

UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
DI PADOVA



**DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA DELL'INFORMAZIONE**

**CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN  
BIOINGEGNERIA**

***“SINTESI E STAMPA 3D DI SCAFFOLDS A BASE  
DI BIOVETRI SILICO-SODICO-CALCICI  
SUPPORTATE DA EMULSIONI IN POLIMERO  
PRECERAMICO”***

**Relatore: PROFESSOR BERNARDO ENRICO**

**Correlatore: ELSAYED HAMADA SAID**

**LAUREANDO: PETTENUZZO MARCO**

**ANNO ACCADEMICO 2021-2022**

**Data di laurea: 13/12/2022**



# INDICE

<b>CAPITOLO 1.....</b>	<b>1</b>
<b>INTRODUZIONE .....</b>	<b>1</b>
<b>CAPITOLO 2 .....</b>	<b>3</b>
<b>IL TESSUTO OSSEO .....</b>	<b>3</b>
2.1 INTRODUZIONE AL TESSUTO OSSEO.....	3
2.2 CLASSIFICAZIONE DEL TESSUTO OSSEO .....	4
2.2.1 Osso lamellare e osso a fibre intrecciate .....	4
2.2.2 Ossa lunghe .....	5
2.2.3 Osso corticale e osso trabecolare.....	5
2.3 COMPOSIZIONE CELLULARE .....	8
2.3.1 Osteoblasti e cellule di rivestimento osseo.....	8
2.3.2 Osteociti .....	9
2.3.3 Osteoclasti .....	10
2.4 MATRICE EXTRACELLULARE.....	11
2.4.1 Matrice extracellulare inorganica .....	11
2.4.2 Matrice extracellulare organica .....	12
2.4.3 Mineralizzazione e riassorbimento.....	14
2.5 GUARIGIONE DELLA FRATTURA OSSEA .....	15
2.5.1 Risposta infiammatoria.....	16
2.5.2 Formazione del callo morbido.....	17
2.5.3 Formazione del callo duro .....	18
2.5.4 Rimodellamento osseo.....	19
<b>CAPITOLO 3 .....</b>	<b>21</b>
<b>INNESTI E SOSTITUTI OSSEI PER IL TRATTAMENTO DI DIFETTI OSSEI .....</b>	<b>21</b>
3.1 RUOLO E PROPRIETA' DEGLI INNESTI OSSEI .....	21
3.1.1 Osteoconduzione .....	21
3.1.2 Osteoinduzione .....	22
3.1.3 Osteogenesi .....	22

3.2	INNESTI OSSEI NATURALI.....	23
3.2.1	Innesti ossei autologhi .....	23
3.2.2	Innesti ossei allogenici .....	24
3.3	INNESTI OSSEI SINTETICI.....	26
3.3.1	Biomateriali e biocompatibilità .....	26
3.3.2	Solfato di calcio.....	28
3.3.3	Ceramiche a base di fosfato di calcio .....	28
3.3.3.1	Idrossiapatite .....	29
3.3.3.2	Fosfato tricalcico.....	29
3.3.4	Vetro bioattivo.....	30
3.3.5	Cementi di fosfato di calcio .....	31
3.3.6	Cementi ossei in polimetilmetacrilato.....	32
<b>CAPITOLO 4 .....</b>		<b>33</b>
<b>IL BIOVETRO.....</b>		<b>33</b>
4.1	STORIA E PROPRIETA' DEL BIOVETRO.....	34
4.2	MECCANISMO DI BIOATTIVITA' DEL BIOVETRO .....	37
4.2.1	Formazione dello strato di HCA .....	38
4.2.2	Prodotti di dissoluzione ionica e osteogenesi .....	40
4.2.3	Influenza dei prodotti di dissoluzione ionica sul ciclo cellulare..	40
4.3	PROCESSI DI FABBRICAZIONE DEI BIOVETRI .....	41
4.4	MECCANICA DEL BIOVETRO.....	44
<b>CAPITOLO 5 .....</b>		<b>47</b>
<b>TECNOLOGIE DI MANIFATTURA ADDITIVA PER MATERIALI</b>		
<b>CELLULARI AVANZATI .....</b>		<b>47</b>
5.1	STEREOLITOGRAFIA .....	47
5.2	ELABORAZIONE DELLA LUCE DIGITALE .....	49
5.3	POLIMERIZZAZIONE A DUE FOTONI.....	50
5.4	SCRITTURA AD INCHIOSTRO DIRETTO .....	51
5.5	MODELLAZIONE A DEPOSIZIONE FUSA.....	52
5.6	STRUTTURE CELLULARI .....	53
5.6.1	Il modello Gibson-Ashby .....	55

<b>CAPITOLO 6</b> .....	<b>57</b>
<b>MATERIALI E METODI</b> .....	<b>57</b>
6.1 CERAMICHE DERIVATE DA POLIMERI.....	57
6.2 PROCEDURA SPERIMENTALE.....	60
6.2.1 Materiali di partenza e creazione delle miscele.....	60
6.2.2 Stampa e trattamento termico degli scaffolds .....	62
6.2.3 Caratterizzazione degli scaffolds.....	67
<b>CAPITOLO 7</b> .....	<b>69</b>
<b>RISULTATI E DISCUSSIONE</b> .....	<b>69</b>
7.1 RESISTENZA A COMPRESSIONE.....	69
7.1.1 Misure di densità e porosità.....	69
7.1.2 Prove di compressione.....	74
7.2 ANALISI DELLA COMPOSIZIONE DI FASE .....	76
7.2.1 Spettroscopia a raggi X.....	76
7.2.2 Spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier.....	80
7.2.3 Spettroscopia Raman .....	81
7.3 CARATTERIZZAZIONE MICROSTRUTTURALE E MORFOLOGICA. ....	85
7.3.1 Microscopia ottica .....	85
7.3.2 Microscopia elettronica a scansione .....	88
7.4 ANALISI DELLE CARATTERISTICHE BIOLOGICHE.....	98
7.4.1 Studio dell'evoluzione del pH .....	98
7.4.2 Effetto fototermico .....	100
<b>CAPITOLO 8</b> .....	<b>105</b>
<b>CONCLUSIONI</b> .....	<b>105</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	<b>109</b>



# CAPITOLO 1: INTRODUZIONE

Il tessuto osseo è un tessuto connettivo specializzato e rappresenta una impalcatura per il sostegno e la protezione di molti organi, è indispensabile per il movimento, per la riserva di minerali utili all'organismo ed è la principale fonte di cellule staminali mesenchimali.

Il tessuto osseo possiede grandi capacità dinamiche, tanto che si rinnova costantemente ed ha notevoli proprietà rigenerative. Purtroppo, spesso si verificano situazioni in cui si deve fornire assistenza per consentire all'osso di guarire, ricorrendo spesso all'innesto osseo per fornire un ambiente per promuovere la guarigione e la riparazione dell'osso, tanto che ogni anno vengono eseguiti più di 1 milione di interventi chirurgici con innesti ossei in tutto il mondo.

Sono disponibili molte forme di innesto osseo, tra le quali l'innesto osseo autologo è considerato il gold standard nel trattamento dei difetti ossei, il quale però possiede degli svantaggi tra i quali la disponibilità del materiale, e complicazioni come dolore, possibile infezione, tempi operativi, processo di prelievo ecc....

I biomateriali sintetici offrono un'alternativa agli innesti ossei naturali, rivoluzionando il campo dell'ingegneria biomedica grazie alle loro caratteristiche. I vetri bioattivi scoperti da L.L. Hench rappresentano una valida alternativa agli innesti ossei naturali come biomateriali di terza generazione poiché sono in grado di stimolare una risposta benefica da parte dell'organismo, legandosi al tessuto osseo subendo una dissoluzione progressiva.

Lo scopo della tesi, infatti, è la creazione di scaffolds a base di biovetri silico-sodico-calcici supportati da emulsioni in polimero preceramico.

I materiali ceramici che possono essere prodotti dalla conversione di precursori polimerici (polimeri preceramici) sono diventati particolarmente interessanti negli ultimi due decenni. La possibilità di manipolare i precursori di queste ceramiche nella fase polimerica offre la possibilità di modellare forme complesse utilizzando tecniche proprie dei polimeri. Le caratteristiche favorevoli dei polimeri preceramici, come le resine siliconiche, sono le basse temperature di lavorazione, la disponibilità commerciale e la possibilità di utilizzare appunto tecniche di lavorazione polimeriche.

Le miscele di biovetro prodotte seguono 2 composizioni diverse: 70S15C15N (70% SiO<sub>2</sub> - 15% Na<sub>2</sub>O - 15% CaO (wt %)) e 50S25C25N (50% SiO<sub>2</sub> - 25% Na<sub>2</sub>O - 25% CaO (wt %)), create

dosando in modo diverso gli ossidi di silice, sodio e calcio. Verranno perciò valutate le differenze tra le composizioni e tra i precursori di ossidi utilizzati.

Gli scaffolds creati seguono 2 geometrie di strutture cellulari differenti (giroide e diamante) create per mezzo di stampa 3D (stereolitografia mascherata) tramite resina fotopolimerizzante. Gli scaffolds così creati sono stati in seguito trattati termicamente in atmosfera inerte a 700 °C.

I siliceni offrono un'opportunità senza precedenti per la sintesi diretta di nano compositi vetroceramici contenenti carbonio. Se trattati in atmosfera non ossidante, i siliceni si trasformano in nanocompositi SiOC, costituiti da nano-fogli di carbonio incorporati in una matrice di vetro di silice.

La tesi inizia quindi con una descrizione dell'importanza e delle funzioni del tessuto osseo, per poi trattare il ruolo e le proprietà dei vari innesti e sostituti ossei per il trattamento dei difetti ossei come gli innesti naturali (autologhi e autogeni) e sintetici (bioceramiche e cementi ossei).

Vengono poi approfondite le caratteristiche, funzioni e meccanismo di bioattività dei vetri bioattivi. Successivamente vengono descritte la creazione, la stampa e la cottura degli scaffolds di biovetro prodotti, concludendo con la caratterizzazione di questi. Le prove di compressione hanno permesso di studiare la risposta meccanica, la microstruttura e la morfologia sono state indagate per mezzo di microscopia ottica ed elettronica a scansione, mentre la composizione di fase è stata studiata mediante analisi di spettroscopia a raggi X, Raman e a trasformata di Fourier. Infine, sono state eseguite prove d'ambito biologico come l'analisi di evoluzione del pH e valutazione dell'effetto fototermico.

# CAPITOLO 2: IL TESSUTO OSSEO

## 2.1 INTRODUZIONE AL TESSUTO OSSEO

Il tessuto osseo è un tessuto connettivo specializzato, che costituisce lo scheletro e la struttura di base del nostro corpo, ed ha diverse funzioni, tra cui il supporto meccanico, l'immagazzinamento di minerali, la produzione di cellule del sangue e la protezione di organi interni come il cervello, il midollo spinale, i polmoni e il cuore. L'osso è anche la principale fonte di cellule staminali mesenchimali dell'organismo. La struttura rigida dell'osso fornisce siti di attacco per i muscoli scheletrici che aiutano il movimento. Allo stesso tempo, la sua elasticità impedisce alle ossa di fratturarsi. La forma delle ossa, definite piatte, lunghe, corte e irregolari, determina anche la loro funzione e attività.

Le ossa lunghe hanno una dimensione maggiore e presentano un fusto chiamato diafisi e due estremità chiamate epifisi. La parte più ampia dell'osso tra l'epifisi e la diafisi è nota come metafisi e la grande cavità piena di midollo osseo è chiamata cavità midollare. Il diametro e la lunghezza delle ossa corte sono quasi uguali. Di solito creano articolazioni mobili per altre ossa vicine, come nel polso e nella caviglia del piede. Le ossa piatte sono relativamente spesse perché hanno due strati. Le ossa irregolari non hanno una forma regolare che si adatta agli altri gruppi [2], [4].

Il tessuto osseo è estremamente dinamico e plastico. In particolare, modula la sua struttura in seguito a stimoli organici e meccanici ed è costituito da una parte organica e una inorganica. La parte organica è costituita da cellule specifiche del tessuto osseo, responsabili della crescita, della produzione e del riassorbimento del tessuto stesso, nonché della matrice extracellulare. D'altra parte, numerosi sali minerali come fosfati di calcio, magnesio e citrati di Na, Mn, K, costituiscono la parte inorganica. Le ossa subiscono un rimodellamento fisiologico necessario per la guarigione delle fratture e l'adattamento dello scheletro all'uso meccanico, nonché per l'omeostasi del calcio [7].

Il tessuto osseo possiede un'architettura gerarchica: osso trabecolare e corticale (macrostruttura); sistemi haversiani (microstruttura, da 10 a 500  $\mu\text{m}$ ), osteoni, singole trabecole; comprendente le lamelle (sottomicrostruttura, 1-10  $\mu\text{m}$ ); collagene fibrillare e minerale incorporato (nanostruttura, da poche centinaia di nanometri a 1  $\mu\text{m}$ ) e la struttura molecolare

degli elementi costitutivi, come minerali, collagene e proteine organiche non collagene (sottonanostruttura, al di sotto di poche centinaia di nanometri).

Questa struttura gerarchicamente organizzata presenta una disposizione e un orientamento irregolari, ma ottimizzati, dei componenti, rendendo il materiale dell'osso eterogeneo e anisotropo (Figura 1.1) [8].

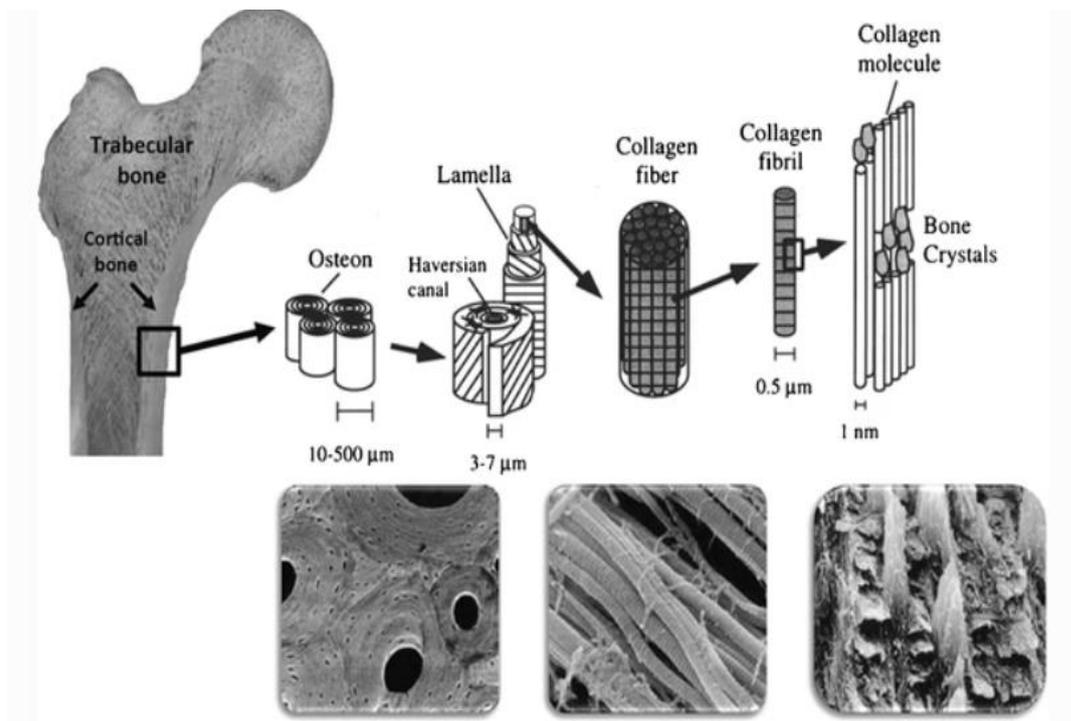


Fig. 1.1: Struttura gerarchica dell'osso dalla macro (pannello di sinistra) alla sub-nanostruttura (pannello di destra) e relative micrografie in situ con microscopia elettronica [7].

## 2.2 CLASSIFICAZIONE DEL TESSUTO OSSEO

### 2.2.1 Osso lamellare e osso a fibre intrecciate

L'osso esiste in due forme, l'osso lamellare e l'osso a fibre intrecciate. L'osso a fibre intrecciate è una forma immatura con fibre di collagene disposte casualmente all'interno dell'osteide. L'osso lamellare è invece composto di bande regolari e parallele di collagene disposte a formare foglietti.

L'osso a fibre intrecciate si forma quando gli osteoblasti producono l'osteide rapidamente. Come durante lo sviluppo osseo fetale e nell'adulto quando si verificano ripidi accrescimenti ossei a seguito di processi patologici come fratture. L'osso a fibre intrecciate può andare incontro a successivo rimodellamento per formare l'osso lamellare che è molto più resistente. Virtualmente tutto il tessuto osseo dell'adulto è lamellare [12].

### **2.2.2 Ossa lunghe**

L'osso compatto forma il fusto delle ossa lunghe, o diafisi, mentre l'osso spugnoso occupa parte della larga cavità midollare centrale. L'osso spugnoso è formato da una rete di fini, irregolari lamine chiamate trabecole, separate da spazi intercomunicanti.

Negli animali immaturi, la cavità midollare della maggior parte delle ossa contiene midollo attivo (rosso) responsabile della produzione degli elementi cellulari del sangue. Nell'adulto, il midollo attivo è limitato a pochi siti; le cavità midollari delle altre ossa sono riempite di midollo inattivo (giallo) composto principalmente da tessuto adiposo.

Le superfici articolari delle estremità arrotondate, o epifisi, delle ossa lunghe sono protette da uno strato di cartilagine ialina specializzata, la cartilagine articolare. La superficie esterna dell'osso è rivestita da uno strato di connettivo denso, il periostio, su cui sono inseriti muscoli, tendini e legamenti. La superficie interna dell'osso, comprese le trabecole dell'osso spugnoso, è rivestita da un delicato strato di tessuto connettivo chiamato endostio. L'endostio e il periostio contengono cellule della serie osteogenica, responsabili della crescita, del rimodellamento e della riparazione delle fratture ossee.

Prima del raggiungimento della maturità scheletrica, le ossa lunghe si accrescono lungo il loro asse maggiore, cioè in lunghezza, attraverso il processo di ossificazione endocondrale; tale processo di crescita si sviluppa a livello della piastra di crescita o piastra epifisaria che è situata ad ogni estremità dell'osso nel punto di unione della diafisi con l'epifisi. La metafisi è definita come la giunzione tra la diafisi e la piastra di crescita [6], [12].

### **2.2.3 Osso corticale ed osso trabecolare**

L'osso corticale (osso compatto) è formato da colonne ossee parallele che, nelle ossa lunghe, sono disposte parallelamente all'asse maggiore dell'osso, cioè su una linea in cui viene esercitato

il carico. Ogni colonna è formata da strati concentrici o Lamelle disposte intorno a canali centrali che contengono vasi ematici e linfatici e nervi. I canali neurovascolari sono chiamati canali di Havers o canali Haversiani; essi, insieme con le loro lamelle concentriche, formano sistemi Haversiani. I fasci neurovascolari comunicano l'uno con l'altro e con l'endostio e il periostio per mezzo dei canali di Volkmann, che percorrono le colonne ad angolo retto ed obliquamente rispetto ai canali di Havers.

Ogni sistema Haversiano inizia come un ampio canale alla cui periferia gli osteoblasti sono situati lungo le lamelle ossee. Con la deposizione delle successive lamelle, il diametro dei canali Haversiani diminuisce e gli osteoblasti sono confinati come osteociti in spazi chiamati lacune, nella matrice. Gli osteociti sono disposti in anelli concentrici entro le lamelle. Tra le lacune adiacenti e il canale centrale ci sono numerosi, piccoli canali di connessione, chiamati canalicoli, che contengono fini estensioni citoplasmatiche degli osteociti.

Come risultato del continuo riassorbimento e rideposizione dell'osso, sistemi Haversiani completi, di nuova formazione, sono disposti tra sistemi parzialmente riassorbiti, precedentemente formati. Le lamelle che non circondano più i canali di Havers formano sistemi interstiziali irregolari tra i sistemi Haversiani intatti e costituiscono la cosiddetta breccia ossea (Figura 1.2).

Alla superficie dell'osso compatto, i sistemi Haversiani danno origine a lamelle concentriche di osso corticale denso, deposto dagli osteoblasti del periostio. A livello della midollare, lamelle circonferenziali simili ma irregolari si uniscono alle trabecole dell'osso spugnoso [6], [12].

L'osso maturo (osso lamellare) può essere quindi classificato in base alla sua porosità e densità. L'osso, quindi, esiste in due forme: corticale (osso compatto) e trabecolare (osso spugnoso).

L'osso corticale è un tessuto connettivo organizzato in strati o fogli regolari di tessuto chiamati lamelle. Lo spessore e la forma delle lamelle possono cambiare da osso a osso e dalla posizione dell'osso. Le ossa portanti, come il femore, hanno un maggior numero di lamelle e sono più spesse rispetto alle ossa degli arti superiori, meno portanti, infatti, in una sezione trasversale, queste lamelle sono più spesse nei siti portanti. Anche le fibre di collagene nelle lamelle sono organizzate in modo regolare; sono di forma circolare e resistono molto bene ai carichi fisiologici. Il tessuto osseo corticale è localizzato principalmente nello strato esterno delle ossa lunghe che formano l'asta e nella parte interna dell'osso trabecolare alle estremità prossimali e distali del tessuto osseo. Inoltre, costituisce circa l'80% della massa totale dello scheletro del nostro corpo.

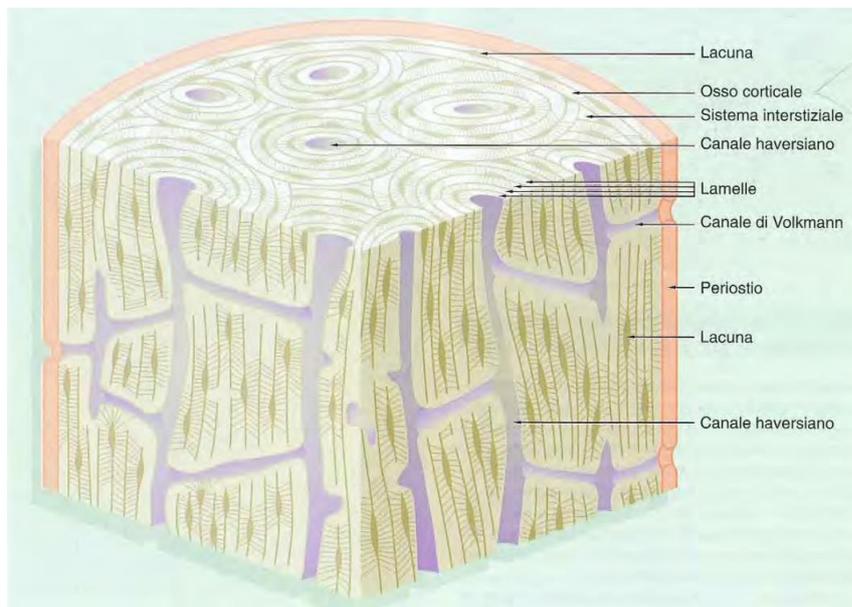


Fig. 1.2: Rappresentazione schematica di una sezione di osso compatto [12].

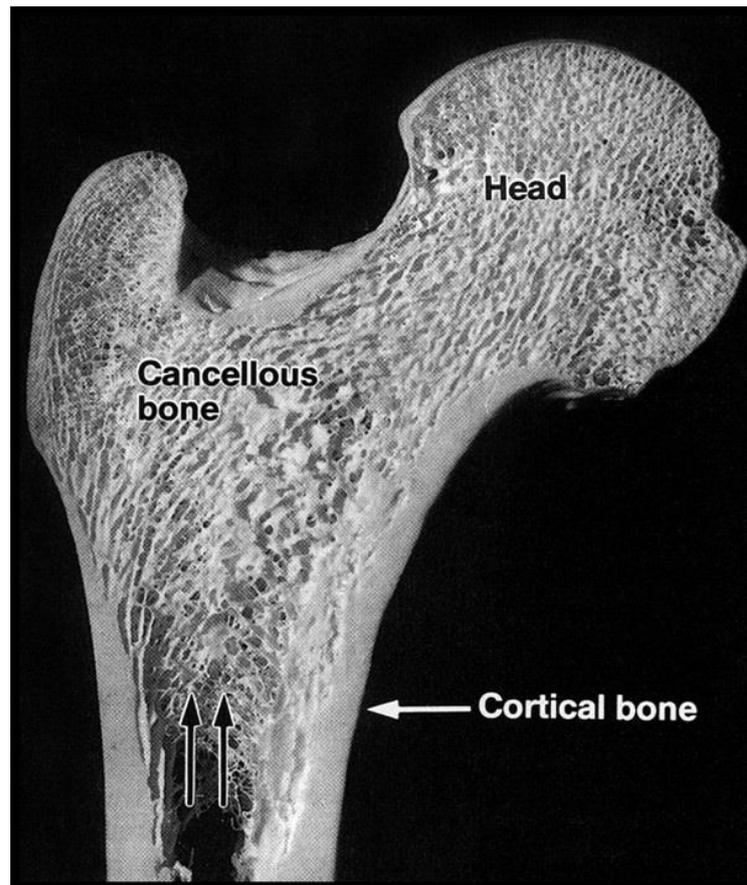


Fig. 1.3: Sezione ossea del femore prossimale nel piano frontale che illustra l'osso corticale e trabecolare [2].

L'osso trabecolare è un tessuto connettivo in cui le lamelle, quindi le fibre di collagene, sono disposte in modo irregolare. Le trabecole contenenti lamelle si interconnettono tra loro per formare una rete di tessuto trabecolare. L'osso trabecolare si trova all'interno della metafisi, dell'epifisi e della cavità midollare all'estremità delle ossa lunghe e anche nelle ossa corte. L'attività metabolica, come la produzione di cellule ossee e lo scambio di minerali, è maggiore nell'osso trabecolare rispetto all'osso corticale.

L'osso corticale ha una densità maggiore o una porosità minore (circa il 10 % di porosità) rispetto l'osso trabecolare, mentre l'osso trabecolare ha una densità minore o una porosità maggiore (dal 50 al 90 % di porosità) rispetto l'osso corticale [2], [4], [8].

## **2.3 COMPOSIZIONE CELLULARE**

I 4 elementi cellulari dell'osso sono: osteoblasti, osteociti, cellule di rivestimento osseo e osteoclasti. È stata sviluppata anche una classificazione cellulare più semplice che consiste in cellule che formano l'osso e cellule che lo riassorbono. Un'ulteriore differenziazione delle cellule ossee si basa sulla loro origine: gli osteoblasti, gli osteociti e le cellule di rivestimento osseo hanno origine da cellule staminali mesenchimali note come cellule osteoprogenitrici, mentre gli osteoclasti hanno origine da cellule staminali emopoietiche. Anche la localizzazione di queste cellule varia. Le cellule ossee che si trovano lungo la superficie dell'osso comprendono osteoblasti, osteoclasti e cellule di rivestimento osseo, mentre gli osteociti sono situati all'interno dell'osso [2].

### **2.3.1 Osteoblasti e cellule di rivestimento osseo**

Come indicato in precedenza, gli osteoblasti derivano da cellule mesenchimali indifferenziate che si trovano nel midollo, nell'endostio, nel periostio e nei canali ossei. Queste cellule, definite anche "preosteoblasti", possono migrare dal tessuto circostante o attraverso il sistema vascolare. Le cellule mesenchimali hanno una forma stellata, contengono quantità relativamente piccole di citoplasma e organuli e possiedono un singolo nucleo. La differenziazione e la proliferazione delle cellule mesenchimali in osteoblasti avvengono durante la formazione dell'osso intramembranoso ed endocondrale. Queste robuste cellule sono strettamente impacchettate lungo i rivestimenti superficiali dell'osso. Quando sono attivi, gli osteoblasti sono ovali e

contengono grandi quantità di reticoli endoplasmatici ruvidi (RER), mitocondri e apparato di Golgi. Il nucleo singolo si trova al centro della cellula. Altri componenti microscopici presenti in queste cellule sono i mitocondri, i microtubuli, i microfilamenti, i lisosomi, il glicogeno e i lipidi. Dal punto di vista funzionale, l'osteoblasto è responsabile della produzione della matrice organica, composta da proteine e polisaccaridi.

È provato che gli osteoblasti, sotto l'influenza dell'ormone paratiroideo e delle citochine locali, rilasciano mediatori che attivano gli osteoclasti.

Gli osteoblasti seguono 1 di 3 percorsi. Queste cellule possono rimanere osteoblasti attivi, essere circondate dalla matrice e diventare osteociti, oppure diventare relativamente inattive e formare cellule di rivestimento osseo. Le cellule di rivestimento osseo sono cellule sottili e allungate che ricoprono la maggior parte delle superfici ossee nello scheletro maturo. Estensioni citoplasmatiche o giunzioni spesso le collegano tra loro o agli osteociti. Essendo metabolicamente inattive, le cellule di rivestimento osseo contengono meno organuli e meno citoplasma degli osteoblasti. A volte vengono definite "osteoblasti a riposo" o "osteociti di superficie" [1], [4], [11].

### **2.3.2 Osteociti**

Si stima che il terzo tipo di cellula, l'osteocita, costituisca oltre il 90% delle cellule ossee di uno scheletro adulto. Come osteociti immaturi, circondati dalla matrice ossea, assomigliano molto agli osteoblasti. Pertanto, il citoplasma contiene grandi quantità di RER e grandi apparati di Golgi e mitocondri, con quantità minori di microtubuli, microfilamenti e lisosomi. Con la maturazione di queste cellule e la deposizione di una maggiore quantità di matrice, gli osteociti si localizzano più in profondità nel tessuto osseo e alla fine diventano più piccoli, poiché perdono citoplasma. Questo spiega l'aspetto allargato del loro nucleo. Inoltre, si trovano all'interno di uno spazio o di una lacuna e presentano lunghi processi citoplasmatici che si proiettano attraverso i canalicoli all'interno della matrice e che contattano i processi delle cellule adiacenti. Questi processi di connessione sono ritenuti estremamente importanti per la comunicazione e la nutrizione cellulare all'interno di una matrice mineralizzata. Inoltre, si ritiene che questa importante rete cellulare consenta scambi di minerali mediati dalle cellule tra i fluidi dell'osso [1], [4].

### 2.3.3 Osteoclasti:

Il quarto componente cellulare dell'osso è l'osteoclasto. Questa cellula gigante e multinucleata è responsabile del riassorbimento osseo sia in condizioni normali che patologiche. Morfologicamente, gli osteoclasti tendono a essere molto più grandi delle altre cellule ossee e sono generalmente localizzati sulla superficie dell'osso. Si sa che sono molto mobili, si spostano da vari siti e lungo la superficie dell'osso, e si pensa che questa motilità spieghi l'aspetto variabile di queste cellule.

I nuclei degli osteoclasti, che sono in media tra 3 e 20, tendono a essere ovali e concentrati a metà cellula. La presenza di RER è minore rispetto agli osteoblasti, il che è coerente con la diminuzione della produzione e della secrezione di proteine. I mitocondri sono più numerosi negli osteoclasti rispetto a qualsiasi altro tipo di cellula dell'organismo. Tra i nuclei si trovano vescicole di materiale del Golgi, in numero relativamente ridotto. Sono presenti molti vacuoli di tipo lisosomiale, che portano alla comune descrizione del citoplasma come "schiumoso". La membrana plasmatica dell'osteoclasto attivo ha un aspetto ripiegato, noto come bordo arruffato. Le profonde pieghe di questo bordo danno luogo a proiezioni della cellula simili ad appendici, che possono avvolgere le prominente ossee o adagiarsi lungo la superficie. L'ampia superficie della membrana consente potenzialmente un ampio scambio tra l'ambiente intracellulare e quello extracellulare [1], [4], [11].

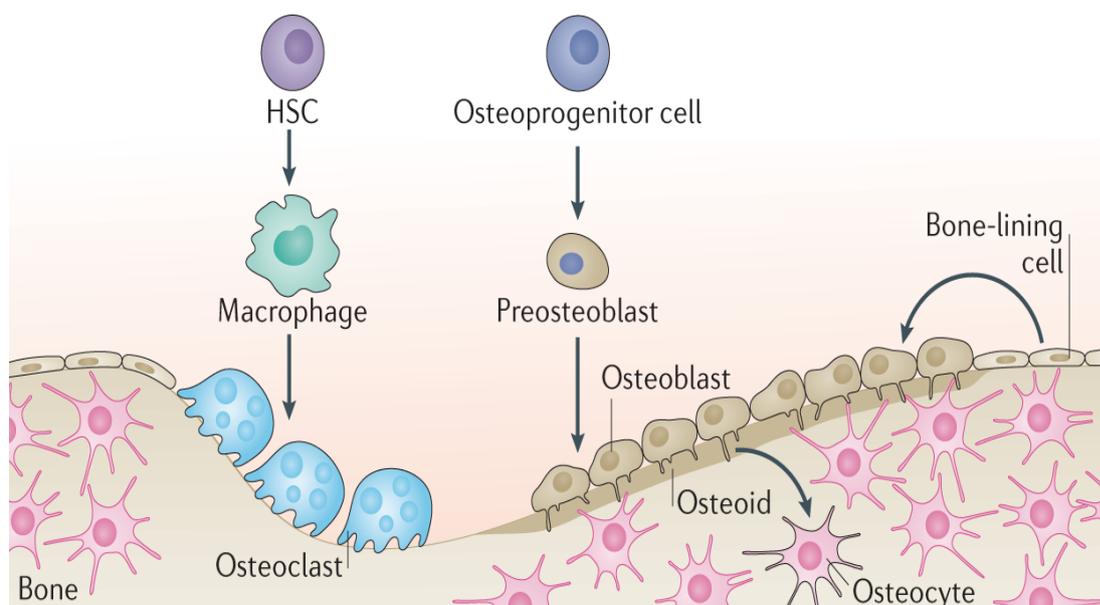


Fig. 1.4: Schema riassuntivo dell'omeostasi ossea, ottenuta attraverso l'attività di osteoblasti, osteoclasti, osteociti e cellule di rivestimento osseo [11].

## 2.4 MATRICE EXTRACELLULARE

La matrice ossea costituisce di solito più del 90% del volume del tessuto, mentre il resto è costituito principalmente da cellule, processi cellulari e vasi sanguigni.

La matrice ossea è un materiale composto da una componente organica e una inorganica.

