge di Bragg.

dove  $n$  indica l'ordine di diffrazione, tipicamente solo quello per  $n = 1$  è apprezzabile con XRD. Dalla legge di Bragg, nota  $\lambda$  si può ricavare il valore di  $d$  per ciascun valore di  $\sin(\theta)$  al quale corrisponda un'intensità diversa dal rumore di fondo. I picchi presenti nei diffrattogrammi vengono identificati confrontando i valori di  $d$  misurati con quelli riportati per le sostanze cristalline in tabelle di riferimento. L'altezza dei picchi è funzione del numero di situazioni reticolari che producono interferenza costruttiva ad un dato angolo: dall'intensità si risale alla disposizione spaziale degli atomi nella cella, mentre  $d$  dà informazioni sulla geometria reticolare. I nuclei non partecipano ai fenomeni di diffrazione, ma la loro posizione risulta chiaramente definita ed è localizzata nel punto massimo della densità elettronica.

L'apparecchiatura utilizzata per la diffrattometria (Bruker D8 Advance) è composta principalmente da tre componenti posti all'interno di una camera schermata:

- Sorgente: è un tubo radiogeno con un'ampolla di vetro sotto alto vuoto contenente un catodo a lamento di tungsteno ed un anodo costituito solitamente da un blocco di rame. Il catodo, arroventato all'incandescenza da una corrente elettrica, emette elettroni per effetto termionico, i quali, accelerati da una differenza di potenziale, colpiscono l'anodo metallico (target), provocando l'emissione dei raggi X.
- Porta campione: è una piastra quadrata di alluminio con un incavo nel quale viene alloggiato uno strato di polvere livellata del materiale da studiare.
- Rivelatore: è costituito da una camera di ionizzazione, dove l'interazione tra i raggi X con un gas produce ioni che vengono accelerati fra elettrodi con una differenza di potenziale costante, producendo una corrente che è funzione dell'intensità dei raggi X.

Sorgente e rivelatore sono montati su un goniometro e ruotano simultaneamente con lo stesso incremento angolare rispetto all'orizzonte mentre il campione rimane fermo al centro.

Per il confronto dei picchi con quelli presenti nel database e l'identificazione delle fasi cristalline è stato utilizzato il software Match!.

### 4.3.5 FTIR (Fourier Transform Infrared Spectroscopy)

Questa tecnica di analisi si basa sulla variazione delle vibrazioni dei legami chimici in seguito all'assorbimento di radiazione infrarossa con lunghezze d'onda comprese tra  $0.78$  e  $100 \mu m$  quando la radiazione ha energia uguale o multipla di quella del legame. Affinché la radiazione IR venga assorbita deve modificare il momento di dipolo della molecola. La vibrazione dei legami chimici può essere di diversi tipi, mostrati in Figura:

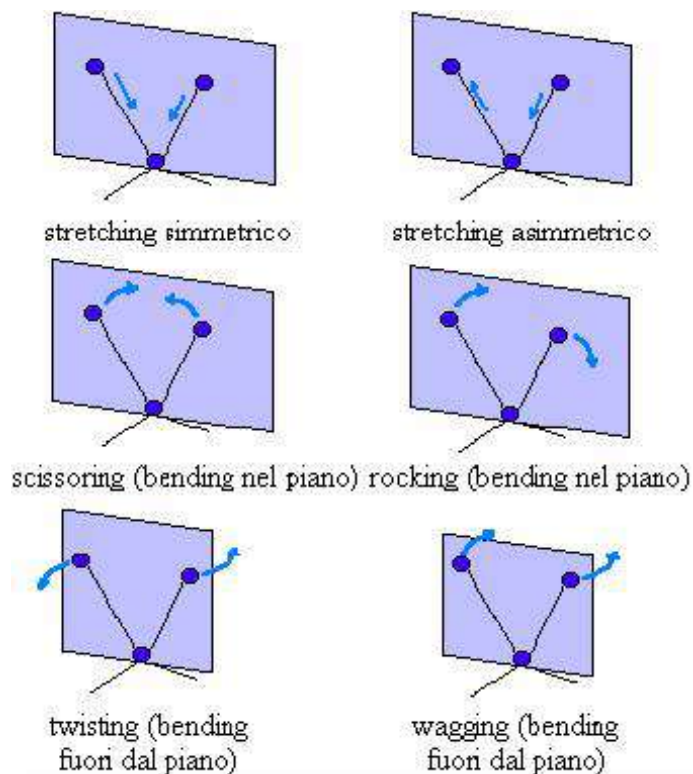


Figura 4.3.3: Rappresentazione dei diversi tipi di vibrazione dei legami chimici.

Uno spettrofotometro in trasformata di Fourier sfrutta un dispositivo meccanico chiamato interferometro di Michelson formato da tre specchi: uno centrale semitrasparente, uno fisso e uno mobile. La radiazione policromatica emessa dalla sorgente arriva allo specchio semitrasparente, dove viene divisa in due parti: una va allo specchio fisso e l'altra allo specchio mobile, che si muove avanti e indietro a velocità costante. Quando le due radiazioni riesse si riuniscono avvengono fenomeni di interferenza costruttiva o distruttiva, avendo percorso cammini ottici diversi. Poiché la posizione dello specchio mobile, e quindi il cammino ottico di una delle radiazioni, varia nel tempo, varieranno nel tempo anche l'interferenza fra le radiazioni e la trasmittanza del campione. Il grafico che riporta la trasmittanza del campione in funzione del tempo si chiama interferogramma,

ma poiché esso è di difficile interpretazione si ricorre ad un operatore matematico (trasformata di Fourier) che lo trasforma in spettro. Un solido che non possiede legami covalenti sarà trasparente alla radiazione infrarossa, pertanto il campione viene spesso preparato comprimendo in pastiglie la polvere mescolata assieme a KBr (solido ionico). Nel caso in esame dall'interpretazione dello spettro è possibile identificare la formazione di CSH nel verde.



# Capitolo 5

## RISULTATI E DISCUSSIONE

Tutti i materiali ceramici elencati nel capitolo precedente sono sottoposti al metodo del Gel-casting. Ogni materiale presenta diverse caratteristiche secondo le quali i parametri del processo produttivo devono essere adattati, quali percentuale di solido nella malta vetrosa, tempo di curing pre schiumaggio e temperatura di sinterizzazione. Lo schema del processo mostrato in 4.1.1 sarà quindi applicato a ogni punto con le opportune condizioni.

Le prove e le analisi effettuate sono volte a esplorare tre punti fondamentali:

1. E' possibile applicare il metodo del gel casting inorganico a sistemi contenenti biovetri quali il 47.5b?
2. E' possibile inserire un'attivazione ibrida al processo, in modo da non modificare la composizione chimica della fase attivata e del materiale originario?
3. E' possibile applicare il metodo del gel casting su materiali diversi dal biovetro, in particolare su bioceramici a base di ossido di ferro (SC45) e nitrato di silicio (UBE-SN10 e Yantai Tomley TM-B)?

Nei paragrafi successivi verranno analizzati singolarmente i materiali a disposizione.

### 5.1 Biovetro 47.5b

#### 5.1.1 Gel Casting Inorganico

Il primo materiale analizzato è il biovetro 47.5b, materiale già spesso utilizzato per scaffold e testato, con il metodo del robocasting, nei lavori di Baines et al. [10, 11]. Questo materiale, in confronto al biovetro 45s5 sviluppato da Hench [63] possiede un'ampia finestra di sinterizzazione, la

Thermal Analysis Used	Characteristic Temperature	Temperature (°C)
DSC (thermal properties)	$T_g$	547
	$T_x$	760
	$T_c$	806
	$T_m$	1004
HSM (viscous behavior)	$T_{FS}$	585
	$T_B$	800
	$T_{FP}$	1050

Figura 5.1.1: Temperature di transizione per biovetro 47.5b [11]

composizione modificata permette infatti di avere ( $T_x - T_g = 260^\circ C$ ). La Temperatura di sinterizzazione, per questo materiale è stata scelta di  $600^\circ C$ , sempre facendo riferimento al lavoro di Baino et al.

Una serie di prove sono state effettuate in modo da individuare la migliore combinazione di parametri per la percentuale di massa di solido (range: 60-70%) e il tempo di curing post attivazione / pre schiumaggio (range 0-2h). In generale, una percentuale di solido più alta produce uno scaffold dalla porosità più piccola e meno aperta; un tempo di curing troppo basso rende difficile uno schiumaggio adeguato, data la bassa viscosità della malta vetrosa. La viscosità della miscela infatti, aumenta principalmente durante il curing. I risultati migliori sono stati ottenuti con il 60% di contenuto solido in miscela e con 2h di curing, in un contenitore chiuso (per non perdere umidità), a  $40^\circ C$ .

Le immagini microscopiche in figura 5.1.2 successive mostrano la morfologia della schiuma vetrosa ottenuta alle condizioni di cui sopra.

La sinterizzazione è stata eseguita con trattamento termico a  $600^\circ C$  ( appena sopra  $T_g$  ma molto distante da  $T_x$  in modo da evitare cristallizzazione) con dwelling time di 1h, heating rate di  $1^\circ C/min$  e tre step a 200, 400, e  $500^\circ C$  in modo da favorire l'espulsione di tutta la frazione organica data dal tensioattivo. Le immagini al microscopio in figura 5.1.3 mostrano lo scaffold post sinterizzazione.

Come si può osservare, lo scaffold post sinterizzazione presenta una colorazione tendente al nero. L'identificazione della fase che porta questa colorazione è ancora in esame, si presume sia dovuta alla presenza di carbonio da pirolisi del surfattante, intrappolato all'interno del gel. A livello fisico e morfologico la presenza di questa fase non comporta particolari ripercussioni. L'effetto a livello biologico dovrà essere valutato ma non è oggetto di questa tesi, anche se sono presenti in



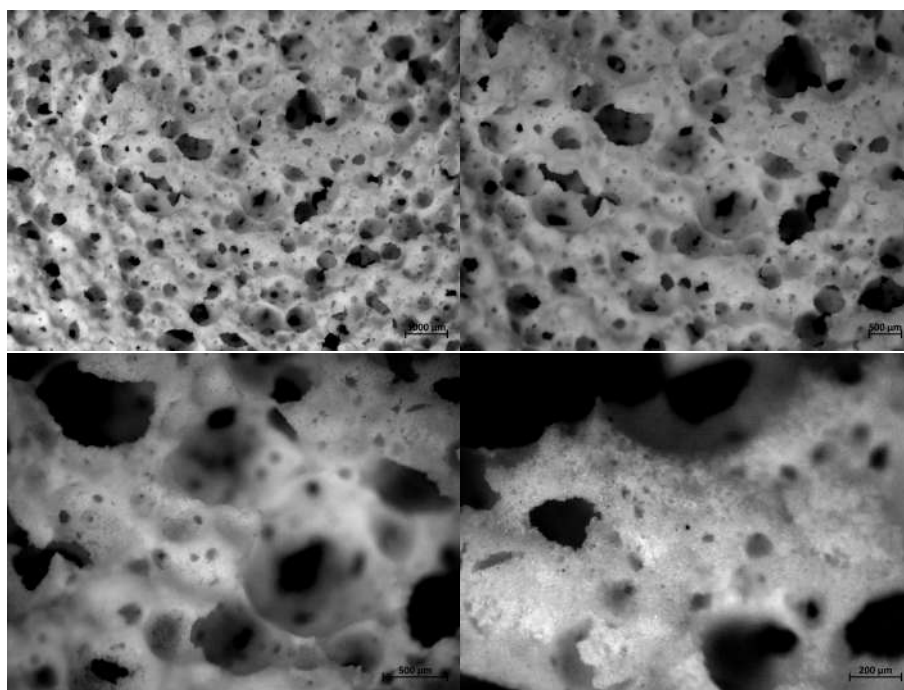


Figura 5.1.2: Immagini al microscopio ottico di scaffold ottenuto con Biovetro 47.5b, attivazione con NaOH, schiuma verde, pre sinterizzazione

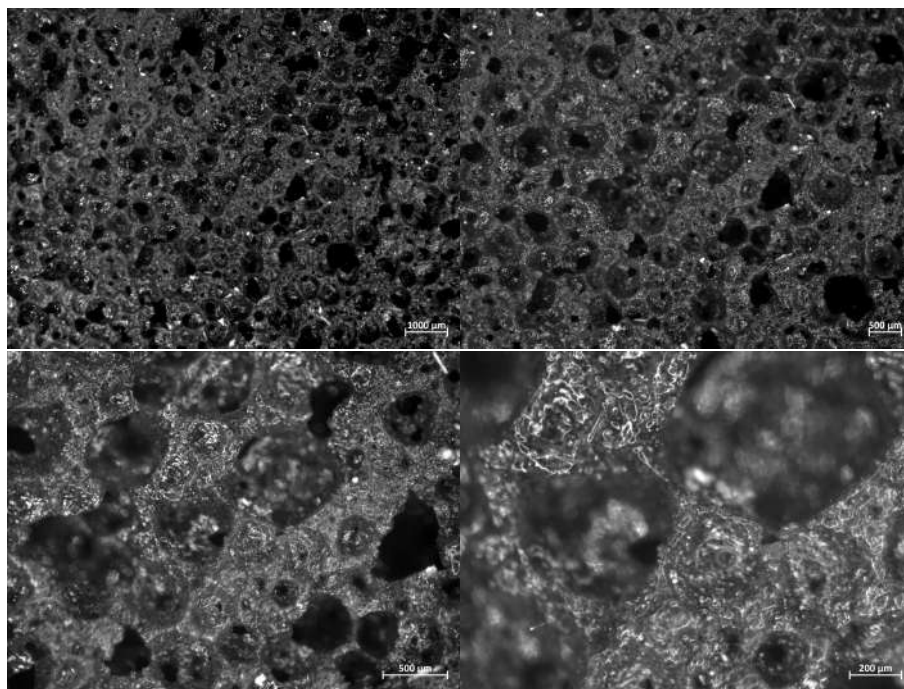


Figura 5.1.3: Immagini al microscopio ottico di scaffold ottenuto con Biovetro 47.5b, schiuma sinterizzata

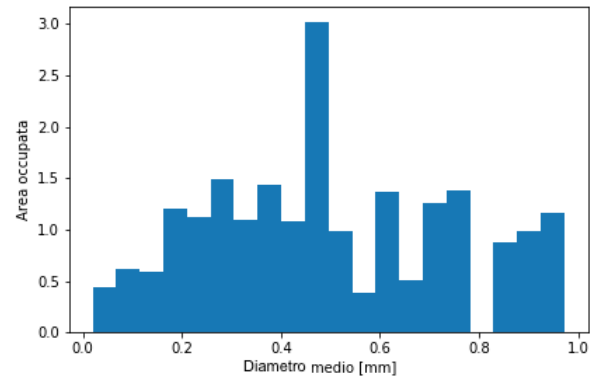
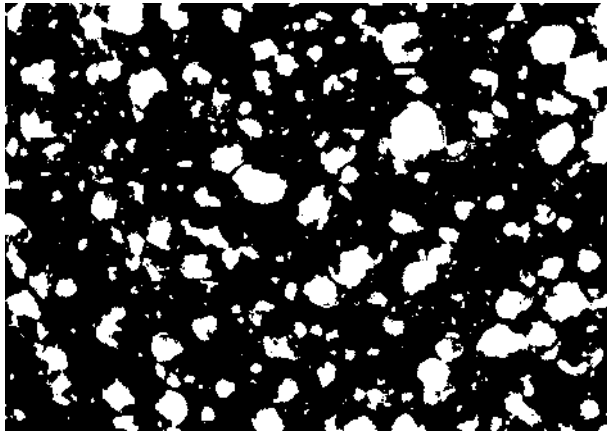


Figura 5.1.4: a sinistra, Immagine binarizzata dell'ingrandimento minore di figura 5.1.2, a destra, grafico della distribuzione della porosità normalizzata con l'area.

letteratura dei dati che mostrano come la presenza di carbonio pirolitico non sia un aspetto dannoso per la bioattività ma, al contrario, possa stimolare la compatibilità dello scaffold [36].

La struttura porosa è stata analizzata al picnometro e tramite un software di analisi di immagini 'ImageJ'. Il software aiuta a fornire una stima della dimensione dei macro-pori e delle interconnessioni, tramite la misura delle aree bianche in un'immagine binarizzata, in figura 5.1.4. La binarizzazione si ottiene aumentando il contrasto dell'immagine, degli strumenti nel software permettono di dividere la parte nera (pareti della schiuma) dalla parte bianca (pori), dopo che sia stato settato in modo adeguato a mano dell'operatore un threshold<sup>1</sup> che divide porosità da pareti. La distribuzione dei diametri della porosità è rappresentata poi, normalizzando la distribuzione dei raggi in base all'area. In questo modo, ogni barra rappresenta la frazione di area superficiale occupata da una certa dimensione dei pori.