### 2.4.1 Matrice extracellulare inorganica

La matrice inorganica o fase minerale dell'osso ha due importanti funzioni. Agisce come un serbatoio di ioni e conferisce all'osso gran parte della sua rigidità e forza. Circa il 99% del calcio nel corpo, circa l'85% del fosforo e il 40-60% del sodio e del magnesio nel corpo sono associati a cristalli minerali ossei.

L'osso aiuta a mantenere le concentrazioni di liquidi extracellulari negli intervalli richiesti per importanti funzioni fisiologiche come la conduzione nervosa e la contrazione muscolare, nonché per le più importanti reazioni biochimiche. I cristalli di fosfato di calcio all'interno creano un materiale resistente con le proprietà meccaniche necessarie per resistere alle forze generate dalla normale attività.

La matrice inorganica dell'osso è costituita principalmente da idrossiapatite di calcio ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ) con piccole quantità di ioni bicarbonato, magnesio, potassio, sodio e citrato. Gli ioni di fosfato di calcio ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ) esistono anche come cristalli di idrossiapatite. Tutti i minerali danno forza al tessuto osseo. Infatti, una diminuzione del livello di minerali nel tessuto osseo porta ad una diminuzione del modulo e della forza dell'osso e ad un aumento del rischio di fratture [3], [4].

I cristalli di osso possono essere rappresentati da tre scomparti: (1) il fluido circostante, (2) lo strato di idratazione, (3) il nucleo di apatite.

Gli ioni dello strato idratato sono estremamente instabili e reattivi e formano domini non apatitici ( $(\text{HPO}_4)^{2-}$ ,  $(\text{PO}_4)^{3-}$ ,  $(\text{CO}_3)^{2-}$ ). Sono prontamente e reversibilmente scambiabili e, man mano che il minerale matura, una diminuzione dell'ambiente labile non apatitico è associata ad un aumento dell'ambiente stabile di apatite (cioè il nucleo di apatite).

La fase minerale del tessuto osseo è metabolicamente attiva per la sua ampia ed elevata superficie specifica (100-200 m<sup>2</sup>/g). Vale a dire che sono possibili varie interazioni tra gli ioni del fluido extracellulare e gli ioni nei cristalli di apatite. Questa capacità di scambiare liquidi e ioni fornisce la formazione iniziale, la crescita, la maturazione e la dissoluzione dei cristalli. Di conseguenza, l'idratazione è essenziale per la matrice ossea appena depositata, che ha un alto contenuto di acqua e scambia costantemente ioni con l'apatite. Successivamente, quando lo spazio si riempie di fasi minerali, il livello dell'acqua scende, gli ioni smettono di diffondersi nell'ambiente e la crescita dei cristalli si interrompe [7].

La presenza di apatite aumenta il modulo elastico e la resistenza del collagene. Al contrario, la matrice organica influisce direttamente sulla velocità di trasferimento del carico alle particelle minerali, impedendone la criccatura del minerale. L'effetto delle proprietà minerali su queste interazioni e il loro effetto sulle proprietà meccaniche è poco conosciuto. La dimensione dei cristalli determina direttamente la superficie su cui avvengono le interazioni tra minerali e collagene. Pertanto, cristalli più lunghi possono ridurre la plasticità dei tessuti e riflettere grandi superfici di interazione, che possono influenzare la mobilità delle molecole di collagene.

La dimensione dei cristalli può variare a seconda di fattori esterni o endogeni come le proprietà della matrice organica, la distribuzione tissutale delle proteine non collagene che influenzano la formazione e la crescita dei cristalli, l'ambiente, la dieta, l'invecchiamento, il tasso di rimodellamento osseo, le condizioni mediche e i farmaci [5].

#### **2.4.2 Matrice extracellulare organica**

La matrice organica extracellulare del tessuto osseo è costituita da una matrice organica fibrosa e da una matrice organica non fibrosa. La matrice delle fibre organiche è composta principalmente da fibre di collagene.

Il collagene è la principale proteina del tessuto connettivo. La struttura più stabile e riarrangiamento del collagene è la tripla elica. L'unità strutturale è rappresentata dal tropocollagene. Il tropocollagene è una proteina formata da tre catene polipeptidiche con una tendenza sinistrorsa ad associarsi per formare una tripla elica destrorsa.

Esistono molti tipi di collagene specifiche e varie proteine con una struttura polipeptidica che sono ampiamente anaboliche per il collagene. Ad oggi, in letteratura sono stati descritti 28 tipi di collagene [3].

Le fibre di collagene di tipo I sono prevalentemente presenti nell'osso ECM. Queste fibre sono prodotte dagli osteoblasti e la loro sintesi avviene sia per via intrinseca che estrinseca. Il collagene fornisce forza e flessibilità alle ossa. Inoltre, non ci sono solo fibre di collagene di tipo I, ma anche fibre di collagene di tipo III, V, XI e XIII. Le molecole di collagene creano una rete di collagene attraverso legami incrociati covalenti, che non solo organizzano la fibrosi, ma promuovono anche la mineralizzazione. Pertanto, le fibre di collagene influenzano le proprietà meccaniche dell'osso [4].

La ECM ossea è costituita anche da un gruppo di aggregati di proteoglicani non fibrillari e glicoproteine poliadesive. La matrice non fibrosa, nota anche come materiale di base dell'osso, svolge un ruolo importante nello sviluppo, nella crescita, nel rimodellamento e nella riparazione dell'osso. Le proteine non fibrillari sono divise in quattro gruppi:

1. I proteoglicani sono composti da una proteina centrale e diversi glicosaminoglicani (GAG come acido ialuronico, cheratan solfato e condroitin solfato) legati in modo covalente come catene laterali. Danno forza alle ossa. Inoltre, controllano il processo di inibizione della mineralizzazione ossea [1], [4], [13].
2. Le glicoproteine poliadesive sono tra i gruppi che servono per attaccare le cellule ossee e le fibre di collagene al materiale sottostante. L'osteonectina è responsabile del legame delle fibre di collagene ai cristalli di HA. Altre glicoproteine poliadesive come le sialoproteine (ad es. OPN e le sialoproteine I e II) controllano l'adesione cellulare e la produzione di fosfato di calcio durante la mineralizzazione [4], [13].
3. Le proteine specifiche dell'osso dipendenti dalla vitamina K possono essere suddivise in tre gruppi: OCN, proteina S e proteina della matrice Gla. L'osteocalcina assorbe il calcio dal flusso sanguigno e stimola gli osteoclasti per il processo di rimodellamento. L'osteocalcina viene rilasciata dagli osteoblasti insieme agli ioni fosfato nelle vescicole della matrice, che promuove la mineralizzazione dell'osso. La proteina S uccide le cellule apoptotiche. La proteina Matrix Gla svolge un ruolo importante nella mineralizzazione ossea dopo l'angiogenesi [2], [4].
4. I fattori di crescita e le citochine sono regolatori del tessuto osseo. Le citochine derivate dal muscolo scheletrico sono anche chiamate miochine. Includono diverse proteine come il fattore di crescita simile all'insulina 1 (IGF1), TGF- $\beta$ , TNF, fattore di crescita derivato dalle piastrine (PDGF), interleuchine (IL-1, IL-6) e BMP [4].

### 2.4.3 Mineralizzazione e riassorbimento

La mineralizzazione è un processo a più stadi. La matrice organica depositata dagli osteoblasti inizia a mineralizzare per nucleazione secondaria 5-10 giorni dopo la deposizione. Vale a dire che i cristalli servono come luogo di origine di quelli recenti. Questa prima fase fornisce un contenuto di minerali pari al 50-70% del massimo. Negli esperimenti sugli animali, questo primo processo è stato accompagnato da un aumento delle proprietà meccaniche locali (rigidità o durezza di indentazione) corrispondenti all'80% del valore massimo.

Dopo alcuni giorni o settimane, il tasso di mineralizzazione diminuisce in modo significativo e inizia la mineralizzazione secondaria. Quest'ultimo processo corrisponde ad un lento aumento del numero, dimensione e/o perfezione dei cristalli, che avviene su scala annuale fino al raggiungimento di un valore massimo. Pertanto, il grado medio di mineralizzazione delle ossa corticali e spugnose e la distribuzione della loro composizione minerale dipendono principalmente da tre parametri: la frequenza di attivazione del rimodellamento osseo, la cinetica della mineralizzazione primaria e secondaria e l'equilibrio tra formazione e riassorbimento osseo [5].

Il modo esatto in cui il processo viene controllato è ancora oggetto di studio, ma si pensa che sia dovuto a una serie di meccanismi che coinvolgono componenti organici minori della matrice e dei suoi precursori, piuttosto che il collagene stesso.

I granuli di fosfato di calcio si trovano all'interno dei mitocondri degli osteoblasti e delle vescicole della matrice, strutture extracellulari attaccate alla membrana cellulare degli osteoblasti. Nel caso della calcificazione delle placche epifisarie, sono formate dalla membrana plasmatica dei condrociti. I minerali si depositano all'interno e tra le fibre di collagene adiacenti sotto forma di cristalli paralleli. Con il progredire di questo processo, la quantità di acqua e di proteine non collagene diminuisce, la concentrazione di minerali aumenta, ma la composizione e la quantità di collagene rimangono le stesse. Ciò è dovuto alla maggiore forza e rigidità delle ossa [5].

Una volta formato, l'osso viene mantenuto dinamicamente attraverso due diversi processi: modellazione e rimodellamento, utilizzati anche nella riparazione delle fratture. Nel processo di modellazione ossea, si forma nuovo osso senza un precedente riassorbimento osseo, mentre nel processo di rimodellamento osseo, la formazione ossea segue il riassorbimento osseo. La modellazione ossea è attiva durante la crescita, determinando un cambiamento nella forma e nelle dimensioni dell'osso. Questo continua nell'età adulta e aumentando la resistenza alla

flessione e la capacità di adattarsi ai compiti funzionali. Il rimodellamento osseo, d'altra parte, è un processo permanente che inizia all'inizio dello sviluppo fetale e svolge un ruolo nel mantenimento della funzione ossea sostituendo continuamente l'osso danneggiato con nuovo osso. Circa il 25% dell'osso trabecolare e il 3% dell'osso corticale sono rimossi e sostituiti ogni anno [3], [4], [16].

Importanti pubblicazioni scientifiche stanno rivelando sempre più informazioni sul processo di riassorbimento osseo. Questo processo è avviato dalla proliferazione dei precursori degli osteoclasti, la differenziazione in osteoclasti, seguita da un processo di degradazione della matrice ossea. In primo luogo, la matrice inorganica viene disciolta per acidificazione dell'ambiente extracellulare (HCl), che provoca una diminuzione del pH. La catepsina K, una proteasi lisosomiale, degrada quindi i componenti organici. I sottoprodotti di questo processo vengono trasportati sull'altro lato dell'osteoclasto dove vengono rilasciati. Come risultato della distruzione della matrice ossea, rimane uno "spazio di riassorbimento" e gli osteoclasti possono lasciare il sito e migrare verso nuovi siti di riassorbimento. Gli osteoblasti entrano quindi in quest'area e sostituiscono l'osso riassorbito.

La densità ossea aumenta rapidamente durante la pubertà, raggiungendo il picco circa 10 anni dopo il completamento della crescita scheletrica. Negli anziani, il riassorbimento supera la deposizione, determinando un bilancio negativo tra riassorbimento e deposizione [2].

## **2.5 GUARIGIONE DELLA FRATTURA OSSEA**

La guarigione delle fratture delle ossa lunghe può essere considerata come una serie di quattro fasi discrete che si verificano in sequenza e si sovrappongono in una certa misura.

La prima fase della guarigione della frattura è rappresentata dalla coagulazione del sangue (formazione di un ematoma) e dall'infiammazione, che iniziano all'interno del sito di frattura. La seconda fase è quella di riparazione in cui il tessuto di granulazione viene sostituito da un callo morbido (cartilagineo) e poi duro di osso intrecciato nel sito della frattura. Nella terza fase gli osteoblasti formano osso intrecciato sulla matrice calcificata. Nell'ultima fase il processo di rimodellamento procede con osteoclasti e osteoblasti che facilitano la conversione dell'osso intrecciato in osso lamellare e infine ricreano la forma anatomica appropriata [9]. Le varie fasi della guarigione di una frattura ossea sono illustrate in Figura 1.5.

## 2.5.1 Risposta infiammatoria

La fase infiammatoria inizia poco dopo la rottura iniziale dell'osso e dei tessuti molli circostanti e continua fino all'inizio della formazione della cartilagine o dell'osso. Questa fase dura quindi 3-4 giorni e può essere più lunga a seconda della forza che ha causato la frattura. Clinicamente, la fine della fase infiammatoria coincide con una diminuzione del dolore e del gonfiore. Le fratture causano inevitabilmente la rottura dei vasi del midollo osseo e il successivo stravasamento di sangue. Sebbene il restringimento e la trombosi delle navi distrutte siano ridotti

Con una minima perdita di sangue, l'interruzione traumatica del flusso sanguigno porta alla necrosi ossea ischemica, caratterizzata istologicamente dalla presenza di una fessura vuota. Un coagulo ricco di fibrina si forma nel sito della frattura e avvia la guarigione naturale della frattura.

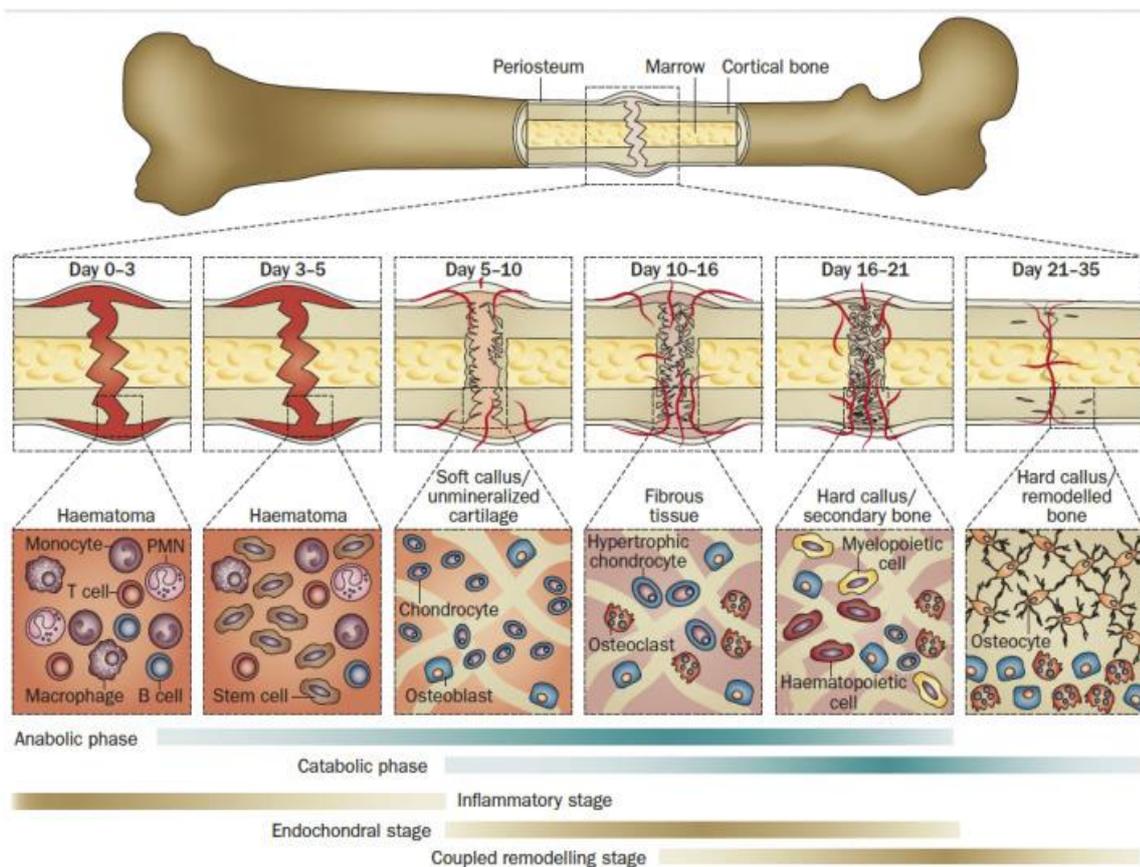


Fig. 1.5: Illustrazione di un tipico processo di guarigione di una frattura, degli eventi biologici e delle attività cellulari nelle diverse fasi. Le fasi metaboliche primarie (barre blu) della guarigione della frattura si sovrappongono alle fasi biologiche (barre marroni) [16].

Entro poche ore, dai tessuti molli circostanti appare un temporaneo apporto di sangue extraosseo per la rivascolarizzazione del sito della frattura ipossico. I fagociti mononucleati trasportati da questi nuovi vasi sanguigni facilitano la rimozione dell'osso morto e la formazione di calli. Il riassorbimento del margine dei frammenti è particolarmente evidente quando la frattura guarisce spontaneamente mentre la frattura si diffonde, riducendo così la deformità interframmentale e minimizzando la deformità tissutale locale.

Si pensa che i macrofagi coordinino la sequenza ordinata della guarigione delle ferite cutanee e svolgano un ruolo simile nella riparazione delle fratture. Questi includono vari fattori di crescita, come il fattore di crescita dei fibroblasti (FGF), che avviano la fibrogenesi sia nei tessuti molli che nella riparazione ossea. Quando il flusso sanguigno del midollo osseo viene ripristinato, l'afflusso di sangue extraosseo diminuisce. L'ematoma si risolve entro la fine della prima settimana a meno che non persistano infezioni, mobilità eccessiva o necrosi estesa dei tessuti molli intorno al sito della frattura [9], [10].

### **2.5.2 Formazione del callo morbido**

In pochi giorni, la crescita dei capillari, insieme alle cellule mononucleate e ai fibroblasti, avvia la trasformazione dell'ematoma in tessuto di granulazione. Questa prima fase di recupero coincide con un leggero aumento della resistenza meccanica. La capacità del tessuto di granulazione di allungarsi due volte la sua lunghezza originale spiega la formazione di tessuto di granulazione in questa fase, poiché la deformazione tra i frammenti rimane elevata. Quando il tessuto di granulazione si trasforma in tessuto connettivo, diventa più abbondante nelle fibre di collagene. I tipi di collagene I, II e III vengono depositati per primi, ma mentre il processo di maturazione continua, predomina il collagene di tipo I [13].

L'ipossia, la ridotta vascolarizzazione, i fattori di crescita e la tensione intersegmentale influenzano tutti l'elaborazione della cartilagine del callo.

Le cellule mesenchimali nel periostio, nell'endostio, nel midollo osseo e dei tessuti molli adiacenti iniziano a proliferare durante la fase infiammatoria e si differenziano in condrociti durante la fase di riparazione.

Chemiotassi, proliferazione, regolazione e differenziazione di queste cellule staminali in condrociti o osteoblasti sono regolati da numerosi fattori di crescita, tra cui il TGF- $\beta$  e le proteine morfogenetiche ossee (BMP) hanno un ruolo fondamentale. La tempistica esatta di

questa fase di induzione non è ancora chiara, ma può iniziare durante la fase infiammatoria ed è fondamentale per la formazione e la maturazione ordinata dei tessuti all'interno delle fratture. Il periostio che circonda il sito della frattura si ispessisce prima della trasformazione condrogenica, determinando la formazione di un callo esterno completamente vascolarizzato da vasi extraossei. Questo nascente "callo molle" si forma nelle prime 3 settimane dopo l'infortunio e resiste alla compressione, ma la sua resistenza alla trazione e l'allungamento a rottura sono simili a quelli del tessuto connettivo fibroso [9], [10].

### **2.5.3 Formazione del callo duro**

Affinché la rigenerazione ossea continui, il callo cartilagineo primario molle deve essere riassorbito e sostituito da un callo duro. Questa fase di guarigione della frattura riassume in una certa misura lo sviluppo osseo, che combina la proliferazione e la differenziazione cellulare, l'espansione del volume cellulare e l'aumento della deposizione della matrice.

Quando i condrociti del callo della frattura proliferano, si ipertrofizzano e mineralizzano la matrice extracellulare. I meccanismi di mineralizzazione includono il ruolo dei mitocondri nell'accumulo di granuli contenenti calcio formati nell'ambiente ipossico delle fratture.

Dopo l'elaborazione nel citoplasma dei condrociti del callo di una frattura, i granuli di calcio vengono trasportati nella matrice extracellulare, dove vengono precipitati dal fosfato con la formazione dei primi depositi minerali. Questi depositi di calcio e fosfato diventano nidi per la nucleazione uniforme e la formazione di cristalli di apatite.

Il picco di formazione del callo viene generalmente raggiunto entro il giorno 14 nei modelli animali. Ciò è determinato non solo dall'istomorfometria del tessuto mineralizzato, ma anche dalla misurazione dei marcatori della matrice extracellulare come il procollagene di tipo I, l'osteocalcina, l'alcalinità della fosfatasi e l'osteonectina. Man mano che il callo duro progredisce e la cartilagine calcificata viene sostituita dall'osso intrecciato, il callo diventa più solido e meccanicamente più rigido.

Al termine della fase di riparazione si ottiene l'unione ossea, ma l'architettura del sito della frattura differisce dall'osso originale. Il tempo necessario per la fusione spinale dipende fortemente dalla forma e dalla posizione della frattura, dalle condizioni dei tessuti molli adiacenti e dalle caratteristiche del paziente (tipo, età, composizione degli alimenti, stato di salute, lesione/malattia concomitante).

Al termine della fase di recupero, l'osso danneggiato riacquista forza e rigidità sufficienti per eseguire esercizi a basso carico [9], [10].

#### **2.5.4 Rimodellamento osseo**

L'ultima fase di guarigione di una frattura ossea riguarda il rimodellamento osseo, in cui il tessuto osseo più vecchio viene sostituito da quello più giovane.

Il callo è una struttura rigida che fornisce stabilità biomeccanica, ma non ripristina completamente le proprietà biomeccaniche dell'osso normale.

Per fare ciò, la cascata di guarigione della frattura attiva il secondo stadio, questa volta per rimodellare il callo in una struttura ossea lamellare con un canale midollare centrale. Il processo di rimodellamento è mediato da un equilibrio tra il riassorbimento del callo da parte degli osteoclasti e la deposizione di osso lamellare da parte degli osteoblasti. Questo processo inizia già in 3-4 settimane nei modelli animali e umani, ma possono essere necessari anni per completare il rimodellamento e ottenere una struttura ossea completamente rigenerata. Questo processo può essere più veloce negli animali e nei pazienti più giovani.

È stato dimostrato che il rimodellamento osseo si verifica come risultato della generazione di polarità elettriche che si verificano quando la pressione viene applicata in un ambiente cristallino. Ciò si ottiene quando si verifica un carico assiale delle ossa lunghe, creando una convessità elettropositiva e una concavità elettronegativa e attivando rispettivamente l'attività degli osteoclasti e degli osteoblasti. A causa di queste azioni, il callo esterno viene gradualmente sostituito da una struttura ossea stratificata e il rimodellamento del callo interno ripristina il canale midollare caratteristico dell'osso diafisario. Un adeguato apporto di sangue e un graduale aumento della stabilità meccanica sono essenziali per il successo del rimodellamento osseo [9], [10], [13].

Nella maggior parte dei casi l'osteosintesi procede senza intoppi e con successo, ma i problemi di unione della frattura come la coaptazione ritardata e la pseudoartrosi sono problemi comuni nella pratica clinica.

L'unione ritardata è definita come la guarigione di una frattura che supera il tempo di guarigione previsto e la pseudoartrosi è definita come la cessazione del processo di guarigione dell'osso.

La causa più comune di pseudoartrosi della frattura è probabilmente un fissaggio inadeguato della frattura con conseguente eccessiva instabilità. Un movimento eccessivo compromette l'angiogenesi e la crescita vascolare durante la guarigione della frattura.

# **CAPITOLO 3: INNESTI E SOSTITUTI OSSEI PER IL TRATTAMENTO DEI DIFETTI OSSEI**

## **3.1 RUOLO E PROPRIETA' DEGLI INNESTI OSSEI**

L'osso è un organo dinamico con notevoli proprietà rigenerative. Tuttavia, l'omeostasi ossea richiede cellule vitali (osteoblasti, osteoclasti e osteociti), un'adeguata vascolarizzazione, stabilità, la presenza di fattori di crescita e una matrice per la crescita. Purtroppo, spesso si verificano situazioni in cui una o più di queste condizioni sono inadeguate e si deve fornire assistenza per consentire all'osso di guarire. Quando il processo di riparazione ossea richiede un'ulteriore assistenza, si ricorre spesso all'innesto osseo per fornire un ambiente osteoconduttivo, osteoinduttivo e/o osteogenico per promuovere la guarigione e la riparazione dell'osso [14].

Gli innesti ossei sono utilizzati da molti anni dai chirurghi ortopedici per assistere il processo di riparazione ossea e sono utilizzati in tutte le sottospecialità dell'ortopedia. Le complicazioni delle lesioni traumatiche, come l'unione ritardata, la non unione e la mal unione, richiedono spesso l'uso di innesti ossei; oltre che per i traumi, questi vengono utilizzati per colmare i difetti ossei causati da tumori o in seguito a osteolisi periprotesica.

Sono disponibili molte forme di innesto osseo, ma sono classificate in tre grandi categorie: osso autogeno, allotrapianto e sostituti dell'innesto osseo. Gli innesti ossei differiscono in termini di proprietà di osteoconduzione, osteoinduzione, osteogenesi e supporto strutturale. Di conseguenza, per identificare l'innesto ideale, i chirurghi devono conoscere i requisiti della situazione clinica e le proprietà specifiche dei diversi tipi di innesto osseo.

### **3.1.1 Osteoconduzione**

La capacità di fornire un ambiente in grado di ospitare le cellule staminali mesenchimali, gli osteoblasti e gli osteoclasti del paziente è essenziale per la funzione dell'innesto osseo. L'osteoconduzione è il processo mediante il quale l'innesto funge da impalcatura, ospitando

passivamente le cellule necessarie. Microscopicamente, il reticolo poroso osteoconduttivo dell'innesto osseo assomiglia alla struttura dell'osso trabecolare.

Tutti gli innesti ossei forniscono un certo grado di impalcatura osteoconduttiva. I sostituti ossei bioceramici, come il solfato di calcio e il fosfato di calcio, si comportano esclusivamente come impalcature osteoconduttive [14] [21].

### **3.1.2 Osteoinduzione**

L'osteoinduzione è la trasformazione (differenziazione) di cellule mesenchimali totipotenti in cellule condrogeniche od osteogeniche dopo loro esposizione a svariati fattori, i più conosciuti dei quali sono le BMP (proteine morfogenetiche). Tali molecole vengono rilasciate dalla stessa componente cellulare dell'osso, e vengono divise in fattori osteoinduttivi (differenziano in osteoblasti le cellule totipotenti) e in fattori di crescita (stimolano la proliferazione di cellule già differenziate). Per essere definito osteoinduttivo un materiale deve essere in grado di indurre tale differenziazione anche in zone dove tale comportamento è inusuale (osteoinduzione eterotopica), come per esempio il tessuto muscolare, oltre che nelle sedi scheletriche (osteoinduzione ortotopica).

L'osteoinduzione è promossa dall'osso autologo, dagli stessi fattori osteoinduttivi purificati (estratti da materiale autologo, omologo od eterologo) o ricombinanti, e infine dall'osso demineralizzato (nella cui matrice sono preservate le proteine, tra cui i fattori citati) [14] [21].

### **3.1.3 Osteogenesi**

Per osteogenesi si intende la formazione di nuovo osso da parte delle cellule vitali presenti nell'innesto. Affinché un innesto osseo possieda la proprietà dell'osteogenesi, deve quindi contenere cellule staminali mesenchimali vitali, osteoblasti e osteociti.

Gli innesti ossei osteogenici possiedono tutti gli elementi cellulari, i fattori di crescita e l'impalcatura necessari per formare nuovo osso. L'innesto osseo osteogenico più utilizzato è l'osso autogeno [14] [21].

## **3.2 INNESTI OSSEI NATURALI**

### **3.2.1 Innesti ossei autologhi**

Un innesto osseo prelevato da un sito anatomico e trapiantato in un altro sito all'interno degli stessi individui è chiamato innesto osseo autologo. Grazie alle proprietà osteoconduttive, osteoinduttive e osteogeniche, un innesto osseo autologo può integrarsi nell'osso ospite in modo più rapido e completo, venendo quindi considerato il gold standard nel trattamento dei difetti ossei e il punto di riferimento per la valutazione di altri innesti e sostituti ossei. Tuttavia, gli svantaggi dell'autotrapianto sono stati ampiamente riportati e sono legati al processo di prelievo, tra cui complicazioni e dolore nel sito del donatore, maggiore perdita di sangue, aumento dei tempi operativi, potenziale infezione del sito del donatore e volume limitato di materiale disponibile [16], [21].

Lo sviluppo del sistema reamer-irrigator-aspirator (RIA) offre un'alternativa alle altre opzioni tradizionali di innesto osseo autologo, come l'innesto osseo della cresta iliaca, con il quale l'innesto può essere prelevato dal canale intramidollare del femore o della tibia. Confrontando gli innesti ossei prelevati da parti diverse dello stesso paziente, sono stati identificati livelli più elevati di espressione di geni associati ai tessuti vascolari, scheletrici ed ematopoietici nei campioni RIA rispetto a quelli prelevati dalla cresta iliaca, mentre le cellule staminali e i fattori di crescita nei campioni RIA erano anche più abbondanti. Tuttavia, sono state documentate anche le corrispondenti complicanze della RIA, che includono principalmente frattura iatrogena, perforazione della corticale anteriore, dissanguamento e ossificazione eterotopica [26].

Gli autotrapianti di osso trabecolare sono la forma più comunemente utilizzata di innesto osseo autologo. Pochi osteoblasti e osteociti, ma abbondanti cellule staminali mesenchimali (MSC) sopravvivono in seguito all'ischemia durante il trapianto, il che contribuisce a mantenere il potenziale osteogenico e la capacità di generare nuovo osso dall'innesto. Inoltre, l'ampia superficie di un autotrapianto trabecolare facilita la rivascolarizzazione e l'incorporazione dell'innesto a livello locale nell'osso ospite. Anche le proteine derivate dall'innesto, che sono attribuite all'osteoiduzione dell'innesto, sono conservate e presenti quando gli autoinnesti sono trattati in modo appropriato. Nella fase iniziale dell'autotrapianto, l'ematoma e l'infiammazione si formano rapidamente con il reclutamento di MSC per la deposizione di tessuto di

granulazione fibroso. Nel frattempo, il tessuto necrotico dell'innesto viene lentamente eliminato dai macrofagi e si verifica anche la neovascolarizzazione. Successivamente, durante l'incorporazione dell'autotrapianto, gli osteoblasti producono filamenti di osteoide che circondano il tessuto necrotico, in concomitanza con la formazione di nuovo osso da parte delle cellule ematopoietiche accumulate all'interno dell'osso trapiantato. Questo processo, che porta al completo riassorbimento e alla sostituzione dell'innesto, richiede solitamente 6-12 mesi.

Gli autoinnesti corticali possiedono un'eccellente integrità strutturale e sono di supporto meccanico, grazie al loro numero limitato di cellule osteoprogenitrici. A differenza dell'innesto autologo trabecolare, la sostituzione dell'autoinnesto corticale è mediata principalmente dagli osteoclasti dopo la rapida formazione dell'ematoma e la risposta infiammatoria nella fase iniziale della rigenerazione ossea, poiché i processi di rivascolarizzazione e rimodellamento sono strettamente ostacolati dall'architettura densa. Questo processo può richiedere anni, a seconda delle dimensioni dell'innesto e del sito di impianto [24], [25].

### **3.2.2 Innesti ossei allogenici**

L'innesto osseo allogenico si riferisce al tessuto osseo prelevato da un individuo e trapiantato in un individuo geneticamente diverso della stessa specie. Considerando i limiti degli innesti ossei autologhi, l'allograpianto osseo è considerato la migliore alternativa agli autoinnesti ed è stato utilizzato efficacemente nella pratica clinica in molte circostanze, soprattutto per i pazienti con scarso potenziale di guarigione, non unione consolidata e comminazione estesa dopo le fratture. L'allograpianto può essere lavorato e personalizzato ed è quindi disponibile in varie forme, tra cui corticale, trabecolare e derivati ossei altamente lavorati (cioè matrice ossea demineralizzata) [25]. Rispetto agli autoinnesti, gli allograpianti risultano essere immunogenici e presentano un tasso di fallimento più elevato, che si ritiene sia causato dall'attivazione degli antigeni del complesso maggiore di istocompatibilità (MHC).

La fase iniziale di osteoinduzione verrebbe distrutta dalla risposta immunitaria e dalle cellule infiammatorie, che potrebbero rapidamente circondare il neo-vascolare, causando la necrosi delle cellule osteo-progenitrici. Anche l'esatto meccanismo della risposta immunitaria nell'incorporazione dell'allograpianto osseo non è chiaro; alcuni studi hanno rilevato che l'accettazione dell'allograpianto è migliorata quando l'immunogenicità viene ridotta modificando l'allograpianto per ridurre le differenze di istocompatibilità. Un altro problema è il rischio di trasmissione virale, che è stato notevolmente migliorato dallo sviluppo di moderne

banche dei tessuti e dal miglioramento della tecnologia di lavorazione. Sulla base di queste situazioni, l'applicazione di allotrapianti freschi è sempre limitata e gli allotrapianti modificati conservati sono solitamente preferiti nella pratica clinica.

Gli alloinnesti trabecolari sono il tipo più comune di alloinnesti disponibili in commercio e sono disponibili principalmente sotto forma di blocchi cubici.

A causa delle loro proprietà meccaniche più limitate e della capacità relativamente bassa di stimolare la guarigione, gli alloinnesti trabecolari modificati conservati vengono utilizzati principalmente come materiale di fusione spinale e riempimento per difetti scheletrici cavitari. Una sequenza di eventi simile ma più lenta si verifica nel processo di attecchimento degli alloinnesti rispetto agli autoinnesti. Tuttavia, l'osteointegrazione può essere ritardata dalla risposta infiammatoria dell'ospite che porta alla formazione di tessuto fibroso attorno all'innesto, osservata in meno del 10% dei casi.

Gli alloinnesti corticali conferiscono proprietà meccaniche rigide e sono utilizzati principalmente nell'aumento spinale per riempire grandi difetti scheletrici dove è richiesta una resistenza al carico immediata. Dal punto di vista della risposta immunitaria e della sicurezza, vengono solitamente trapiantati prodotti congelati o liofilizzati senza sangue o midollo osseo [16], [21].

La matrice ossea demineralizzata (DCM) è un tipo di derivato dell'allotrapianto altamente trasformato in cui almeno il 40% del contenuto minerale della matrice ossea viene rimosso dall'acido mentre rimangono collagene, proteine non collagene e fattori di crescita. Grazie alla sua integrità strutturale e alle basse proprietà meccaniche, il DMB viene utilizzato principalmente per riempire i difetti ossei.

L'osteococonduttività del DBM è dovuta al fatto che fornisce struttura alle popolazioni cellulari e alla formazione di nuovo osso dopo la demineralizzazione. Le proprietà osteoinduttive della DMB sono determinate principalmente dai fattori di crescita rimanenti; questi fattori di crescita sono direttamente correlati al metodo di preparazione.

L'assorbimento di DMB è simile agli autoinnesti, in cui i fattori di crescita innescano una cascata di ossificazione endocondrale che porta alla formazione di nuovo osso nel sito dell'innesto [16].

## **3.3 SOSTITUTI OSSEI SINTETICI**

### **3.3.1 Biomateriali e biocompatibilità**

Comunemente si definisce materiale una sostanza fisica, generalmente solida, manipolata dall'uomo per realizzare specifici manufatti, non soggetti a significative trasformazioni durante l'uso; in modo analogo si può definire biomateriale una sostanza utilizzata per costruire dispositivi in grado di sostituire o trattare una o più funzioni del corpo umano [22].

La definizione di biomateriale sulla quale attualmente esiste il più ampio consenso è quella stabilita nel corso della II International consensus conference on biomaterials, tenutasi a Chester (Inghilterra) nel 1991: «Si definisce biomateriale un materiale concepito per interfacciarsi con i sistemi biologici al fine di valutare, dare supporto o sostituire un qualsiasi tessuto, organo o funzione del corpo».

L'attuale disponibilità di materiali, sia in termini di prodotti commerciali che di ricerca, è così ampia da soddisfare i requisiti chimico-fisici e meccanici di quasi tutte le applicazioni biomediche immaginabili. Tuttavia, pochi materiali sono stati utilizzati come biomateriali. Il principale fattore limitante è la biocompatibilità, perché un biomateriale è per definizione destinato a entrare in contatto con i tessuti viventi.

La biocompatibilità può essere definita come la capacità di un materiale di non provocare, da parte del sistema vivente in cui viene utilizzato, una serie di reazioni sfavorevoli tali da compromettere la possibilità di utilizzarlo per il tempo previsto. Un caso particolare di biocompatibilità è l'emocompatibilità, cioè la compatibilità con il sangue. Un requisito essenziale di un materiale emocompatibile è la sua non trombogenicità, cioè non deve indurre la formazione di trombi quando viene a contatto con il sangue. La biocompatibilità di un determinato materiale deve essere valutata in base al tipo di prestazione richiesta. In particolare, occorre considerare la forma fisica, la posizione dell'impianto e la sua durata, la presenza di additivi (come plastificanti o stabilizzanti, nel caso dei polimeri) e la natura di eventuali prodotti di degradazione. Nel caso di un impianto medico, la biocompatibilità dipende evidentemente dall'instaurarsi di interazioni favorevoli tra i materiali componenti, nella forma fisica che assumono, e i tessuti circostanti. L'esistenza di interazioni è prevista dalla definizione stessa di biomateriale; d'altra parte, i materiali che non suscitano reazioni di alcun tipo da parte

dell'organismo ospite sono adatti per applicazioni temporanee (ad esempio, alcuni tipi di cateteri) ma non per applicazioni a lungo termine (ad esempio, protesi cardiovascolari o ortopediche). Infatti, affinché un impianto garantisca prestazioni stabili a lungo termine, non è sufficiente che sia passivamente tollerato dall'organismo, ma deve essere in qualche modo incorporato, attaccato ai tessuti circostanti e infine comportarsi come un settore funzionale dell'organismo ospite. Ciò presuppone che l'impianto subisca una colonizzazione cellulare e che le cellule colonizzatrici vi aderiscano correttamente. Nei casi più favorevoli, può accadere che l'impianto venga gradualmente "invaso" dalle cellule e contemporaneamente si degradi. In questo modo, al posto del materiale originale si forma un tessuto autologo di cui si conservano morfologia e funzionalità. La biocompatibilità di un materiale impiantato è influenzata, oltre che dalla sua tossicità, da numerosi fattori, tra cui la forma dell'impianto, l'abilità del chirurgo che lo inserisce, la dinamica dei movimenti dell'impianto una volta posizionato, la biostabilità, cioè la resistenza alla degradazione chimica e meccanica, e la natura delle reazioni che si verificano all'interfaccia con i tessuti biologici. Questi fattori variano in modo significativo a seconda della posizione dell'impianto (ad esempio, se nel tessuto duro o nel sistema cardiovascolare), per cui la biocompatibilità può essere definita in modo univoco solo dal tipo di applicazione [17], [18], [19], [20].

La ricerca e lo sviluppo dei biomateriali sono stati stimolati e guidati dai progressi della biologia cellulare e molecolare, della chimica, della scienza dei materiali e dell'ingegneria. Lo sviluppo di biomateriali per applicazioni mediche si è evoluto in tre generazioni, che si sono in qualche modo sovrapposte temporalmente, ma ciascuna con un focus distinto [20].

Quando si cerca di comprendere l'evoluzione della ricerca sui biomateriali e la loro disponibilità clinica negli ultimi 60 anni, sembrano essere chiaramente delineate tre diverse generazioni: materiali bioinerti (prima generazione), materiali bioattivi e biodegradabili (seconda generazione) e materiali progettati per stimolare specifiche risposte cellulari a livello molecolare (terza generazione). Queste tre generazioni non devono essere interpretate come cronologiche, ma concettuali, poiché ogni generazione rappresenta un'evoluzione dei requisiti e delle proprietà dei materiali coinvolti. Ciò significa che attualmente la ricerca e lo sviluppo sono ancora dedicati a biomateriali che, in base alle loro proprietà, potrebbero essere considerati di prima o seconda generazione. I materiali che ogni nuova generazione porta con sé non escludono necessariamente l'uso di quelli di una generazione precedente [15].

### 3.3.2 Solfato di calcio

Il solfato di calcio, noto anche come gesso di Parigi, è un materiale cristallino inorganico osteoconduttivo naturale. Esiste in varie forme idratate, tra cui anidrite ( $\text{CaSO}_4$ ), emiidrato ( $\text{CaSO}_4 \cdot 0,5 \text{H}_2\text{O}$ ), diidrato o gesso ( $\text{CaSO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ ). Il solfato di calcio viene utilizzato da solo sotto forma di granuli o come sospensione per iniezione o in combinazione con altre sostanze. La sua resistenza alla compressione (99,15 MPa) è paragonabile all'osso spugnoso. È fragile e perde rapidamente a causa dell'idrolisi.

Grazie alla loro iniettabilità e rapida degradabilità, sono stati utilizzati come innesti ossei e come vettori di antibiotici per prevenire le infezioni. Il solfato di calcio un tipo di ceramica osteoconduttiva e biodegradabile ed è stata applicata per riempire i difetti ossei fin dal 1892. Viene preparato riscaldando il gesso con una struttura cristallina alfa-emiidrata brevettata e può essere prodotto in diverse forme, come pellet duri o fluidi viscosi iniettabili che induriscono in vivo. Pur non avendo una struttura macroporosa, il solfato di calcio ha comunque un tasso di riassorbimento rapido e una debole resistenza interna, il che implica che può essere utilizzato solo per riempire piccoli difetti ossei con fissazione interna rigida; la ricrescita di vasi e nuovo osso avviene in concomitanza con il riassorbimento dell'innesto [23], [25].

### 3.3.3 Ceramiche a base di fosfato di calcio

Le ceramiche al fosfato di calcio sono composte da idrossiapatite di calcio, una composizione chimica simile alla fase minerale del tessuto mineralizzato. Sono sali inorganici sintetici, solitamente prodotti mediante sinterizzazione ad alta temperatura con esclusione del vapore acqueo, e quindi modellati mediante pressatura ad alta pressione.

Gli impianti porosi, gli impianti densi non porosi e le particelle granulari porose sono forme comuni disponibili in commercio. In quanto classe di ceramiche bioassorbibili con un'eccellente osteoconduttività, le ceramiche CaP hanno ricevuto molta attenzione e sono state ampiamente testate in studi clinici. A differenza del rapporto tra fosfato di calcio (Ca/P) e fosfato di calcio bifasico (BCP), è possibile determinare il rapporto tra HAp e fosfato tricalcico (TCP) il quale è più utilizzato in ortopedia. Diversi parametri importanti della ceramica CaP, come il tasso di assorbimento e le proprietà meccaniche, sono strettamente correlati al rapporto Ca/P. Inoltre, la cristallinità e la struttura porosa sono fattori altamente considerati nella scelta della ceramica CaP [23].

### 3.3.3.1 Idrossiapatite

L'idrossiapatite (HAp), una forma minerale naturale di apatite di calcio con la formula chimica  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , rappresenta circa il 50% della massa ossea il che spiega la sua eccellente osteoconduttività e osteointegrazione. Inoltre, HAp ha proprietà meccaniche simili all'osso trabecolare. Cioè, è fragile e debole alla tensione e al taglio, ma è resistente ai carichi di compressione e può essere ridotto del 30-40% in situ dopo diversi mesi dall'impianto.

La macroporosità (pori con diametri  $> 100 \mu\text{m}$ ) e l'interconnettività dei pori dell'HAp sintetica consentono l'adesione, la proliferazione e la differenziazione di cellule osteoprogenitrici, nonché la rivascolarizzazione e successivamente la ricrescita di nuovo osso, quando impiantate in vivo. Tuttavia, il rapporto Ca/P relativamente elevato e la cristallinità ritardano il tasso di riassorbimento dell'HAp, un processo predeterminato dalle cellule giganti e dai macrofagi. Pertanto, l'HAp da sola è più spesso applicata come rivestimento su impianti e perni di fissatori esterni o in siti con basse sollecitazioni meccaniche.

Questi inconvenienti possono essere parzialmente superati grazie all'HAp nanocristallino di recente sviluppo. Ciò fornisce un rapporto superficie/volume più elevato. Questa ampia superficie non solo ha ridotto significativamente la temperatura di sinterizzazione delle ceramiche HAp, ma ha anche portato ad un aumento dei tassi di riassorbimento [16], [27].

### 3.3.3.2 Fosfato Tricalcico

Il fosfato tricalcico (TCP), presenta due fasi diverse, come  $\alpha$ -TCP e  $\beta$ -TCP. Numerosi studi dimostrano che l' $\alpha$ -TCP si dissolve più rapidamente del  $\beta$ -TCP, ma il  $\beta$ -TCP è il più utilizzato in ambito clinico per la sua natura osteoconduttiva e osteoinduttiva.

In particolare, la forma  $\beta$  romboedrica, il  $\beta$ -fosfato tricalcico ( $\beta$ -TCP), ha attirato una crescente attenzione da quando è stato riportato per la prima volta nel 1920 da Albee.

Con la formula chimica di  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , il  $\beta$ -TCP ha un rapporto Ca/P di 1,5 ed è quindi inferiore a quello dell'idrossiapatite, il che potrebbe accelerarne parzialmente la degradazione e l'assorbimento. Come l'HAp, il TCP ha strutture porose ancora più interconnesse che possono favorire direttamente l'invasione fibrovascolare e la sostituzione ossea, ma allo stesso tempo indeboliscono le proprietà meccaniche. A causa del pH fisiologico termodinamicamente

instabile, una parte del TCP si convertirebbe inevitabilmente in idrossiapatite dopo l'impianto, ostacolando così parzialmente la degradazione del TCP, mentre la maggior parte verrebbe riassorbita dalla fagocitosi dopo 6-24 mesi e una parte rimarrebbe per anni. Ciò rende il TCP efficace per il riempimento di difetti ossei causati da traumi e tumori benigni, ma non è favorito come sostituto di un innesto osseo a causa di un profilo di biodegradazione imprevedibile [16], [27].

### **3.3.4 Vetro bioattivo**

Il vetro bioattivo, noto anche come biovetro, si riferisce a un gruppo di ceramiche sintetiche a base di silicati ed era originariamente costituito da biossido di silicio ( $\text{SiO}_2$ ), ossido di sodio ( $\text{Na}_2\text{O}$ ), ossido di calcio ( $\text{CaO}$ ) e pentossido di fosforo ( $\text{P}_2\text{O}_5$ ) quando fu sviluppato per la prima volta negli anni '70. In seguito, è stato modificato in una composizione più stabile con l'aggiunta di ossido di potassio ( $\text{K}_2\text{O}$ ), ossido di magnesio ( $\text{MgO}$ ) e ossido borico ( $\text{B}_2\text{O}_3$ ); il componente chiave, il silicato, costituisce il 45-52% del suo peso [29]. Le costituzioni ottimizzate portano a un forte legame fisico tra il biovetro e l'osso ospite. Si ritiene che questa proprietà di legame con l'osso sia causata dalla lisciviazione e dall'accumulo di ioni di silicio esposti ai fluidi corporei al momento dell'impianto e dalla successiva formazione di un rivestimento di idrossiapatite sulla superficie del biovetro [38]. Questo sottile rivestimento di idrossiapatite assorbe le proteine e attrae le cellule osteo-progenitrici. Inoltre, questo strato di apatite biologica viene parzialmente sostituito dall'osso attraverso un processo di sostituzione per scorrimento nell'impianto a lungo termine [30]. La porosità e il tasso di riassorbimento relativamente rapido nelle prime due settimane di impianto consentono la crescita di neo-vascolari dopo la deposizione del nuovo osso. Uno studio ha dimostrato che gli scaffold in fibra di biovetro possono essere completamente riassorbiti in sei mesi in vivo con una scarsa risposta infiammatoria [16].

I biovetri 45S5 e S53P4 sono i due vetri bioattivi più conosciuti in commercio che possono essere utilizzati come sostituti ossei per l'innesto. Diversi studi clinici hanno dimostrato un buon contatto con l'osso ospite quando i biovetri S53P4 e 45S5 sono stati applicati per il trattamento di difetti ossei, mentre è stato evidenziato un ridotto riassorbimento dell'S53P4 a causa del maggiore contenuto di silice. Inoltre, sono stati riportati risultati di guarigione inferiori rispetto agli innesti autologhi [16].

Oltre al  $\text{SiO}_2$ , anche il  $\text{P}_2\text{O}_5$  è stato utilizzato come network former, mentre i metalli alcalino-terrosi (ad esempio  $\text{MgO}$  o  $\text{CaO}$ ) o alcalini (ad esempio  $\text{Na}_2\text{O}$  o  $\text{K}_2\text{O}$ ) agiscono come modificatori di rete, consentendo di modificare l'ambiente interno dell'interfaccia attraverso lo scambio ionico. In diversi casi, anche il  $\text{TiO}_2$  è stato utilizzato come modificatore per migliorare la reticolazione all'interno della rete di vetro. A causa delle loro scarse proprietà meccaniche, della bassa resistenza alla trazione e della bassissima tenacità alla frattura, i biovetri non sono adatti per applicazioni portanti. Al contrario, i biovetri sono stati utilizzati con successo in applicazioni con materiali a basso carico per la riparazione ossea in chirurgia dentale e ortopedica. Le superfici dei vetri bioattivi sono state anche modificate per aumentarne la bioattività, rivestendole con proteine adesive come la fibronectina per promuovere l'adesione cellulare [16].

### **3.3.5 Cementi a base di fosfato di calcio**

I cementi a base di fosfato di calcio (CPC), a differenza delle ceramiche a base di CaP, hanno tipicamente due composti, uno dei quali è un agente polimerizzante acquoso. Sono stati inventati da Brown e Chow negli anni '80 per estendere l'adattabilità e la modellabilità dei sostituti ossei CaP e sono stati approvati dalla Food and Drug Administration (FDA) statunitense nel 1996. Possono essere convenientemente iniettati per riempire difetti di varia forma e poi solidificare miscelandosi con la fase acquosa attraverso una reazione isoterma. I CPC autoindurenti sono generalmente altamente microporosi, biocompatibili e supportati meccanicamente con una bassa resistenza alla flessione. Tuttavia, possono essere degradati solo strato dopo strato, come predeterminato dalla loro dissoluzione e dall'attività di riassorbimento degli osteoclasti in condizioni fisiologiche. Di conseguenza, la crescita del tessuto neovascolare e osseo è teoricamente impedita rispetto ad altre ceramiche Cap che supportano la macroporosità interconnessa.

In base alla composizione, è possibile distinguere l'apatite e la brushite CPC. Le proprietà dei CPC rispetto alla produzione, alla cinetica di polimerizzazione e al tasso di biodegradazione sono altamente correlate con la loro composizione. L'apatite CPC è viscosa, indicando un'iniettabilità relativamente bassa, ma possono verificarsi reazioni di indurimento a pH fisiologico e le proprietà meccaniche sono leggermente più forti del brushite CPC. Sono stati dimostrati tassi di degradazione più elevati a causa della struttura cristallina inferiore dell'idrossiapatite carente di calcio ottenuta dopo l'indurimento ma ancora incompleto.

Le CPC di brushite sono iniettabile e solidificano rapidamente a bassi valori di pH (<6). La separazione delle fasi, ovvero la separazione dei componenti in polvere e liquidi durante l'iniezione, è un altro grave problema associato all'applicazione clinica del CPC [16].

### **3.3.6. Cementi ossei in polimetilmetacrilato**

Utilizzato per la prima volta dai chirurghi ortopedici 60 anni fa, il polimetilmetacrilato (PMMA) continua ad essere un componente chiave della pratica moderna e può essere uno dei materiali più durevoli nella chirurgia ortopedica. Non è considerato un materiale sostitutivo osseo, nonostante sia il materiale sintetico più utilizzato in ambito clinico, in quanto non è biodegradabile e non riassorbibile, più simile a una malta che a un cemento. Il cemento osseo PMMA autopolimerizzante è ampiamente utilizzato nelle protesi articolari totali per componenti fissazione e vertebroplastica percutanea grazie alle sue elevate proprietà meccaniche e facilità di manipolazione. A seguito dell'infezione della protesi, sono stati sviluppati cementi acrilici contenenti antibiotici, che sono stati considerati parte della profilassi antimicrobica nell'artroplastica primaria dell'articolazione [28]. Tuttavia, gli svantaggi del cemento PMMA sono evidenti. La polimerizzazione del PMMA è esotermica e può potenzialmente danneggiare i tessuti adiacenti. Inoltre, la mobilizzazione asettica causata dal danno osseo mediato dal monomero, dal disadattamento meccanico e dalla proprietà inerte intrinseca, è stata riferita come inevitabile nell'usura a lungo termine e quindi ha portato al fallimento delle artroplastiche con cemento PMMA [16].

## CAPITOLO 4: IL BIOVETRO

Le bioceramiche possono essere di origine sintetica o naturale, progettate per creare legami con l'osso e sono apparse come un'alternativa agli impianti metallici. Le ceramiche sono definite come ossidi, nitrucci, solfuri e carburi di metalli e metalloidi. Sono importanti nel campo biomedico grazie alle loro buone proprietà fisico-chimiche che si adattano ad alcune parti del corpo umano. Le applicazioni della ceramica sono aumentate di molte volte in campo medico nel XX secolo grazie ai progressi della tecnologia di lavorazione.

I materiali bioceramici hanno un'eccellente biocompatibilità, scarsa degradabilità, alta temperatura di fusione, non corrosività, migliori proprietà meccaniche con scarsa plasticità rispetto ai biomateriali a base metallica. Le bioceramiche sono dure e fragili e hanno una bassa tenacità alla frattura e un basso modulo elastico rispetto all'osso. Per quanto riguarda le bioceramiche sintetiche, come l'allumina, la zirconia, la titania, i materiali porosi a base di Ca-P, i vetri bioattivi e le vetroceramiche, sono utilizzate in odontoiatria, ortopedia, tessuti calcificati, impianti, rivestimenti, sensori medici e molte altre applicazioni. Gli approcci avanzati prevedono anche l'uso di biovetri/ vetroceramiche come scaffold 3D, come rivestimento di impianti e compositi che mostrano proprietà meccaniche paragonabili a quelle delle ossa naturali [32].

Al giorno d'oggi, i vetri bioattivi (BG) sono utilizzati principalmente per migliorare e supportare il processo di guarigione dei difetti ossei derivanti da eventi traumatici, rimozione di tumori, patologie congenite, revisioni di impianti o infezioni.

In passato, sono stati proposti diversi approcci per la sostituzione di difetti ossei estesi, ognuno con i propri vantaggi e svantaggi. Di conseguenza, la necessità di innesti ossei sintetici è ancora una sfida clinica notevole, dato che ogni anno vengono eseguiti più di 1 milione di interventi chirurgici con innesti ossei in tutto il mondo. Inoltre, studi recenti dimostrano l'efficacia dei BG anche nella rigenerazione dei tessuti molli. Spesso i criteri chirurgici non corrispondono a quelli ingegneristici e, quindi, è necessario un compromesso per avvicinarsi a un risultato ideale in termini di buona rigenerazione, supporto meccanico e biocompatibilità a contatto con i tessuti viventi [31].

## 4.1 STORIA E PROPRIETA' DEL BIOVETRO

La scoperta dei BG nel 1969 è attribuita a Larry L. Hench, professore di ricerca presso il Dipartimento di Scienza dei Materiali e Ingegneria dell'Università della Florida.

Per ottenere un materiale in grado di sopravvivere all'esposizione al corpo umano senza la formazione di tessuto cicatriziale intorno al dispositivo impiantato, tra il 1969 e il 1971 sono state testate tre diverse composizioni di vetro, sulla base del diagramma di stato ternario  $\text{Na}_2\text{O}$ - $\text{CaO}$ - $\text{SiO}_2$ . Il processo di ottimizzazione della composizione del vetro ha portato alla scelta finale della cosiddetta formulazione 45S5, 45%  $\text{SiO}_2$ -24,5%  $\text{Na}_2\text{O}$ -24,5%  $\text{CaO}$ -6%  $\text{P}_2\text{O}_5$  (wt %), caratterizzata da elevate quantità di  $\text{Na}_2\text{O}$  e  $\text{CaO}$ , nonché da un rapporto  $\text{CaO}/\text{P}_2\text{O}_5$  relativamente alto che rende la superficie del materiale molto reattiva in ambiente fisiologico [33], [38].

Il nome Bioglass® è stato marchiato dall'Università della Florida come nome della composizione originale 45S5 e pertanto può essere utilizzato solo in riferimento a tale composizione e non in generale per indicare i biovetri [30].

Bioglass® è un vetro silicato, quindi caratterizzato dalla presenza di silice ( $\text{SiO}_2$ ) come ossido che forma una rete tridimensionale in cui l'unità di base è il tetraedro  $\text{SiO}_4$ . Ciascuna unità condivide fino a 4 atomi di ossigeno permettendo la creazione della rete 3D e connettendosi l'una all'altra tramite legami a ponte ossigeno  $-\text{Si}-\text{O}-\text{Si}-$ . Il sodio e il calcio agiscono come modificatori di rete che interrompono la rete creando legami con ossigeno non pontanti.

La composizione 45S5 è caratterizzata da una maggiore bioattività e dalla capacità di promuovere la differenziazione delle cellule staminali in un fenotipo osteoblastico, favorendo così la formazione di una matrice ossea ben mineralizzata. Il Bioglass® è stato utilizzato nel corso degli anni per produrre scaffold per la rigenerazione del tessuto osseo attraverso diversi approcci produttivi, finalizzati all'ottimizzazione delle proprietà meccaniche e bioattive del dispositivo [33].

I prodotti medici più comuni a base di Bioglass® disponibili nella pratica clinica riguardano la rigenerazione di tessuti calcificati (ad esempio, osso, smalto) in ortopedia e odontoiatria.

Le caratteristiche compositive chiave che sono responsabili della bioattività del vetro 45S5 sono il suo basso contenuto di  $\text{SiO}_2$  (rispetto a vetri silicati più resistenti dal punto di vista chimico), l'alto contenuto di  $\text{Na}_2\text{O}$  e  $\text{CaO}$  (modificatori della rete vetrosa) e l'alto rapporto  $\text{CaO}/\text{P}_2\text{O}_5$ .

Nella Tabella 4.1 sono riportati i principali vetri bioattivi in base alla loro composizione [29].

<b>Composizioni (wt.%)</b>	<b>45S5</b>	<b>13- 93</b>	<b>6P53B</b>	<b>58S</b>	<b>70S30C</b>	<b>13- 93B1</b>	<b>13- 93B3</b>	<b>P<sub>50</sub>C<sub>35</sub>N<sub>15</sub></b>
Na <sub>2</sub> O	24.5	6.0	10.3	0	0	5.8	5.5	9.3
K <sub>2</sub> O	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 <sub>2</sub>	45.0	53	52.7	58.2	71.4	34.4	0	0
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	6.0	4.0	6.0	9.2	0	3.8	3.7	71.0
B <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	0	0	0	0	0	19.9	56.6	0

Tab. 4.1: Composizione di vari vetri bioattivi. [29]

I BG offrono la possibilità di regolare la loro composizione in modo molto flessibile, conferendo proprietà specifiche al materiale, che di conseguenza diventa in grado di soddisfare i requisiti sia nelle applicazioni di guarigione dei tessuti duri che di quelli molli [5].

Il 45S5 Bioglass® ha effetti intracellulari sulla proliferazione del tessuto osseo grazie al rilascio di silice solubile e di altre specie ioniche, ma anche effetti extracellulari dovuti all'elevata area superficiale e alla porosità su scala nanometrica del gel di silice idrata e degli strati di apatite (idrossicarbonatoapatite) che si formano rapidamente [38].

Sorprendentemente, dopo 40 anni di ricerca sui vetri bioattivi da parte di numerosi gruppi di ricerca, non è stata trovata nessun'altra composizione di vetro bioattivo che abbia proprietà biologiche migliori della composizione originale Bioglass 45S5 [30].

Attualmente esistono diversi tipi di vetro bioattivo: i silicati convenzionali, come Bioglass 45S5, i vetri a base di fosfati e i vetri a base di borati. Recentemente, l'interesse per i vetri borati

è aumentato, soprattutto grazie ai risultati clinici molto incoraggianti della guarigione di ferite croniche, come le ulcere diabetiche, che non guarirebbero con il trattamento convenzionale. La risposta dei tessuti molli può essere dovuta alla loro rapida dissoluzione, più rapida di quella dei vetri a base di silice. Anche i vantaggi dei vetri fosfatici sono probabilmente legati alla loro rapidissima solubilità piuttosto che alla bioattività [30].

Inoltre, i progressi tecnologici nei processi di produzione dei biomateriali hanno reso possibile, negli ultimi anni, la fabbricazione di strutture 3D (scaffolds) meccanicamente più performanti, aprendo nuove possibilità nella sostituzione del tessuto osseo anche in siti portanti. Tutti questi aspetti rendono i BG molto interessanti nello sviluppo di approcci di ingegneria tissutale e medicina rigenerativa, dove la disponibilità di sostituti tissutali artificiali funzionali vascolarizzati in vitro è particolarmente importante per garantire il necessario apporto di nutrienti e ossigeno fin dai primi giorni dopo l'impianto del dispositivo [33].

I vetri bioattivi mostrano proprietà sia di osteoconduzione che di osteoinduzione e possono essere utilizzati in diverse applicazioni, come innesti ossei, scaffolding, somministrazione di farmaci, rivestimenti e ingegneria dei tessuti molli. Tuttavia, nonostante le loro eccellenti proprietà bioattive, i principali svantaggi dei vetri bioattivi sono la loro bassa resistenza meccanica e la bassa tenacità alla frattura. Queste caratteristiche ne limitano l'uso a poche applicazioni che non richiedono carichi significativi. Per migliorare la loro resistenza meccanica, sono stati sviluppati vari tipi di vetri che subiscono la precipitazione di diverse fasi cristalline sotto trattamento termico, noti come vetroceramici (BC) bioattivi; i più famosi e disponibili in commercio sono Cerabone®, Biosilicate®, Ceravital® e Bioverit® [34].

Il Ceravital® presenta precipitati di apatite ( $\text{CaO-P}_2\text{O}_5$ ) in una matrice di vetro  $\text{Na}_2\text{O-K}_2\text{O-MgO-CaO-SiO}_2\text{-P}_2\text{O}_5$  ed è stato sviluppato per la prima volta da Brömer et al. nel 1973. Kokubo et al. hanno sviluppato alla fine degli anni '80 il GC A-W, commercialmente noto come Cerabone®, in cui apatite e wollastonite cristallizzano in un vetro di  $\text{MgO-CaO-SiO}_2\text{-P}_2\text{O}_5$ . Il Bioverit®, con apatite e mica dispersi in un vetro di  $\text{Na}_2\text{O-MgO-CaO-Al}_2\text{O}_3\text{-SiO}_2\text{-P}_2\text{O}_5\text{-F}$ , è stato sviluppato da Höland et al. nel 1985. Tutti questi GC sono composti da una fase cristallina simile all'apatite e sono molto meno solubili di Bioglass® 45S5. Nel 1996, Peitl et al. hanno sviluppato una vetro-ceramica priva di apatite basato sulla cristallizzazione di Bioglass® (leggermente modificato). Hanno chiamato il loro prodotto Biosilicate® e hanno dimostrato che una cristallizzazione controllata, che ha portato a una microstruttura ben progettata di un vetro  $\text{Na}_2\text{O-CaO-SiO}_2\text{-P}_2\text{O}_5$ , può aumentare la sua resistenza media alla flessione [34]. Tutte

queste vetroceramiche, ottenute attraverso la nucleazione e la crescita controllata di cristalli in una fase vetrosa, sono risultate avere un indice di bioattività inferiore a 8 (inferiore a 12,5 del vetro bioattivo 45S5) ma proprietà meccaniche superiori (cioè, resistenza alla compressione, alla flessione e modulo di Young). La minore bioattività delle vetroceramiche sviluppate è in un range simile a quello delle ceramiche a base di fosfato di calcio come l'HA sintetico [40].

## 4.2 MECCANISMO DI BIOATTIVITA' DEL BIOVETRO

In realtà, Bioglass® rappresenta il primo esempio di biomateriale appartenente alla terza generazione, grazie al ruolo biologico svolto dai suoi prodotti di dissoluzione ionica, rilasciati direttamente nell'ambiente fisiologico, nonché alla sua capacità di legare fortemente il tessuto osseo con la formazione di uno strato interfacciale di fosfato di calcio [35].

Il meccanismo di bioattività proposto per la prima volta da Hench e tuttora accettato per i biovetri a base di silicato si basa su 11 fasi di reazione (riportate in Figura 4.1),

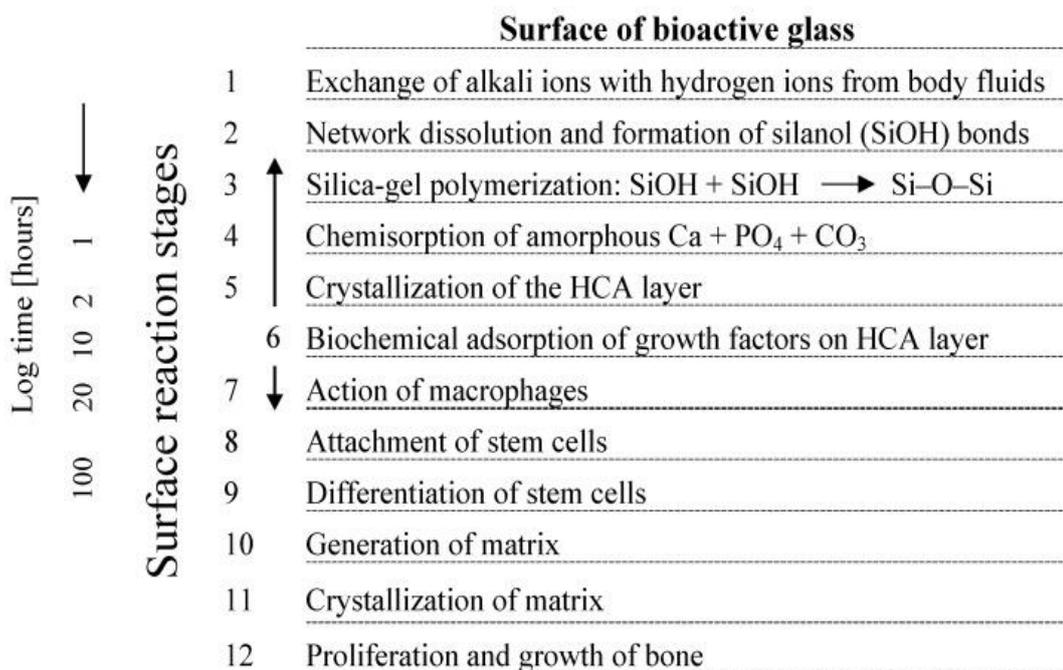


Fig. 4.1: Sequenza delle reazioni interfacciali coinvolte nella formazione di un legame tra l'osso e un vetro bioattivo [35].

Le 11 fasi di reazione di bioattività del biovetro vengono suddivise in due diversi macro-stadi:

- Formazione dello strato di idrossicarbonatoapatite (HCA), che avviene durante le prime 5 fasi di reazione e culmina nella cristallizzazione del film amorfo di fosfato di calcio;
- Dissoluzione dei prodotti ionici dalla superficie del BG e osteogenesi, che porta alla mineralizzazione della matrice extracellulare [33].

#### 4.2.1 Formazione dello strato di HCA

Il primo evento significativo nella formazione del legame impianto-tessuto risulta essere la formazione di uno strato simil-idrossicarbonatoapatite (HCA), osservato sia in vitro che in vivo sulla superficie del materiale, senza differenze significative.

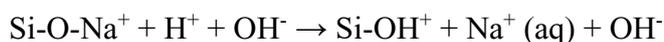
Nella formazione di tale strato, i prodotti di dissoluzione provenienti dal materiale giocano un ruolo determinante: infatti, si accumulano nell'ambiente causando variazioni locali del pH fisiologico e variazioni nella composizione chimica della soluzione.

Il meccanismo di formazione dello strato di HCA interposto tra il materiale e i fluidi biologici coinvolge le prime cinque fasi del meccanismo citato e si verificano apparentemente in sequenza.