Come si osserva dall'immagine 5.1.4, la distribuzione della porosità è ampia e presenta un massimo per i pori di diametro  $500\mu m$ , mantenendo però una buona quantità tra  $20\mu m$  e  $100\mu m$ , e di dimensioni superiori, che si avvicinano al millimetro.

L'analisi al picnometro ha riportato una porosità totale  $\phi_{tot} = 77\%$ , una porosità aperta  $\phi_{open} = 74,3\%$  e una porosità chiusa del  $\phi_{close} = 2,6\%$ .

<sup>1</sup>I treshold sono stati impostati in modo conservativo, considerando anche parte della porosità effettiva appartenente alla parete, tutte le misure effettuate con questo metodo forniscono quindi una stima della dimensione media dei pori inferiore a quella che si troverebbe utilizzando ad esempio la microtomografia. In questo modo si può avere un certo margine di sicurezza, affermando che i pori siano 'almeno' delle dimensioni indicate nei grafici.

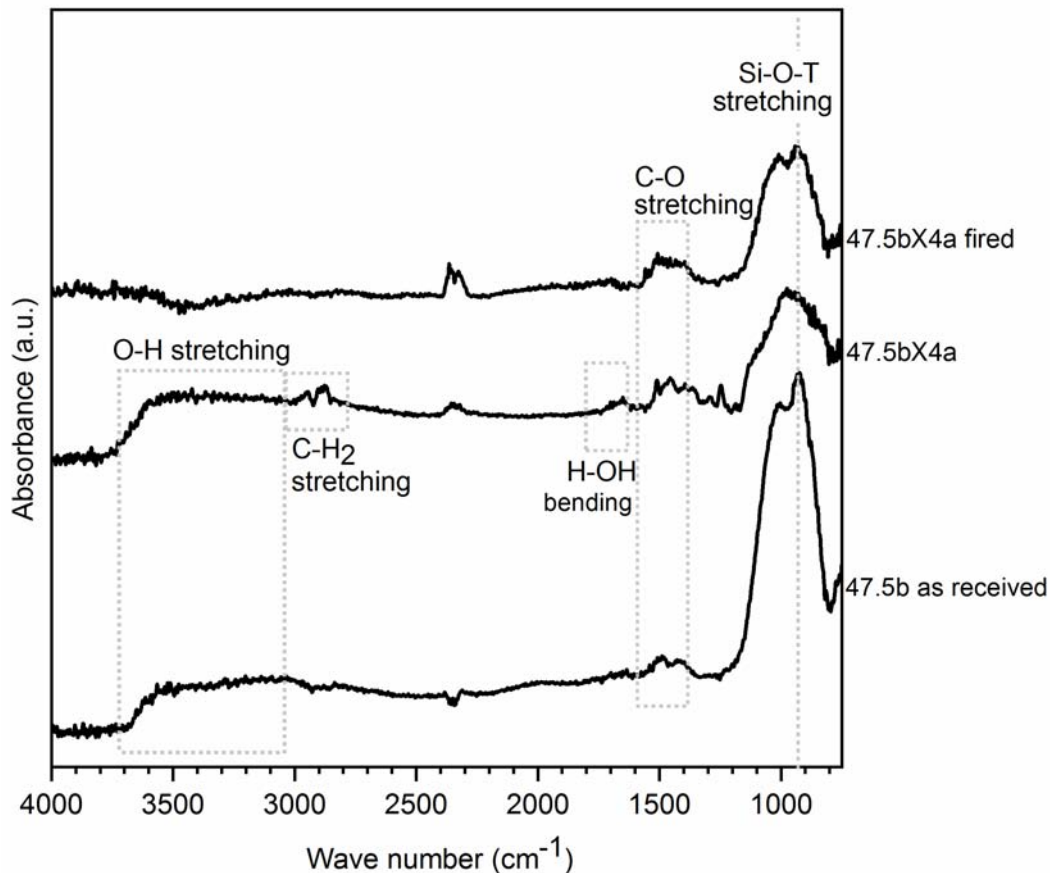


Figura 5.1.5: confronto tra spettri FTIR della schiuma a base di biovetro 47.5b, dall'alto in basso: post sinterizzazione (47.5bX4a fired), verde (47.5bX4a) e materiale originario come ricevuto (47.5b as received)

I dati ottenuti da queste prove, in accordo con i requisiti illustrati nel paragrafo 3.1 confermano che le qualità morfologiche ottenute in questo tipo di schiuma sono adatte per l'ottenimento di uno scaffold per l'ingegneria tissutale.

Come è possibile notare da quanto mostrato in figura 5.1.5, lo spettro FTIR mostra alcune bande presenti solo nella fase attivata (verde) e non nel sinterizzato e nel vetro di partenza; le bande presenti tra 3000-3700 e 1650  $\text{cm}^{-1}$  sono attribuibili all'idratazione del biovetro 47.5b (O-H stretching e bending), è presente un'indicazione del legame C-O, tra 1450 e 1500  $\text{cm}^{-1}$ , possibile contributo di carbonati formati nell'indurimento. Il surfattante è visibile nella banda a 2900  $\text{cm}^{-1}$ . I picchi che si trovano a numeri d'onda compresi tra 1050 e 950  $\text{cm}^{-1}$  sono dovuti ai legami degli ossigeni pontanti con gli atomi di silicio o di alluminio.

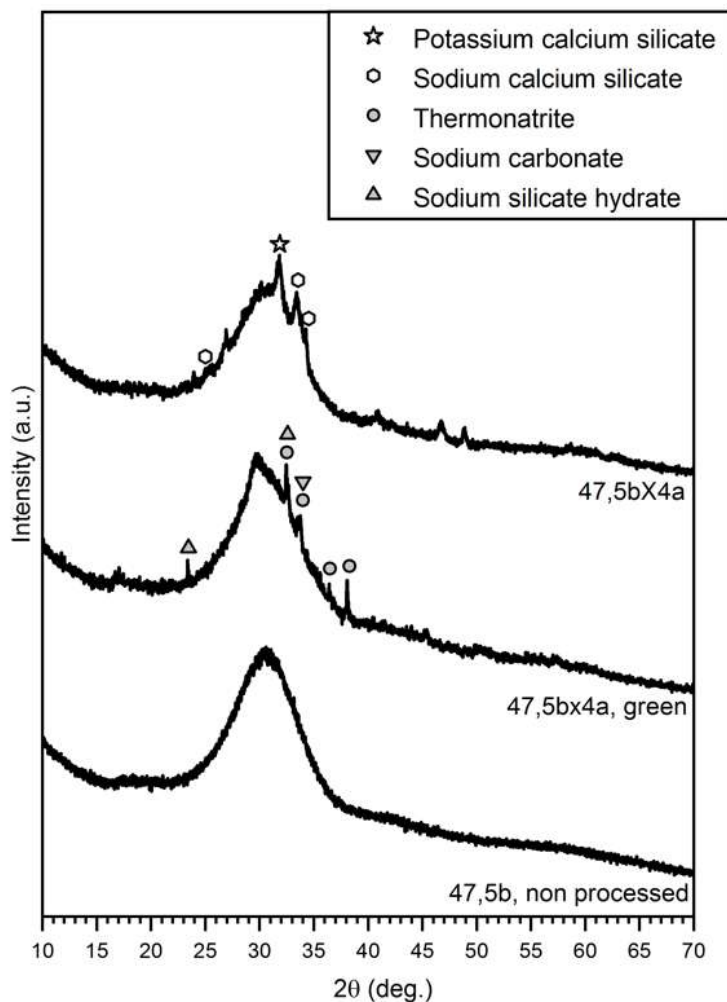


Figura 5.1.6: confronto tra spettri XRD della schiuma a base di biovetro 47.5b, dall'alto in basso: post sinterizzazione (47.5bX4a), verde (47.5bX4a, green) e materiale originario come ricevuto (47.5b non processed)

Nello spettro XRD in figura 5.1.6 si conferma che il vetro rimane quasi totalmente amorfo durante la sinterizzazione. Nel verde si osservano alcuni picchi di diversi composti contenenti sodio, possibile effetto dell'attivatore NaOH e la conferma della formazione di alcuni carbonati idrati.

### 5.1.2 Gel Casting - Attivazione Ibrida

Questo paragrafo mira a rispondere alla seconda questione presentata all'inizio di questo capitolo: è possibile inserire un'attivazione ibrida al processo, in modo da non modificare la composizione chimica della fase attivata e del materiale originario?

Per la produzione dello scaffold di biovetro 47.5b con TEAOH è stato utilizzato il processo identico a quello per l'attivazione alcalina, inizialmente però è chiaramente stata utilizzata una soluzione 1M di TEAOH. Le figure 5.1.7 e 5.1.8 mostrano le immagini al microscopio della schiuma verde e sinterizzata; come si può notare, la comparsa del colore nero nel sinterizzato è presente anche in questa composizione.

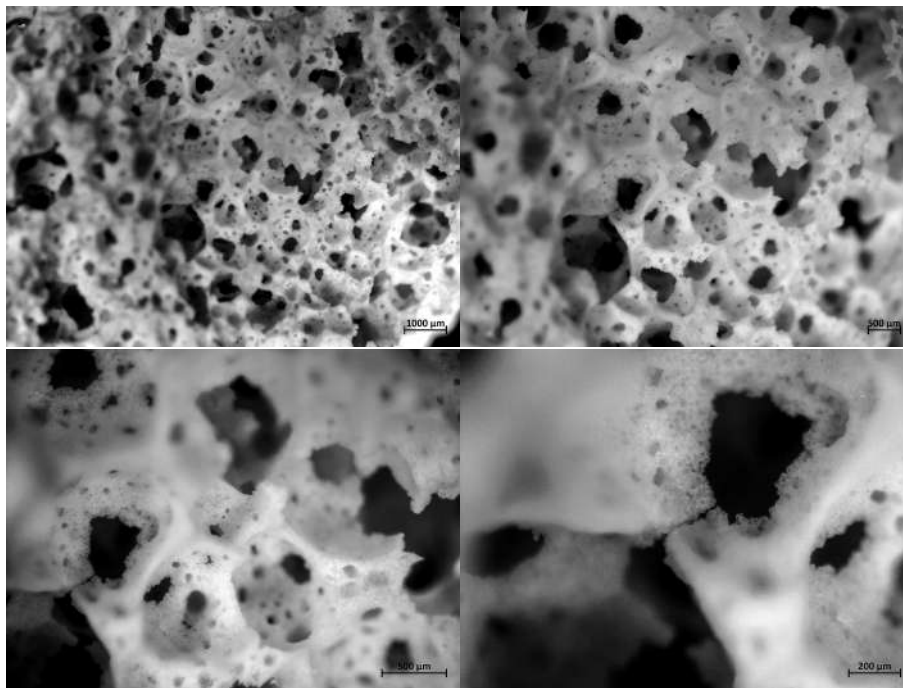


Figura 5.1.7: Immagini al microscopio ottico di scaffold ottenuto con Biovetro 47.5b tramite attivazione ibrida con TEAOH, schiuma verde, pre sinterizzazione

Come si può osservare poi in figura 5.1.9, l'analisi delle immagini riporta risultati molto simili alla schiuma prodotta con gel casting inorganico, confermando la fattibilità a livello morfologico della produzione di scaffold per l'ingegneria tissutale con entrambi i metodi.

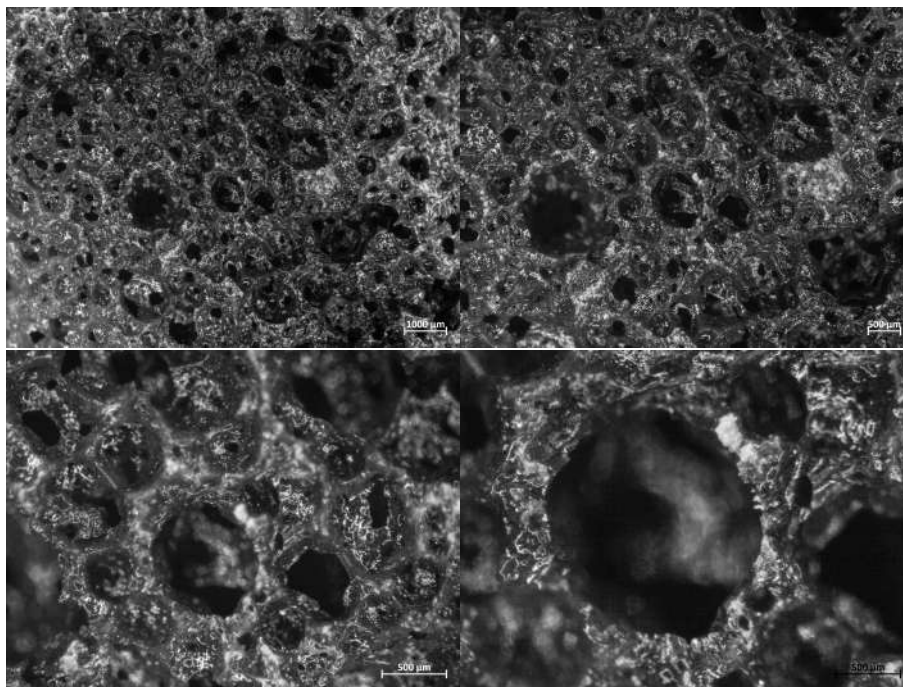


Figura 5.1.8: Immagini al microscopio ottico di scaffold ottenuto con Biovetro 47.5b tramite attivazione ibrida con TEAOH, schiuma sinterizzata

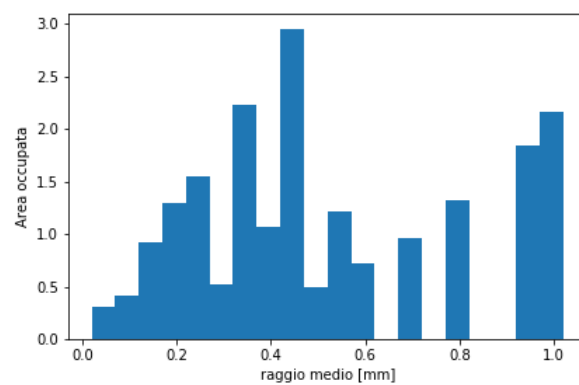
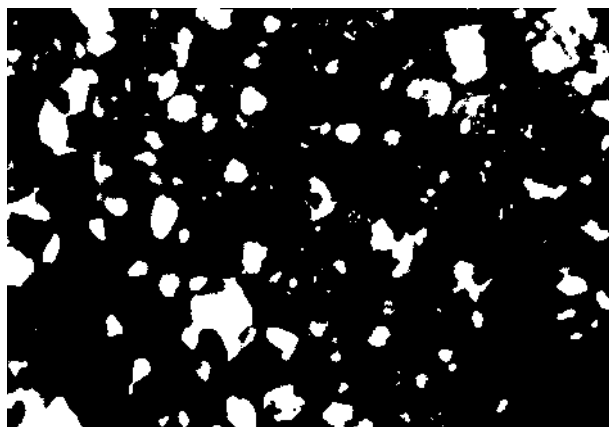


Figura 5.1.9: a sinistra, immagine binarizzata dell'ingrandimento minore di figura 5.1.7, a destra, grafico della distribuzione della porosità normalizzata con l'area.

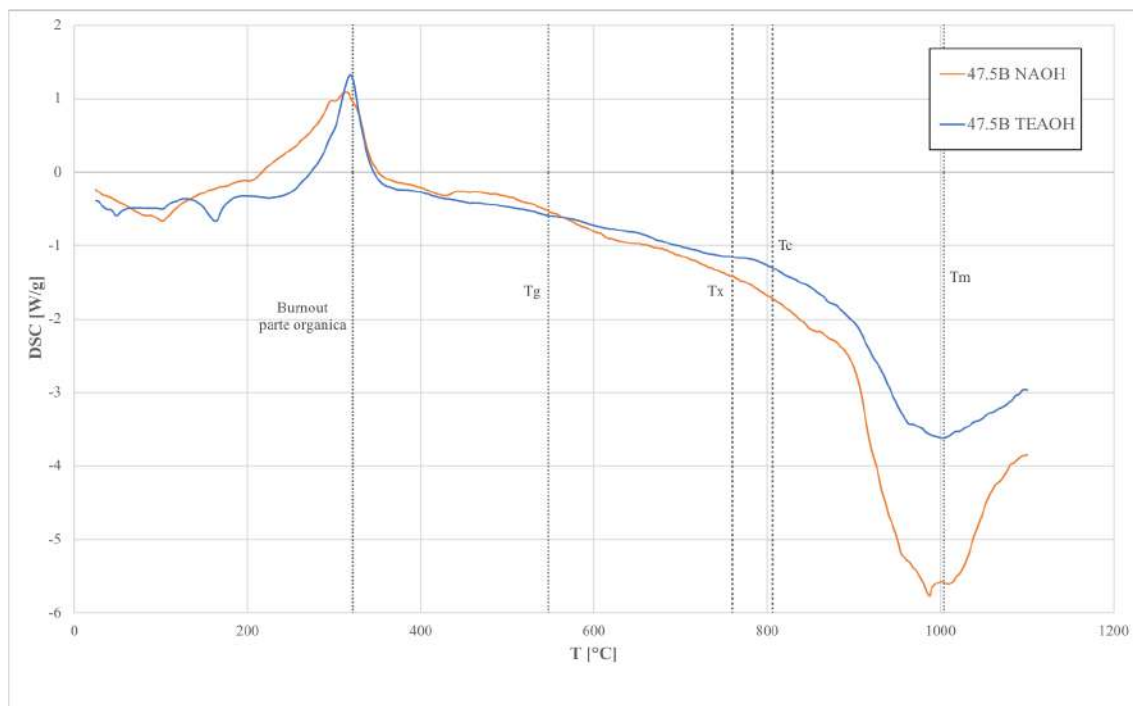


Figura 5.1.10: DSC delle schiume di vetro a base di 47.5B

Le figure 5.1.10 e 5.1.11, rispettivamente differential scanning calorimetry (DSC) e termogravimetria (TGA) confrontano le analisi termiche della schiuma verde di vetro 47.5b attivato con le due tecniche in esame.

Nella DSC non è stato possibile individuare chiaramente i picchi di cristallizzazione, le temperature segnalate provengono dalla letteratura (tabella 5.1.1).

I risultati più interessanti arrivano dalla TGA; si può notare che utilizzando TEAOH come attivatore non ci siano perdite di massa ad alte temperature. Le perdite di massa a basse temperature sono dovute al rilascio di acqua legata fisicamente e alla condensazione di gruppi silanici sulla superficie delle particelle di vetro. Mentre per quanto riguarda l'attivazione inorganica con NaOH le perdite ad alta temperatura possono essere dovute alla decomposizione di composti C-S-H che rilasciano vapore a temperatura maggiore di 500 gradi.

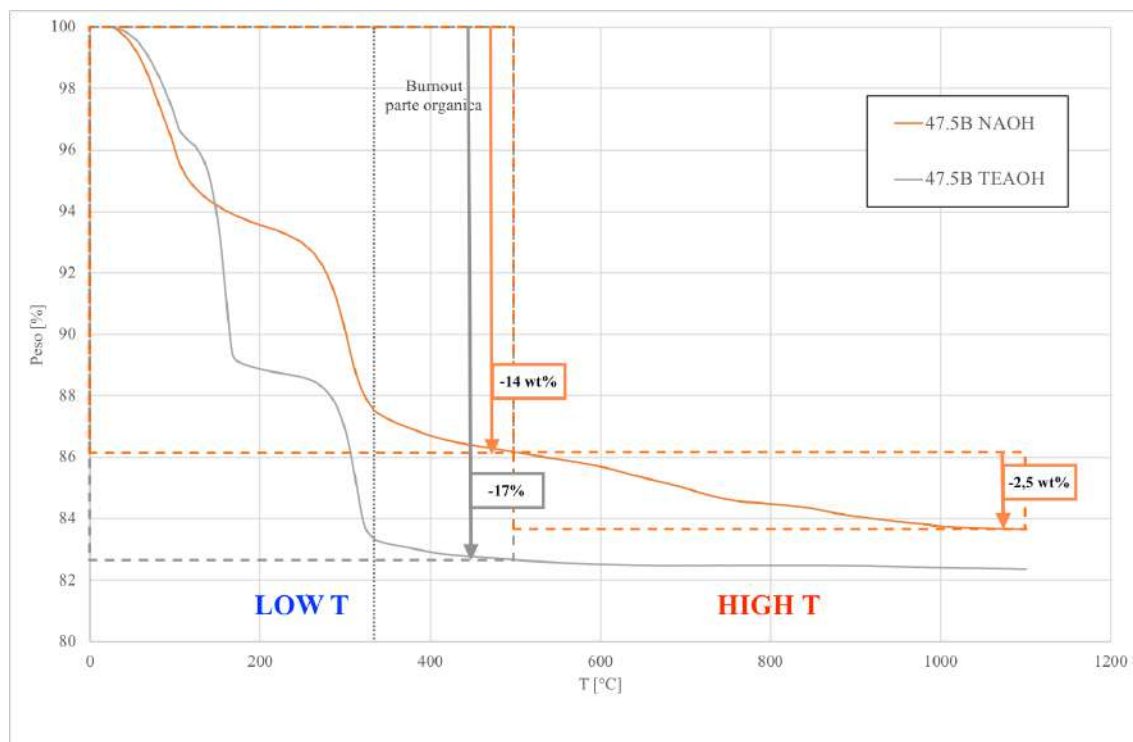


Figura 5.1.11: TGA delle schiume di vetro a base di 47.5B

L'ipotesi è che l'interazione tra gli ioni  $Ca^{2+}$  del ceramico e gli ioni  $Na^+$  dell'attivatore inorganico formi dei silicati o carbonati idrati diversi da quelli che si formano con i soli ossidi del vetro originario, contaminando la composizione del gel. La dissoluzione del TEAOH invece forma degli ioni che non interagiscono con gli ioni calcio del vetro lasciando invariata la composizione della fase attivata.



## 5.2 Biovetri WD

Due vetri del sistema  $CaO - MgO - SiO_2$  sono stati utilizzati per preparare delle schiume vetrose con il metodo del Gel Casting. I biovetri in questione sono stati precedentemente studiati nei lavori di Bernardo et al. [49, 52]. In questi lavori si è analizzata la preparazione di scaffold con il metodo del gel casting inorganico e con il Robocasting. L'obiettivo di questa tesi è quindi quello di produrre delle schiume vetrose con il metodo del gel casting, con attivazione ibrida, per verificarne la fattibilità, con le stesse ipotesi fatte nel paragrafo 5.1.2.

I parametri scelti per lo schema produttivo di figura 4.1.1 sono stati valutati in base ai dati presenti in letteratura; in particolare, come temperatura di sinterizzazione si è scelto  $800\text{ }^\circ\text{C}$ , che secondo il lavoro di Bernardo et al. consente di ottenere un sinterizzato completamente amorfo; Il dato è in accordo con le analisi termiche svolte sulle schiume verdi (figura 5.2.1). Come si può notare nella DSC, la temperatura scelta per la sinterizzazione è al di sotto della temperatura di cristallizzazione, ciò dovrebbe garantire l'ottenimento di una schiuma amorfa. Il trattamento termico prevede una rampa di  $5\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$  con uno step di 1h a  $300\text{ }^\circ\text{C}$  per consentire la fuoriuscita del residuo organico, segue il mantenimento a  $800\text{ }^\circ\text{C}$  per 1h.

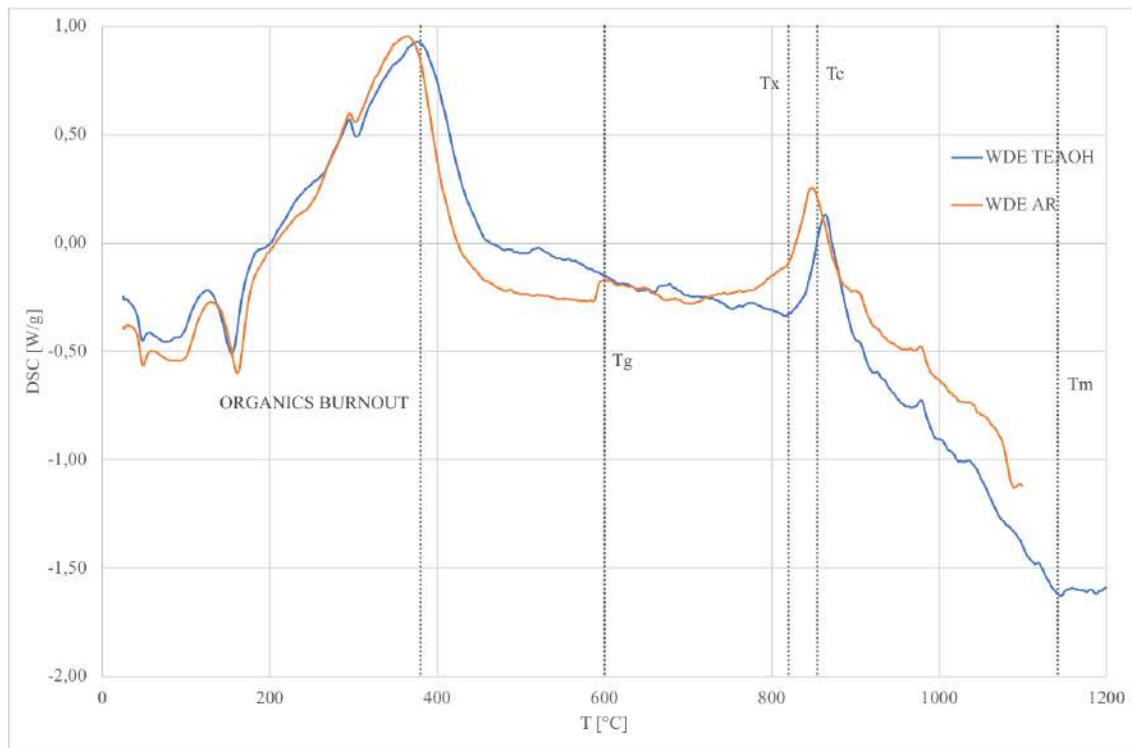


Figura 5.2.1: DSC delle schiume ceramiche a base di WD

L'attivazione è stata effettuata con una soluzione 1M di TEAOH, dopo l'attivazione, si è lasciata la malta vetrosa per un periodo di curind di 2h in forno a 40 °C. La frazione ponderale di solido scelta varia dal 60 al 70%, in particolare, la versatilità del materiale, consente di ottenere delle schiume utilizzabili con entrambe le frazioni; per il biovetro WDP si sono analizzate entrambe le schiume, prodotte con il 60% e il 70% di polvere di vetro, mentre per il WDE si è analizzata solo la schiuma con il 60% di solido.

### 5.2.1 WDP

Nelle figure 5.2.2 e 5.2.3 si possono osservare le immagini al microscopio, pre sinterizzazione, ottenute per i campioni a 60% e 70% di solido.

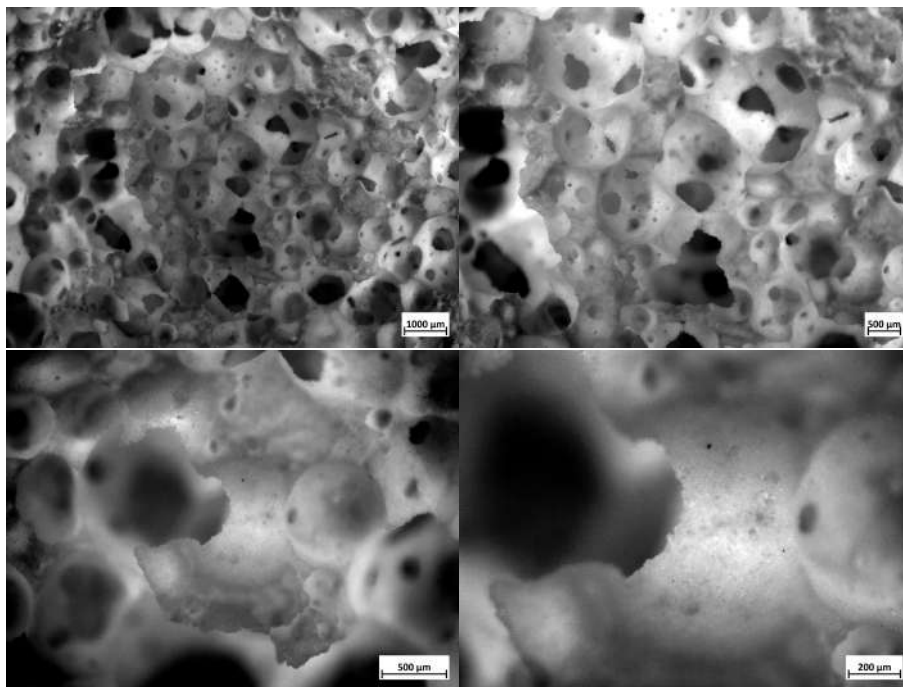


Figura 5.2.2: Immagini al microscopio ottico di scaffold ottenuto con bioceramico WDP, contenuto solido 60%, attivazione con TEAOH, schiuma verde, pre sinterizzazione

Si può notare immediatamente come, soprattutto la schiuma di WDP, 60% (fig 5.2.2) mostri un ottima schiumatura, con pareti sottili e celle ben interconnesse con dimensione delle interconnessioni confrontabile con quella delle celle; oltre che una microporosità ben distribuita sulle pareti.

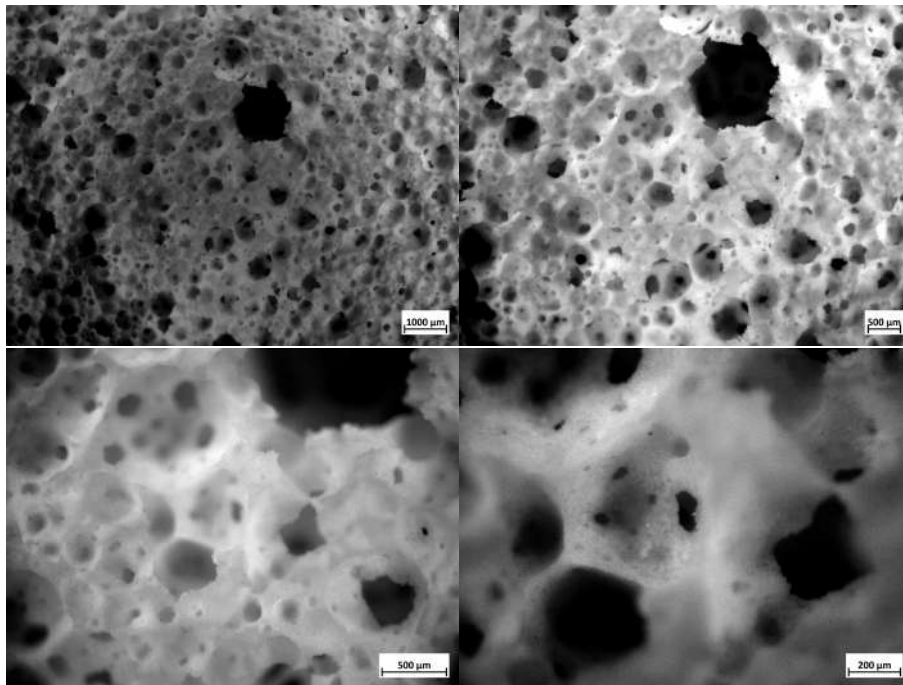


Figura 5.2.3: Immagini al microscopio ottico di scaffold ottenuto con bioceramico WDP, contenuto solido 70%, attivazione con TEAOH, schiuma verde, pre sinterizzazione

Le figure 5.2.4 e 5.2.5 mostrano poi i risultati post sinterizzazione, non si notano particolari variazioni nella morfologia, in particolare in questo caso, a differenza del vetro 47.5b, le schiume prodotte con i biovetri WD non presentano annerimento dopo la sinterizzazione.

L'analisi al picnometro, per la schiuma al 60% di contenuto solido ha riportato una porosità totale  $\phi_{tot} = 84,5\%$ , una porosità aperta  $\phi_{open} = 84,1\%$  e una porosità chiusa del  $\phi_{close} = 0,4\%$ . Valori che si abbassano di poco per la schiuma al 70% di contenuto solido con una porosità totale  $\phi_{tot} = 76\%$ , una porosità aperta  $\phi_{open} = 74,3\%$  e una porosità chiusa del  $\phi_{close} = 1,7\%$ . In generale, entrambe le schiume soddisfano i requisiti per la porosità, in modo particolare la prima, che mostra una porosità molto alta e completamente aperta. Nelle figure 5.2.6 e 5.2.7 si mostra l'analisi delle immagini al microscopio.