Fase 1: Le rapide reazioni di scambio ionico tra i modificatori della rete vetrosa ( $\text{Na}^+$  e  $\text{Ca}^{2+}$ ) e gli ioni  $\text{H}^+$  (o  $\text{H}_3\text{O}^+$ ) della soluzione portano all'idrolisi dei gruppi di silice e alla creazione di gruppi silanolo ( $\text{Si-OH}$ ) sulla superficie del vetro:

Vengono rilasciati anche ioni  $(\text{PO}_4)^{3-}$ , se presenti nella composizione di partenza ed il pH della soluzione aumenta a causa del consumo di ioni  $\text{H}^+$ .

La reazione chimica è riportata di seguito:



Questa reazione avviene molto rapidamente, entro pochi minuti dall'esposizione ai fluidi corporei. Lo strato superficiale viene disalcalizzato (impovertito di cationi alcalini) ed è caratterizzato da una carica negativa netta superficiale.

Fase 2: l'aumento del pH (o della concentrazione di  $\text{OH}^-$ ) porta all'attacco della rete di vetro  $\text{SiO}_2$  e alla dissoluzione della silice, sotto forma di acido silicico,  $\text{Si}(\text{OH})_4$ , nella soluzione e alla continua formazione di gruppi  $\text{Si-OH}$  sulla superficie del vetro:



È stato dimostrato che la silice solubile rilasciata ha un grande impatto sulla proliferazione delle cellule responsabili della formazione di nuovo osso nell'area adiacente alla superficie del vetro.

Fase 3: condensazione e polimerizzazione di uno strato amorfo ricco di  $\text{SiO}_2$  (tipicamente di 1-2  $\mu\text{m}$  di spessore) sulla superficie del vetro impoverito in  $\text{Na}^+$  e  $\text{Ca}^{2+}$ .

La superficie è caratterizzata da microporosità, con un diametro medio dei pori compreso tra 30 e 50 Å e un'area superficiale effettiva fino a 100  $\text{m}^2/\text{g}$ .

Fase 4: ulteriore dissoluzione del vetro, associata alla migrazione di ioni  $\text{Ca}^{2+}$  e  $(\text{PO}_4)^{3-}$  dal vetro attraverso lo strato ricco di  $\text{SiO}_2$  e dalla soluzione, che porta alla formazione di uno strato di fosfato di calcio amorfo (ACP) sulla superficie dello strato ricco di  $\text{SiO}_2$ .

Fase 5: il vetro continua a dissolversi, mentre lo strato ACP incorpora  $(\text{OH})^-$  e  $(\text{CO}_3)^{2-}$  dalla soluzione e cristallizza come strato HCA.

Con la formazione iniziale di uno strato di HCA, si ritiene che i meccanismi biologici di adesione all'osso comportino l'adsorbimento di fattori di crescita, seguito dall'attaccamento, dalla proliferazione e dalla differenziazione di cellule osteoprogenitrici. Gli osteoblasti (cellule che formano l'osso) creano matrice extracellulare (collagene), che si mineralizza formando un minerale nanocristallino e collagene sulla superficie dell'impianto in vetro, mentre la degradazione e la conversione del vetro continuano nel tempo.

Lo spessore dello strato di HCA aumenta in funzione del tempo fino a 100  $\mu\text{m}$ . La conformità dell'interfaccia è fondamentale per il mantenimento meccanico del legame.

Come accennato in precedenza, poiché la composizione influenza il tasso di formazione di HCA, si può osservare un comportamento diverso nei vari sistemi a base di silice, con una consistente diminuzione del potenziale di bioattività all'aumentare del contenuto di silice fino al 60 % in peso.

Le composizioni a basso contenuto di silice mostrano una rete meno interconnessa che può dissolversi rapidamente, in modo che le reazioni riportate avvengano in un tempo minore. Inoltre, la connettività della rete dipende fortemente dalla presenza di cationi modificatori come  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Ti}^{4+}$  o  $\text{Ta}^{5+}$ , che possono essere incorporati opzionalmente nella formulazione del vetro e possono sostituire gli atomi di Ca e Na. In questo caso si osserva una riduzione della bioattività come conseguenza della diminuzione della velocità di dissoluzione [29], [33], [38].

## **4.2.2 Prodotti di dissoluzione ionica e osteogenesi**

Le fasi di reazione che seguono la formazione dello strato di HCA non sono ancora del tutto note. Tuttavia, si può affermare che la presenza di tale strato favorisce l'adsorbimento delle proteine, portando all'ancoraggio, alla proliferazione e alla successiva differenziazione cellulare. Una volta differenziate nel fenotipo appropriato, le cellule sono in grado di sintetizzare una matrice extracellulare che verrà poi mineralizzata.

L'assorbimento di specie organiche come proteine e fattori di crescita (stadio 6) è responsabile delle caratteristiche dello strato HCA, poiché avviene in concomitanza con i primi quattro stadi.

Lo strato di reazione influenza il tempo necessario ai macrofagi per preparare il sito di impianto e consentire l'inizio della rigenerazione tissutale (stadio 7). Dall'impianto del materiale, sono necessarie 12 ore per la colonizzazione della superficie da parte delle cellule staminali (stadio 8). Durante lo stadio 9, le cellule staminali proliferano e si differenziano in un fenotipo osteoblastico maturo. Gli osteoblasti iniziano a produrre vari fattori di crescita che innescano l'adesione cellulare, la mitosi e la sintesi di proteine della matrice extracellulare (stadio 10), che portano, dopo 6-12 giorni, alla mineralizzazione della matrice (stadio 11) [29], [33], [38].

## **4.2.3 Influenza dei prodotti di dissoluzione ionica sul ciclo cellulare**

Larry Hench ha classificato il 45S5 Bioglass® come materiale bioattivo di classe A sulla base del livello di interazione con il tessuto circostante che presenta una volta impiantato. Questo vetro, infatti, ha effetti intracellulari sulla proliferazione del tessuto osseo grazie al rilascio di silice solubile e di altre specie ioniche, ma anche effetti extracellulari dovuti all'elevata area superficiale e alla porosità su scala nanometrica degli strati di gel di silice idrata e di apatite idrossicarbonata che si formano rapidamente [33].

Un controllo rigoroso dei tassi di rilascio dei prodotti ionici è fondamentale affinché il materiale mostri un comportamento bioattivo. Se venissero rilasciati troppi ioni, si potrebbero osservare alcuni effetti tossici.

Il processo di mitosi cellulare è essenziale per la formazione di nuovo tessuto osseo. Di conseguenza, è necessario fornire stimoli chimici corretti per consentire alle cellule osteo-progenitrici di entrare nelle fasi attive del ciclo cellulare.

È stato riscontrato che i prodotti di dissoluzione regolano la trascrizione di alcuni fattori responsabili della transizione dalla fase G0 alla fase G1 del ciclo cellulare. La fase G0 è rappresentativa di uno stato di riposo cellulare, la fase successiva indica un periodo di crescita (fase G1). La seconda fase di crescita è chiamata G2. Se la cellula entra nella fase G2, ha luogo il processo di mitosi.

Il processo di apoptosi cellulare ha luogo se le condizioni dell'ambiente circostante non sono adatte al completamento delle fasi G1 e G2.

Il controllo sul ciclo cellulare degli osteoblasti si ottiene monitorando il rilascio di ioni derivanti dalla dissoluzione del vetro e in particolare la concentrazione di Si e Ca all'interfaccia cellule-soluzione, al fine di controllare l'attivazione dei geni responsabili del processo di osteogenesi.

Gli ioni  $\text{Ca}^{2+}$  aumentano la produzione di IGF-II e di glutammato da parte degli osteoblasti, mentre gli ioni silicato stimolano la produzione di collagene di tipo I da parte di cellule osteoblastiche umane [30], [38].

### **4.3 PROCESSI DI FABBRICAZIONE DEI BIOVETRI**

I metodi di produzione della bioceramica hanno fatto progressi costanti negli ultimi 50 anni. Per la fabbricazione dei biovetri vengono utilizzati diversi metodi, ma quelli comunemente impiegati si distinguono in due macro-classi di processi produttivi, ovvero le vie di melt-quenching (fusione e tempra) e le strategie sol-gel. [32]

Gli scaffolds di vetro bioattivo derivati da fusione prevedono come prima fase la fusione ad alte temperature, generalmente tra 1300 °C e 1450 °C, in crogioli di platino (per evitare contaminazioni), di diversi ossidi, come  $\text{SiO}_2$ ,  $\text{Na}_2\text{O}$ ,  $\text{CaO}$  e  $\text{P}_2\text{O}_5$ ; inoltre, ai vetri bioattivi possono essere aggiunti ossidi di zinco, magnesio, titanio, boro, argento, ecc. per migliorare la funzionalità e la bioattività del vetro, dopodiché avviene un rapido raffreddamento per congelare la struttura atomica. La seconda fase è la ricottura, che consiste nel riscaldare il biovetro prodotto per ridurre le tensioni interne dovute all'elevata espansione termica del materiale.

Inoltre, la ricottura può ridurre la quantità di ossidi di metalli alcalini volatili e favorire la precipitazione di cristalli di apatite nella matrice di vetro [31]. Nonostante il BG 455S sia il più

studiato, anche altri BG, come l'S53P4 e le vetroceramiche A-W con composizioni diverse, hanno mostrato un grande interesse per il metodo della fusione. Durante la fusione, la temperatura deve essere scelta in modo da ottenere una fusione omogenea e priva di bolle. Il processo di fusione può essere eseguito più volte per raggiungere un livello di omogeneità elevatissimo. Il tempo necessario per la fusione varia a seconda delle dimensioni dei lotti. La ricottura viene eseguita sui vetri trattati termicamente al di sotto della temperatura di transizione vetrosa ( $T_g$ ) che aiuta a eliminare le tensioni residue prodotte durante il processo di raffreddamento. Al di sopra della  $T_g$ , i vetri sinterizzati permettono di formare architetture porose (scaffold), di disegnare fibre o di formare particelle sigillanti utilizzate per il rivestimento di superfici. Il biovetro è stato utilizzato anche come materiale di rivestimento di impianti metallici biodegradabili per migliorarne la bioattività e la biocompatibilità, utilizzando diversi metodi di fabbricazione [32]. La cristallizzazione è un aspetto critico quando si considera la gamma compositiva dei BG, poiché i trattamenti termici, utilizzati ad esempio per il processo di sinterizzazione, potrebbero indurre la devettrificazione. Tuttavia, è possibile progettare opportunamente i parametri di processo studiando accuratamente le dinamiche di cristallizzazione del sistema, al fine di ottenere materiali vetroceramici bioattivi con proprietà specifiche. Inoltre, è possibile controllare la nucleazione dei cristalli variando la composizione del vetro [33].

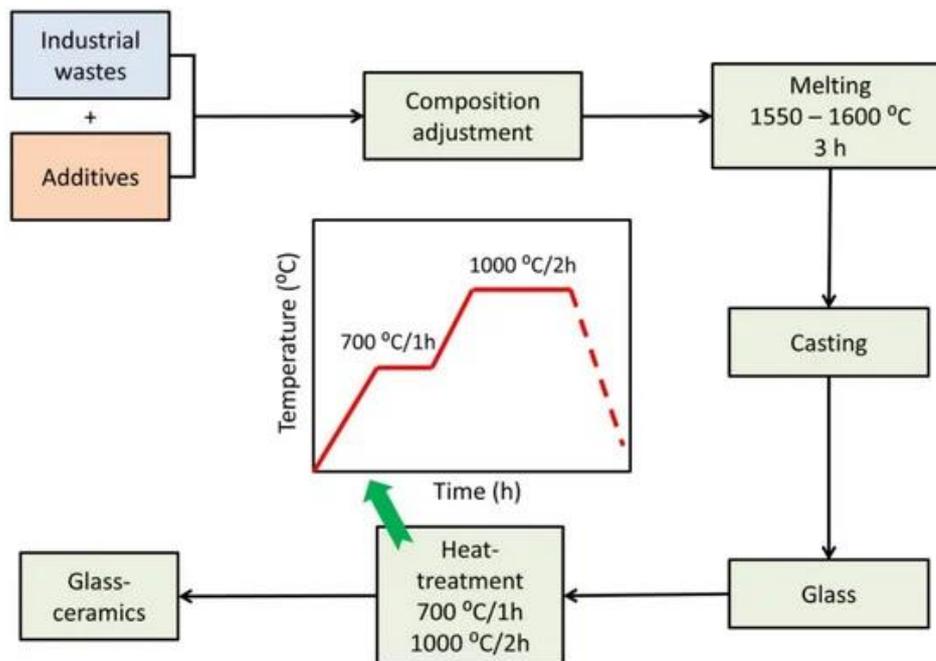


Fig. 4.2: Rappresentazione schematica della produzione di vetro e vetroceramica.

Il metodo sol-gel invece forma e assembla essenzialmente nanoparticelle di silice a temperatura ambiente. Si tratta di una via di sintesi basata sulla chimica in cui una soluzione contenente i precursori compositivi subisce reazioni di tipo polimerico a temperatura ambiente per formare un gel. Il gel è una rete inorganica umida di silice legata covalentemente, che può essere poi essiccata e riscaldata, ad esempio a 600 °C, per diventare un vetro.

Le differenze fisiche tra i vetri derivati da fusione e sol-gel consistono nel fatto che i vetri sol-gel tendono ad avere una nanoporosità intrinseca, mentre i vetri plasmati da fusione sono densi. La nanoporosità può determinare una migliore risposta cellulare grazie alla nanotopografia e un'area superficiale specifica superiore di due ordini di grandezza rispetto a composizioni simili di vetro derivato da fusione. Le composizioni sol-gel hanno solitamente meno componenti rispetto ai vetri bioattivi ottenuti per fusione. Questo perché il ruolo principale dell' $\text{Na}_2\text{O}$  nei vetri bioattivi ottenuti per fusione è quello di abbassare il punto di fusione, migliorando la lavorabilità. Inoltre, aumenta la solubilità del vetro, importante per la bioattività. L'elevata area superficiale dei vetri sol-gel determina un'alta velocità di dissoluzione e, poiché non c'è fusione, il sodio non è necessario nella composizione [30].

Il processo sol-gel ha una grande versatilità: i vetri bioattivi possono essere prodotti come polveri o monoliti nanoporosi o come nanoparticelle semplicemente cambiando il pH del processo. Un tipico precursore di silicato è il tetraetil ortosilicato (TEOS),  $\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_4$ , che reagisce con l'acqua (idrolisi) in condizioni acide o basiche per formare una soluzione (sol) contenente nanoparticelle. Se la sintesi avviene in condizioni basiche si possono formare nanoparticelle bioattive sferiche e submicrometriche. Più comunemente, microparticelle, monoliti o schiume vengono prodotti utilizzando la catalisi acida. Con la catalisi acida le nanoparticelle primarie che si formano nel sol si coalizzano e si verifica la condensazione (polimerizzazione), formando legami Si-O-Si. Le nanoparticelle si sgrossano, si coalizzano e si legano tra loro, formando una rete di gel di nanoparticelle assemblate.

Il trattamento termico viene utilizzato per invecchiare, asciugare e stabilizzare il gel per produrre un vetro nanoporoso. Quando l'acqua e l'alcol evaporano durante l'essiccazione, lasciano dietro di sé una rete di pori interconnessi. I pori sono gli interstizi tra le nanoparticelle coalizzate e la loro dimensione dipende dai precursori utilizzati, dalla composizione del vetro e dal pH della reazione [30], [33].

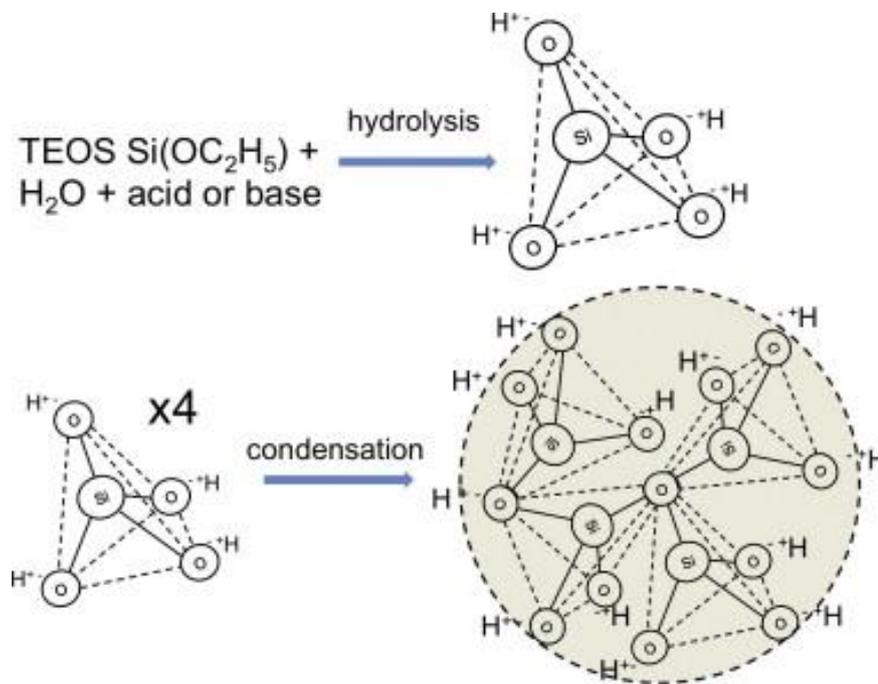


Fig. 4.3: Schema delle reazioni nel processo sol-gel: formazione di tetraedri e nanoparticelle di silice a temperatura ambiente [30].

## 4.5 MECCANICA DEL BIOVETRO

Una proprietà fondamentale, in particolare per gli scaffold destinati alla riparazione di ossa sotto carico, è la risposta meccanica poiché gli scaffold devono avere proprietà meccaniche paragonabili a quelle del tessuto da sostituire. Come introdotto nel Capitolo 2 l'osso corticale, che si trova principalmente nell'asta delle ossa lunghe e come involucro esterno dell'osso trabecolare, è molto più denso, con una porosità del 5-10%, mentre l'osso trabecolare è molto più poroso, con una porosità compresa tra il 50 e il 90%. Perciò le proprietà meccaniche dell'osso variano da un soggetto all'altro, da un osso all'altro e all'interno di diverse regioni dello stesso osso. Le proprietà meccaniche sono anche altamente anisotrope, come risultato della microstruttura orientata. Tuttavia, sulla base di test su campioni di grandi dimensioni, la resistenza alla compressione e il modulo elastico dell'osso corticale sono stati riportati nell'intervallo 100-150 MPa e 5-15 GPa, rispettivamente, nella direzione parallela all'asse di orientamento (asse lungo). La resistenza e il modulo nella direzione perpendicolare all'asse lungo sono tipicamente 1,5-2 volte inferiori. È stato riportato un ampio intervallo per il modulo elastico (0,1-5 GPa) e la resistenza alla compressione (2-12 MPa) dell'osso trabecolare. Le

proprietà meccaniche degli scaffold porosi dipendono dal tipo di biomateriale, dalla microstruttura e dal metodo di fabbricazione [33], [39].

La Tabella 4.2 riassume le proprietà meccaniche dell'osso trabecolare e corticale umano confrontandole con il Bioglass® 45S5 denso.

<b>Material Property</b>	<b>Trabecular Bone</b>	<b>Cortical Bone</b>	<b>45S5 Bioglass</b>
Compressive strength (MPa)	0.1–16	130–200	500
Tensile strength (MPa)	n.a.	50–151	42
Compressive elastic modulus (GPa)	0.12–1.1	11.5–17	n.a.
Young's modulus (GPa)	0.05–0.5	7–30	35
Fracture toughness (MPa·m <sup>1/2</sup> )	n.a.	2–12	0.7–1.1

Tab. 4.2: Proprietà meccaniche dell'osso trabecolare e corticale rispetto alla composizione 45S5 BG [33].

I limiti delle prestazioni meccaniche degli scaffold BG sono legati alla fragilità intrinseca dei vetri e alla struttura interconnessa e porosa richiesta nelle applicazioni TE. Il cedimento meccanico potrebbe verificarsi sia durante l'impianto chirurgico del dispositivo sia nella fase post-operatoria, poiché la dissoluzione del materiale può portare alla formazione di cricche responsabili della rottura della struttura anche in condizioni di sottocarico.

Infine, è stato riportato che un'elevata porosità negli scaffold vetroceramici comporta basse proprietà meccaniche. In particolare, è stata riscontrata una relazione lineare altamente negativa tra la porosità dello scaffold e la resistenza alla compressione. Inoltre, è necessario osservare che il verificarsi della nucleazione cristallina come avviene negli scaffold di vetroceramiche la quale produce un rafforzamento dello scaffold ma, allo stesso tempo, può ridurre la reattività dello scaffold all'ambiente fisiologico, poiché parte della struttura amorfa viene sostituita da una fase cristallina, che risulta in una migliore stabilità biochimica rendendole però così meno bioattive rispetto alle loro controparti in vetro [33].



# **CAPITOLO 5: TECNOLOGIE DI MANIFATTURA ADDITIVA PER MATERIALI CELLULARI AVANZATI**

La fabbricazione additiva, detta anche prototipazione rapida o fabbricazione solida a forma libera (SFF), è un termine che descrive un gruppo di tecniche che possono essere utilizzate per fabbricare oggetti in modo stratificato a partire da un file di progettazione assistita da computer (CAD), senza l'uso di strumenti tradizionali come stampi o matrici. La tecnica può essere utilizzata per costruire impalcature la cui struttura segue un'architettura predefinita modellata al computer. In questo modo, l'architettura dello scaffold può essere controllata e ottimizzata per ottenere la risposta meccanica desiderata, accelerare il processo di rigenerazione ossea e guidare la formazione di osso con la struttura anatomica corticale-trabecolare. Per la fabbricazione di scaffold sono state utilizzate diverse tecniche di SFF, tra cui: stereolitografia, polimerizzazione a due fotoni, stampa ad inchiostro diretto, elaborazione della luce digitale e modellazione a deposizione fusa [36].

## **5.1 STEREOLOGRAFIA**

Nel processo della stereolitografia (SL), la parte stampata scende in modo incrementale nel bagno di resina su cui viene scansionata la luce ultravioletta (UV) per la polimerizzazione e quindi uno strato liscio di resina viene coperto sulla superficie della parte stampata per la polimerizzazione dello strato successivo, e questo viene ripetuto fino alla costruzione dell'oggetto 3D.

Gli oggetti stampati sono quasi perfettamente lisci, incredibilmente dettagliati e gli strati sono quasi invisibili ad occhio nudo, con l'altezza minima dello strato che va da 25 a 100 micron. Il più grande svantaggio di questa tecnologia può essere una superficie di stampa più piccola e anche la tossicità delle resine liquide. Bisogna evitare che le resine tocchino la pelle ed evitare di inalare i vapori della resina.

La resina fotopolimerizzabile è una miscela complessa e prevede un fotoiniziatore che avvia la fotopolimerizzazione in presenza di un fotone di lunghezza d'onda appropriata. [32], [41].

La stereolitografia utilizza quindi un laser che solidifica la resina strato per strato nel serbatoio della stampante 3D. Una volta terminato lo strato, il piano di lavoro scende nuovamente per far posto a quello successivo. Il processo si ripete quindi fino all'ottenimento del pezzo finale.

La Masked Stereolithography (MSL), o Stereolitografia Mascherata, è una forma modificata di stampa 3D SL. Sebbene si basi sullo stesso principio di fotopolimerizzazione della resina mediante una sorgente luminosa, il metodo è leggermente diverso. In particolare, invece di utilizzare un raggio laser per tracciare gli strati, le stampanti MSL utilizzano una sorgente di luce ultravioletta più grande che viene poi mascherata selettivamente con uno schermo LCD per creare il disegno.

Nella Figura 5.1 sono illustrate schematicamente il funzionamento della stampa SL e MSL.

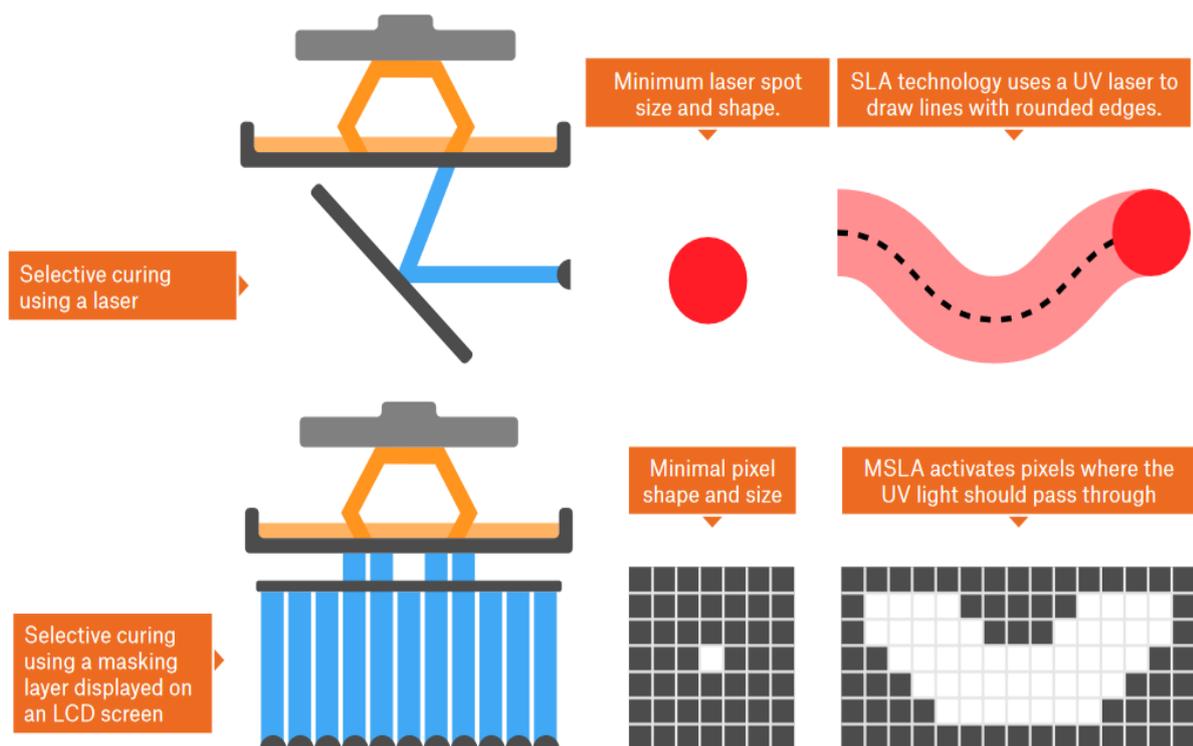


Fig. 5.1: Rappresentazione schematica della stampa stereolitografica (in alto), e della stereolitografia mascherata (in basso).

## 5.2 ELABORAZIONE DELLA LUCE DIGITALE

La tecnica di elaborazione della luce digitale (DLP, Digital Light Processing) è di fatto un derivato della SL e presenta un meccanismo simile, in cui un modello digitale viene trasferito su una resina fotopolimerizzabile esponendola in un'unica proiezione. La differenza principale con la SL è che la DLP utilizza la proiezione planare di una sorgente di luce UV basata su diodi emettitori di luce (LED), anziché un singolo fascio di luce UV [41].

L'intero strato viene solidificato in una volta sola grazie a un proiettore digitale. Le aree che ricevono l'esposizione dal proiettore vengono solidificate. Il vantaggio di questo metodo è ovvio: ogni strato viene solidificato nella stessa quantità di tempo, non importa quanti oggetti ci siano sulla piattaforma di stampa.

I parametri che influenzano la risoluzione nella tecnica DLP sono simili a quelli della SL e la risoluzione è limitata dalla profondità di polimerizzazione e dall'energia di esposizione. Tuttavia, la stampa DLP non è adatta alla produzione di parti di grandi dimensioni a causa del compromesso tra risoluzione e dimensioni di stampa [41].

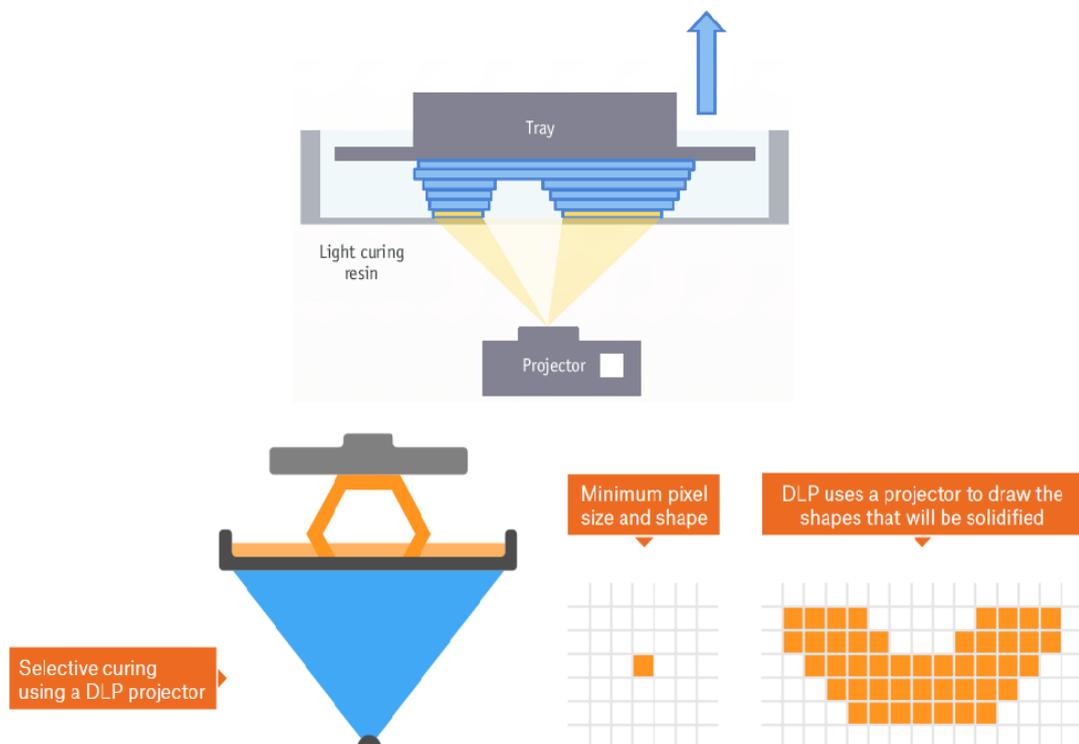


Fig. 5.2: Illustrazione dei principi base del processo di stampa 3D di elaborazione della luce digitale.

### 5.3 POLIMERIZZAZIONE A DUE FOTONI

La polimerizzazione a due fotoni (TPP) utilizza il confinamento spaziale dell'assorbimento a due fotoni (TPA) attraverso l'interazione non lineare di un raggio laser ad impulsi con una resina polimerica, consentendo una complessa fabbricazione di 2D E 3D micro/nano.

Il processo è anche noto come “litografia a due fotoni”, e consiste nel polimerizzare – trasformando in solida – una resina liquida monomerica, grazie all’azione di un fascio laser. La polimerizzazione avviene solo se il monomero assorbe un quantitativo minimo di energia, corrispondente a due fotoni (da cui il nome del processo), e questo avviene solo al centro del fascio laser, consentendo precisioni dell’ordine delle centinaia di nanometri. La polimerizzazione può, tra l’altro, avvenire ovunque nella resina, non necessariamente a strati consecutivi come avviene per altre tecnologie, e questo rappresenta un grande vantaggio pratico. L'area vicina al voxel polimerizzato rimane inalterata e, spostando il campione contro il fascio di luce focalizzata, è possibile realizzare le caratteristiche desiderate. Questa tecnologia AM è emersa come un forte concorrente nelle applicazioni scientifiche e industriali, tra cui componenti fotonici, metamateriali e metastrutture e micromacchine che utilizzano resine polimeriche [41].

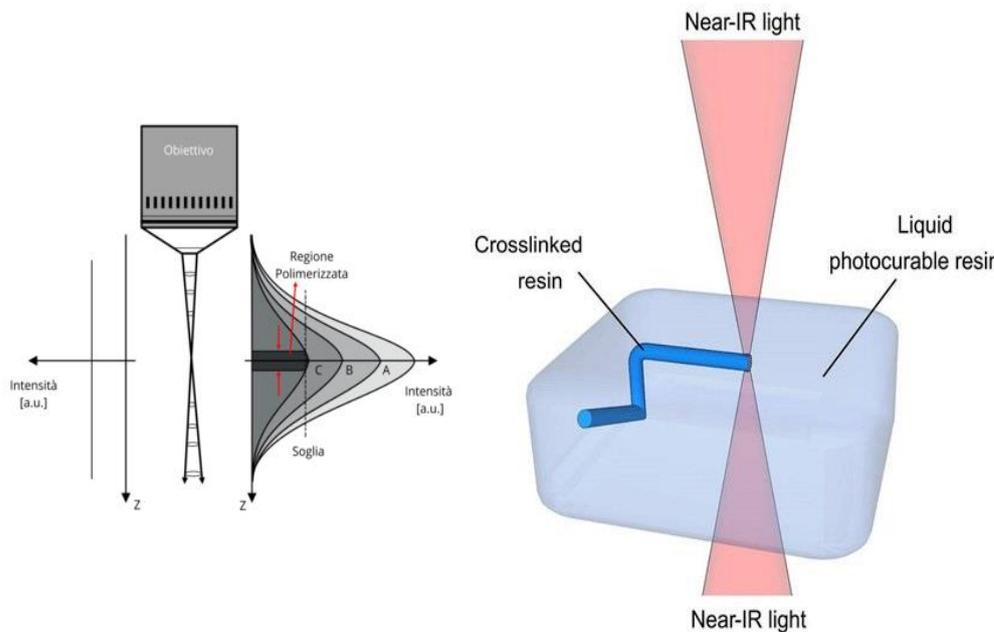


Fig. 5.3: Illustrazione schematica del funzionamento della polimerizzazione a due fotoni.

## 5.4 SCRITTURA AD INCHIOSTRO DIRETTO

La tecnica di scrittura a inchiostro diretto (DIW) prevede l'estrusione a pressione e la deposizione senza riscaldamento di un inchiostro/pasta denso e carico di particelle solide fini attraverso un ugello su un substrato per formare oggetti 3D (Figura 5.4). La scrittura a inchiostro diretto permette di depositare il materiale fluido-denso, chiamato inchiostro per assonanza con le stampanti 2D, sempre su diversi strati non a partendo da un modello tridimensionale, ma da un percorso bidimensionale ripetuto nello spazio.