La schiuma WDP 60% mostra picchi di dimensione dei pori a 0,5mm ; 0,9mm e 1,5 mm, oltre che una porosità sparsa anche nelle dimensioni intermedie. I pori fino a 1mm di diametro sono

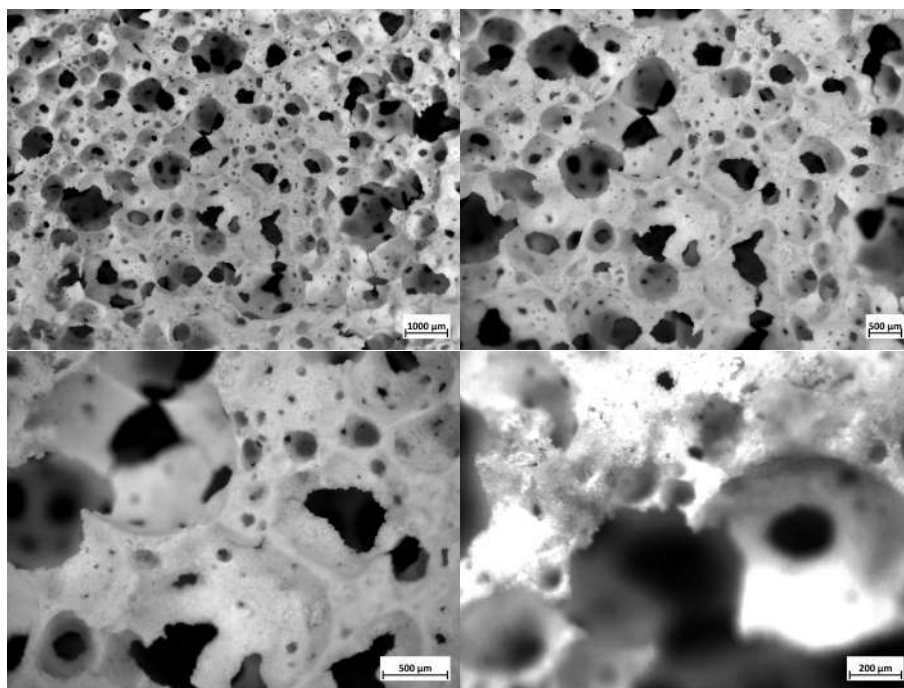


Figura 5.2.4: Immagini al microscopio ottico di scaffold ottenuto con bioceramico WDP, contenuto solido 60%, attivazione con TEAOH, post sinterizzazione

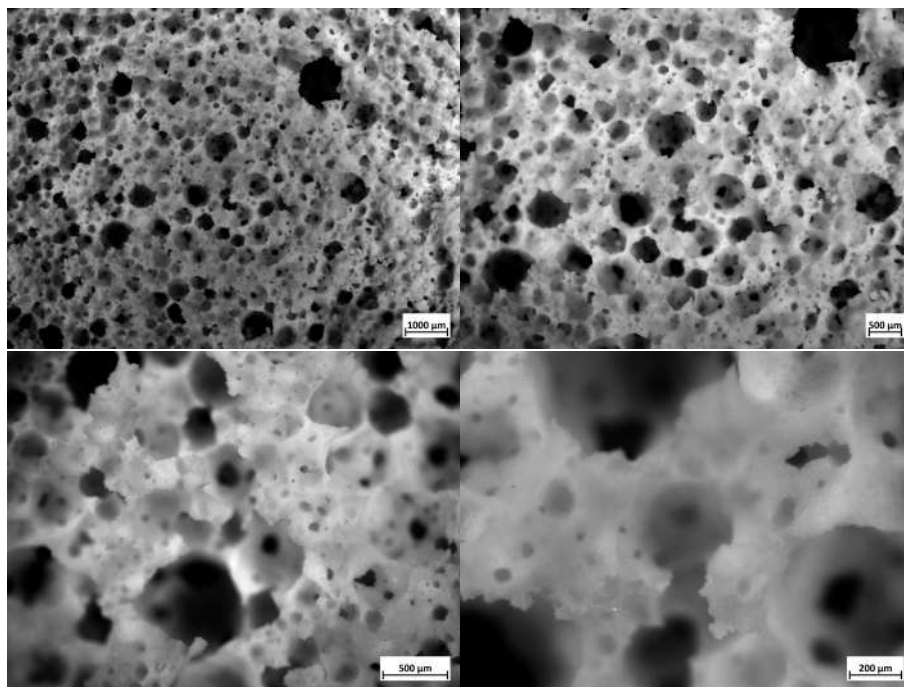


Figura 5.2.5: Immagini al microscopio ottico di scaffold ottenuto con bioceramico WDP, contenuto solido 70%, attivazione con TEAOH, post sinterizzazione

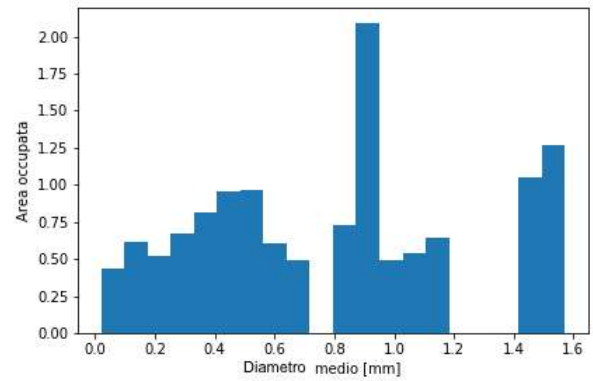
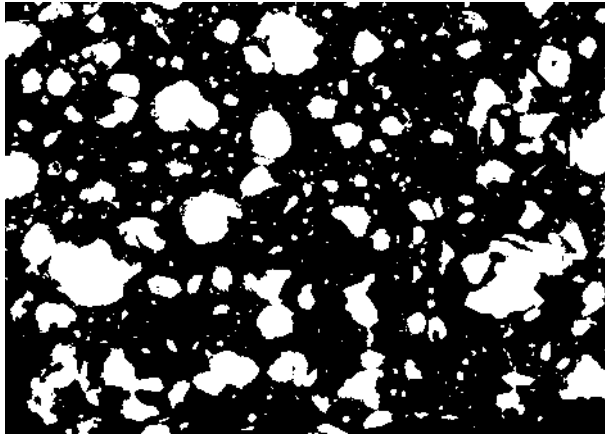


Figura 5.2.6: a sinistra, Immagine binarizzata dell'ingrandimento minore di figura 5.2.2, a destra, grafico della distribuzione della porosità normalizzata con l'area.

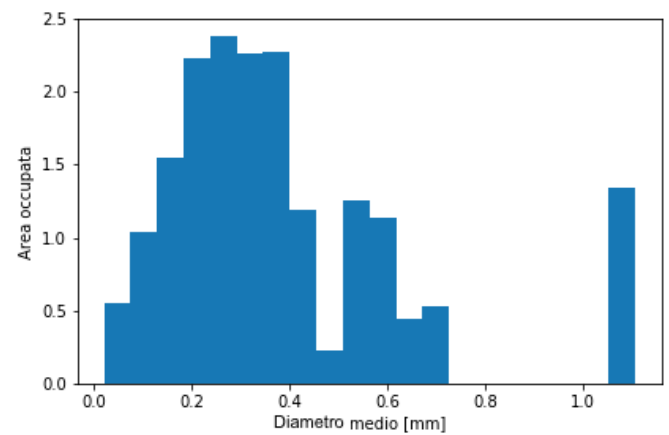
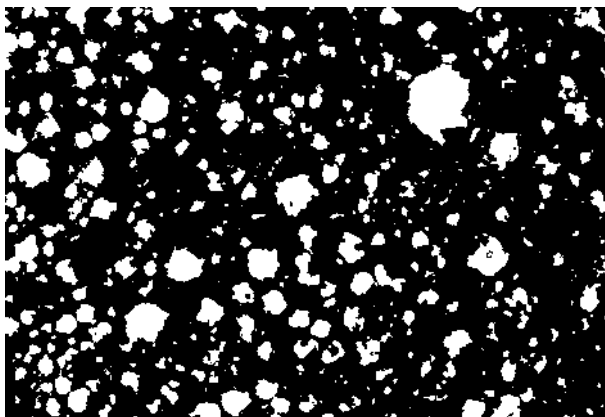


Figura 5.2.7: a sinistra, Immagine binarizzata dell'ingrandimento minore di figura 5.2.3, a destra, grafico della distribuzione della porosità normalizzata con l'area.

considerati favorevoli per l'insediamento cellulare e la vascolarizzazione, mentre i pori superiori al millimetro potrebbero comportare delle difficoltà per l'adesione cellulare in quanto troppo grandi. Nella schiuma WDP 70% la situazione è opposta, sono presenti picchi tra 0,3 e 0,5 mm, sempre accompagnati da un ampio ventaglio da 20 a 700  $\mu\text{m}$ . In generale, entrambe le schiume prodotte possono considerarsi adatte all'uso come scaffold, la soluzione più equilibrata tuttavia, potrebbe essere ottenuta con la composizione intermedia.

### 5.2.2 WDE

Il biovetro WDE presenta caratteristiche molto simili al WDP, si è analizzata solamente la schiuma con il 60% di contenuto solido, la figura 5.2.8, mostra le immagini microscopiche del verde. Le immagini ottenute dal sinterizzato non mostrano particolari cambiamenti.

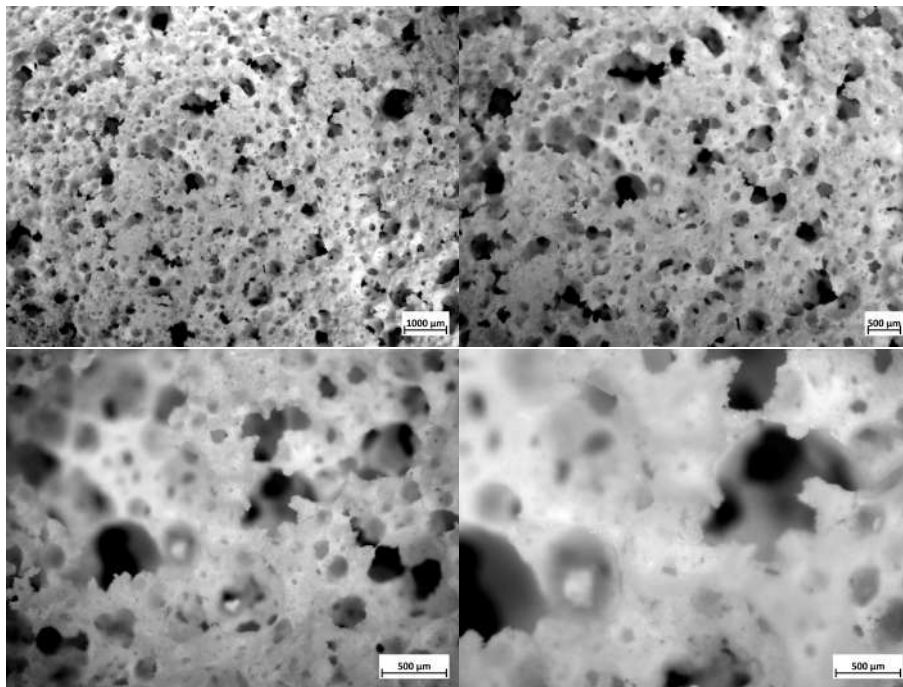


Figura 5.2.8: Immagini al microscopio ottico di scaffold ottenuto con bioceramico WDE, contenuto solido 60%, attivazione con TEAOH, schiuma verde, pre sinterizzazione

L'analisi dell'immagine in figura 5.2.9 mostra poi dei risultati molto simili a quelli ottenuti con la schiuma WDP 70%, ciò suggerisce che il curing post attivazione in questo caso possa essere esteso oltre alle 2h, per ottenere una malta vetrosa più viscosa e in grado di sostenere porosità di dimensione maggiore.

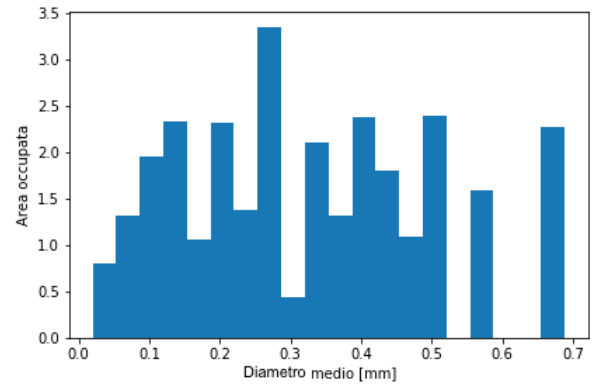
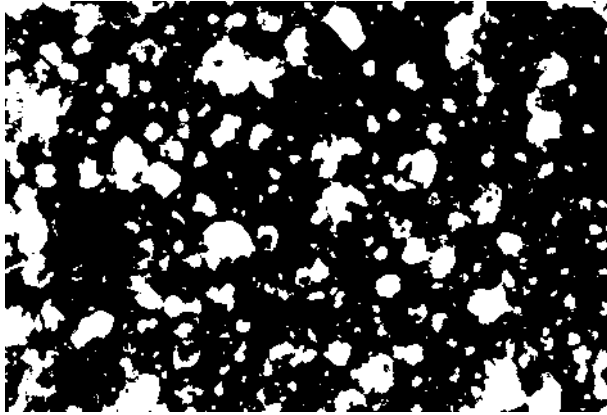


Figura 5.2.9: a sinistra, immagine binarizzata dell'ingrandimento minore di figura 5.2.8, a destra, grafico della distribuzione della porosità normalizzata con l'area.

La figura 5.2.10 mostra poi un confronto della termogravimetria delle due schiume prodotte con i biovetri in questione, anche in questo caso si nota che la maggior parte della perdita di massa si ha a basse temperature, con perdita praticamente nulla sopra i 500°C. I risultati supportano le ipotesi fatte nel paragrafo 5.1.2 e le perdite di peso maggiori sono da attribuirsi alle molecole d'acqua legate fisicamente e alla condensazione di gruppi silanolici sulla superficie delle particelle di vetro.

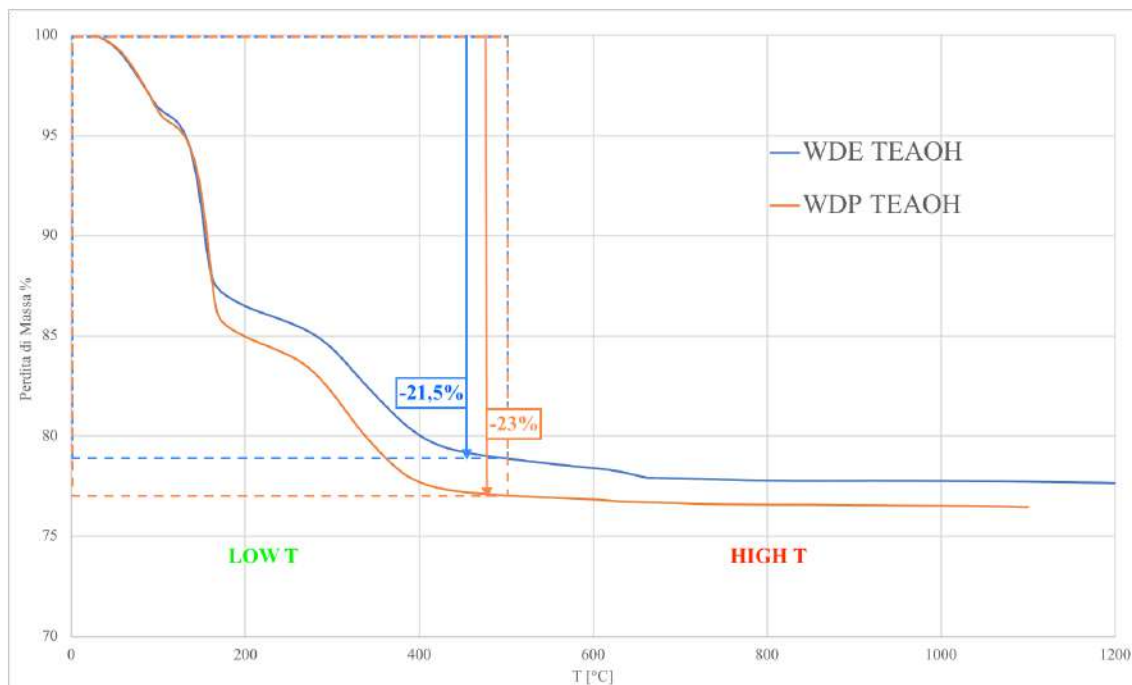


Figura 5.2.10: TGA delle schiume ceramiche a base di WD

Anche in questo caso si è dimostrata la possibilità nell'ottenimento di schiume di vetro tramite attivazione ibrida, con i biovetri del sistema Wollastonite - Diopside



## 5.3 Biovetro SC45

Il biovetro SC45 è stato studiato per la produzione di scaffold per applicazioni di ipertermia. In letteratura, i lavori di riferimento provengono da Vernè et al. [23, 22, 33]. Per questo tipo di materiale, come precedentemente annunciato all'inizio del capitolo, si vuole testare il processo del gel casting inorganico, per verificare la possibilità di produrre delle schiume tramite attivazione alcalina; dato non ancora presente in letteratura.