I vantaggi del DIW includono il basso costo, la velocità di stampa e l'ampio inviluppo di stampa, oltre a un sistema di stampa meno complicato. Tuttavia, la reologia dell'inchiostro ceramico per la DIW è cruciale, in quanto deve possedere una tensione di snervamento sufficiente e la sua viscosità e proprietà elastiche devono essere controllate con precisione per il mantenimento delle forme, soprattutto per le strutture con caratteristiche di sporgenza. Anche la risoluzione di stampa è influenzata in modo significativo dal diametro dell'ugello, che può essere compreso tra decine e centinaia di micrometri, con conseguente effetto a scala che causa bassa risoluzione, scarsa finitura superficiale ed elevata anisotropia delle proprietà geometriche e meccaniche delle parti stampate [32], [41].

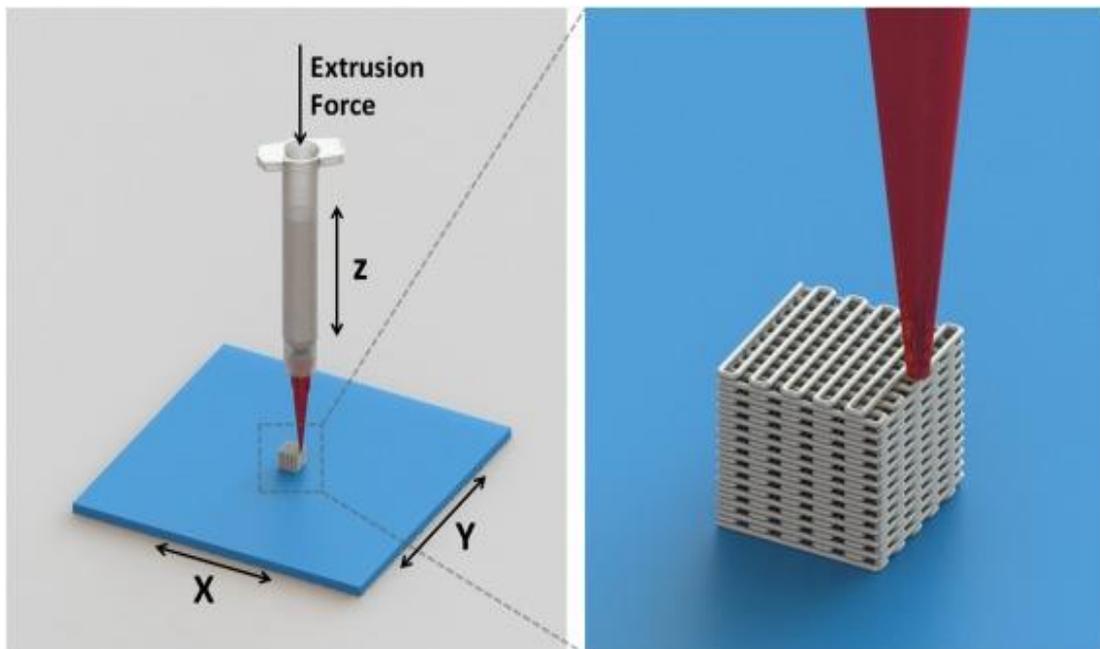


Fig. 5.4: Illustrazione schematica della tecnologia Direct Ink Writing (DIW). [7]

## 5.5 MODELLAZIONE A DEPOSIZIONE FUSA

Il processo di fabbricazione per modellazione a deposizione fusa (FDM) prevede l'estrusione di filamenti composti termoplastici fusi da un ugello mobile, riscaldato a una temperatura superiore alla temperatura di transizione vetrosa del materiale polimerico coinvolto, su una piattaforma di costruzione in modo stratificato (Figura 5.5); il materiale si solidifica immediatamente sullo strato precedentemente stampato grazie al raffreddamento per creare oggetti 3D. La FDM è spesso considerata la tecnologia di stampa 3D più semplice. Gli elementi fondamentali per la FDM sono essenzialmente 3: un piatto di stampa sul quale viene stampato il pezzo; una bobina di filamento che funge da materiale di stampa e una testina di estrusione, anche chiamata estrusore. In sintesi, il filamento è fuso dall'estrusore della stampante, che deposita il materiale strato per strato sul piatto.

La differenza principale rispetto alla DIW è che il processo FDM prevede il riscaldamento. Tuttavia, gli svantaggi di una risoluzione di stampa inferiore, dell'effetto scala e dell'anisotropia intrinseca delle parti stampate, causati principalmente dal processo di stampa strato per strato basato sul filamento, sono simili al caso della DIW [41].

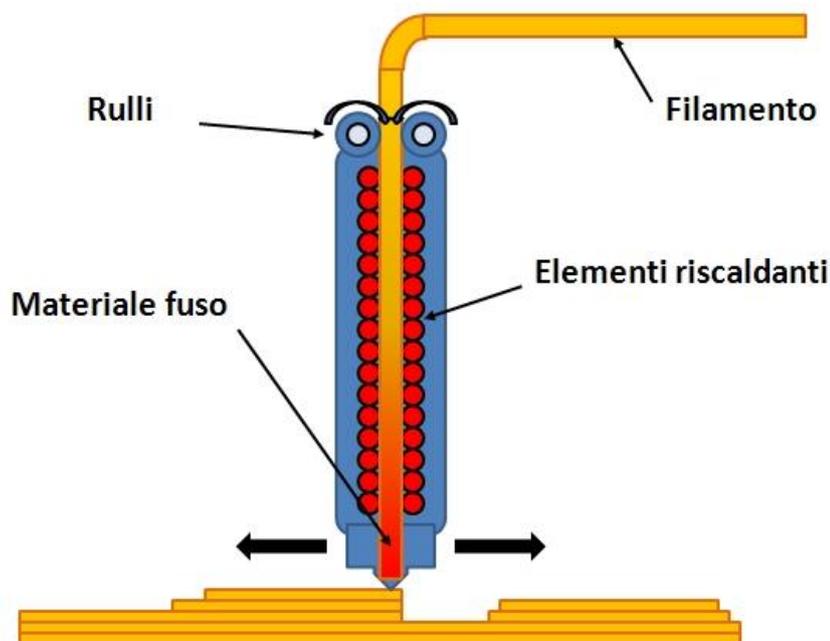


Fig. 5.5: Illustrazione schematica della modellazione a deposizione fusa.

## 5.6 STRUTTURE CELLULARI

La stampa 3D ha elaborato molti diversi tipi di materiali ceramici per l'ingegneria dei tessuti, inclusi HAp, CaP, solfato di calcio, BG e vetroceramiche. La stampa 3D può essere utilizzata per generare strutture di scaffold macroporose come le strutture cellulari.

Una struttura cellulare è una struttura aperta tridimensionale ordinata topologicamente composta da una o più celle unitarie ripetute. Queste celle sono definite dalle dimensioni e dalla connettività dei blocchi costitutivi collegati a nodi specifici.

Ottimizzando i parametri strutturali dei reticoli, come la topologia cellulare (connettività) e la geometria (dimensioni della cella e dei montanti), la risposta meccanica di queste strutture può essere significativamente alterata per migliorare le proprietà acustiche, dielettriche e meccaniche. Troviamo che le strutture reticolari AM sono significativamente superiori alle strutture cellulari prodotte da metodi di fabbricazione alternativi con porosità comparabile, soprattutto a causa del maggiore controllo geometrico e prevedibilità offerti dalla fabbricazione AM.

Nelle applicazioni biomediche, le strutture reticolari possono essere utilizzate per ridurre la rigidità degli impianti medici, avvicinandosi alla rigidità dell'osso. Ciò evita la schermatura delle sollecitazioni consentendo al contempo il flusso del fluido a causa dell'ampia porosità, con un elevato rapporto superficie/volume per facilitare l'osteointegrazione garantendo un grande rapporto resistenza-peso.

Le strutture reticolari possono essere 2D o 3D e possono essere prodotte con una varietà di mezzi, tra cui microfusione, una combinazione di estrusione e lavorazione di scariche elettriche, produzione di compositi, interlacciamento, incastro, pressatura a caldo o vari metodi di avvolgimento del filamento. Le strutture reticolari possono generalmente essere classificate in base alla loro risposta meccanica, che è governata dalla flessione o dallo stiramento.

Una struttura dominata dalla flessione subisce un momento flettente all'interno della struttura ed è quindi cedevole, mentre una struttura dominata dallo stiramento subisce carichi assiali. Cioè, è più rigido e più forte di una struttura a dominante curva. La topologia cellulare della struttura reticolare definisce se è governata da flessione o stiramento [42], [43], [44].

Le topologie cellulari basate su travi più comuni che sono state studiate sono il cubico a corpo centrato (BCC) e il cubico a facce centrate (FCC), o variazioni di questi, come l'inclusione di montanti z (BCCZ e FCCZ), che prendono il nome da analoghe strutture cristalline. Esistono anche altre topologie basate sulle travi, come il cubo, l'ottetto-traliccio e il diamante; le celle citate sono riportate in Figura 4.3 [42].

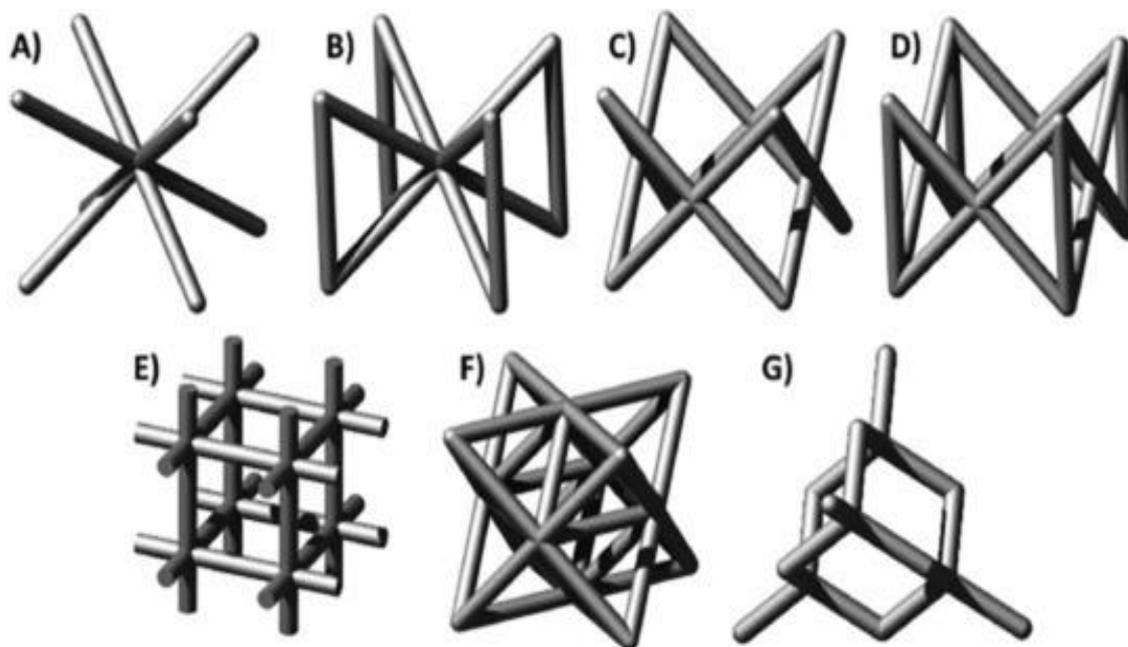


Fig. 4.3: Strutture reticolari a trave: BCC (A), BCCZ (B), FCC (C), FCCZ (D), cubica (E), Octet-truss (F) e diamante (G). [42]

Queste topologie a trave sono spesso scelte per la loro semplicità di progettazione, ma sono state anche generate dall'ottimizzazione topologica per massimizzare l'efficienza della distribuzione del materiale all'interno della struttura reticolare e sfruttare appieno le opportunità offerte dall'AM.

Sono state studiate anche strutture reticolari con celle unitarie basate su superfici minime triplicemente periodiche (TPMS), come il giroide di Schoen, il diamante di Schwartz e il Neovius (Figura 4.4). Vari parametri, come la periodicità e la densità relativa, possono essere modificati per regolare le prestazioni meccaniche.

Le strutture reticolari TPMS presentano potenziali vantaggi rispetto alle topologie basate su travi in termini di producibilità e fissazione ossea.

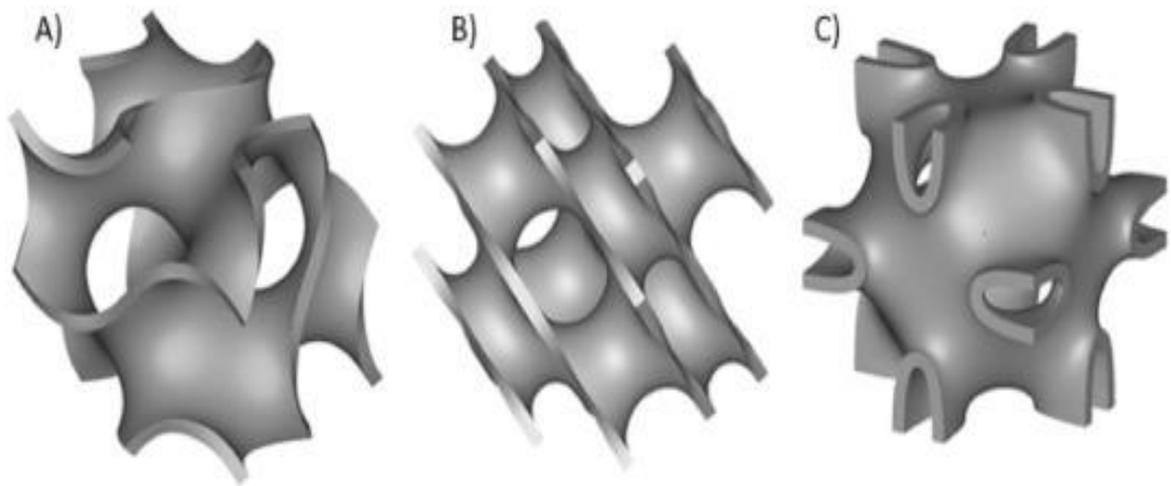


Fig. 4.4: Celle unitarie di superficie minima triplicemente periodiche: Giroide di Schoen (A), diamante di Schwarz (B) e Neovius (C). [42]

Gli studi suggeriscono anche che la curvatura delle superfici implantari svolge un ruolo critico nel promuovere la crescita dell'osso e, grazie alla loro somiglianza geometrica con l'osso trabecolare naturale e alla curvatura tridimensionale delle loro superfici, le strutture reticolari TPMS offrono potenzialmente una migliore fissazione dell'osso rispetto alle strutture reticolari a trave. Tuttavia, questi potenziali vantaggi non sono stati dimostrati in modo definitivo e le prestazioni comparative delle strutture reticolari basate sulle travi e TPMS rimangono un'area di ricerca ulteriore [42], [44].

### 5.6.1 Il modello Gibson-Ashby

Il modello Gibson-Ashby è il modello più noto e più utilizzato per prevedere le proprietà delle strutture cellulari, comprese le strutture reticolari. La gamma di proprietà meccaniche, termiche ed elettriche di una struttura reticolare possono essere previste in base alla densità relativa della struttura, e sono espresse come frazioni delle proprietà del materiale di base della struttura. Sono disponibili varie equazioni delle proprietà meccaniche, tra cui modulo di taglio, modulo di flessione, resistenza alla trazione e durezza, tutte funzioni della resistenza o del modulo strutturale. Queste proprietà dipendono dal tipo di risposta esibita dalla struttura (controllata dalla flessione o dallo stiramento) e hanno una legge di potenza positiva che dipende dalla densità relativa della struttura [42].

Le formule per il modulo e la resistenza delle strutture cellulari a flessione e a stiramento sono presentate nella Tabella 4.3, in cui:

$E^*$  = Modulo statico della struttura cellulare.

$E_s$  = Modulo statico del materiale di base della struttura cellulare.

$C$  = costante di Gibson-Ashby, il cui valore dipende dalla topologia e dalla geometria della cella unitaria ed è derivato da risultati sperimentali.

$\sigma^*$  = Resistenza della struttura cellulare.

$\sigma_{y,s}$  = Sforzo di snervamento del materiale di base della struttura cellulare.

<b>Response type</b>	<b>Mechanical property</b>	<b>Formula</b>
<i>Bending-dominated</i>	Modulus (E)	$E^*/E_s=C \cdot (\rho_{rel})^2$
	Strength ( $\sigma$ )	$\sigma^*/\sigma_{y,s}=C \cdot (\rho_{rel})^{3/2}$
<i>Stretch-dominated</i>	Modulus (E)	$E^*/E_s=C \cdot (\rho_{rel})$
	Strength ( $\sigma$ )	$\sigma^*/\sigma_{y,s}=C \cdot (\rho_{rel})$

Tabella 4.3: Formule del modello di Gibson-Ashby in cui  $\rho_{rel}$  rappresenta la densità relativa.[42]

# CAPITOLO 6: MATERIALI E METODI

Lo scopo della tesi, come da titolo, è stato quello di creare e caratterizzare scaffolds a base di biovetri silico-sodico-calcici supportati da emulsioni in polimero preceramico. Sono stati prodotti scaffolds a base di biovetro seguendo le composizioni 70S15C15N (70% SiO<sub>2</sub> - 15% Na<sub>2</sub>O - 15% CaO (wt %)) e 50S25C25N (50% SiO<sub>2</sub> - 25% Na<sub>2</sub>O - 25% CaO (wt %)), creati attraverso stampa 3D (stereolitografia mascherata) per mezzo di resina fotopolimerizzante e sottoposti a trattamento termico in atmosfera inerte (azoto) creando così una fase carboniosa di carbonio pirolitico. Gli scaffolds ottenuti sono stati sottoposti a numerose analisi e misurazioni: tramite misure di densità, porosità e prove di compressione è stato possibile determinare le caratteristiche fisico-meccaniche dei campioni prodotti, inoltre sono stati caratterizzati dal punto di vista microstrutturale e morfologico tramite microscopio ottico e microscopia elettronica a scansione (SEM). La composizione di fase è stata studiata mediante analisi a raggi X, spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier (FTIR) e spettroscopia Raman. Sono state eseguite anche prove di interesse biologico come l'analisi di rilascio del pH, dell'effetto fototermico tramite irradiazione infrarossa e prove di adesione cellulare.

## 6.1 CERAMICHE DERIVATE DA POLIMERI (PDC)

I polimeri preceramici sono stati proposti oltre 40 anni fa come precursori per la fabbricazione di ceramiche avanzate principalmente a base di silicio, generalmente indicate come ceramiche derivate da polimeri (PDC). Il processo di trasformazione da polimero a ceramica ha consentito importanti progressi tecnologici nella scienza e nella tecnologia della ceramica, come lo sviluppo di fibre ceramiche, rivestimenti o ceramiche stabili a temperature elevatissime (fino a 2000 C°) per quanto riguarda la decomposizione, la cristallizzazione, la separazione delle fasi e il creep. Di conseguenza, i possibili campi di applicazione delle PDC sono stati notevolmente ampliati dalle recenti attività di ricerca e sviluppo. Diversi campi ingegneristici chiave adatti all'applicazione delle PDC includono i materiali resistenti alle alte temperature (materiali energetici, automobilistici, aerospaziali, ecc.), i materiali duri, l'ingegneria chimica (supporto per catalizzatori, alimenti e biotecnologie, ecc.), i materiali funzionali nell'ingegneria elettrica e nella micro/nanoelettronica e materiali nell'ingegneria biomedica [45].

Il crescente interesse per le ceramiche derivate da polimeri negli ultimi due decenni è stato associato principalmente al loro utilizzo come precursori iniziali per la sintesi di materiali multifunzionali. Le ceramiche derivate da polimeri, note anche come polimeri organosiliconici preceramici, forniscono un processo efficace, sicuro e rapido per la produzione di ceramiche tecniche; i principali vantaggi sono la lavorazione (facile modellazione/formazione con tecniche di lavorazione polimerica, come la filatura per fusione, l'estrusione, lo stampaggio a iniezione, fabbricazione additiva) e le desiderabili proprietà del materiale. Le ceramiche derivate da polimeri sono emerse come una classe promettente di materiali ceramici, generalmente sintetizzati attraverso la degradazione termica controllata di precursori polimerici in atmosfera inerte. Questa conversione rapida e semplice da polimero a ceramica può essere utilizzata per produrre materiali compositi omogenei e di elevata purezza con una composizione nuova e proprietà eccezionali.

L'incorporazione di cariche, attive o passive, nei polimeri preceramici può indurre varie funzionalità e generare un'ampia gamma di composizioni e morfologie ceramiche. Il concetto di cariche fornisce uno strumento prezioso per ottenere non solo pezzi monolitici senza crepe, ma modifica anche la chimica e l'architettura delle PDC.

Negli ultimi 25 anni sono stati sviluppati e studiati polimeri preceramici a base di silicio come alternative ai materiali ceramici non ossidati a base di silicio attualmente utilizzati. La domanda di compositi ceramici nuovi e funzionali sta aumentando rapidamente, perché il mondo moderno si sforza di migliorare i propri standard di vita e di aprire possibilità imprevedute per la crescita economica e il benessere della società. In questo contesto, le ceramiche derivate da polimeri (PDC) offrono un percorso unico per sviluppare ceramiche funzionali a base di ossidi e non ossidi, grazie alle caratteristiche nanostrutturali costruite a partire dalla struttura molecolare dei precursori polimerici. L'interesse per i composti organosiliconici come precursori di ceramiche amorfe come SiOC, SiCN, SiBCN, ecc.. attraverso la pirolisi di questi materiali si è notevolmente sviluppato. In generale, la pirolisi dei polimeri organosiliconici preceramici in un'atmosfera non ossidativa (inerte) comporta la scissione dei legami organici funzionali nella struttura del polimero, portando a materiali ceramici inorganici che possiedono proprietà migliorate e insolite rispetto alle ceramiche esistenti/tradizionali [46]. Nell'intervallo di temperatura di ~600-800 °C avviene l'eliminazione dei gruppi funzionali organici tipici di un polimero (fenile, vinile, metile, ecc.) lasciando un residuo completamente ceramico; questa conversione avviene con rilascio di gas (sotto forma di metano, benzene e idrogeno) accompagnata da una riduzione di peso del 10-30 wt%, e quindi dalla formazione di componenti del materiale contenenti pori e fessure con un ritiro volumetrico fino al 70%; questo, a sua volta,

porta alla formazione di porosità e cricche indesiderate/incontrollate, che impediscono la conversione diretta di un componente di grandi dimensioni allo stato preceramico in una parte ceramica densa. Solo quando le dimensioni del componente sono ridotte (come nelle fibre), e quindi il percorso di diffusione dei gas generati è limitato, o quando è presente una via preferenziale per l'eliminazione dei gas di decomposizione (come nei corpi con un'elevata quantità di porosità interconnessa, ad esempio le schiume) è possibile produrre componenti ceramici privi di difetti (densi) [47].

La tecnologia basata su polimeri preceramici e riempitivi, recentemente presentata come estensione della ricerca sulle ceramiche derivate da polimeri, ha il vantaggio fondamentale di combinare sintesi e modellazione per la produzione di ceramiche a base di silicati e ossinitruri di silicio.

Nel caso dei silicati, la sintesi è associata alla reazione tra la silice, fornita dalla decomposizione termo-ossidativa delle resine siliconiche, e le particelle di ossido, fornite dai riempitivi, mentre la formatura, soprattutto sotto forma di corpi altamente porosi, può essere facilmente ottenuta utilizzando tecnologie di formazione dei polimeri ben consolidate e convenzionali [48].

I riempitivi possono essere attivi, ossia reagire con i prodotti di decomposizione del polimero preceramico per creare nuove fasi, o passivi, ossia non modificare la composizione della fase ceramica derivata da polimero. Le caratteristiche favorevoli dei polimeri preceramici, come le resine siliconiche, sono la loro disponibilità commerciale, le basse temperature di lavorazione e la possibilità di utilizzare tecniche di lavorazione dei polimeri per ottenere forme complesse; attraverso il controllo della miscela di composizione, della temperatura di lavorazione e dell'atmosfera di riscaldamento è possibile produrre componenti ceramici multifase, comprese le bioceramiche [49].

Le ceramiche derivate da polimeri di due famiglie, il silicio-ossicarburo e il silicio-carbonitruro, condividono una caratteristica comune: incorporano grandi quantità di carbonio, fino a circa un terzo molare, nella loro struttura molecolare. Il carbonio può essere incorporato solo per via organica, quando un polimero altamente reticolato (o un gel) viene pirolizzato nella ceramica. Il carbonio legato al silicio negli oligomeri organici a base di silicio viene mantenuto perché i legami silicio-carbonio sopravvivono meglio alla pirolisi rispetto ai legami C-H. Così l'idrogeno viene rilasciato, nell'intervallo di temperatura 700°-900°C, lasciando un eccesso di carbonio nella ceramica. In questo modo il carbonio, che è insolubile nella silice (si scioglie pochissimo se mescolato al vetro di silice fuso), può essere incorporato in essa attraverso il processo polimerico. [50]

I siliconi offrono un'opportunità senza precedenti per la sintesi diretta di nano-compositi vetro-ceramici contenenti carbonio. Se trattati in atmosfera non ossidante, i siliconi si trasformano in nanocompositi SiOC (ossicarburo di silicio), costituiti da nano-fogli di carbonio turbostratici incorporati in una matrice di vetro di silice modificata con legami Si-C oltre a legami Si-O. La presenza della fase carboniosa promuove la differenziazione osteogenica e, soprattutto, aumenta l'assorbimento della luce infrarossa. Il surriscaldamento degli scaffold contenenti carbonio sotto la luce infrarossa può essere utilizzato nella terapia del cancro o per la disinfezione [51].

I vetri a base di ossicarburo di silicio (SiOC) (chiamati anche vetri neri) sono quindi dei materiali che possono essere formalmente descritti come prodotti risultanti dall'incorporazione di carbonio in reti di vetro silicato poiché i precursori preceramici presentano legami Si-C e Si-O all'interno del loro backbone, che vengono conservati al momento della conversione termica del precursore in vetro. Gli ossicarburi di silicio rimangono amorfi fino a  $T = 1200^{\circ}\text{C}$ , presentano un'eccellente resistenza al creep fino a temperature elevate e un eccellente comportamento in ambienti ossidativi e corrosivi. L'incorporazione di elementi aggiuntivi nei sistemi Si-O-C può portare a un ulteriore miglioramento di queste proprietà [52].

## **6.2 PROCEDURA SPERIMENTALE**

### **6.2.1 Materiali di partenza e creazione delle miscele**

Come precursori della silice sono stati utilizzati una resina siliconica solida commerciale, H44 (poly-methyl-phenyl-silsesquioxane, Wacker-Chemie GmbH, Munich, Germany) e silice idrofoba (Aerosil R106 Fumed Silica Cyclotetrasiloxane, Octamethyl-,  $\text{C}_8\text{H}_{24}\text{O}_4\text{Si}_4$ , Evonik Industries AG, Hanau, Germany). I precursori siliconici sono stati miscelati con una resina acrilica fotopolimerizzante commerciale (Funtodo standard blend) e con un tensioattivo ed emulsionante Span 80 (Sorbitan Monooleate, Tokyo Chemical Industry co., Tokyo, Japan). Come riempitivi attivi sono stati utilizzati: calcio nitrato tetraidrato ( $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , Scharlau, Istanbul, Turkey) e separatamente sodio acetato triidrato e sodio nitrato ( $\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ , NORMAPUR e  $\text{NaNO}_3$  EssentQ, Leuven, Belgium, rispettivamente). La creazione dell'emulsione si basa sulla preparazione di una fase oleosa e una fase acquosa. La fase oleosa è preparata in due passi, il primo passo riguarda lo scioglimento di 6,11 g di resina siliconica

H44 in 3 g di resina acrilica. Per completare il passaggio la si lascia riposare per 24 ore per lasciare disperdere in modo omogeneo il silicone nella resina. Il secondo passo consiste nel miscelare assieme 17 g di resina acrilica, 1 g di Span 80 e 1 g di silice idrofoba. Una volta creata la miscela tramite miscelatore magnetico, questa si sottopone a 2 minuti di ultrasuono di punta per disperdere la silice nella miscela in modo omogeneo. Il sale di calcio (2,805 g) e il precursore di sodio (3,227 g di sodio acetato triidrato e alternativamente 2,016 g di sodio nitrato precedentemente disciolto 4,2 ml di acqua distillata) vengono aggiunti alla fase oleosa creando così la fase acquosa.

Il prodotto viene sottoposto ad ultrasuono di punta per 15 minuti (Badelin Sonoplus, Germany) mantenendolo in agitatore magnetico (MST magnetic stirrer, VELP scientifica). L'emulsione termina con un raffreddamento rapido, per evitare l'instabilità dell'emulsione.

La miscela è conclusa aggiungendo il silicone sciolto nella resina dopo le 24h creato precedentemente.

In totale sono stati creati scaffolds di biovetro con 2 composizioni differenti, 70S15C15N (70% SiO<sub>2</sub> - 15% Na<sub>2</sub>O - 15% CaO (wt %)) e 50S25C25N (50% SiO<sub>2</sub> - 25% Na<sub>2</sub>O - 25% CaO (wt %)); per ognuna di queste sono stati creati scaffolds utilizzando due precursori di ossido di sodio differenti: sodio acetato triidrato (SA) e sodio nitrato (SN), creando quindi in totale 4 miscele differenti.

I pesi di ogni sostanza utilizzata per la produzione delle diverse miscele sono riportati in Tabella 6.1.

	<b>70S15C15N- SA</b>	<b>70S15C15N- SN</b>	<b>50S25C25N- SA</b>	<b>50S25C25N- SN</b>
<b>Silice idrofoba (g)</b>	1	1	0,71	0,71
<b>Resina siliconica H44 (g)</b>	6,11	6,11	4,36	4,36
<b>Resina fotopolimerizzante (g)</b>	20	20	20	20
<b>Span 80 (g)</b>	1	1	1	1
<b>Calcio Nitrato Tetraidato (g)</b>	2,805	2,805	2,805	2,805
<b>Sodio Acetato triidrato (g)</b>	3,227	-	3,227	-
<b>Sodio Nitrato (g)</b>	-	2,016	-	2,016

Tab. 6.1: Pesi in grammi delle sostanze utilizzate per la creazione delle 4 miscele.

Le miscele create verranno definite come segue:

- 70S15C15N-SA: 70% SiO<sub>2</sub> - 15% Na<sub>2</sub>O - 15% CaO (wt %), precursore di sodio: sodio acetato triidrato
- 70S15C15N-SN: 70% SiO<sub>2</sub> - 15% Na<sub>2</sub>O - 15% CaO (wt %), precursore di sodio: sodio nitrato
- 50S25C25N-SA: 50% SiO<sub>2</sub> - 25% Na<sub>2</sub>O - 25% CaO (wt %), precursore di sodio: sodio acetato triidrato
- 50S25C25N-SN: 50% SiO<sub>2</sub> - 25% Na<sub>2</sub>O - 25% CaO (wt %), precursore di sodio: sodio nitrato

Le composizioni create sono tipiche di vetri silicati, quindi caratterizzati dalla presenza di silice (SiO<sub>2</sub>) come ossido che forma una rete tridimensionale in cui l'unità di base è il tetraedro SiO<sub>4</sub>. Ciascuna unità condivide fino a 4 atomi di ossigeno permettendo la creazione della rete 3D e connettendosi l'una all'altra tramite legami a ponte ossigeno -Si-O-Si-.

Il sodio e il calcio agiscono come modificatori di rete che interrompono la rete creando legami con ossigeno non pontanti.

## 6.2.2 Stampa e trattamento termico degli scaffolds

Gli scaffold prodotti tramite stampa 3D replicano le strutture cellulari a celle aperte a diamante e a giroide.

Un solido cellulare è definito come una struttura composta da celle e possono essere suddivisi in due gruppi: materiali a celle aperte e materiali a celle chiuse. I materiali a celle aperte sono generalmente costituiti da una rete di membrane interconnesse simili ad aste o a travi [44], [43].

Una delle applicazioni più importanti dei solidi cellulari è la chirurgia ortopedica, in cui gli impianti ortopedici devono sostituire l'osso e integrarsi con il tessuto osseo ospite. Le proprietà meccaniche, la permeabilità e le prestazioni biologiche come l'adesione, la crescita e la differenziazione delle cellule, delle strutture cellulari dipendono dalle loro caratteristiche morfologiche, come il tipo di cella unitaria, la porosità e la dimensione dei pori [53].

L'osso trabecolare ha una struttura cellulare, con una densità relativa tipicamente compresa tra 0,05 e 0,3 circa. L'osso cresce in risposta al carico, per cui la densità dell'osso trabecolare dipende dall'entità dei carichi e l'orientamento delle trabecole dipende dalla direzione del carico, inoltre l'osso trabecolare a bassa densità assomiglia a una schiuma a celle aperte (Figura 6.1).

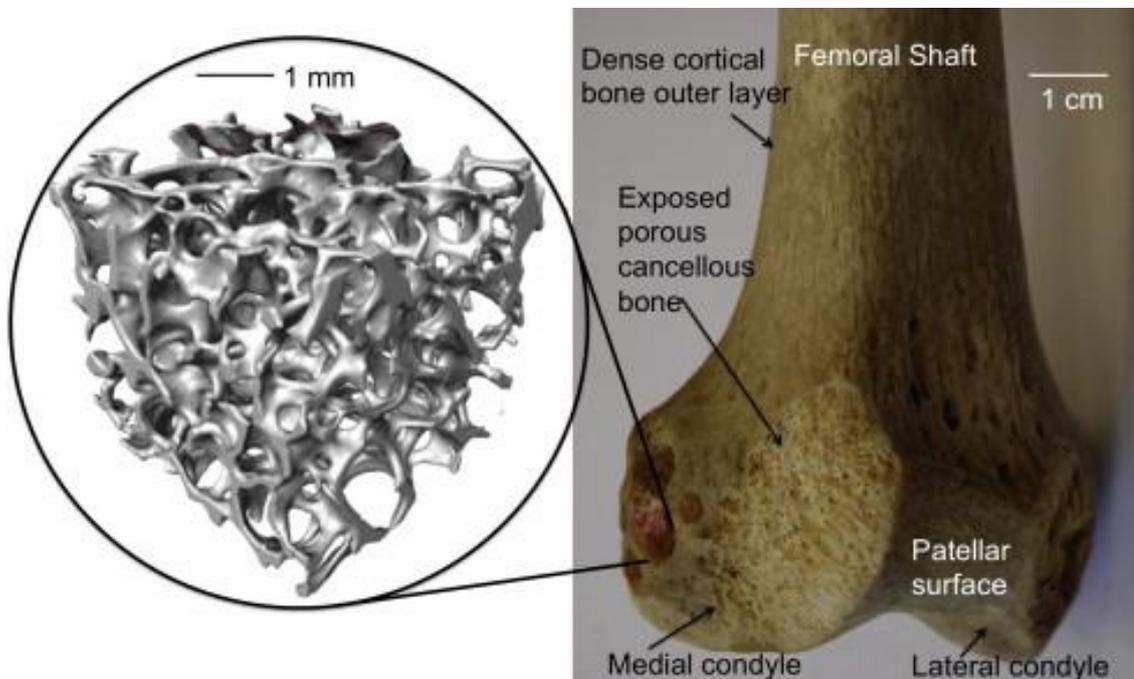


Fig. 6.1: Fotografia di un femore umano con un pezzo rimosso da un carotaggio. Riquadro: Immagine di microtomografia a raggi X ( $\mu$ CT) dell'osso trabecolare rimosso dal femore prossimale all'articolazione del ginocchio [30].