Le prove eseguite tuttavia non hanno restituito i risultati sperati; in tutti i casi la struttura porosa collassa dopo lo schiumaggio. anche in questo caso sono stati fatti tentativi con contenuti di solido tra il 50% e il 70%, tempi di curing fino a 6h, e soluzioni di partenza con concentrazioni 1M e 2,5M di NaOH. Nessuna delle prove ha consentito di ottenere una struttura schiumosa stabile.

Ulteriori tentativi sono stati fatti aggiungendo additivi stabilizzanti alla malta vetrosa. Sono stati provati i prodotti viscosizzanti KELCO-CRETE® Diutan Gum, prodotto da CPKelco e RHEO-MATRIX 150 prodotto da BASF; utilizzati per viscosizzare prodotti cementizi. In entrambi i casi non si sono osservati risultati soddisfacenti. La figura 5.3.1 mostra degli esempi del risultato tipico ottenuto, si può osservare come la struttura porosa risulti del tutto collassata.

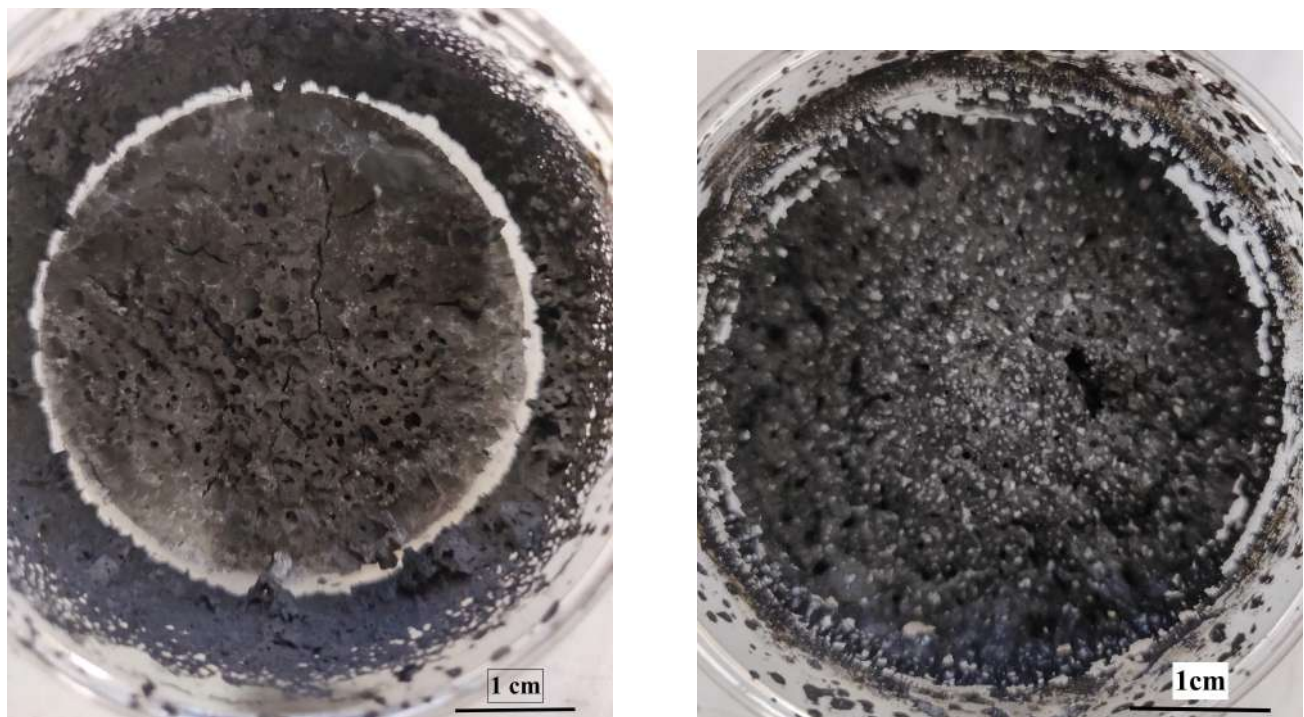


Figura 5.3.1: A sinistra, risultato di schiuma di vetro con SC45 non additivato, a destra, additivazione con RHEOMATRIX 150

L'ipotesi in questo caso è che la presenza di polvere di ossido di ferro renda troppo pesante la schiuma facendola collassare, oppure che non sia presente sufficiente frazione vetrosa che formi dei prodotti di dissoluzione in grado di sostenere una struttura di questo tipo, in attesa di ulteriori risultati, si considera il metodo del gel casting non adatto alla produzione di schiume vetrose con il Biovetro SC45.

## 5.4 Bioceramiche a base di $Si_3N_4$

Il metodo del gel casting inorganico è stato provato su due bioceramiche a base di  $Si_3N_4$  proveniente da due diversi produttori: Yantai Tomley TM-B e UBE SN10, per comodità, le due ceramiche saranno chiamate Yantai e Ube. Di nuovo, come preannunciato all'inizio del capitolo, il metodo del gel casting non è mai stato precedentemente provato su questi materiali, si vuole quindi capire se il metodo sia estendibile a materiali di questo tipo.

In letteratura, la produzione di scaffold bioceramici a base di nitruro di silicio è presente nei lavori di Sajgaljk et al. [102, 45, 18]. In questi studi si utilizza il metodo della replicazione per produrre strutture porose, un esempio è mostrato in figura 5.4.1 .

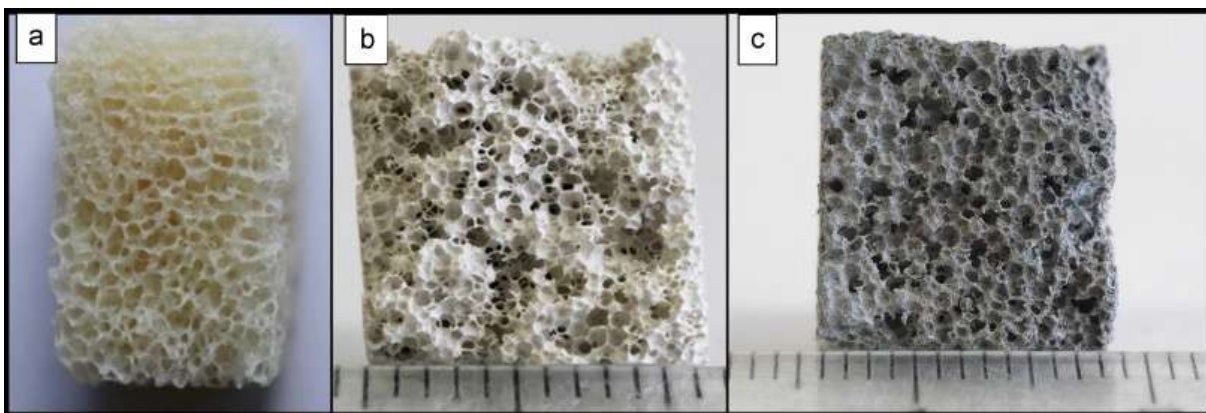


Figura 5.4.1: a: struttura porosa della schiuma utilizzata per la replicazione, b: scaffold sinterizzato in aria, c: scaffold sinterizzato in azoto [102]

Seguendo i dati raccolti nelle prove precedenti, si è scelto di creare delle malte vetrose contenenti il 60% di contenuto solido e di utilizzare un tempo di curing di 2h dopo l'attivazione. Le figure 5.4.2 e 5.4.3 mostrano le immagini al microscopio delle schiume ottenute con il metodo del gel casting.

Si può notare come la struttura risulti notevolmente più interconnessa, rispetto alle immagini di letteratura (fig. 5.4.1); effetto diretto del metodo del gel casting, rispetto alla replicazione. L'analisi delle immagini si può osservare nelle figure 5.4.4 e 5.4.5. La struttura porosa può ritenersi soddisfacente, con dimensioni dei pori, per entrambi i materiali compresa tra 0,1 e 0,8 mm.

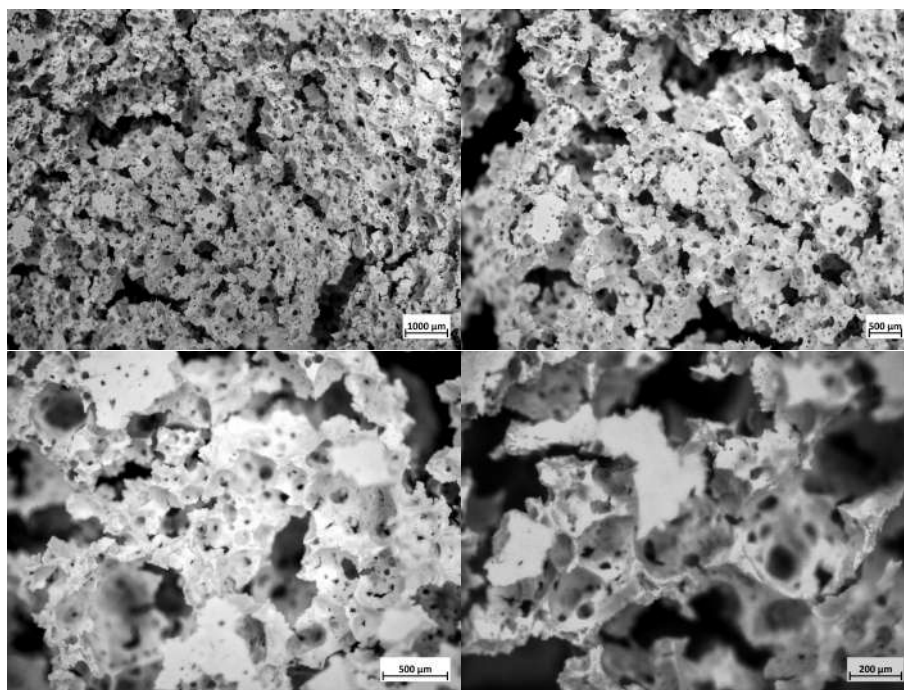


Figura 5.4.2: Immagini al microscopio ottico di scaffold ottenuto con bioceramico Yantai Tomley TM-B, contenuto solido 60%, attivazione con TEAOH, schiuma verde, pre sinterizzazione

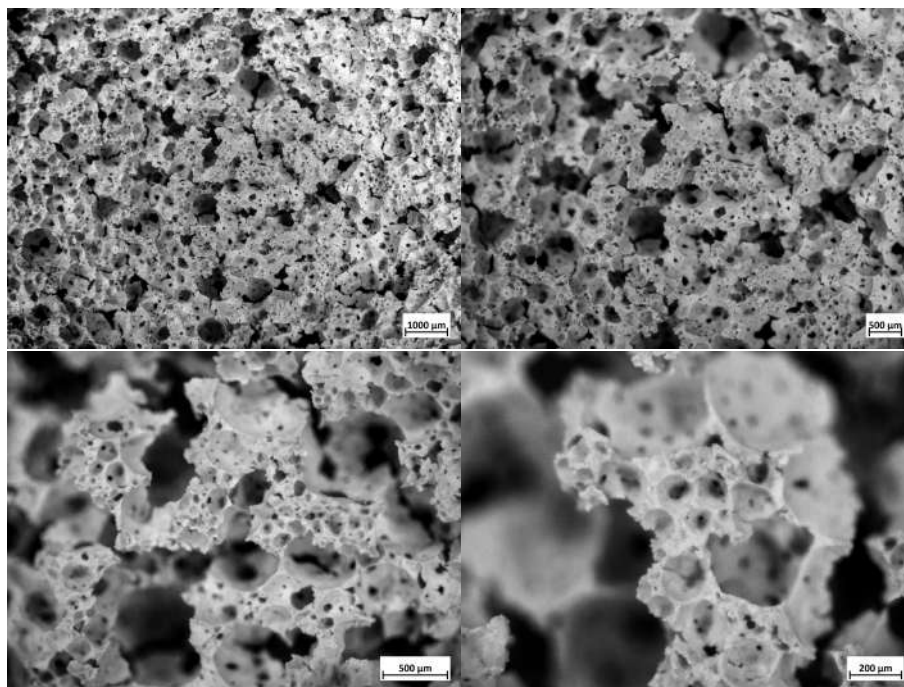


Figura 5.4.3: Immagini al microscopio ottico di scaffold ottenuto con bioceramico UBE-SN10, contenuto solido 60%, attivazione con TEAOH, schiuma verde, pre sinterizzazione

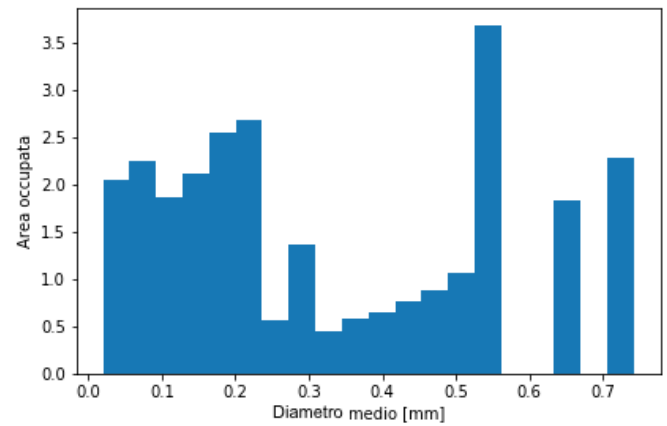
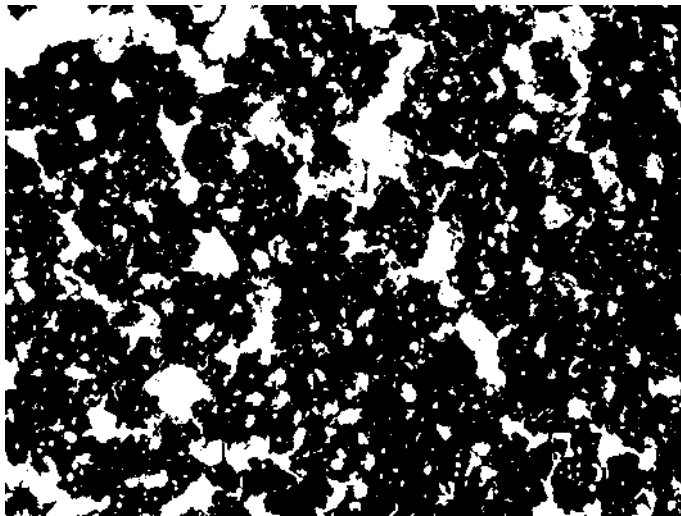


Figura 5.4.4: a sinistra, Immagine binarizzata dell'ingrandimento minore di figura 5.4.2, a destra, grafico della distribuzione della porosità normalizzata con l'area.

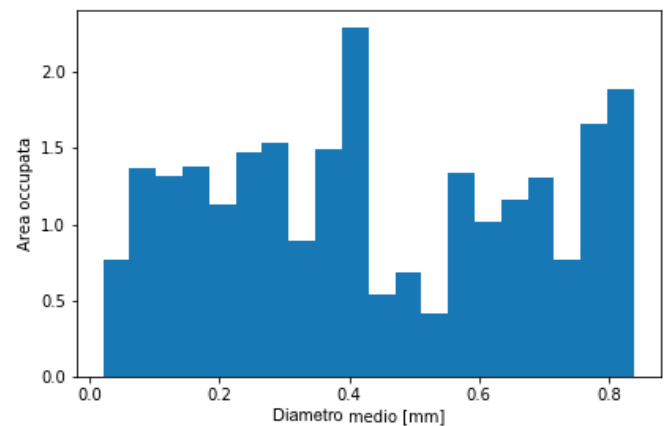
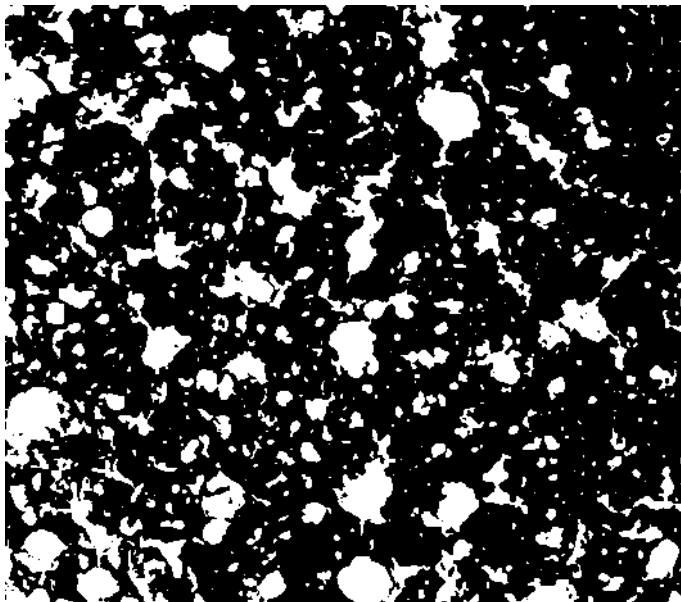


Figura 5.4.5: a sinistra, Immagine binarizzata dell'ingrandimento minore di figura 5.4.3, a destra, grafico della distribuzione della porosità normalizzata con l'area.

La sinterizzazione di queste schiume è stata eseguita grazie all'aiuto di Monika Tatarková, (PhD. Department of ceramics Institute of Inorganic Chemistry Slovak Academy of Sciences). La sinte-

rizzazione è stata eseguita in azoto, a diverse temperature, tra 1100 e 1400 °C. Il trattamento termico avviene nel vuoto fino a 800°C e prosegue fino alla temperatura di sinterizzazione in atmosfera contenente  $N_2$  a 1atm, rampa a 20°C/min con dwell time di 1h. In ognuno dei casi la struttura porosa è rimasta stabile, oltre a uno spiccato ritiro delle dimensioni dei campioni. A tutte le temperature di sinterizzazione la parte a contatto con il crogiolo mostra una fase vetrosa (fig. 5.4.6) la cui natura è ancora in fase di analisi. Seguono nelle figure 5.4.7, 5.4.8 e 5.4.9 alcuni esempi delle schiume ottenute dopo la sinterizzazione.

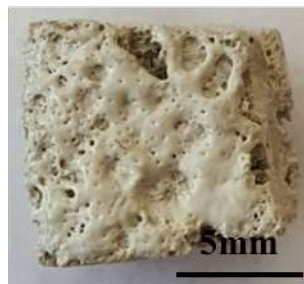


Figura 5.4.6: Fase vetrosa formata a contatto con il crogiolo

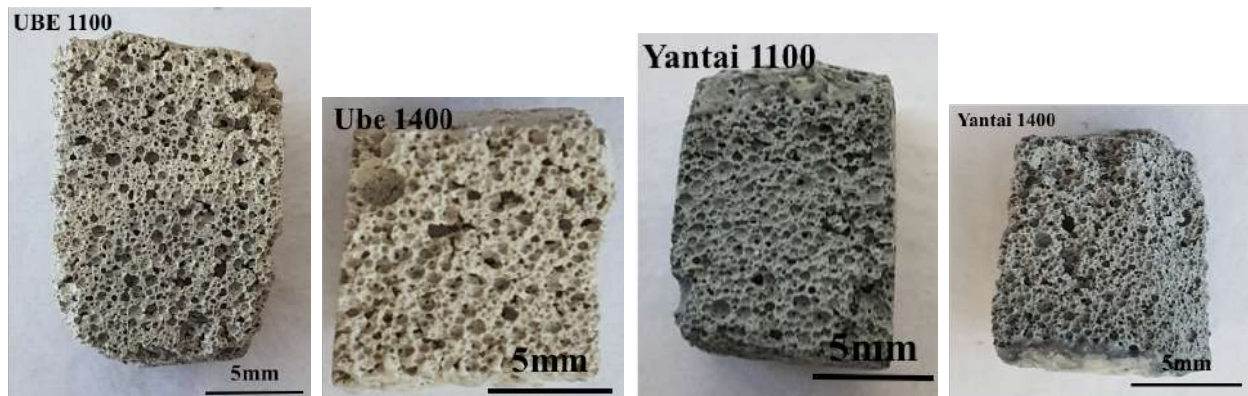


Figura 5.4.7: esempi delle schiume ottenute con bioceramici a base di nitruro di silicio a diverse temperature di sinterizzazione

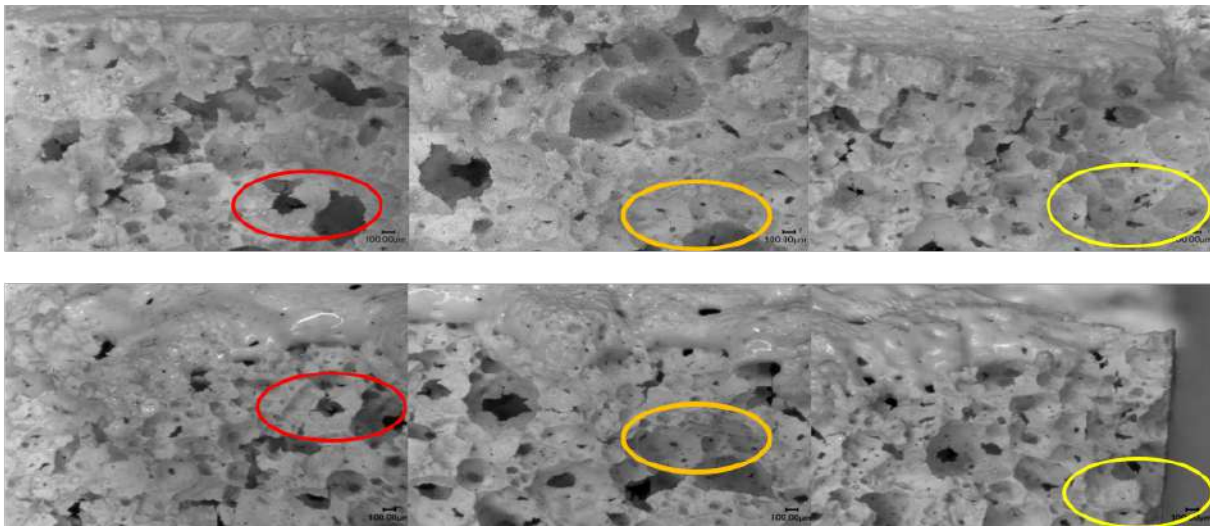


Figura 5.4.8: Ube sinterizzato a 1100°C, sopra: pre sinterizzazione, sotto: post sinterizzazione

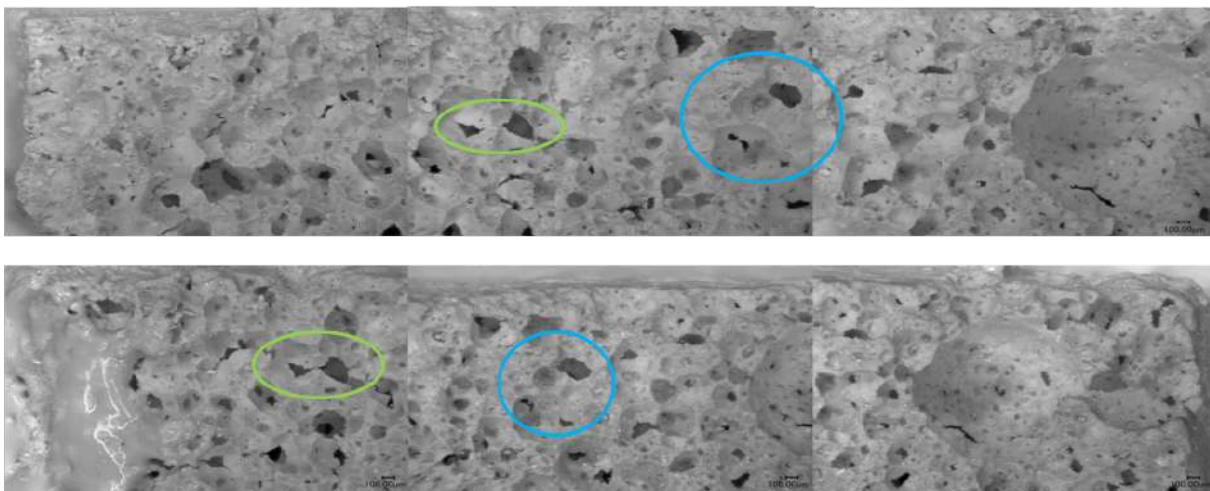


Figura 5.4.9: Yantai sinterizzato a 1400°C, sopra: pre sinterizzazione, sotto: post sinterizzazione

Le schiume sinterizzate sono poi state analizzate al picnometro, ottenendo i risultati nella seguente tabella:

T sinter. °C	UBE			YANTAI		
	$\rho[g \cdot cm^{-3}]$	$\phi_{open}[\%]$	$\phi_{closed}[\%]$	$\rho[g \cdot cm^{-3}]$	$\phi_{open}[\%]$	$\phi_{closed}[\%]$
1400	1.1241	60.87	2.97	1.0876	62.30	2.72
1300	1.0764	59.89	5.49	1.0148	65.01	2.35
1200	0.7576	72.86	2.77	0.8168	70.72	3.01
1100	0.7074	75.66	1.69	0.8243	71.55	1.93

La temperatura migliore per la sinterizzazione sembra essere la più bassa, che porta porosità maggiori e più aperte, potrebbe quindi portare benefici in termini di applicazione biomedica. E' notevole il fatto che la sinterizzazione in scorrimento viscoso può essere effettuata a temperature più accessibili rispetto al nitrato di silicio con additivi convenzionali.

E' possibile applicare il metodo del gel casting su bioceramici a base di  $Si_3N_4$  ottenendo una struttura e una porosità e interconnettività nei range desiderati per uno scaffold per l'ingegneria dei tessuti.



# Capitolo 6

## Conclusioni

L'obiettivo del lavoro di tesi è stato quello di esplorare l'applicabilità e le variabili legate al metodo innovativo del gel-casting, confrontando i risultati con la letteratura e verificandone il funzionamento su diversi sistemi.

Risultati importanti sono stati ottenuti osservando tre fondamentali questioni, già espresse all'inizio della discussione.

Il principale punto di riferimento per una successiva estensione del progetto è stata la verifica del funzionamento del gel casting su un sistema già testato per diverse applicazioni biomedicali: lo scaffold di biovetro silicatico. I risultati confermano che la struttura porosa ottenuta con una sospensione acquosa di biovetro 47.5b è fisicamente adatta all'applicazione, presentando un ampio range di porosità in grado di soddisfare la coltura e il trasporto in vivo delle necessarie specie biologiche.

Dalle analisi termiche del biovetro attivato con NaOH, e in particolare dalla termogravimetria, si osserva tuttavia la perdita di massa a  $T > 500$  °C che secondo la letteratura potrebbe essere legata alla degradazione di composti C-S-H che rilasciano vapore ad alte temperature. Questo fa pensare che gli ioni  $Na^+$  provenienti dalla dissoluzione dell'attivatore alcalino interagiscano con gli ioni  $Ca^{2+}$  provenienti dal materiale vetroso per formare silicati o carbonati idrati dalla composizione alterata rispetto alla chimica del vetro originale. L'alterazione della composizione della fase vetrosa che avviene con l'attivazione alcalina può portare a spostare e allargare il picco esotermico di cristallizzazione verso temperature più basse. Ciò significa modificare e aumentare la cristallizzazione del vetro durante la sinterizzazione, aspetto dannoso per le caratteristiche di osteoinduttività dello scaffold.

Per ovviare a ciò si applica l'attivazione ibrida alla sospensione vetrosa, che consiste nell'utilizzo di una base organica (tetrametilammonio idrossido) i cui ioni dissociati non interagiscono con quelli degli ossidi del vetro. Il funzionamento dell'attivazione ibrida si verifica sia nel sistema

contenente biovetro 47.5b sia nei biovetri WDP e WDE del sistema wollastonite-diopside, ottenendo strutture porose notevolmente aperte e stabili, in particolare con il biovetro WDP e il 60% di contenuto solido nella malta vetrosa. Le analisi termiche mostrano inoltre che le perdite di massa a alte temperature risultano, attivando le polveri vetrose con TEAOH, quasi nulle, supportando le ipotesi fatte in precedenza.

L'altro obiettivo della tesi è stato quello di estendere il metodo del gel casting inorganico a sistemi meno comuni quali biovetri ferrimagnetici per ipertermia e bioceramici a base di nitruro di silicio.

Nel primo caso non si sono ottenuti i risultati sperati: la malta vetrosa a base di SC45 tende a separarsi e una volta schiumata a collassare. L'ipotesi è che la frazione di materiale che si dissolve e gela sia troppo bassa per sostenere una struttura composta da pesanti ossidi ferrosi.

Applicando il metodo ai bioceramici a base di nitruro di silicio si sono invece ottenute ottime strutture porose, sinterizzabili a temperature più basse del  $Si_3N_4$  con i comuni additivi e con una porosità più aperta dei risultati concorrenti in letteratura.

## Next steps

Cause di forza maggiore non hanno permesso di terminare tutte le prove programmate per la tesi. Il lavoro potrà però fungere da base di partenza per affinare la tecnica e migliorare i risultati ottenuti.

I seguenti punti possono essere utilizzati per proseguire e colmare la mancanza di dati nella tesi:

- **Proprietà meccaniche:** le strutture si possono assumere sufficientemente resistenti confrontandone la morfologia con la letteratura. La verifica delle proprietà meccaniche è fondamentale però per valutare il giusto equilibrio tra porosità e resistenza.
- **Caratterizzazione:** alcuni punti importanti potrebbero approfondire le conclusioni ottenute da questa tesi, in particolare, si vogliono verificare gli effetti che l'attivazione alcalina e ibrida hanno sulla chimica del materiale. Prove FTIR su campioni attivati ibridamente possono servire per confrontare i composti che si formano con l'attivazione alcalina, ad esempio confrontandole con quelle in figura 5.1.5 si potrebbe ottenere un'ulteriore conferma della differenza tra i composti idrati provenienti dai due metodi. allo stesso modo, prove XRD sui campioni attivati con TEAOH potrebbero risultare nella formazione di diverse fasi cristalline o addirittura in uno spettro completamente amorfo nel sinterizzato. Gli stessi ragionamenti sono estendibili ai Biovetri WD.

- Bioceramici  $Si_3N_4$ : le schiume ottenute da questi materiali non sono state particolarmente affinate per la mancanza di materiale. Osservato il funzionamento del metodo in questo sistema, è sicuramente possibile ottenere delle schiume morfologicamente migliori a quelle in esame, variando i parametri di contenuto di solido, tempo di curing, e possibilmente testando il sistema con l'attivazione ibrida.
- Biovetri ferrimagnetici: In questo caso le prove non sono state sufficienti ad ottenere un risultato soddisfacente. In questo caso, l'ipotesi sarebbe quella di modificare la composizione del materiale aggiungendo una frazione di biovetro silicatico, ad esempio di 47.5b, in modo da ridurre la frazione di ossidi di ferro e stimolare lo sviluppo delle proprietà reologiche nella malta vetrosa.



# Ringraziamenti

Alla mia famiglia. Qualche volta ho pensato a come avrei potuto fare senza di voi. Spesso si dà un peso esagerato a tante cose, tante cose che in momenti come questo perdono il loro significato e fanno spazio a ciò che veramente ci resta tra le mani. Mi avete dato la possibilità di fare tutto quello che volevo, in 26 anni che ho passato con voi non mi avete mai fatto mancare nulla. Ora dedico a voi questa tesi e con lei tutto il mio percorso universitario. Mamma, papà, siete la spina dorsale di tutto ciò in cui sono riuscito, di tutto ciò che mi ha fatto sentire realizzato e di tutto ciò che ho imparato ad amare. Ringrazio voi, ma anche i nonni, gli zii e i cugini per il supporto e per la fiducia che non mi avete mai fatto mancare.

Ringrazio poi tutti quelli che mi hanno influenzato durante la vita accademica. Il professor Bernardo per avermi dato la possibilità di lavorare su un progetto nei miei interessi, Patricia e Hamada per avermi guidato nei laboratori e con loro tutti quelli che mi hanno aiutato quando non sapevo cosa e come fare. Ringrazio i compagni di corso con cui ho legato di più: Edoardo, Francesco e Ilaria, senza le sessioni di studio con voi probabilmente ora non mi troverei qui.

Ringrazio tutti i miei amici, in questo momento mi sono reso conto che siete veramente tantissimi, sappiate che non passa un momento in cui io mi dimentichi di voi.