Il materiale a celle aperte permettere il passaggio di cellule e fluidi biologici, replicando il più fedelmente possibile la struttura cellulare dell'osso trabecolare. Per questi motivi i modelli cellulari utilizzati (diamante e giroide) sono entrambi modelli di solidi cellulari a celle aperte.

Per ogni miscela sono stati prodotti scaffolds cellulari a modello a diamante, inoltre per le 2 miscele aventi sodio acetato sono stati prodotti ulteriori scaffolds a modello giroide.

Il modello giroide è una struttura in cui la porosità non è definita come lo spazio tra travi interconnesse, ma corrisponde a canali elicoidali variamente impacchettati, divisi da membrane curve. Più precisamente, il giroide è un tipo di superficie minima triplicemente periodica, definita come superficie periodica lungo gli assi x, y e z, con curvatura media zero, solitamente descrive come superficie implicita:

$$(2\pi x/cs) * \cos(2\pi y/cs) + \sin(2\pi y/cs) * \cos(2\pi z/cs) + \sin(2\pi z/cs) \cos(2\pi x/cs) = 0.$$

dove  $cs$  è la dimensione delle celle. L'intera porosità può essere regolata in base al rapporto tra lo spessore della membrana e la dimensione del canale [54].

La cella cubica del diamante è una geometria isotropa con quattordici vertici e sedici spigoli uguali. Ogni nodo è collegato ad altri quattro nodi e l'angolo tra ogni due spigoli è di  $109,5^\circ$ . La lunghezza di ciascuno spigolo ( $L$ ), la lunghezza della cella unitaria ( $a$ ) e l'angolo tra i puntoni e il piano orizzontale,  $\theta$ , sono correlati tra loro attraverso le seguenti relazioni:

$$a = 2\sqrt{2} L \cos \theta \quad ; \quad a = \frac{4\sqrt{3}}{3} L \quad ; \quad \theta = 35,26^\circ \quad [53].$$

I modelli giroide e diamante importati nella stampante sono stati creati tramite software PrusaSlicer 2.4.2, i due modelli sono riportati nella Figura 6.2.

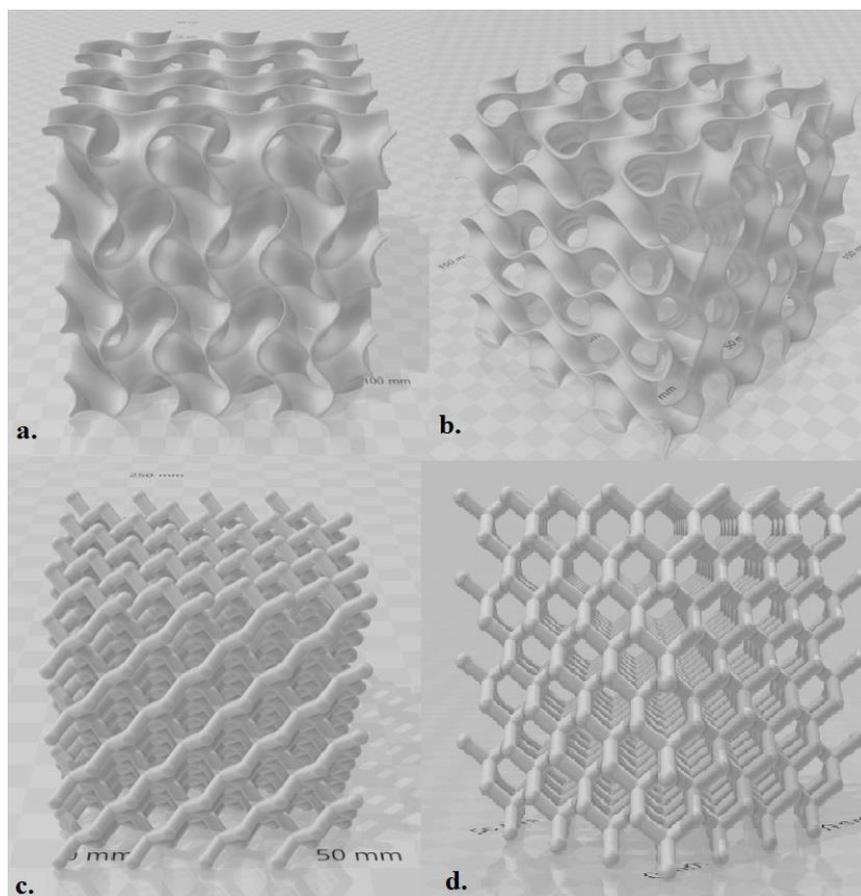


Fig. 6.2: Modello CAD giroide, a) frontale, b) ruotato di  $45^\circ$  e modello CAD diamante, c) frontale, d) ruotato di  $45^\circ$ .

Gli scaffold tridimensionali sono stati prodotti attraverso una stampante stereolitografica (Original Prusa SL-1, Prusa Research a.s., Praga, Repubblica Ceca) che opera nella gamma di luce visibile (405 nm). Lo spessore dello strato è stato impostato a 50  $\mu\text{m}$  e il tempo di esposizione a 15 secondi per layer.

La stampante è costruita attorno a un serbatoio resina con fondo trasparente e una piattaforma di stampa che viene immersa nel serbatoio resina per creare parti capovolte, strato dopo strato. La stampante utilizza la tecnica di stampa della stereolitografia con maschera (MSLA) in cui la forma di ogni strato viene visualizzata come maschera semitrasparente su uno schermo LCD e l'esposizione viene eseguita con un LED UV ad alte prestazioni. La luce UV può passare solo attraverso i pixel bianchi del display. Grazie alla risoluzione fissa del display LCD, gli oggetti stampati hanno una risoluzione XY fissa. Inoltre, questo metodo polimerizza un intero strato alla volta per mezzo di uno schermo di proiezione digitale per far lampeggiare l'immagine di ogni strato su tutta la piattaforma polimerizzando tutti i punti allo stesso tempo. Poiché il proiettore è uno schermo digitale, l'immagine di ogni strato è composta da pixel quadrati. Questo comporta la creazione di uno strato tridimensionale formato da piccoli cubetti rettangolari chiamati voxel. La luce proveniente dalla matrice di LED passa solo attraverso i pixel bianchi del display, polimerizzando il materiale fotosensibile e definendo un'area di proiezione per ogni strato stampato (Figura 6.3).

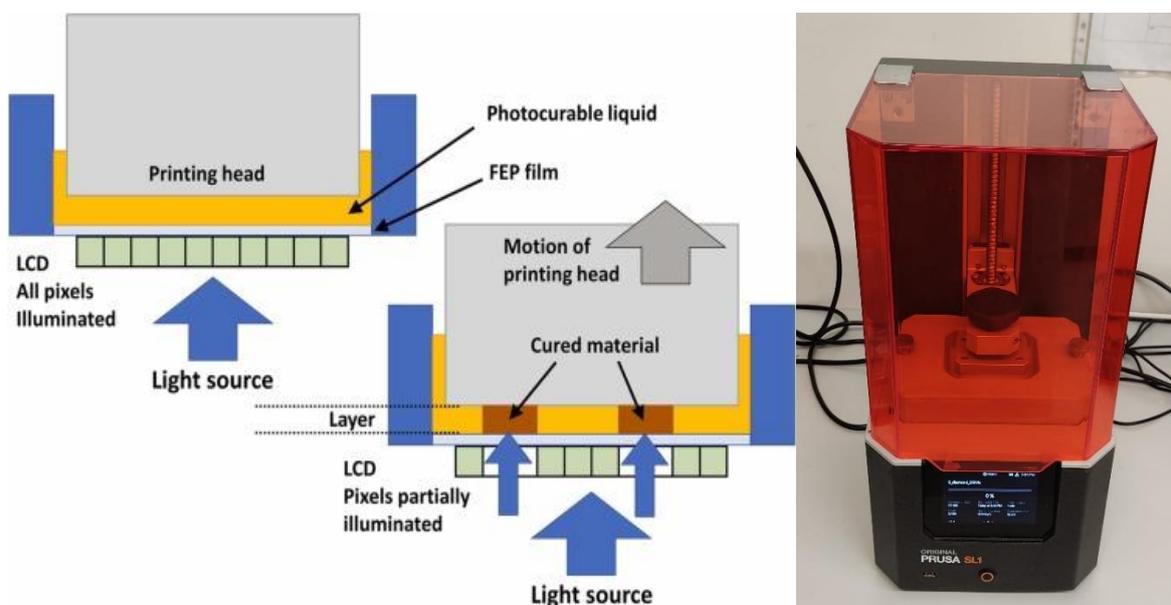


Fig. 6.3: Schema della stampa 3D stereolitografica con maschera [51] a sinistra, a destra la stampante Original Prusa SL-1 utilizzata.

Dopo la stampa, le strutture sono state pulite con aria compressa e lavate con alcol isopropilico. Dopo un'ulteriore polimerizzazione in una camera UV (365 nm, Robotfactory S.r.l., Mirano, Italia) per 20 minuti gli scaffold sono stati scaldati a 0,3 °C/min fino a 500 °C con un tempo di mantenimento di 5 h e poi sottoposti a un riscaldamento a 5 °C/min fino a 700 °C per un'ora; il trattamento è stato eseguito in azoto (atmosfera inerte) in forno tubulare (TERSID, Milano).

Come indicato precedentemente i siliconi se trattati in atmosfera non ossidante si trasformano in nanocompositi SiOC (ossicarburo di silicio).

I materiali a base di ossicarburo di silicio (SiOC) sono una classe di ceramiche derivate da polimeri che consente la formazione di una struttura omogenea a livello molecolare a partire da precursori polimerici. In questo sistema, gli atomi di ossigeno e carbonio condividono i legami con gli atomi di silicio nella struttura a rete amorfa, mentre possono coesistere carbonio elementare ed eventualmente nanodomini di SiO<sub>2</sub> e SiC [55].

La struttura del vetro ossicarburo di silicio è composta da una rete di tetraedri centrati sul silicio con angoli condivisi che incorporano sia legami Si-C che Si-O ma non C-O (tetraedri SiO<sub>x</sub>C<sub>4-x</sub>). La rete si distingue da una miscela di nanofasi separate e intercalate di carburo di silicio e ossido di silicio e presenta l'intera gamma di tetraedri SiO<sub>x</sub>C<sub>4-x</sub> con legami misti (ad es, SiO<sub>4</sub>, SiO<sub>3</sub>C, SiO<sub>2</sub>C<sub>2</sub>, SiOC<sub>3</sub> e SiC<sub>4</sub>). La presenza di carbonio all'interno della rete amorfa indica che i tetraedri di Si sono condivisi ad angolo non solo tramite ossigeni (cioè due tetraedri condividono un ossigeno), ma anche tramite carboni (cioè quattro tetraedri condivisi ad angolo da un carbonio). Questo porta formalmente a un grado di reticolazione della rete di ossicarburo di silicio significativamente più elevato rispetto a quello di un vetro SiO<sub>2</sub> completamente connesso (costituito da tetraedri Q<sub>4</sub> con condivisione d'angolo tramite ossigeni a ponte). Pertanto, la presenza di carbonio all'interno della rete dell'ossicarburo di silicio fornisce una rete completamente connessa tramite condivisione degli angoli e una struttura locale diversa da quella delle reti di silice o silicato [56].

Grazie al carbonio, che può far parte della rete di silicio-ossigeno o essere presente come fase separata, le ceramiche SiOC possiedono proprietà termiche, meccaniche e chimiche migliori rispetto alle ceramiche di silice pura [55]. La presenza della fase carboniosa promuove la differenziazione osteogenica e, soprattutto, aumenta l'assorbimento della luce infrarossa. Il surriscaldamento degli scaffold contenenti C sotto la luce infrarossa può essere utilizzato nella terapia del cancro o per la disinfezione [51].

### **6.2.3 Caratterizzazione degli scaffolds**

I valori di densità (geometrica, apparente e reale) e porosità sono stati determinati da misure geometriche di blocchi regolari tramite calibro digitale e dalla picnometria a gas elio (Ultrapyc 3000, Anton Paar, Graz, Austria), su scaffold interi e su materiali in polvere dopo il trattamento termico.

I campioni sono stati sottoposti a prove di compressione misurando la resistenza alla rottura utilizzando una macchina universale per prove sui materiali (Quasar 25, Galdabini, Cardano, Italia), operante ad una velocità della testa trasversale di  $1 \text{ mm min}^{-1}$ ; ogni punto di dati rappresenta un valore medio ottenuto testando almeno sei campioni.

Le caratterizzazioni morfologiche e microstrutturali degli scaffolds sono state eseguite utilizzando la stereomicroscopia ottica (Stemi 2000-C, Zeiss, Jena, Germany) e la microscopia elettronica a scansione (SEM, FEI Quanta 200 ESEM, Eindhoven, Paesi Bassi) dotata di spettroscopia a raggi X a dispersione di energia (EDS).

La composizione delle fasi è stata valutata mediante diffrazione di polveri a raggi X (XRD, Bruker AXS D8 Advance, Bruker, Germania) con il supporto del pacchetto di programmi Match! (Crystal Impact GbR, Bonn, Germania) e spettrografia a infrarosso in trasformata di Fourier (FTIR) (FT/IR-4200, JASCO, Tokio, Japan) eseguite su campioni in polvere.

I campioni selezionati di biovetro, in forma di polvere, sono stati ulteriormente studiati mediante spettroscopia Raman con sorgente di eccitazione laser Spectra-Physics Ar+ (Stabilite 2017-06S, Spectra-Physics, Mountain View, CA, USA) operante a 514,5 nm.

Infine, sono state eseguite analisi biologiche come lo studio dell'evoluzione del pH con campioni immersi in acqua distillata per 25 ore e analisi dell'effetto fototermico tramite irradiazione infrarossa per mezzo di una lampada a infrarossi.



# CAPITOLO 7: ANALISI E DISCUSSIONI

## 7.1 PROVE DI RESISTENZA A COMPRESSIONE

### 7.1.1 Misure di densità e porosità

I valori di densità geometrica (calcolata come massa/volume) sono stati determinati da misure geometriche tramite calibro digitale, mentre le misure delle masse tramite bilancia elettronica.

I valori di densità apparente ( $\rho_{app}$ ) e reale ( $\rho_{true}$ ) sono stati ottenuti tramite picnometria a gas elio su scaffolds interi e su materiali in polvere dopo il trattamento termico.

In Tabella 7.1 vengono riportati i valori di densità geometrica, densità apparente e densità reale; sono indicati anche i valori di ritiro volumetrico subito dai campioni pre e post trattamento termico suddividendo tutti i valori per composizione e modello 3D del biovetro prodotto. In Figura 7.1 ed in Figura 7.2 sono esposte le foto degli scaffolds prodotti pre e post trattamento con riferimento dimensionale.

Tipologia di Scaffold	$\rho_{geom}$ (g/cm <sup>3</sup> )	$\rho_{app}$ (g/cm <sup>3</sup> )	$\rho_{true}$ (g/cm <sup>3</sup> )	Ritiro Volumetrico (%)
70S15C15N-SA Diamante	0,526 ± 0,0634	2,065 ± 0,5369	2,135 ± 0,4685	81
70S15C15N-SN Diamante	0,410 ± 0,0415	1,821 ± 0,5478	2,135 ± 0,4928	79
50S25C25N-SA Diamante	0,511 ± 0,0798	1,963 ± 0,5091	2,532 ± 0,3859	80
50S25C25N-SN Diamante	0,393 ± 0,0254	1,678 ± 0,729	2,220 ± 0,727	81
70S15C15N-SA Giroide	0,869 ± 0,0254	2,065 ± 0,5369	2,240 ± 0,4685	79
50S25C25N-SA Giroide	0,848 ± 0,0545	1,963 ± 0,5091	2,532 ± 0,3859	75

Tab. 7.1: Nella tabella sono riportati i valori di Densità geometrica =  $\rho_{geom}$  (g/cm<sup>3</sup>) Densità apparente =  $\rho_{app}$  (g/cm<sup>3</sup>), Densità reale =  $\rho_{true}$  (g/cm<sup>3</sup>) e ritiro volumetrico percentuale.

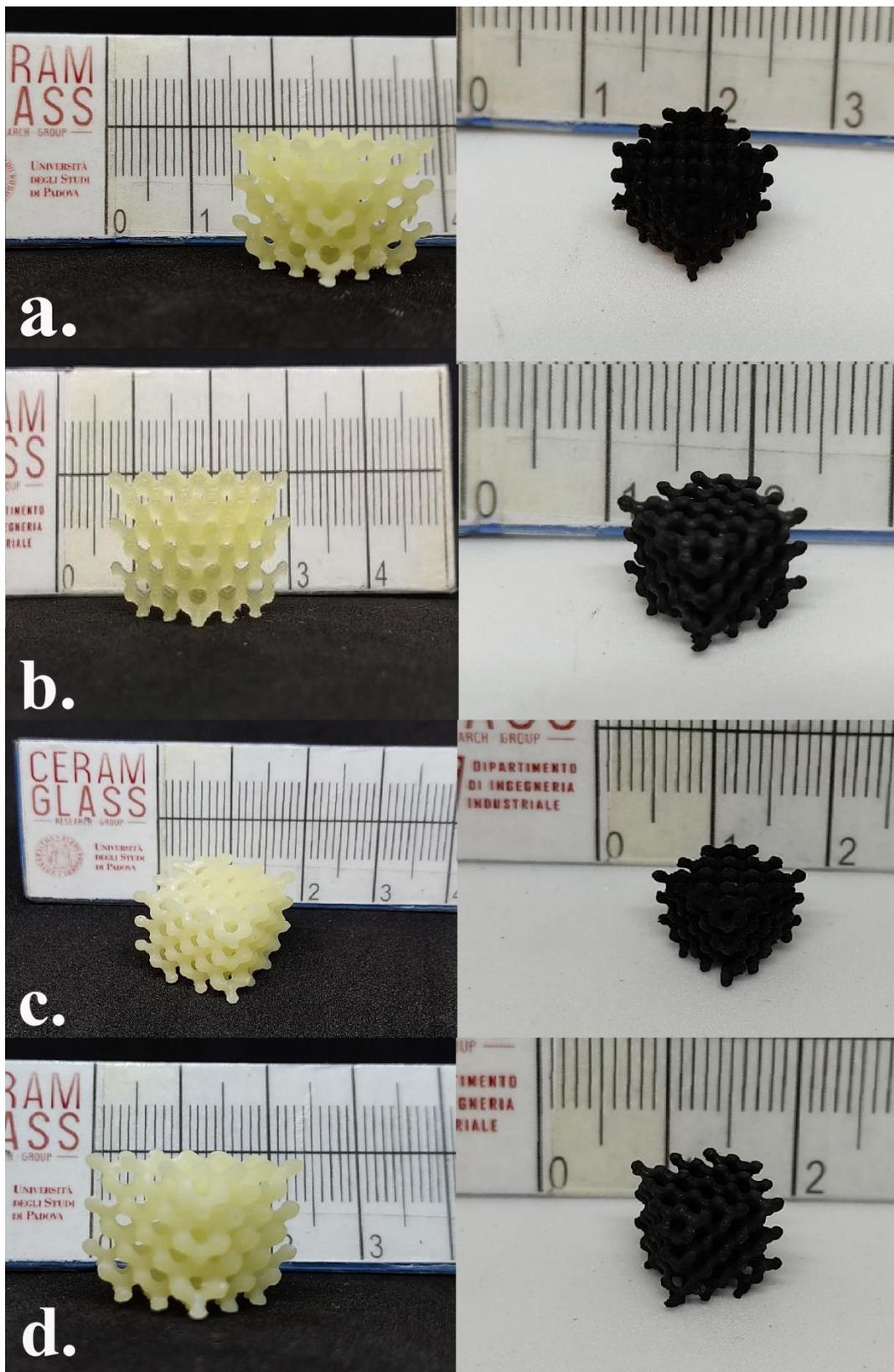


Figura 7.1: Immagini ottenute tramite fotocamera degli scaffolds modello diamante di composizione a) 70S15C15N-SA, b) 70S15C15N-SN, c) 50S25C25N-SA, d) 50S25C25N-SN, pretrattamento termico a sinistra e post pirolizzazione a destra.

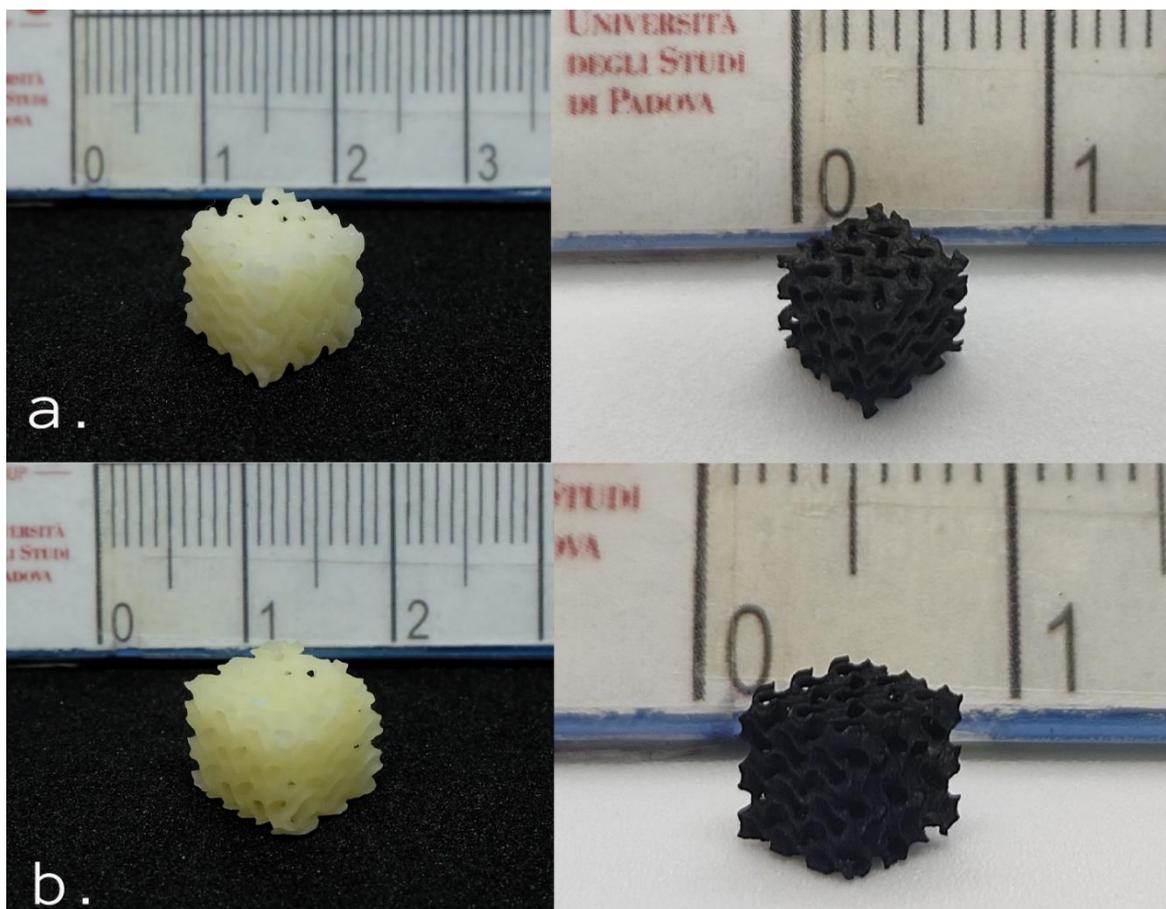


Figura 7.2: Immagini ottenute tramite fotocamera degli scaffolds di composizione a) 70S15C15N-SA, b) 50S25C25N-SA pretrattamento termico a sinistra e post pirolizzazione a destra.

Gli scaffolds esibiscono un grande ritiro volumetrico, nel range del 75-81%, come osservabile delle Figure 7.1 e 7.2. Il ritiro è dovuto all'eliminazione dei gruppi funzionali organici (intervallo di temperatura di  $\sim 600-800$  °C) tipici di un polimero (fenile, vinile, metile, ecc.) lasciando un residuo completamente ceramico; questa conversione avviene con rilascio di gas (sotto forma di metano, benzene e idrogeno) accompagnata da una riduzione di peso.

Le misure di densità tramite picnometria hanno permesso il calcolo della porosità aperta e chiusa la quale somma descrive la porosità totale delle strutture tridimensionali. I valori di porosità aperta, chiusa e totale sono riportati nella Tabella 7.2.

<b>Tipologia di Scaffold</b>	<b>PA (vol%)</b>	<b>PC (vol%)</b>	<b>PT (vol%)</b>
70S15C15N-SA Diamante	75	2	76
70S15C15N-SN Diamante	77	3	81
50S25C25N-SA Diamante	74	6	80
50S25C25N-SN Diamante	77	6	82
70S15C15N-SA Giroide	58	3	61
50S25C25N-SA Giroide	57	9	66

Tab. 7.2: La tabella riporta i valori di porosità aperta (PA), porosità chiusa (PC) e porosità totale (PT).

La precisione di stampa è stata valutata misurando la densità apparente tramite picnometria dei modelli stampati pre trattamento termico, confrontando la porosità aperta dei modelli creati con la porosità di una stampa di sola resina fotopolimerizzante e la porosità teorica dei modelli a diamante CAD. I dati ottenuti sono presentati nella Tabella 7.3.

<b>Tipologia di Scaffold</b>	<b>Porosità Aperta (vol%)</b>	<b>Porosità Teorica (vol%)</b>
Resina Fotopolimerizzante	79	85
70S15C15N-SA	70	
70S15C15N-SN	72	
50S25C25N-SA	68	
50S25C25N-SN	70	

Tab. 7.3: La tabella riporta i valori di porosità aperta degli scaffolds con modello diamante pre trattamento termico confrontati con la porosità teorica.

La correlazione tra porosità dei modelli geometrici e porosità dei prodotti finali non è semplice nella stampa 3D stereolitografica. Un contributo significativo è legato alla natura del materiale studiato. Ad esempio, nelle vetroceramiche sinterizzate, un notevole coartazione può essere

causata dal flusso viscoso; se incontrollato, può degradare completamente la struttura tridimensionale creata dalla stampa. In generale, tuttavia, alcuni problemi possono sorgere anche prima della sinterizzazione, durante la fase di stampa. L'uso di sospensioni di polveri ceramiche influisce negativamente sulla risoluzione di stampa rispetto al materiale liquido omogeneo. Le particelle solide diffondono la luce, alterando la profondità di polimerizzazione (Figura 7.3). Questo fenomeno può essere corretto regolando i tempi di esposizione, ma non si può escludere la polimerizzazione della resina fotosensibile al di fuori dell'area di proiezione teorica (definita dalle sezioni trasversali orizzontali dei modelli). Ciò riduce la porosità, poiché un'estensione dell'area di proiezione corrisponde a un'estensione dell'occupazione solida in uno strato stampato. [51]

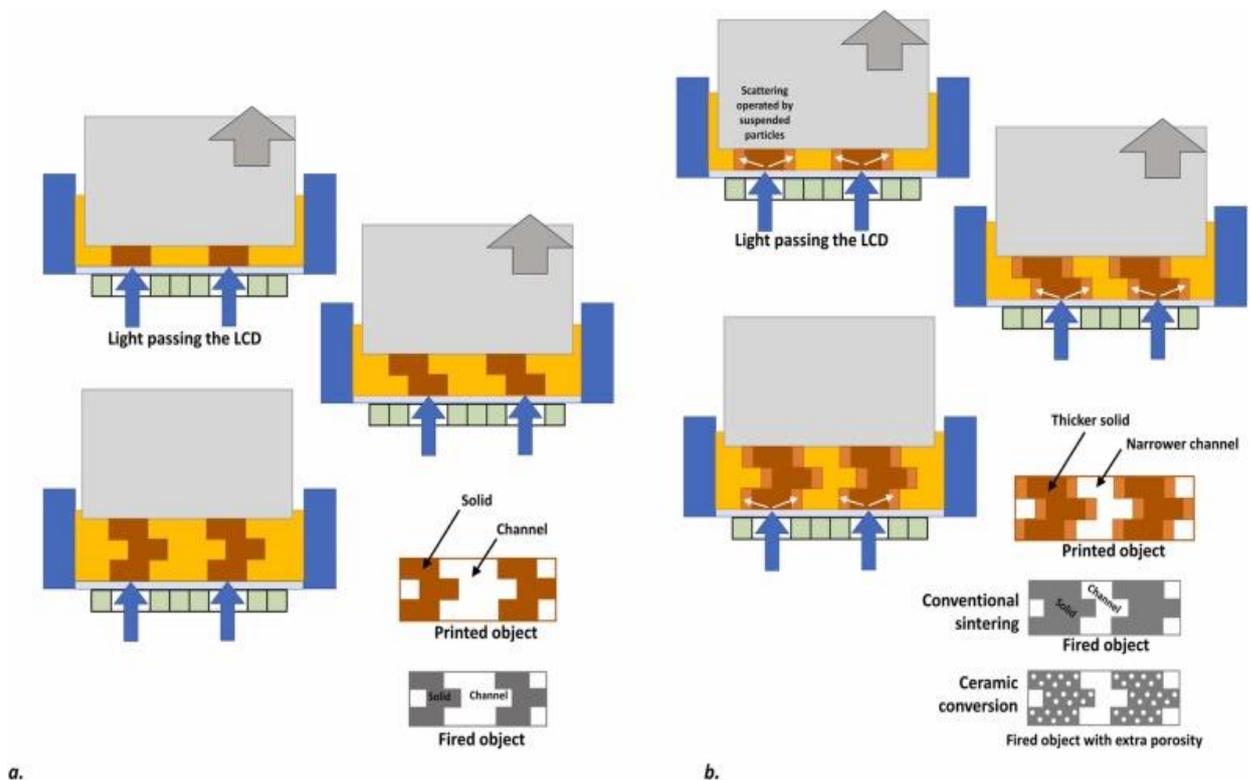


Fig. 7.3: a) Schema della stereolitografia "ideale"; b) schema della coartazione indotta dalla diffusione della luce. [51]

Per questi motivi si osserva effettivamente una riduzione di porosità totale nei campioni stampati.

La differenza tra il modello 3D che esprime una porosità del' 85% e degli scaffolds prodotti a

modello a diamante è sostanziale, passando da un minimo del 3% ad un massimo del 9% di differenza dal modello del software. Gli scaffolds prodotti con il modello a giroide invece rivelano una differenza dal modello teorico (90% porosità) ancora più elevata, precisamente del 29 e 24% per il 70S15C15N-SA e 50S25C25N-SA rispettivamente.

L'analisi di valutazione della precisione di stampa rivela uno scostamento della porosità del 5% dal modello teorico utilizzando solo la resina fotopolimerizzante. Il confronto tra il modello teorico e gli scaffold pre trattamento termico rivela una riduzione della porosità post stampa che va dal 13 al 17%.

### **7.1.2 Prove di compressione**

Gli scaffolds prodotti e sottoposti a trattamento termico sono stati caratterizzati meccanicamente tramite prove di compressione misurando la resistenza alla rottura di blocchi regolari (~ 9 x 9 x 9 mm per i modelli a diamante e ~ 5 x 5 x 5 mm per i modelli giroide); ogni punto di dati rappresenta un valore medio ottenuto testando almeno sei campioni.

L'effettiva adeguatezza della resistenza alla compressione osservata nei campioni derivati da stereolitografia può essere compresa solo applicando un modello per la correlazione resistenza/densità. Più precisamente, i dati di resistenza e densità sono stati studiati sulla base del noto modello di Gibson & Ashby, appropriato per strutture cellulari a celle aperte e dominate dalla flessione [57].

La resistenza alla compressione ( $\sigma_c$ ) è regolata dalla resistenza alla flessione della fase solida ( $\sigma_{bend}$ ), "ridimensionata" dalla densità relativa ( $\rho_{rel}$ , definita come  $\rho_{rel} = (1-PT) / 100$ , dove PT è la porosità totale), come segue:

$$(1) \quad \sigma_c \approx \sigma_{bend} \cdot 0,2 \cdot (\rho_{rel})^{3/2}$$

Invertendo l'equazione, i valori sperimentali di  $\sigma_c$  e  $\rho_{rel}$  possono fornire valori di resistenza di riferimento per i materiali sviluppati:

$$(2) \quad \sigma_{bend} \approx \sigma_c \cdot 5 \cdot (\rho_{rel})^{3/2}$$

In Tabella 7.4 vengono presentati i valori di densità relativa ( $\rho_{rel}$ ), resistenza alla compressione ( $\sigma_c$ ) e resistenza alla flessione ( $\sigma_{bending}$ ) dei biovetri prodotti.

<b>Tipologia di Scaffold</b>	<b><math>\rho_{rel}</math></b>	<b><math>\sigma_c</math> (Mpa)</b>	<b><math>\sigma_{bending}</math> (Mpa)</b>
70S15C15N-SA Diamante	0,235	1,46 ± 0,2515	64,10
70S15C15N-SN Diamante	0,192	1,17 ± 0,3133	69,43
50S25C25N-SA Diamante	0,201	1,00 ± 0,2155	53,88
50S25C25N-SN Diamante	0,177	1,09 ± 0,5078	73,27
70S15C15N-SA Giroide	0,388	5,28 ± 0,925	-
50S25C25N-SA Giroide	0,335	5,89 ± 1,1945	-

Tab. 7.4: La tabella riporta i valori di Densità relativa [ $1 - P_{tot}$ ] =  $\rho_{rel}$ , Resistenza alla compressione =  $\sigma_c$  (MPa) e Resistenza alla flessione =  $\sigma_{bending}$  (MPa) calcolata con l'Eq. (2).

La resistenza alla compressione dei modelli a diamante risulta minore dell'intervallo di dati degli scaffold bioattivi applicabili alla rigenerazione ossea (2-12 MPa), caratteristico del tessuto osseo trabecolare [58], la classe di scaffolds con resistenza a compressione maggiore per i modelli a diamante è la 70S15C15N-SA (~1,5 MPa). Ulteriormente, secondo la Tabella 7.4, la composizione 50S25C25N-SN supera di circa 3 MPa il valore trovato per il vetro standard di ~70 Mpa; le altre tipologie di scaffold rimangono sotto a questo valore.

Il modello geometrico giroide invece è noto per ottimizzare il rapporto resistenza/densità, anche nella prospettiva degli impianti ossei [54].

Il modello giroide esibisce infatti migliori proprietà meccaniche sebbene la densità relativa sia maggiore. Questi modelli hanno una porosità totale maggiore di ~ 20% rispetto al modello diamante il che porta ad una resistenza a compressione di circa 4 volte maggiore. I valori di resistenza alla compressione (~6 MPa) sono in pieno range di valori di resistenza a compressione tipici del tessuto osseo trabecolare umano.

## 7.2 ANALISI DELLA COMPOSIZIONE DI FASE

### 7.2.1 Spettroscopia a raggi X

Gli scaffolds ottenuti sono stati analizzati mediante diffrazione a raggi X.

Il vetro può essere ampiamente definito come un solido amorfo poiché possiede una disposizione casuale degli atomi con la mancanza di un ordine a lungo raggio come quello che si trova nei solidi cristallini. Una fase è un solido cristallino con una disposizione regolare degli atomi in 3 dimensioni. Le posizioni e le intensità dei picchi di diffrazione misurati sono come un'impronta digitale di una particolare fase cristallina. L'identificazione di fasi maggiori e minori, singole o multiple, in un campione sconosciuto è l'applicazione principale della diffrazione classica di polveri a raggi X (XRD).

L'analisi XRD è stata sviluppata per gli scaffolds di composizione 50S25C25N-SA e 70S15C15N-SA, modello diamante e giroide e 70S15C15N-SN e 50S25C25N-SN modello diamante.

Le Figure 7.4, 7.5, 7.6 e 7.7 riportano gli spettri ottenuti dalla diffrazione a raggi X effettuati da 5 a 80° con step da 0.05° per secondo in modalità LC dei campioni prodotti post trattamento termico sotto forma di polveri rese tali dalla frantumazione manuale degli scaffolds tramite mortaio.

Gli spettri ottenuti delle composizioni 50S25C25N-SA, 70S15C15N-SA modelli a giroide e diamante (Fig. 7.4 e 7.5) esibiscono uno spettro tipico di un materiale amorfo con assenza di picchi indicanti fasi cristalline, mentre per gli scaffolds di composizione 50S25C25N-SN, 70S15C15N-SN modelli diamante (Fig. 7.6 e 7.7) sono presenti picchi indicanti fasi cristalline nel solido prodotto. Nella figura 7.8 è riportato lo spettro ottenuto con l'identificazione della fase cristallina presente ricavato tramite il software Match!. La presenza di altri picchi negli spettri è dovuta ad inquinamenti delle polveri.

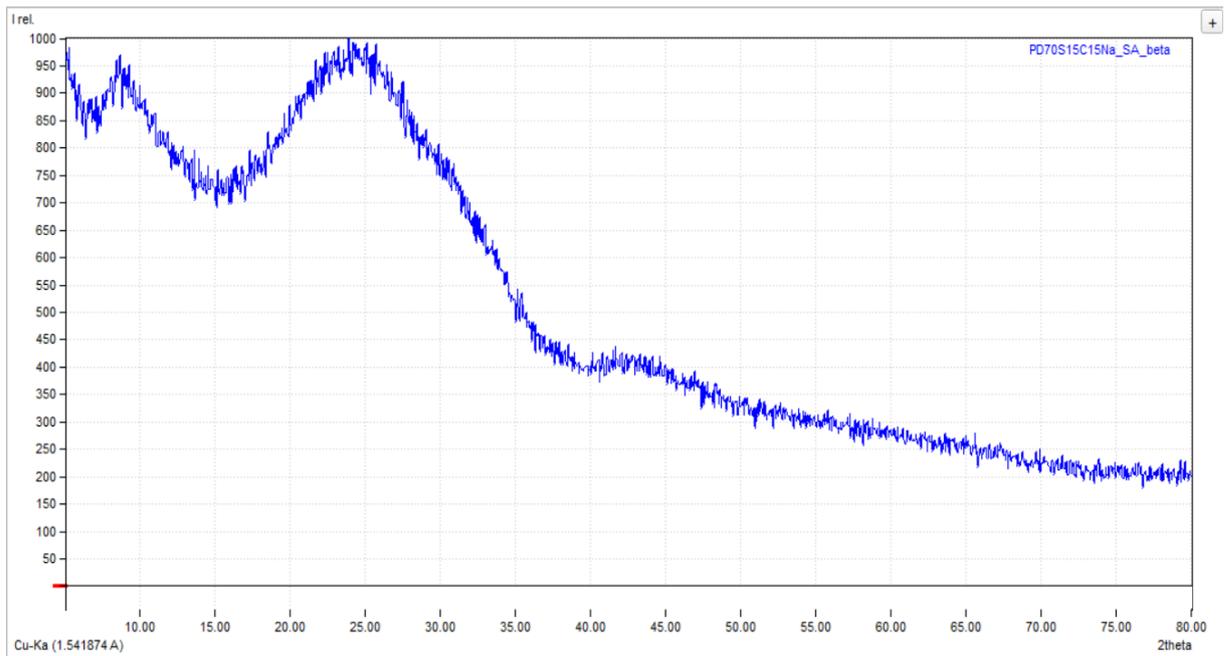


Fig. 7.4: Spettro raggi X per campione di composizione 70S15C15N-SA (modello giroide e diamante).

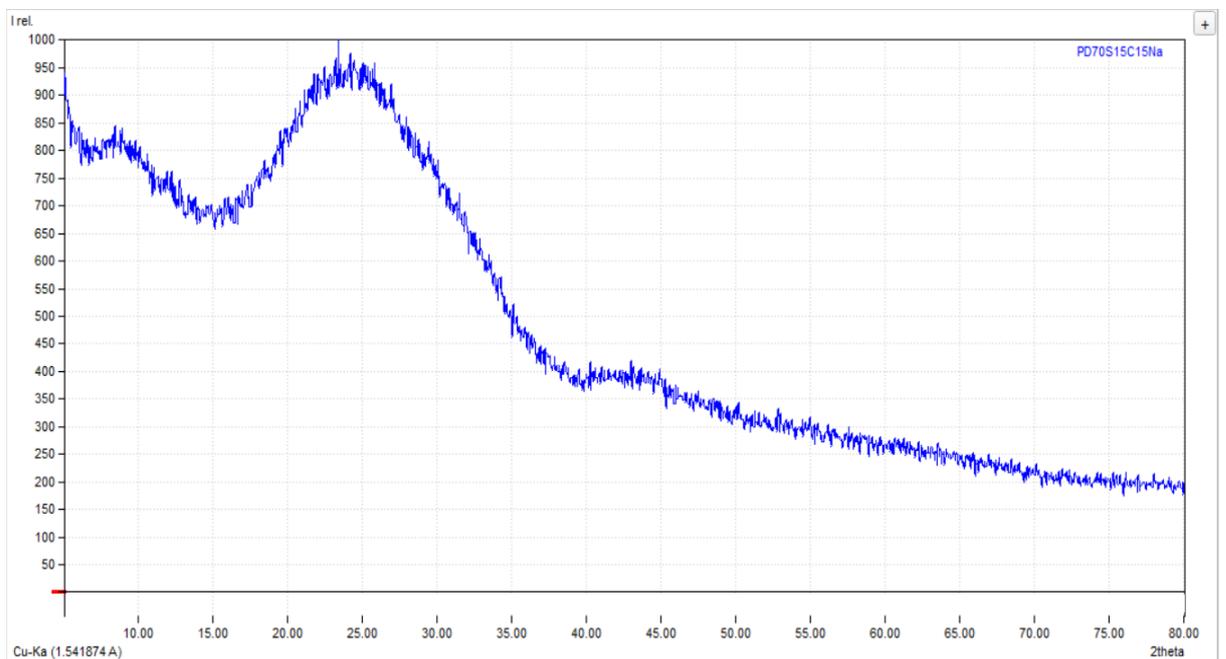


Fig. 7.5: Spettro raggi X per campione di composizione 50S25C25N-SA (modello giroide e diamante).

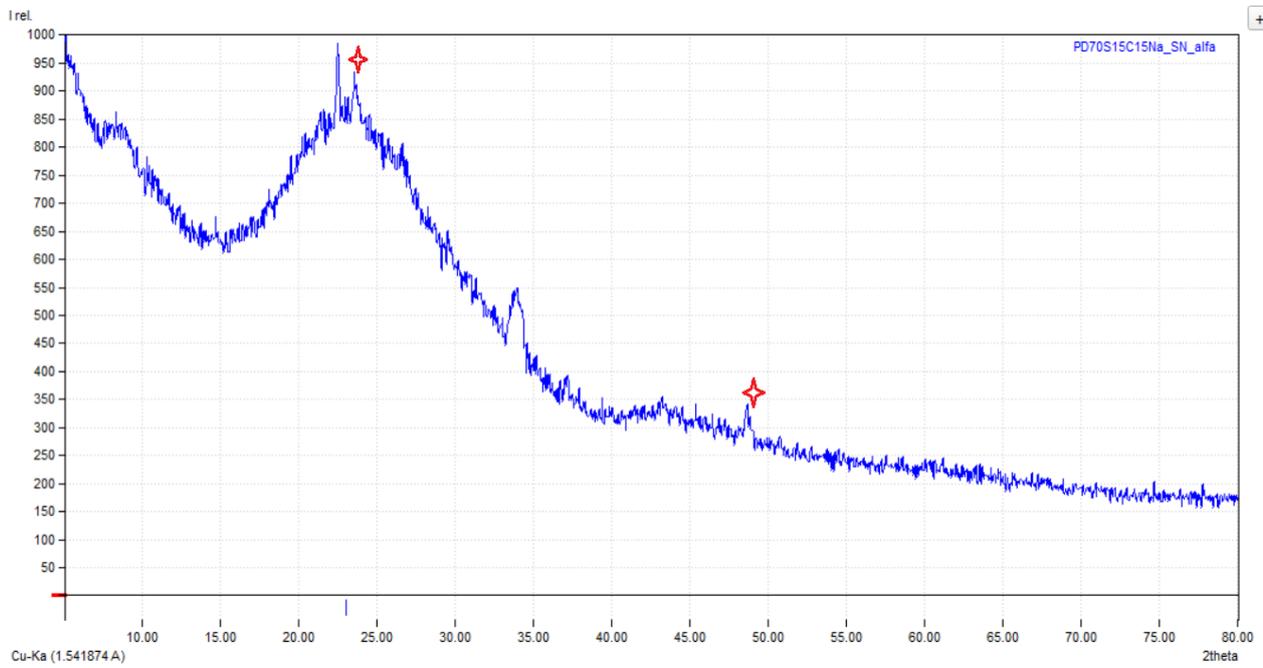


Fig. 7.6: Spettro raggi X per campione di composizione 70S15C15N-SN (modello diamante) con indicati i picchi dovuti al carbonato di calcio.

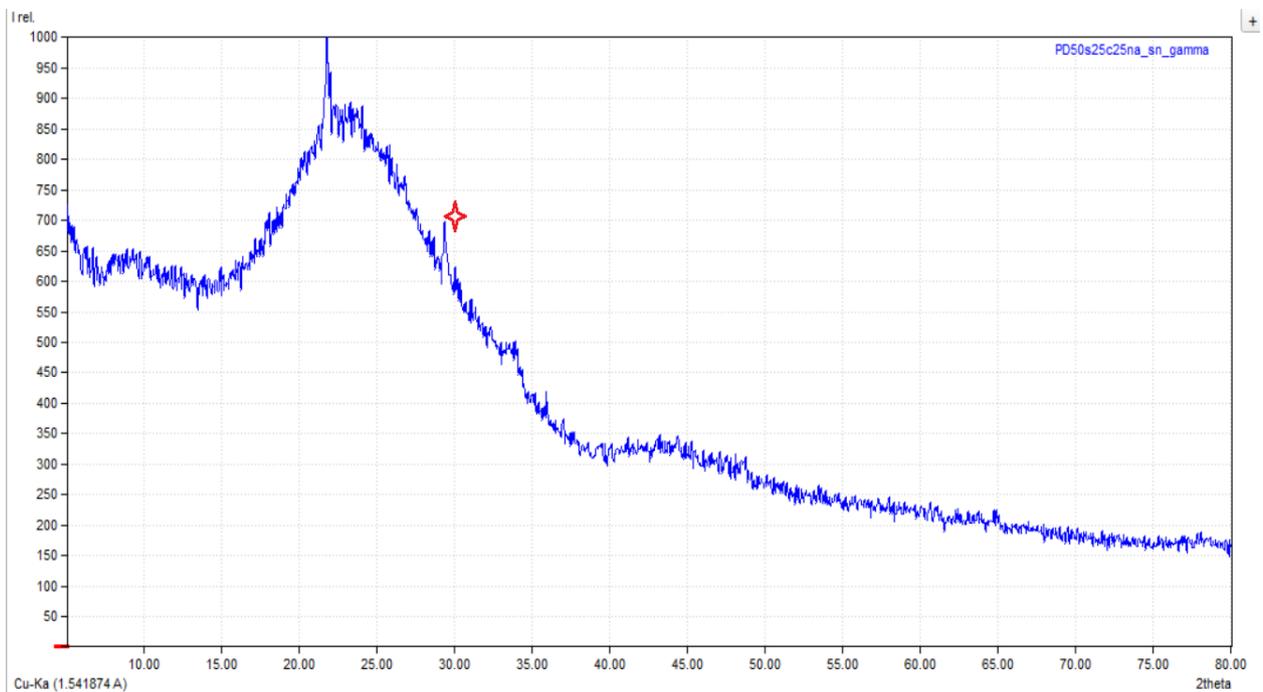


Fig. 7.7: Spettro raggi X per campione di composizione 50S25C25N-SN (modello diamante) con indicati i picchi dovuti al carbonato di calcio.

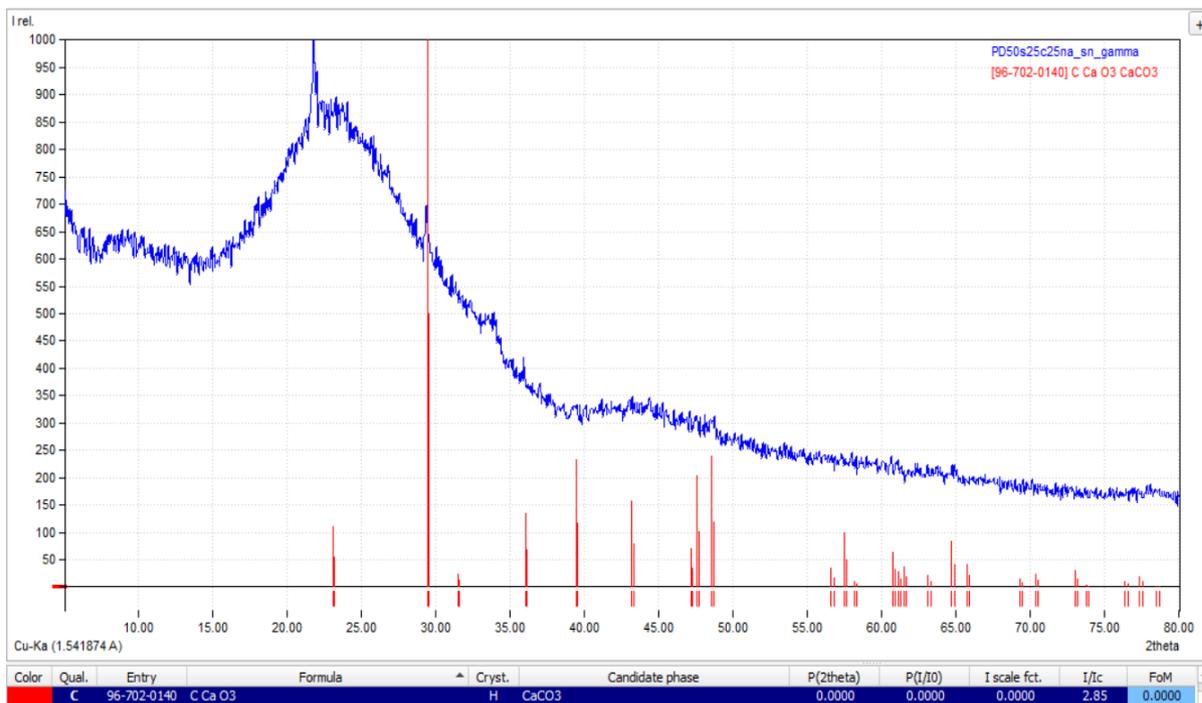


Fig. 7.8: Spettro raggi X per campione di composizione 50S25C25N-SN (modello diamante) con identificazione dei picchi tipici del carbonato di calcio tramite software Match!.

La fase identificata è quella del carbonato di calcio ( $\text{CaCO}_3$ ), un composto semplice e uno dei minerali più abbondanti in natura; esso esiste in sei diverse fasi polimorfiche, di cui tre diverse fasi cristalline (calcite, aragonite e vaterite). Il carbonato di calcio (comunemente indicato come cristalli di calcite) può formarsi sulla superficie dei vetri bioattivi, al posto dell'idrossiapatite o in competizione con essa, durante i test in vitro [60].

Inoltre, le proprietà bioattive dei cementi a base di  $\text{CaCO}_3$  sono state confermate dalla nucleazione simile all'apatite dopo 7 giorni di immersione in un fluido corporeo simulato e dallo sviluppo di uno strato simile all'osso [61].

Dagli spettri a raggi X si può dedurre che l'utilizzo del nitrato di calcio come precursore per l'ossido di sodio nelle composizioni create porta alla creazione di fasi cristalline di carbonato di calcio ( $\text{CaCO}_3$ ) le quali discordano con il teorico e caratteristico aspetto amorfo dei biovetri; d'altra parte, la presenza di carbonato di calcio non interferisce con la bioattività degli scaffolds trattandosi di un composto bioattivo.

L'utilizzo del sodio acetato invece per entrambe le composizioni e modelli 3D ha portato ad una struttura completamente amorfa degli scaffolds creati caratteristica dei vetri bioattivi.

### 7.2.2 Spettroscopia Raman

Come descritto precedentemente una pirolisi in atmosfera inerte porta alla formazione di compositi con una fase carboniosa nei campioni di biovetro originati da polimeri preceramici.

Attraverso la spettroscopia Raman è stato possibile rilevare la presenza di una fase a base di carbonio.

I campioni sottoposti all'analisi sono state polveri di scaffolds di composizione 70S15C15N-SN e 70S15C15N-SA.

Gli spettri sono stati raccolti con un sistema micro-Raman fatto in casa con un singolo spettrografo di imaging di 320 mm di lunghezza focale (Triax-320, Horiba Jobin Yvon, Edison, NJ, USA) dotato di un reticolo olografico di 1800 g/mm e di un rivelatore CCD raffreddato ad azoto liquido (Spectrum One, ISA Instruments Jobin-Yvon Spex, Edison, NJ, USA).

La sorgente di eccitazione era un laser Spectra-Physics Ar<sup>+</sup> (Stabilite 2017-06S, Spectra-Physics, Mountain View, CA, USA) operante a 514,5 nm, e per ridurre il livello di luce parassita è stato utilizzato un appropriato filtro 'passa-bordo lungo' (Semrock Filters, IDEX Health & Science, LLC, Rochester, NY, USA). Per registrare gli spettri Raman in configurazione micro è stato utilizzato un microscopio ottico (Olympus BX 40, Olympus Co., Tokyo, Giappone), dotato di tre obiettivi, 20X/0,35, 50X/0,75 e 100X/0,90, accoppiati otticamente allo spettrografo.

In Figura 7.9 sono riportati gli spettri Raman ottenuti.

Le misure sono state realizzate con lunghezza d'onda della radiazione laser di 514.5 nm con un obiettivo metallografico 50X, la potenza del laser sul campione è sempre stata controllata e mai superiore a 0.8 mW.

In Figura 7.9 sono confrontati gli spettri Raman dei 2 campioni, gli spettri sono molto simili e caratteristici di carbonio grafítico amorfo sia per le bande del primo ordine D e G a 1300 e 1600 cm<sup>-1</sup> che per quelle del secondo ordine fra 2500 e 3250 cm<sup>-1</sup> quest'ultime, generalmente deboli, sono in relazione con l'ordinamento tridimensionale del carbonio pirolitico.

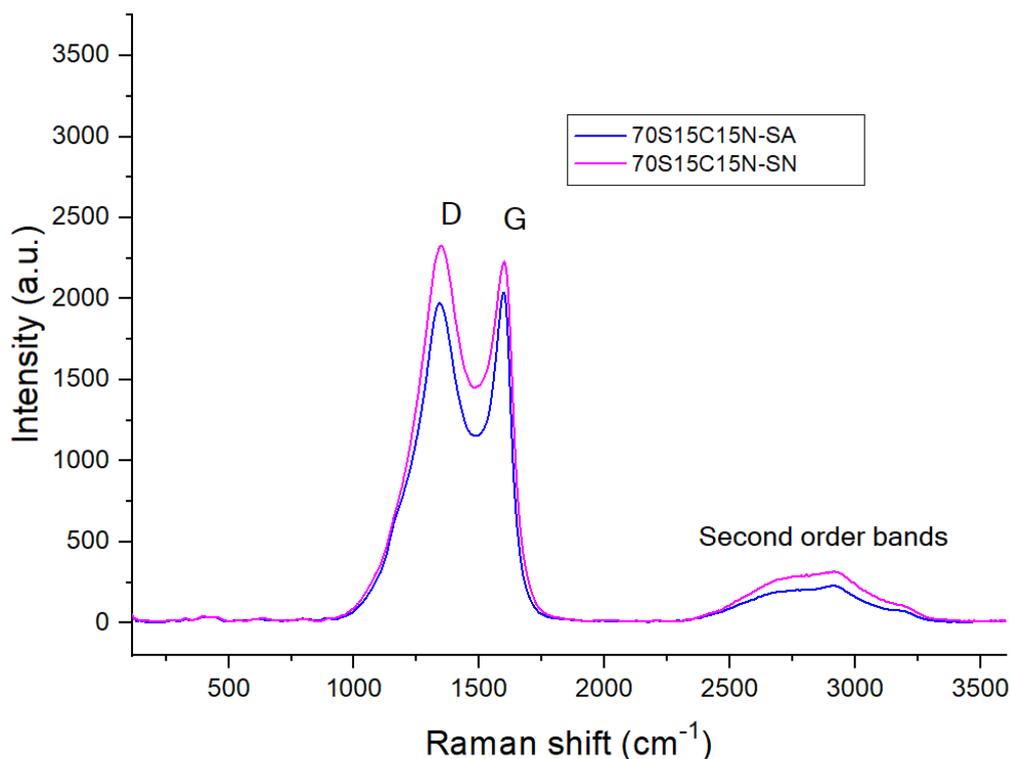


Fig. 7.9: Spettri Raman degli scaffolds di biovetro per le due composizioni (70S15C15N-SN e 70S15C15N-SA) cotti in atmosfera inerte ( $N_2$ ).

Il carbonio pirolitico ha una struttura simile a quella della grafite in cui gli strati di grafene sono impilati approssimativamente paralleli tra loro, ma con un certo livello di disordine lungo il piano del grafene. Inoltre, questo tipo di carbonio, definito anche turbostratico, presenta una traslazione casuale parallela allo strato di grafene e/o una rotazione intorno alla normale del piano del grafene [59].

Le analisi di spettroscopia Raman mostrano quindi bande del primo e del secondo ordine perfettamente caratteristiche di carbonio definito ‘turbostratico’, confermando la presenza di una fase di carbonio pirolitico amorfo in entrambi i campioni valutati.

### 7.2.3 Spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier

L’indagine della composizione di fase per gli scaffolds creati si è conclusa con la spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier (FTIR) eseguita sulle polveri delle 4 composizioni di scaffolds.

La spettroscopia infrarossa o spettroscopia IR è una tecnica spettroscopica di assorbimento normalmente utilizzata nel campo della caratterizzazione dei materiali per lo studio dei legami chimici. Quando un fotone infrarosso viene assorbito da una molecola, questa passa dal suo stato vibrazionale fondamentale ad uno stato vibrazionale eccitato. In un tipico spettro infrarosso in ascissa troviamo il numero d'onda del fotone incidente, e in ordinata la trasmittanza.

Le vibrazioni possono essere di due tipi: stiramento del legame chimico (stretching) e deformazione dell'angolo di legame (bending). La posizione (frequenza) e l'intensità delle singole bande di assorbimento contribuiscono allo spettro complessivo, creando l'impronta digitale caratteristica della molecola.

Nelle Figure 7.10, 7.11, 7.12, 7.13 sono riportati gli spettri FTIR rispettivamente per gli scaffolds 70S15C15N-SA, 70S15C15N-SN, 50S25C25N-SA e 50S25C25N-SN riportando i legami chimici individuati con le relative bande di assorbimento.

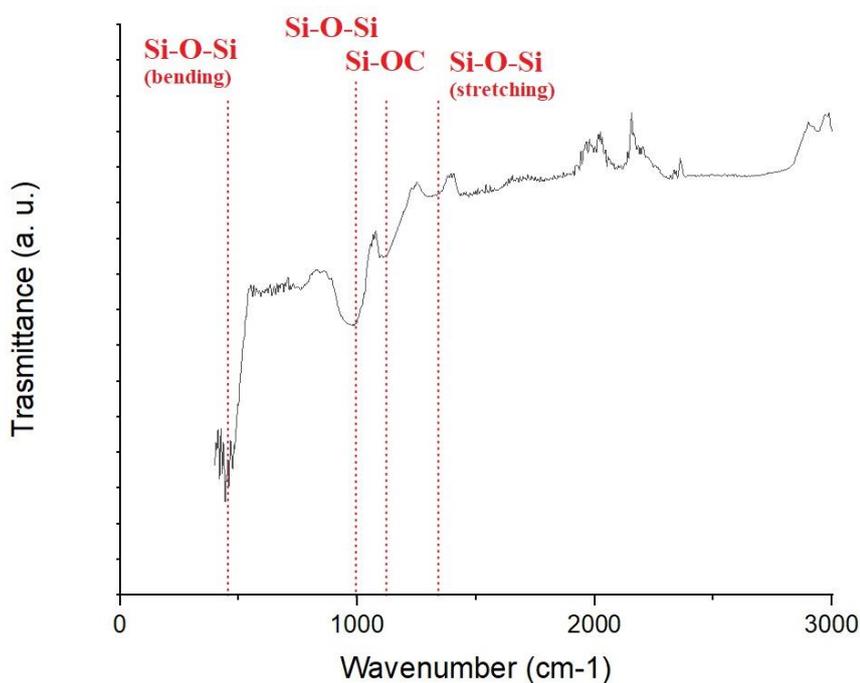


Fig. 7.10: Spettro FTIR di campioni di composizione 70S15C15N-SA ottenuti da polveri di scaffolds dopo pirolisi.

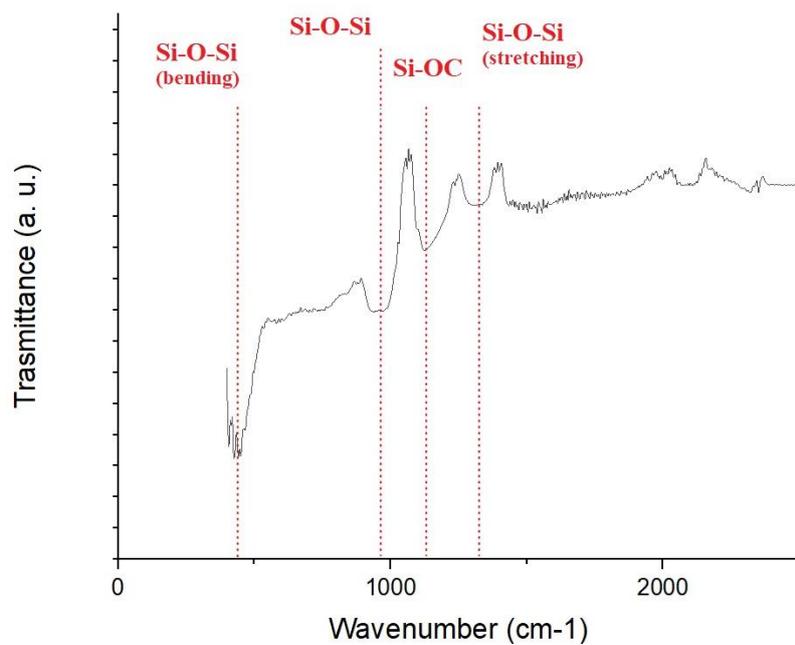


Fig. 7.11: Spettro FTIR di campioni di composizione 70S15C15N-SN ottenuti da polveri di scaffolds dopo pirolisi.

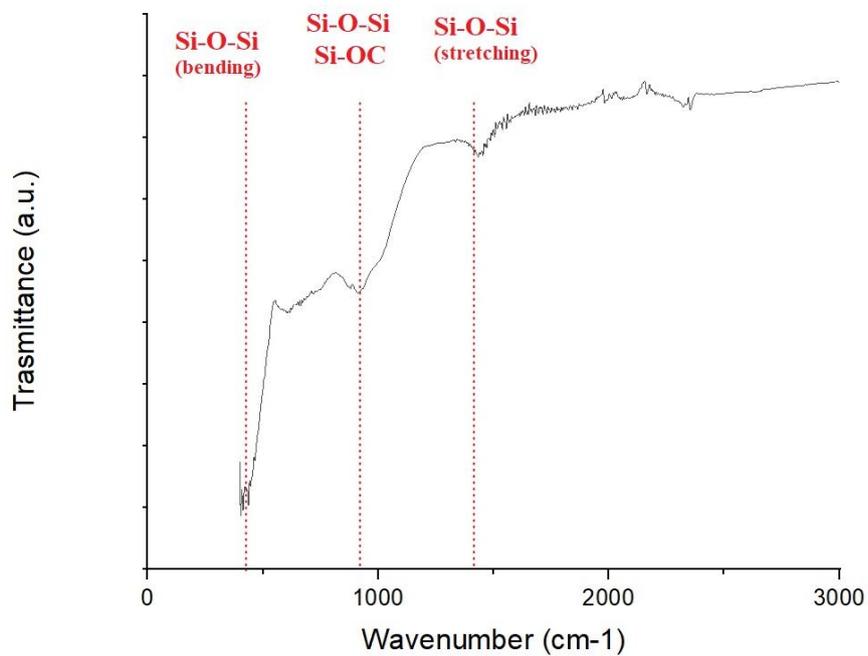


Fig. 7.12: Spettro FTIR di campioni di composizione 50S25C25N-SA ottenuti da polveri di scaffolds dopo pirolisi.

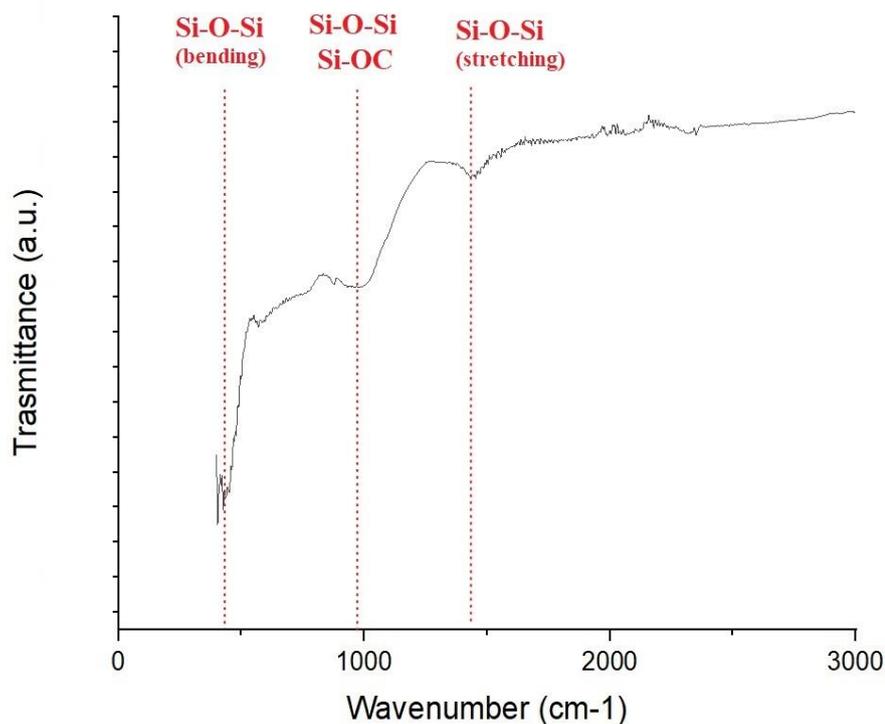


Fig. 7.13: Spettro FTIR di campioni di composizione 50S25C25N-SN ottenuti da polveri di scaffolds dopo pirolisi.

Negli spettri FTIR (Fig. 7.10, 7.11, 7.12, 7.13) di tutte e 4 le composizioni è possibile individuare la presenza del legame Si-O-Si con vibrazioni di legame di flessione (Si-O-Si bending) relative ad assorbimenti nella banda  $540-415\text{ cm}^{-1}$  [63], [67] e dal legame Si-O-Si con vibrazioni di legame di stiramento (Si-O-Si stretching) nell'assorbimento a circa  $1220\text{ cm}^{-1}$  [65], [66].

Gli spettri, inoltre, indicano la presenza di un doppietto di due bande vibrazionali nella regione  $1015-1111\text{ cm}^{-1}$  appartenenti ai gruppi Si-OC [62] e ai gruppi asimmetrici Si-O-Si [64], [62], [52].

La spettroscopia FTIR per mezzo degli spettri prodotti permette di confermare la presenza di una rete di silice caratteristica dei biovetri formata da legami Si-O-Si (vibrazioni di stiramento e flessione) e l'esistenza di una fase di carbonio dovuta alla cottura in atmosfera inerte per la presenza dei legami Si-OC (ossicarburo di silicio) in tutti gli scaffolds prodotti.