Per finire ringrazio tutti i coinquilini passati per casa porciglia, anche se il mio pensiero va su voi due: Anita e Bianca, abbiamo passato questo ultimo periodo assieme, e credo che stare chiusi in casa assieme per più di un mese ci abbia resi inseparabili. Nessuno era mai stato condannato alla convivenza forzata con me, e in un certo senso, Coronavirus ti ringrazio per questa condanna.

Per finire ringrazio la città di Padova, sei stata per molto tempo la mia casa, questo è solo un arrivederci.



# Bibliografia

- [1] Micromeritics. accupyc ii 1340 pycnometer.
- [2] Ris - rechtsinformationssystem des bundes. bundesrecht konsolidiert: Gesamte rechtsvorschrift für recycling-baustoverordnung.
- [3] Mukul Agarwal, Kurt W Koelling, and Jeffrey J Chalmers. Characterization of the degradation of polylactic acid polymer in a solid substrate environment. *Biotechnology progress*, 14(3):517–526, 1998.
- [4] Seema Agarwal, Joachim H Wendorff, and Andreas Greiner. Progress in the field of electrospinning for tissue engineering applications. *Advanced Materials*, 21(32-33):3343–3351, 2009.
- [5] C Mauli Agrawal and Robert B Ray. Biodegradable polymeric scaffolds for musculoskeletal tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*, 55(2):141–150, 2001.
- [6] Fred H Albee. Studies in bone growth: triple calcium phosphate as a stimulus to osteogenesis. *Annals of surgery*, 71(1):32, 1920.
- [7] Amira MM Amin and Emad MM Ewais. Bioceramic scaffolds. *Scaffolds in Tissue Engineering Materials, Technologies and Clinical Applications*, page 49, 2017.
- [8] Carlo Di Bello Andrea Bagno. *Biomateriali: dalla scienza dei materiali alle applicazioni cliniche*. Pàtron editore, 2016.
- [9] K Anselme. Osteoblast adhesion on biomaterials. *Biomaterials*, 21(7):667–681, 2000.

- [10] F Baino and C Vitale-Brovarone. Bioactive glass and glass–ceramic foam scaffolds for bone tissue restoration. In *Biomedical Foams for Tissue Engineering Applications*, pages 213–248. Elsevier, 2014.
- [11] Francesco Baino, Jacopo Barberi, Elisa Fiume, Gissur Orlygsson, Jonathan Massera, and Enrica Verné. Robocasting of bioactive  $\text{SiO}_2\text{-P}_2\text{O}_5\text{-CaO-MgO-Na}_2\text{O-K}_2\text{O}$  glass scaffolds. *Journal of healthcare engineering*, 2019, 2019.
- [12] B Sonny Bal, Ashok Khandkar, R Lakshminarayanan, Ian Clarke, Aaron A Hoffman, and Mohamed N Rahaman. Testing of silicon nitride ceramic bearings for total hip arthroplasty. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*, 87(2):447–454, 2008.
- [13] B Sonny Bal and MN Rahaman. Orthopedic applications of silicon nitride ceramics. *Acta biomaterialia*, 8(8):2889–2898, 2012.
- [14] Christian Bergmann, Markus Lindner, Wen Zhang, Karolina Koczur, Armin Kirsten, Rainer Telle, and Horst Fischer. 3d printing of bone substitute implants using calcium phosphate and bioactive glasses. *Journal of the European Ceramic Society*, 30(12):2563–2567, 2010.
- [15] Robert C Bielby, Ioannis S Christodoulou, Russell S Pryce, Warwick JP Radford, Larry L Hench, and Julia M Polak. Time-and concentration-dependent effects of dissolution products of 58s sol–gel bioactive glass on proliferation and differentiation of murine and human osteoblasts. *Tissue engineering*, 10(7-8):1018–1026, 2004.
- [16] M Bigerelle, K Anselme, B Noel, I Ruderman, P Hardouin, and A Iost. Improvement in the morphology of ti-based surfaces: a new process to increase in vitro human osteoblast response. *Biomaterials*, 23(7):1563–1577, 2002.
- [17] Ryan M Bock, Erin N Jones, Darin A Ray, B Sonny Bal, Giuseppe Pezzotti, and Bryan J McEntire. Bacteriostatic behavior of surface modulated silicon nitride in comparison to polyetheretherketone and titanium. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 105(5):1521–1534, 2017.
- [18] Katarína Bodišová, Monika Kašiarová, Magdaléna Domanická, Miroslav Hnatko, Zoltán Lenčేశ, Zuzana Varchulová Nováková, Ján Vojtaššák, Sylvia Gromošová, and Pavol Šajgalík. Porous silicon nitride ceramics designed for bone substitute applications. *Ceramics International*, 39(7):8355–8362, 2013.



- [19] Nicholas F Borrelli, Albert A Luderer, and Joseph N Panzarino. Radio frequency induced hyperthermia for tumor therapy, April 6 1982. US Patent 4,323,056.
- [20] Susmita Bose, Mangal Roy, and Amit Bandyopadhyay. Recent advances in bone tissue engineering scaffolds. *Trends in biotechnology*, 30(10):546–554, 2012.
- [21] BD Boyan. Hummert tw, dean dd, and schwartz z. *Role of material surfaces in regulating bone and cartilage cell response. Biomaterials*, 17:137–146, 1996.
- [22] O Bretcanu, E Verné, M Cöisson, PAOLA Tiberto, and P Allia. Magnetic properties of the ferrimagnetic glass-ceramics for hyperthermia. *Journal of magnetism and magnetic materials*, 305(2):529–533, 2006.
- [23] Oana Bretcanu, Marta Miola, Claudia L Bianchi, Ida Marangi, Roberta Carbone, Ingrid Corazzari, Mario Cannas, and Enrica Verné. In vitro biocompatibility of a ferrimagnetic glass-ceramic for hyperthermia application. *Materials Science and Engineering: C*, 73:778–787, 2017.
- [24] Maria Brink. The influence of alkali and alkaline earths on the working range for bioactive glasses. *Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials and The Japanese Society for Biomaterials*, 36(1):109–117, 1997.
- [25] Maria Brink, Tia Turunen, Risto-Pekka Happonen, and Antti Yli-Urpo. Compositional dependence of bioactivity of glasses in the system  $\text{Na}_2\text{O}-\text{K}_2\text{O}-\text{MgO}-\text{CaO}-\text{B}_2\text{O}_3-\text{P}_2\text{O}_5-\text{SiO}_2$ . *Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials and The Japanese Society for Biomaterials*, 37(1):114–121, 1997.
- [26] A Butscher, M Bohner, S Hofmann, L Gauckler, and Ralph Müller. Structural and material approaches to bone tissue engineering in powder-based three-dimensional printing. *Acta biomaterialia*, 7(3):907–920, 2011.
- [27] Andre Butscher, Marc Bohner, Christian Roth, Annika Ernstberger, Roman Heuberger, Nicola Doebelin, Philipp Rudolf Von Rohr, and Ralph Müller. Printability of calcium phosphate powders for three-dimensional printing of tissue engineering scaffolds. *Acta biomaterialia*, 8(1):373–385, 2012.
- [28] JIII Cesarano, R Segalman, and P Calvert. Robocasting provides mouldless fabrication from slurry deposition. *Ceramic Industry*, 148(4):94–96, 1998.

- [29] Q Chen, JA Roether, and AR Boccaccini. Tissue engineering scaffolds from bioactive glass and composite materials. *Topics in tissue engineering*, 4(6):1–27, 2008.
- [30] Qizhi Chen, Chenghao Zhu, and George A Thouas. Progress and challenges in biomaterials used for bone tissue engineering: bioactive glasses and elastomeric composites. *Progress in Biomaterials*, 1(1):2, 2012.
- [31] Qizhi Z Chen, Ian D Thompson, and Aldo R Boccaccini. 45s5 bioglass®-derived glass–ceramic scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*, 27(11):2414–2425, 2006.
- [32] Stephen D Cook, Jeanette E Dalton, Edward H Tan, DC Rueger, et al. In vivo evaluation of recombinant human osteogenic protein (rhop-1) implants as a bone graft substitute for spinal fusions. *Spine*, 19(15):1655–1663, 1994.
- [33] Ingrid Corazzari, Maura Tomatis, Francesco Turci, Sara Ferraris, Elisa Bertone, Enrico Pre-nesti, and Enrica Vernè. Gallic acid grafting modulates the oxidative potential of ferrima-gnetic bioactive glass-ceramic sc-45. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 148:592–599, 2016.
- [34] Murilo C Crovace, Marina T Souza, Clever R Chinaglia, Oscar Peitl, and Edgar D Zanotto. Biosilicate®—a multipurpose, highly bioactive glass-ceramic. in vitro, in vivo and clinical trials. *Journal of Non-Crystalline Solids*, 432:90–110, 2016.
- [35] Matthew J Dalby, Nikolaj Gadegaard, Rahul Tare, Abhay Andar, Mathis O Riehle, Pawel Herzyk, Chris DW Wilkinson, and Richard OC Oreffo. The control of human mesenchymal cell differentiation using nanoscale symmetry and disorder. *Nature materials*, 6(12):997–1003, 2007.
- [36] PN De Aza, AH De Aza, and S De Aza. Crystalline bioceramic materials. *Bol. Soc. Esp. Ceram*, 44(3):135–145, 2005.
- [37] PN De Aza, F Guitian, and S De Aza. Bioactivity of wollastonite ceramics: in vitro evaluation. *Scripta metallurgica et materialia*, 31(8):1001–1005, 1994.
- [38] PN De Aza, F Guitian, and S De Aza. Polycrystalline wollastonite ceramics. biomaterials free of p2o5. *Advances in science and technology*, 12:19–27, 1995.
- [39] Kay C Dee and Rena Bizios. Mini-review: Proactive biomaterials and bone tissue engineering. *Biotechnology and bioengineering*, 50(4):438–442, 1996.

- [40] R Detsch, D Hagemeyer, M Neumann, S Schaefer, A Vortkamp, M Wuelling, G Ziegler, and M Epple. The resorption of nanocrystalline calcium phosphates by osteoclast-like cells. *Acta biomaterialia*, 6(8):3223–3233, 2010.
- [41] Rainer Detsch and Aldo R Boccaccini. The role of osteoclasts in bone tissue engineering. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*, 9(10):1133–1149, 2015.
- [42] Sylvain Deville. Freeze-casting of porous ceramics: a review of current achievements and issues. *Advanced Engineering Materials*, 10(3):155–169, 2008.
- [43] N. Douard, R. Detsch, Roxana Chotard-Ghodsnia, Chantal Damia, U. Deisinger, and Eric Champion. In vitro biological evaluation of b-tricalcium phosphate (b-TCP) ceramics for bone substitution. In *3rd International Workshop on Advanced Ceramics (IWAC03)*, LIMOGES, France, November 2008.
- [44] Shazia Durrani, Mikhail Konoplyannikov, Muhammad Ashraf, and Khawaja Husnain Haider. Skeletal myoblasts for cardiac repair. *Regenerative medicine*, 5(6):919–932, 2010.
- [45] Jan Dusza and Pavol Sajgalik. Fracture toughness and strength testing of ceramic composites. *Handbook of advanced materials testing(A 95-20351 04-23)*, New York, Marcel Dekker, Inc.(*Materials Engineering.*, 9:399–435, 1995.
- [46] Peter Duxson, Ana Fernández-Jiménez, John L Provis, Grant C Lukey, Angel Palomo, and Jannie SJ van Deventer. Geopolymer technology: the current state of the art. *Journal of materials science*, 42(9):2917–2933, 2007.
- [47] Hamada Elsayed, Acacio Rincon Romero, Devis Bellucci, Valeria Cannillo, and Enrico Bernardo. Advanced open-celled structures from low-temperature sintering of a crystallization-resistant bioactive glass. *Materials*, 12(22):3653, 2019.
- [48] Hamada Elsayed, Acacio Rincón Romero, Letizia Ferroni, Chiara Gardin, Barbara Zavan, and Enrico Bernardo. Bioactive glass-ceramic scaffolds from novel ‘inorganic gel casting’and sinter-crystallization. *Materials*, 10(2):171, 2017.
- [49] Hamada Elsayed, Andrea Zocca, Johanna Schmidt, Jens Günster, Paolo Colombo, and Enrico Bernardo. Bioactive glass-ceramic scaffolds by additive manufacturing and sinter-crystallization of fine glass powders. *Journal of Materials Research*, 33(14):1960–1971, 2018.

- [50] Siamak Eqtesadi, Azadeh Motealleh, Pedro Miranda, Antonia Pajares, Alexandra Lemos, and José MF Ferreira. Robocasting of 45s5 bioactive glass scaffolds for bone tissue engineering. *Journal of the European Ceramic Society*, 34(1):107–118, 2014.
- [51] Oscar Peitl Filho, Guy P La Torre, and Larry L Hench. Effect of crystallization on apatite-layer formation of bioactive glass 45s5. *Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials and The Japanese Society for Biomaterials*, 30(4):509–514, 1996.
- [52] Laura Fiocco, Hamada Elsayed, Letizia Ferroni, Chiara Gardin, Barbara Zavan, and Enrico Bernardo. Bioactive wollastonite-diopside foams from preceramic polymers and reactive oxide fillers. *Materials*, 8(5):2480–2494, 2015.
- [53] Elisa Fiume, Enrica Verné, and Francesco Baino. Crystallization behavior of  $\text{SiO}_2\text{-P}_2\text{O}_5\text{-CaO-MgO-Na}_2\text{O-K}_2\text{O}$  bioactive glass powder. *Biomedical Glasses*, 5(1):46–52, 2019.
- [54] Qiang Fu, Eduardo Saiz, Mohamed N Rahaman, and Antoni P Tomsia. Bioactive glass scaffolds for bone tissue engineering: state of the art and future perspectives. *Materials Science and Engineering: C*, 31(7):1245–1256, 2011.
- [55] I Garcia-Lodeiro, A Fernández-Jimenez, P Pena, and A Palomo. Alkaline activation of synthetic aluminosilicate glass. *Ceramics International*, 40(4):5547–5558, 2014.
- [56] Carol V Gay. Role of microscopy in elucidating the mechanism and regulation of the osteoclast resorptive apparatus. *Microscopy research and technique*, 33(2):165–170, 1996.
- [57] Lutz-Christian Gerhardt and Aldo R Boccaccini. Bioactive glass and glass-ceramic scaffolds for bone tissue engineering. *Materials*, 3(7):3867–3910, 2010.
- [58] Lorna J Gibson and Michael F Ashby. *Cellular solids: structure and properties*. Cambridge university press, 1999.
- [59] Manuela E Gomes and RL Reis. Biodegradable polymers and composites in biomedical applications: from catgut to tissue engineering. part 1 available systems and their properties. *International materials reviews*, 49(5):261–273, 2004.
- [60] Sibylle Grad, Laszlo Kupcsik, Katarzyna Gorna, Sylwester Gogolewski, and Mauro Alini. The use of biodegradable polyurethane scaffolds for cartilage tissue engineering: potential and limitations. *Biomaterials*, 24(28):5163–5171, 2003.

- [61] Larry L Hench. Bioactive materials: the potential for tissue regeneration. *Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and the Australian Society for Biomaterials*, 41(4):511–518, 1998.
- [62] Larry L Hench. The story of bioglass®. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 17(11):967–978, 2006.
- [63] Larry L Hench and HA Paschall. Direct chemical bond of bioactive glass-ceramic materials to bone and muscle. *Journal of biomedical materials research*, 7(3):25–42, 1973.
- [64] LL Hench and T Kokubo. Properties of bioactive glasses and glass-ceramics. In *Handbook of biomaterial properties*, pages 355–363. Springer, 1998.
- [65] Wolfram Höland, Volker Rheinberger, Elke Apel, and Christian van't Hoen. Principles and phenomena of bioengineering with glass-ceramics for dental restoration. *Journal of the European Ceramic Society*, 27(2-3):1521–1526, 2007.
- [66] Jeffrey O Hollinger, Charles Sfeir, Thomas A Einhorn, and Bruce Doll. *Bone tissue engineering*. CRC press, 2004.
- [67] Scott J Hollister. Porous scaffold design for tissue engineering. *Nature materials*, 4(7):518–524, 2005.
- [68] Alexander Hoppe, Nusret S Güldal, and Aldo R Boccaccini. A review of the biological response to ionic dissolution products from bioactive glasses and glass-ceramics. *Biomaterials*, 32(11):2757–2774, 2011.
- [69] Wenhai Huang, Delbert E Day, Kanisa Kittiratanapiboon, and Mohamed N Rahaman. Kinetics and mechanisms of the conversion of silicate (45s5), borate, and borosilicate glasses to hydroxyapatite in dilute phosphate solutions. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 17(7):583–596, 2006.
- [70] Wenhai Huang, Mohamed N Rahaman, Delbert E Day, and Yadong Li. Mechanisms for converting bioactive silicate, borate, and borosilicate glasses to hydroxyapatite in dilute phosphate solution. *Physics and Chemistry of Glasses-European Journal of Glass Science and Technology Part B*, 47(6):647–658, 2006.
- [71] Dietmar W Hutmacher. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials*, 21(24):2529–2543, 2000.

- [72] JM Huyghe. Analytical solution of a pressure transmission experiment on shale using electrochemomechanical theory. *Journal of engineering mechanics*, 133(9):994–1002, 2007.
- [73] Michael Jarcho. Calcium phosphate ceramics as hard tissue prosthetics. *Clinical Orthopaedics and Related Research*®, 157:259–278, 1981.
- [74] JR Jones and LL Hench. Effect of surfactant concentration and composition on the structure and properties of sol-gel-derived bioactive glass foam scaffolds for tissue engineering. *Journal of Materials Science*, 38(18):3783–3790, 2003.
- [75] Julian R Jones and Larry L Hench. Factors affecting the structure and properties of bioactive foam scaffolds for tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*, 68(1):36–44, 2004.
- [76] Judith A Juhasz and Serena M Best. Bioactive ceramics: processing, structures and properties. *Journal of Materials Science*, 47(2):610–624, 2012.
- [77] Vassilis Karageorgiou and David Kaplan. Porosity of 3d biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials*, 26(27):5474–5491, 2005.
- [78] Gregory J King and Marijke E Holtrop. Actin-like filaments in bone cells of cultured mouse calvaria as demonstrated by binding to heavy meromyosin. *The Journal of cell biology*, 66(2):445–451, 1975.
- [79] Tadashi Kokubo. Bioactive glass ceramics: properties and applications. *Biomaterials*, 12(2):155–163, 1991.
- [80] Tadashi Kokubo, Masazumi Shigematsu, Yukihiro Nagashima, Megumi Tashiro, Takashi Nakamura, Takao Yamamuro, and Shoichiro Higashi. Apatite-and wollastonite-containing glass-ceramics for prosthetic application. 1982.
- [81] Jean-Pierre Kruth, X Wang, Tahar Laoui, and Ludo Froyen. Lasers and materials in selective laser sintering. *Assembly Automation*, 2003.
- [82] Panjian Li, Chikara Ohtsuki, Tadashi Kokubo, Kazuki Nakanishi, Naohiro Soga, Takashi Nakamura, and Takao Yamamuro. Apatite formation induced by silica gel in a simulated body fluid. *Journal of the American Ceramic Society*, 75(8):2094–2097, 1992.

- [83] Qihai Liu, Lian Cen, Shuo Yin, Lei Chen, Guangpeng Liu, Jiang Chang, and Lei Cui. A comparative study of proliferation and osteogenic differentiation of adipose-derived stem cells on akermanite and  $\beta$ -tcp ceramics. *Biomaterials*, 29(36):4792–4799, 2008.
- [84] Renjiang Lü, Wei Zhou, Keying Shi, Ying Yang, Lei Wang, Kai Pan, Chungui Tian, Zhiyu Ren, and Honggang Fu. Alumina decorated tio 2 nanotubes with ordered mesoporous walls as high sensitivity no x gas sensors at room temperature. *Nanoscale*, 5(18):8569–8576, 2013.
- [85] Andrea Lucke, Jörg Teßmar, Edith Schnell, Georg Schmeer, and Achim Göpferich. Biodegradable poly (d, l-lactic acid)-poly (ethylene glycol)-monomethyl ether diblock copolymers: structures and surface properties relevant to their use as biomaterials. *Biomaterials*, 21(23):2361–2370, 2000.
- [86] Simon R MacNeill, Charles M Cobb, John W Rapley, Alan G Glaros, and Paulette Spencer. In vivo comparison of synthetic osseous graft materials: a preliminary study. *Journal of Clinical Periodontology*, 26(4):239–245, 1999.
- [87] Carlo Mangano, Enrico G Bartolucci, and Carlo Mazzocco. A new porous hydroxyapatite for promotion of bone regeneration in maxillary sinus augmentation: clinical and histologic study in humans. *International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, 18(1), 2003.
- [88] Ivan Martin, David Wendt, and Michael Heberer. The role of bioreactors in tissue engineering. *TRENDS in Biotechnology*, 22(2):80–86, 2004.
- [89] RB Martin, MW Chapman, NA Sharkey, SL Zissimos, B Bay, and EG Shors. Bone ingrowth and mechanical properties of coralline hydroxyapatite 1 yr after implantation. *Biomaterials*, 14(5):341–348, 1993.
- [90] Alan D McNaught, Andrew Wilkinson, et al. *Compendium of chemical terminology*, volume 1669. Blackwell Science Oxford, 1997.
- [91] Y Miake, T Yanagisawa, Y Yajima, H Noma, N Yasui, and T Nonami. High-resolution and analytical electron microscopic studies of new crystals induced by a bioactive ceramic (diopside). *Journal of dental research*, 74(11):1756–1763, 1995.
- [92] Aneta J Mieszawska and David L Kaplan. Smart biomaterials-regulating cell behavior through signaling molecules. *BMC biology*, 8(1):59, 2010.

- [93] Živko Mladenović, Anders Johansson, Britta Willman, Kaveh Shahabi, Erik Björn, and Maria Ransjö. Soluble silica inhibits osteoclast formation and bone resorption in vitro. *Acta biomaterialia*, 10(1):406–418, 2014.
- [94] Toru NONAMI. In vivo and in vitro testing of diopside for biomaterial. *Journal of the Society of Materials Engineering for Resources of Japan*, 8(2):12–18, 1996.
- [95] Fergal J O’Brien. Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. *Materials today*, 14(3):88–95, 2011.
- [96] K Ohura, T Nakamura, T Yamamuro, Y Ebisawa, T Kokubo, Y Kotoura, and M Oka. Bioactivity of  $\text{CaO-SiO}_2$  glasses added with various ions. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 3(2):95–100, 1992.
- [97] Kouichiro Ohura, Minoru Ikenaga, Takashi Nakamura, Takao Yamamuro, Yukihiro Ebisawa, Tadashi Kokubo, Yoshihiko Kotoura, and Masanori Oka. A heat-generating bioactive glass-ceramic for hyperthermia. *Journal of Applied Biomaterials*, 2(3):153–159, 1991.
- [98] Hironobu Oonishi, Shoichi Kushitani, Eiichi Yasukawa, Hiroyoshi Iwaki, Larry L Hench, June Wilson, Eiji Tsuji, and Tomihito Sugihara. Particulate bioglass compared with hydroxyapatite as a bone graft substitute. *Clinical orthopaedics and related research*, (334):316–325, 1997.
- [99] Luca Di Palma. *Tecnologia dei materiali e chimica applicata*. Esculapio, 2017.
- [100] Oscar Peitl, Edgar Dutra Zanotto, and Larry L Hench. Highly bioactive  $\text{P}_2\text{O}_5\text{-Na}_2\text{O-CaO-SiO}_2$  glass-ceramics. *Journal of Non-Crystalline Solids*, 292(1-3):115–126, 2001.
- [101] F Pernot, J Zarzycki, F Bonnel, P Rabischong, and P Baldet. New glass-ceramic materials for prosthetic applications. *Journal of Materials Science*, 14(7):1694–1706, 1979.
- [102] Magdaléna Precnerová, Katarína Bodišová, Františka Frajkorová, Dagmar Galusková, Zuzana Varchulová Nováková, Ján Vojtaššák, Zoltán Lenčేశ, and Pavol Šajgalík. In vitro bioactivity of silicon nitride-hydroxyapatite composites. *Ceramics International*, 41(6):8100–8108, 2015.
- [103] John L Provis and Susan A Bernal. Geopolymers and related alkali-activated materials. *Annual Review of Materials Research*, 44:299–327, 2014.



- [104] Mohamed N Rahaman, Delbert E Day, B Sonny Bal, Qiang Fu, Steven B Jung, Lynda F Bonewald, and Antoni P Tomsia. Bioactive glass in tissue engineering. *Acta biomaterialia*, 7(6):2355–2373, 2011.
- [105] SA Redey, S Razzouk, C Rey, D Bernache-Assollant, G Leroy, M Nardin, and G Cournot. Osteoclast adhesion and activity on synthetic hydroxyapatite, carbonated hydroxyapatite, and natural calcium carbonate: relationship to surface energies. *Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials*, 45(2):140–147, 1999.
- [106] Chiara Renghini, Alessandra Giuliani, Serena Mazzoni, Francesco Brun, Emanuel Larsson, Francesco Baino, and Chiara Vitale-Brovarone. Microstructural characterization and in vitro bioactivity of porous glass-ceramic scaffolds for bone regeneration by synchrotron radiation x-ray microtomography. *Journal of the European Ceramic Society*, 33(9):1553–1565, 2013.
- [107] Kurosh Rezwan, QZ Chen, J Ju Blaker, and Aldo Roberto Boccaccini. Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*, 27(18):3413–3431, 2006.
- [108] Acacio Rincón, Giovanni Giacomello, Marco Pasetto, and Enrico Bernardo. Novel ‘inorganic gel casting’ process for the manufacturing of glass foams. *Journal of the European Ceramic Society*, 37(5):2227–2234, 2017.
- [109] JC Roldán, T Klünter, P Schulz, R Detsch, U Deisinger, C Dietz, P Proff, G Ziegler, and TE Reichert. Effect of bmp-7 on degradation and resorption of different calcium phosphate ceramics as well as on bone formation in an ectopic minipig model. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 40(10):e15–e16, 2011.
- [110] C Ruiz-Santaquiteria, A Fernández-Jiménez, and A Palomo. Alternative prime materials for developing new cements: Alkaline activation of alkali aluminosilicate glasses. *Ceramics international*, 42(8):9333–9340, 2016.
- [111] Michael Scheffler and Paolo Colombo. *Cellular ceramics: structure, manufacturing, properties and applications*. John Wiley & Sons, 2006.
- [112] Hermann Seitz, Ulrike Deisinger, Barbara Leukers, Rainer Detsch, and Günter Ziegler. Different calcium phosphate granules for 3-d printing of bone tissue engineering scaffolds. *Advanced Engineering Materials*, 11(5):B41–B46, 2009.

- [113] Pilar Sepulveda, Julian R Jones, and Larry L Hench. Characterization of melt-derived 45s5 and sol-gel-derived 58s bioactive glasses. *Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*, 58(6):734–740, 2001.
- [114] Richard Skalak and C Fred Fox. *Tissue engineering: proceedings of a workshop, held at Granlibakken, Lake Tahoe, California, February 26-29, 1988*, volume 107. Alan R. Liss, 1988.
- [115] Andre R Studart, Urs T Gonzenbach, Elena Tervoort, and Ludwig J Gauckler. Processing routes to macroporous ceramics: a review. *Journal of the American Ceramic Society*, 89(6):1771–1789, 2006.
- [116] Hongli Sun, Chengtie Wu, Kerong Dai, Jiang Chang, and Tingting Tang. Proliferation and osteoblastic differentiation of human bone marrow-derived stromal cells on akermanite-bioactive ceramics. *Biomaterials*, 27(33):5651–5657, 2006.
- [117] K Suzuki, K Aoki, and K Ohya. Effects of surface roughness of titanium implants on bone remodeling activity of femur in rabbits. *Bone*, 21(6):507–514, 1997.
- [118] James C Taylor, Sheldon E Cuff, James PL Leger, Amani Morra, and Gail I Anderson. In vitro osteoclast resorption of bone substitute biomaterials used for implant site augmentation: a pilot study. *International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, 17(3), 2002.
- [119] Steven L Teitelbaum. Bone resorption by osteoclasts. *Science*, 289(5484):1504–1508, 2000.
- [120] Debra J Trantolo, Stephen T Sonis, Benjamin MJ Thompson, Donald L Wise, Kai-Uwe Lewandrowski, and David D Hile. Evaluation of a porous, biodegradable biopolymer scaffold for mandibular reconstruction. *International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, 18(2), 2003.
- [121] H Kalervo Väänänen and Haibo Zhao. Osteoclast function: biology and mechanisms. In *Principles of bone biology*, pages 193–209. Elsevier, 2008.
- [122] Patricia Valerio, Marivalda M Pereira, Alfredo M Goes, and M Fatima Leite. The effect of ionic products from bioactive glass dissolution on osteoblast proliferation and collagen production. *Biomaterials*, 25(15):2941–2948, 2004.

- [123] María Vallet-Regí, Montserrat Colilla, and Isabel Izquierdo-Barba. Bioactive mesoporous silicas as controlled delivery systems: application in bone tissue regeneration. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 4(1):1–15, 2008.
- [124] Maria Vallet-Regi and José María González-Calbet. Calcium phosphates as substitution of bone tissues. *Progress in solid state chemistry*, 32(1-2):1–31, 2004.
- [125] C Vitale-Brovarone, E Verné, L Robiglio, P Appendino, Francesco Bassi, Germana Martinasso, Giuliana Muzio, and R Canuto. Development of glass–ceramic scaffolds for bone tissue engineering: characterisation, proliferation of human osteoblasts and nodule formation. *Acta Biomaterialia*, 3(2):199–208, 2007.
- [126] Chiara Vitale-Brovarone, Francesco Baino, and Enrica Verné. High strength bioactive glass-ceramic scaffolds for bone regeneration. *Journal of materials science: materials in medicine*, 20(2):643–653, 2009.
- [127] Martin Vogel, Christian Voigt, Ulrich M Gross, and Christian M Müller-Mai. In vivo comparison of bioactive glass particles in rabbits. *Biomaterials*, 22(4):357–362, 2001.
- [128] Jie Wang, Alvaro Goyanes, Simon Gaisford, and Abdul W Basit. Stereolithographic (sla) 3d printing of oral modified-release dosage forms. *International journal of pharmaceutics*, 503(1-2):207–212, 2016.
- [129] Min Wang. Composite scaffolds for bone tissue engineering. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, 2(2):80–84, Jun. 2006.
- [130] Anne Wilson and Andreas Trumpp. Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. *Nature Reviews Immunology*, 6(2):93–106, 2006.
- [131] Chengtie Wu, Jiang Chang, Siyu Ni, and Junying Wang. In vitro bioactivity of akermanite ceramics. *Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*, 76(1):73–80, 2006.
- [132] Ioannis D Xynos, Alasdair J Edgar, Lee DK Buttery, Larry L Hench, and Julia M Polak. Gene-expression profiling of human osteoblasts following treatment with the ionic products of bioglass® 45s5 dissolution. *Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*, 55(2):151–157, 2001.

- [133] Shoufeng Yang, Kah-Fai Leong, Zhaohui Du, and Chee-Kai Chua. The design of scaffolds for use in tissue engineering. part i. traditional factors. *Tissue engineering*, 7(6):679–689, 2001.
- [134] Aihua Yao, Deping Wang, Wenhai Huang, Qiang Fu, Mohamed N Rahaman, and Delbert E Day. In vitro bioactive characteristics of borate-based glasses with controllable degradation behavior. *Journal of the American Ceramic Society*, 90(1):303–306, 2007.
- [135] Alan W Yasko, JM Lane, EJ Fellingner, V Rosen, JM Wozney, and EA Wang. The healing of segmental bone defects, induced by recombinant human bone morphogenetic protein (rhbmp-2). a radiographic, histological, and biomechanical study in rats. *The Journal of bone and joint surgery. American volume*, 74(5):659–670, 1992.
- [136] Wai-Yee Yeong, Chee-Kai Chua, Kah-Fai Leong, and Margam Chandrasekaran. Rapid prototyping in tissue engineering: challenges and potential. *TRENDS in Biotechnology*, 22(12):643–652, 2004.
- [137] Zi Yin, Xiao Chen, Jia Lin Chen, Wei Liang Shen, Thi Minh Hieu Nguyen, Ling Gao, and Hong Wei Ouyang. The regulation of tendon stem cell differentiation by the alignment of nanofibers. *Biomaterials*, 31(8):2163–2175, 2010.
- [138] Takafumi Yoshikawa, Hajime Ohgushi, and Susumu Tamai. Immediate bone forming capability of prefabricated osteogenic hydroxyapatite. *Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials and The Japanese Society for Biomaterials*, 32(3):481–492, 1996.
- [139] YM Zhao, YM Zhang, YT Zhao, YR Cai, F Monchau, A Lefevre, and HF Hildebrand. Osteoclast behaviour on synthetic bioglasses with different crystallinity in vitro. *BIOmaterialien*, 6(4):281–286, 2005.