## 7.3 CARATTERIZZAZIONE MICROSTRUTTURALE E MORFOLOGICA

### 7.3.1 Microscopia ottica

Attraverso microscopio ottico e microscopio elettronico a scansione è stato possibile osservare le caratteristiche microstrutturali e morfologiche degli scaffolds prodotti.

Le foto derivanti da microscopia ottica sono riportate in Figura 7.14 per gli scaffolds 70S15C15N-SN e 50S15C15N-SN modello diamante, in Figura 7.15 per gli scaffolds 70S15C15N-SA e 50S15C15N-SA modello diamante e infine la Figura 7.16 riporta le immagini degli scaffolds 70S15C15N-SA e 50S15C15N-SA modello giroide.

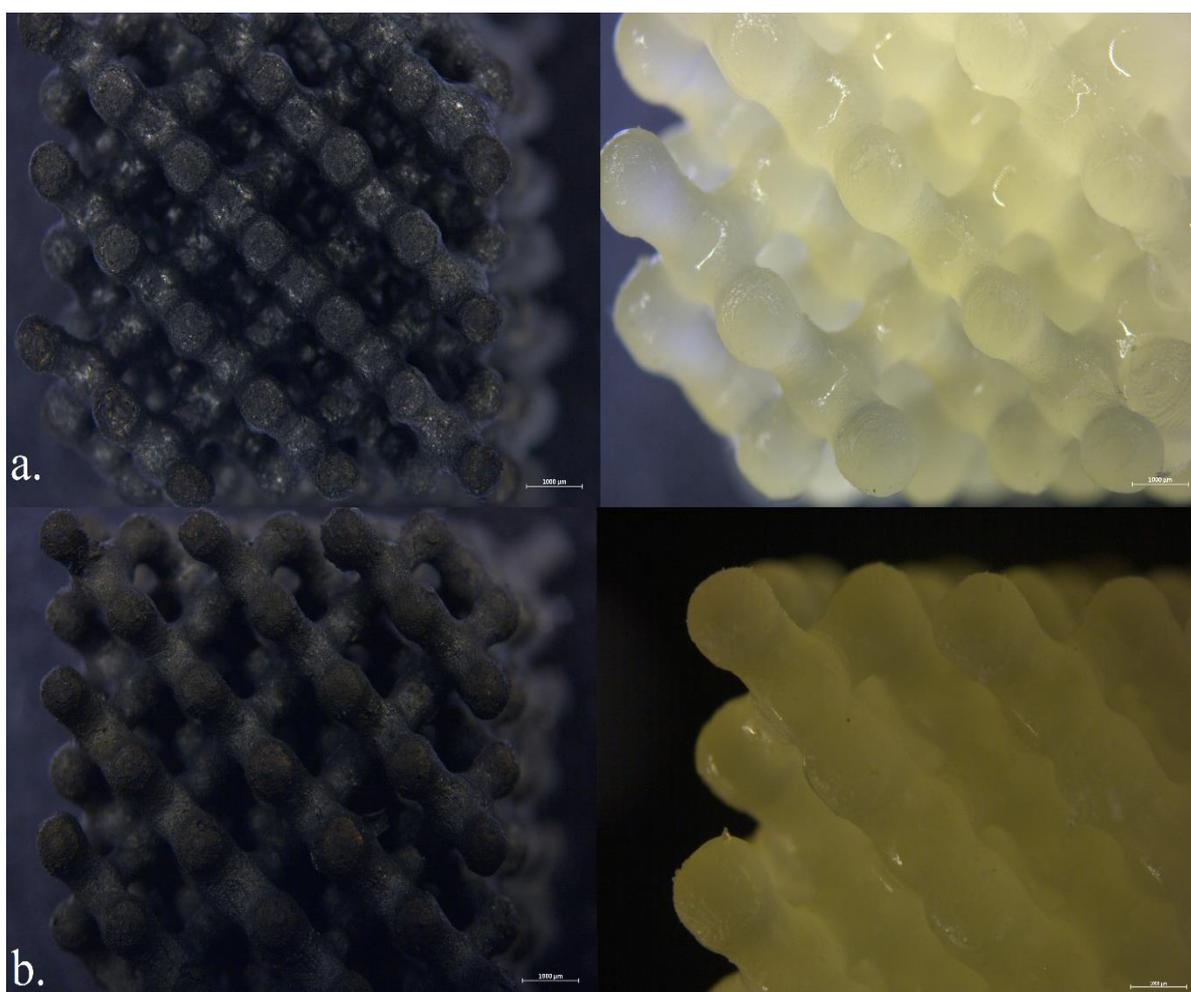


Fig. 7.14: Foto da microscopio ottico degli scaffolds di composizione a) 70S15C15N-SN e b) 50S15C15N-SN dei campioni pirolizzati a sinistra e relativi campioni pre trattamento termico a destra. Riferimento dimensionale di 1000  $\mu\text{m}$ .

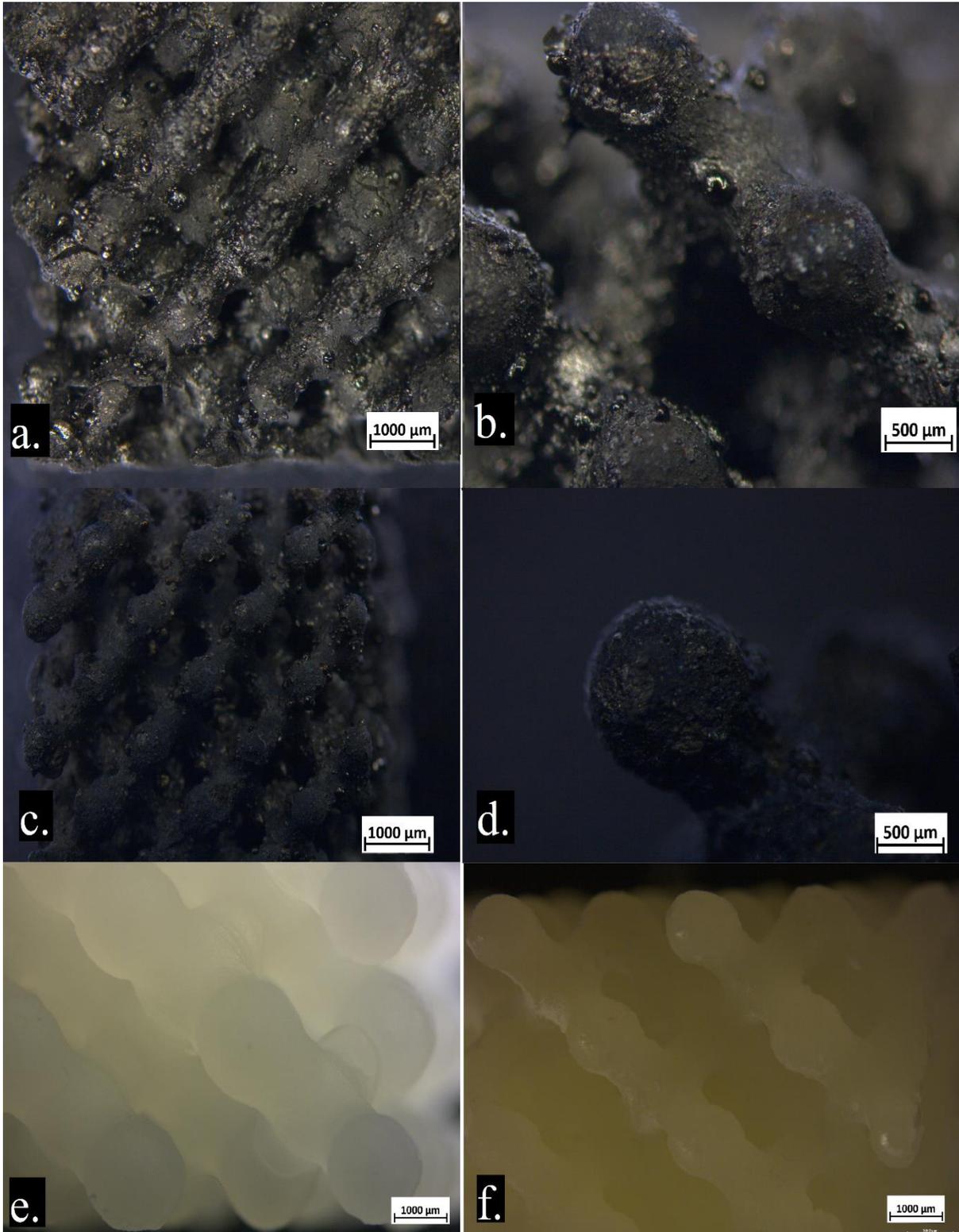


Fig. 7.15: Foto da microscopio ottico degli scaffolds a modelli a diamante di composizione 70S15C15N-SA in a) con ingrandimento di un particolare in b) e composizione 50S15C15N-SA in c) con ingrandimento di un particolare in d). In e) e f) i campioni pre-trattamento termico 70S15C15N-SA e 50S15C15N-SA rispettivamente.

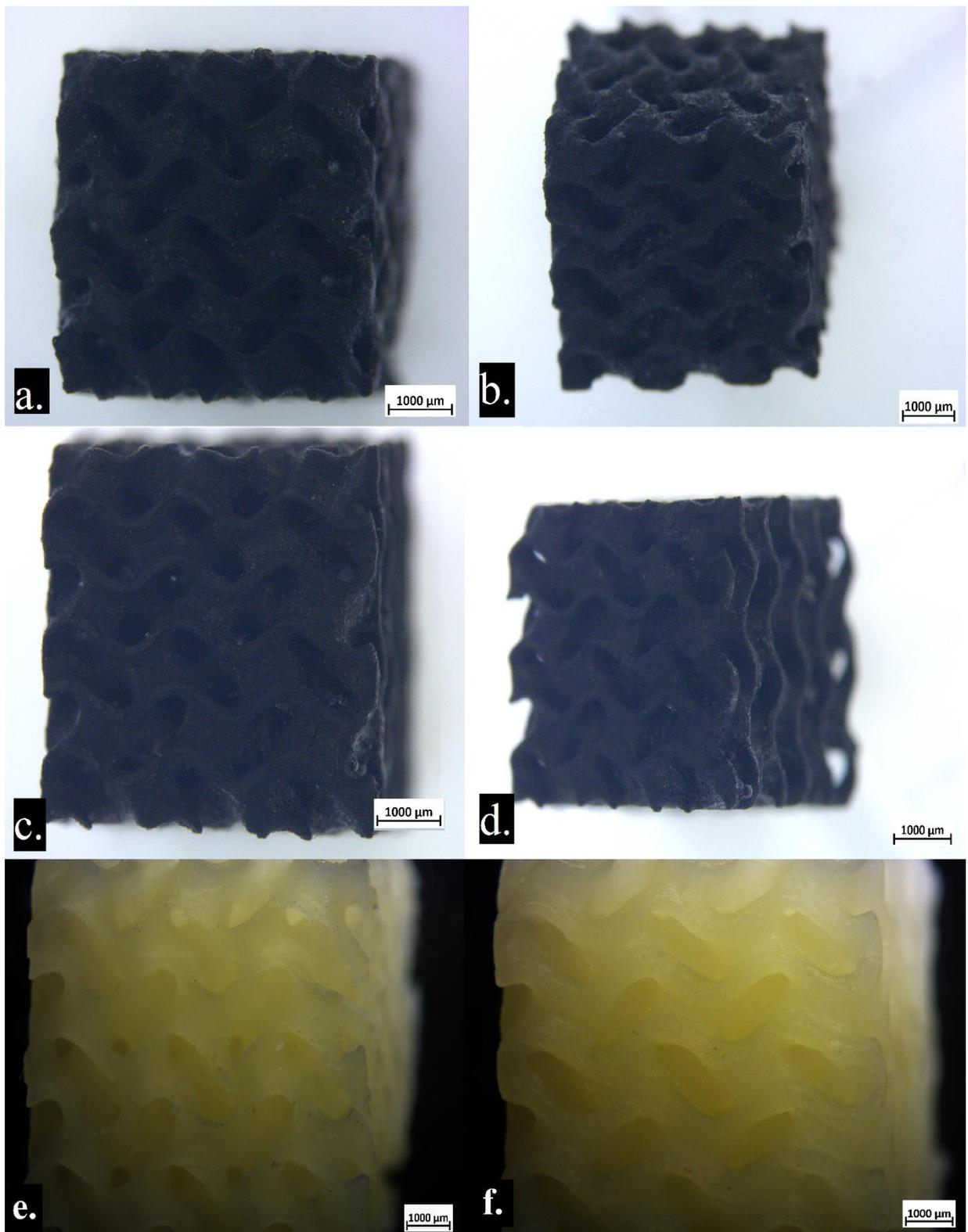


Fig. 7.16: Foto da microscopio ottico dei campioni a modello a giroide di composizione 70S15C15N-SA in a) frontale e b) ruotato di 45° e composizione 50S15C15N-SA in c) frontale e d) ruotato di 45°. In e) e f) i campioni pre-trattamento termico 70S15C15N-SA e 50S15C15N-SA rispettivamente.

Dalla Figura 7.14 si può notare che gli scaffolds di composizioni 70S15C15N-SN e 50S15C15N-SN non presentano bolle o cricche, inoltre la geometria degli scaffolds è stata rispettata dalla stampa sia nei ‘verdi’ (scaffolds pretrattamento termico) che negli scaffolds dopo pirolizzazione. Nei verdi inoltre è possibile notare i vari layers dovuti alla stampa.

Gli scaffolds 70S15C15N-SA e 50S15C15N-SA esibiscono una porosità ridotta rispetto agli scaffolds precedenti dovuto ad uno spessore maggiore delle travi (Figura 7.15). Si può notare inoltre l’assenza di cricche e nella Figura 7.15 nei riquadri b e c, i quali rappresentano un ingrandimento degli scaffolds, si nota la presenza di bolle. I verdi invece risultano più opachi e spessi rispetto ai precedenti scaffolds.

Infine, i modelli giroide (Figura 7.16) non presentano bolle e cricche, ma esibiscono una visibile diminuzione della porosità rispetto al modello CAD dovuto ad uno ispessimento delle membrane che compongono la geometria, notevole anche dai modelli pre trattamento (Fig. 7.16, riquadri e ed f).

Tutti gli scaffolds prodotti non presentano cricche al microscopio ottico; gli scaffolds a diamante aventi sodio acetato presentano bolle nella superficie (70S15C15N-SA e 50S15C15N-SA) mentre le stesse composizioni a modello giroide non le presentano. Le bolle rappresentano discontinuità geometrica rispetto al modello teorico, tuttavia le superfici rugose conferiscono migliore biocompatibilità [68].

Le immagini di microscopia ottica, infine, mostrano una minore porosità degli scaffolds con sodio acetato rispetto a quelli con il sodio nitrato specialmente nei modelli a giroide in cui si può notare un inspessimento delle pareti formanti la geometria, confermando le misure di porosità e densità precedentemente discusse.

### **7.3.2 Spettroscopia elettronica a scansione**

Il microscopio elettronico a scansione (SEM) è un tipo di microscopio elettronico che produce immagini di un campione scansionando la superficie con un raggio focalizzato di elettroni. Gli elettroni interagiscono con atomi nel campione, producendo vari segnali che contengono informazioni sulla superficie topografia e composizione del campione. Il fascio di elettroni viene scansionato e la posizione del raggio viene combinata con l'intensità del segnale rilevato per produrre un'immagine.

Tramite SEM sono stati analizzati i campioni di scaffolds di composizione 70S15C15N-SA e 50S25C25N-SA modello giroide. Le immagini ottenute a diversi ingrandimenti effettuati su scaffolds pre e post trattamento termico delle due composizioni sono riportate nelle Figure 7.17 e 7.18.

Dalla Figura 7.17-a è possibile notare elementi bianchi dati da inquinamenti esterni; le varie immagini permettono di confermare l'assenza di micro-cricche e di bolle, mentre nell'immagine 7.17-d si può notare la formazione di placche di carbonio. La geometria a giroide degli scaffolds è rispettata e la porosità è ben visibile. Dalle immagini è possibile misurare un diametro medio dei pori di ~200 micrometri.

Anche nei campioni 50S25C25N-SA dalla Figura 7.18 si nota l'assenza di micro-cricche e bolle, rimane ben visibile la geometria a giroide e la porosità. La superficie risulta prevalentemente rugosa e non si notano placche presenti nei campioni precedenti. Dalle immagini è possibile misurare un diametro medio dei pori di ~220 micrometri.

Nelle immagini ottenute dagli scaffolds pre pirolizzazione della Figura 7.17-e, f e 7.18-e, f è possibile notare le linee ondulate descriventi i vari strati caratteristici della geometria giroide, nonché l'assenza di cricche o bolle superficiali in entrambi i 'verdi' delle due composizioni analizzate.

Tramite microscopia elettronica oltre che l'analisi morfologica è possibile ottenere informazioni sulla composizione, fino al livello atomico, con l'aggiunta di un rilevatore EDS (Energy Dispersive X-ray Spectroscopy). Durante la scansione della sonda elettronica sul campione, vengono emessi e misurati i raggi X caratteristici; ogni spettro EDS registrato viene mappato a una posizione specifica sul campione. La qualità dei risultati dipende dall'intensità del segnale e dalla pulizia dello spettro. Gli spettri ottenuti restituiscono la composizione in atomi e in ossidi di Si, Ca e Na permettendo di confrontare questi dati con le composizioni teoriche 70S15C15N (70% SiO<sub>2</sub> - 15% Na<sub>2</sub>O - 15% CaO) e 50S25C25N (50% SiO<sub>2</sub> - 25% Na<sub>2</sub>O - 25% CaO).

Nelle Figure 7.19 e 7.20 sono riportati gli spettri e le composizioni in ossidi per le due tipologie di scaffolds pirolizzati analizzati.

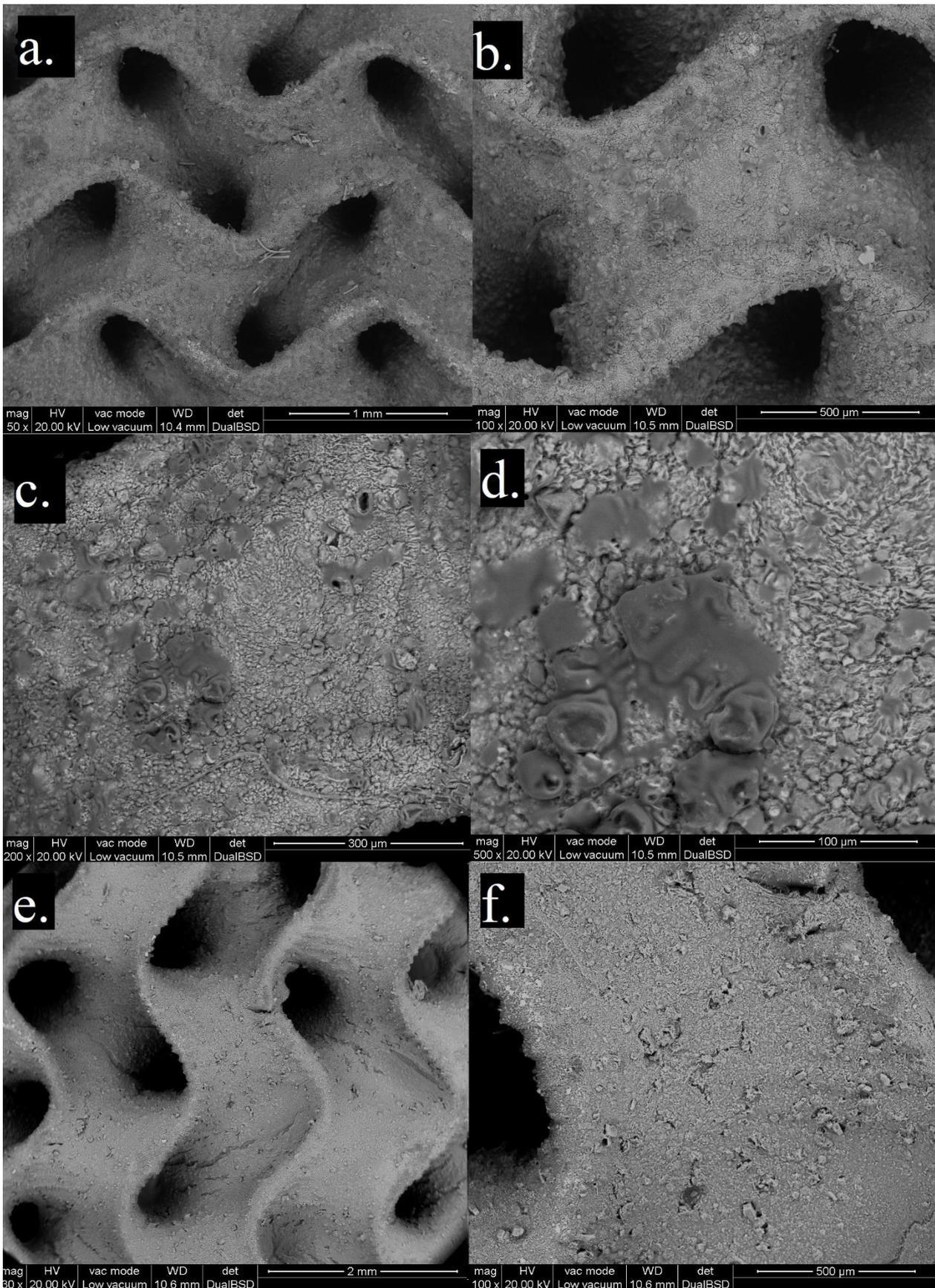


Fig. 7.17: Immagini SEM di uno scaffold 70S15C15N-SA modello giroide: immagini a), b), c), d) ottenute post trattamento termico a diversi ingrandimenti, immagini e) ed f) ottenute pre trattamento termico a due diversi ingrandimenti.

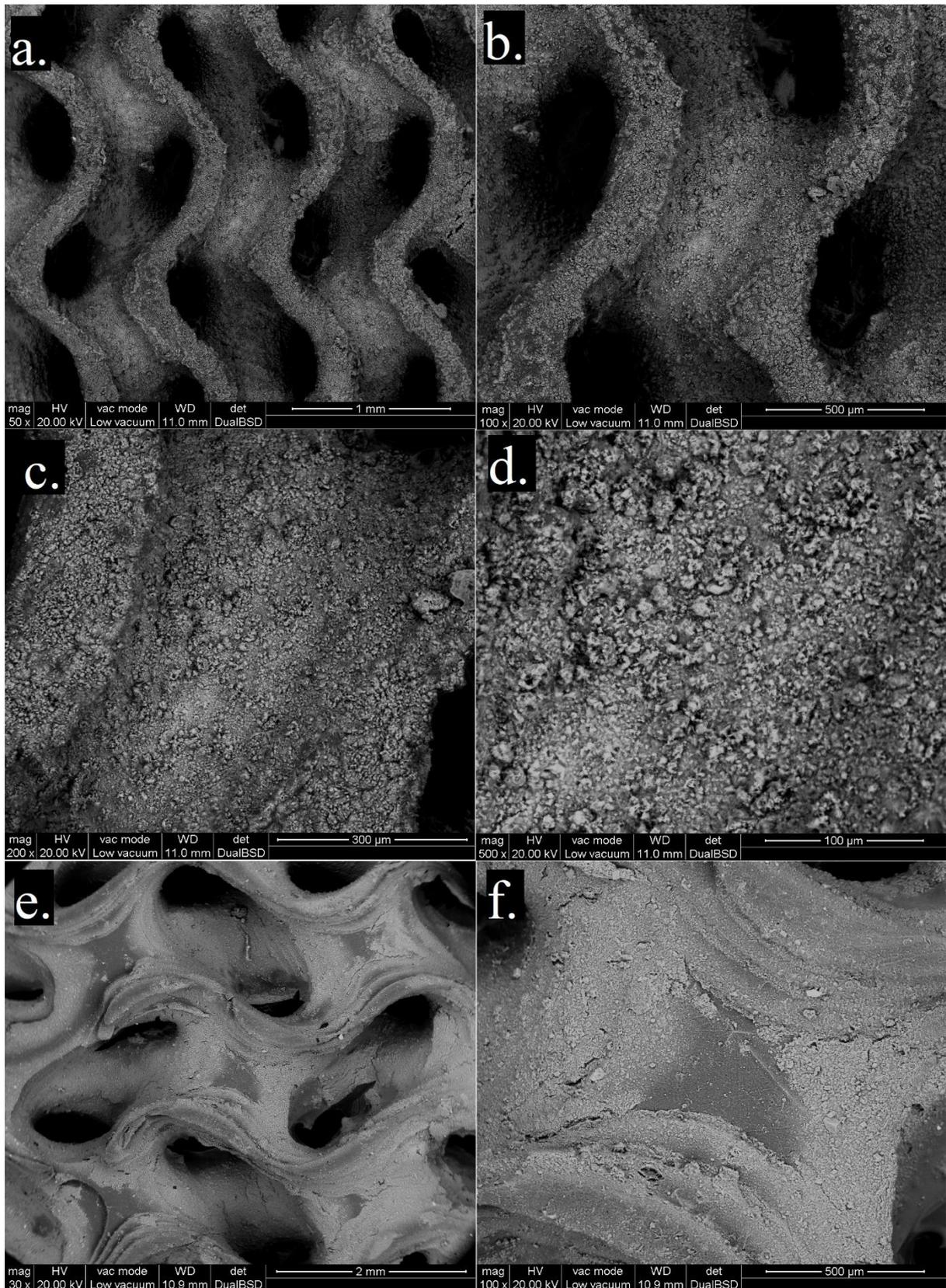


Fig. 7.18: Immagini SEM di uno scaffold 50S25C25N-SA modello giroide: immagini a), b), c), d) ottenute post trattamento termico a diversi ingrandimenti, immagini e) ed f) ottenute pre trattamento termico a due diversi ingrandimenti.

Nella composizione teorica 70S15C15N il rapporto tra le moli di ossidi di silice e le moli di ossidi di calcio e sodio è di 4,7, i rapporti risultanti dagli spettri EDS tra l'ossido di silice e gli ossidi di calcio e sodio per scaffolds di composizione 70S15C15N-SA sono di 4,2 e 2,6 rispettivamente. Il rapporto con gli ossidi di calcio non si discosta molto da quello teorico, mentre più lontano da questo valore risulta il rapporto con l'ossido di sodio.

Mentre nella composizione teorica 50S25C25N il rapporto tra le moli di ossidi di silice e moli di ossidi di calcio e sodio è di 2, i rapporti risultanti tra l'ossido di silice e gli ossidi di calcio e sodio per scaffolds di composizione 50S25C25N-SA sono di 2,5 e 0,5 rispettivamente. Il rapporto con gli ossidi di calcio si discosta di 0,5 da quello teorico, mentre il rapporto tra moli di ossidi di silice e ossidi di sodio risulta sproorzionato.

Dagli spettri EDX si può dedurre che la composizione che più si avvicina a quella teorica è la 70S15C15N-SA, in entrambe le composizioni le moli corrispondenti agli ossidi di sodio sono minori in proporzione rispetto le moli degli ossidi di calcio, specialmente nella composizione 50S25C25N-SA.

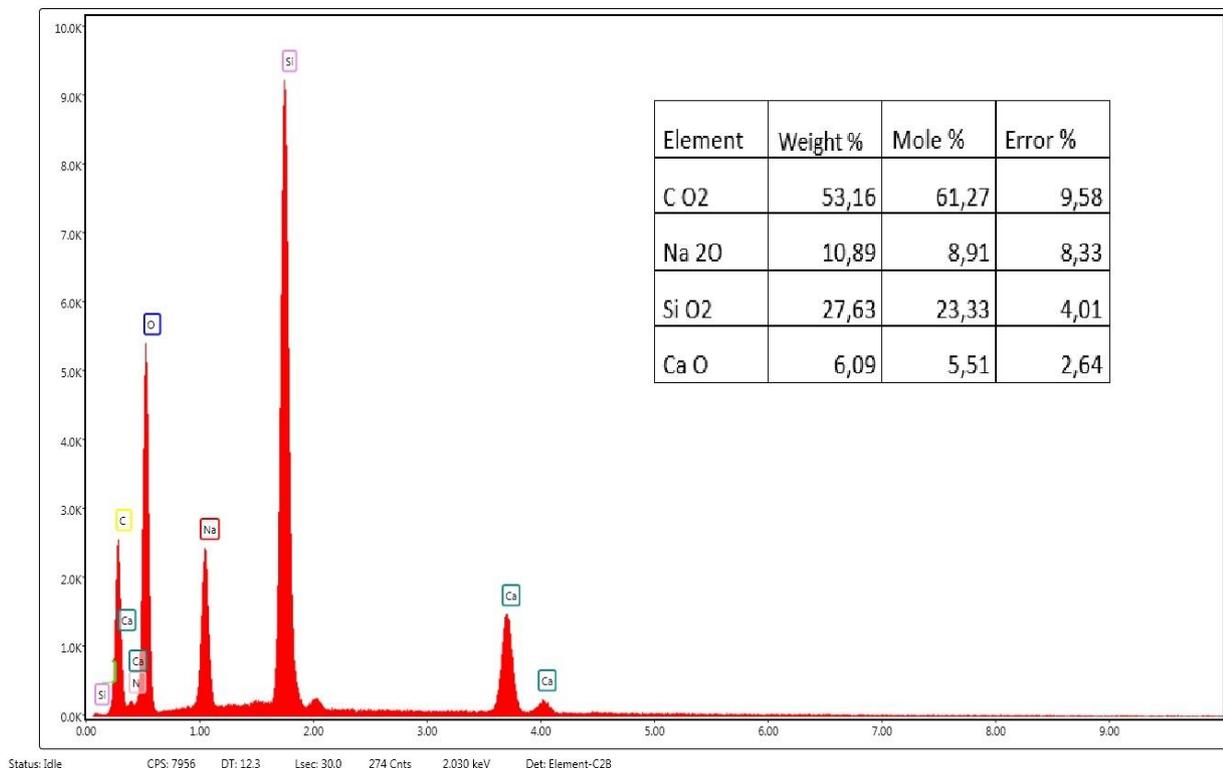


Fig. 7.19: Spettro EDS per scaffold di composizione 70S15C15N-SA e relativa tabella con composizione in ossidi.

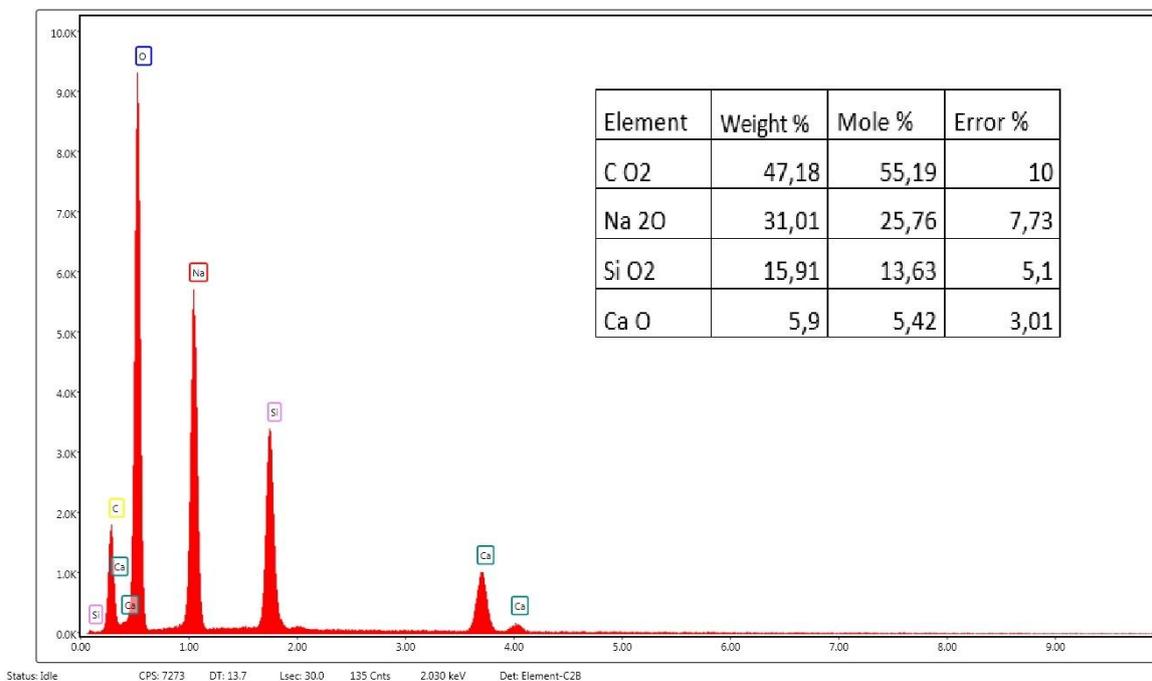


Fig. 7.20: Spettro EDS per scaffold di composizione 50S25C25N-SA e relativa tabella con composizione in ossidi.

Infine, l'utilizzo del SEM e della tecnologia EDS hanno permesso di effettuare delle 'mappe EDS', di ottenere quindi delle immagini raccogliendo i segnali di fluorescenza X separati, di atomi di silice, calcio, sodio e carbonio. Questo tipo di indagine permette di verificare la presenza o l'assenza di gradienti degli atomi citati, poiché i vetri hanno una struttura amorfa, l'assenza di gradienti è la prova fondamentale dell'ottenimento di vetri.

L'analisi della composizione tramite mappe EDS è stata effettuata sugli stessi scaffolds delle immagini precedenti (70S15C15N-SA e 50S25C25N-SA) sia su campioni pretrattamento termico che campioni post trattamento.

Le mappe EDS ottenute sono presentate nelle Figure 7.21 e 7.22 per scaffold di composizione 70S15C15N-SA post trattamento termico e pretrattamento termico rispettivamente. Nelle Figure 7.23 e 7.24 invece vengono riportate le mappe EDS di scaffolds di composizione 50S25C25N-SA anch'esse rispettivamente post trattamento e pre trattamento termico.

Nelle Figure sopra citate la prima immagine in alto a sinistra in bianco e nero rappresenta l'area su cui è stata effettuata la mappa EDS; le immagini successive sono dei segnali di fluorescenza X degli atomi indagati con diversi colori: gli atomi di carbonio sono rappresentati in giallo, gli atomi di silice in rosa, gli atomi di sodio in rosso e gli atomi di calcio in verde.

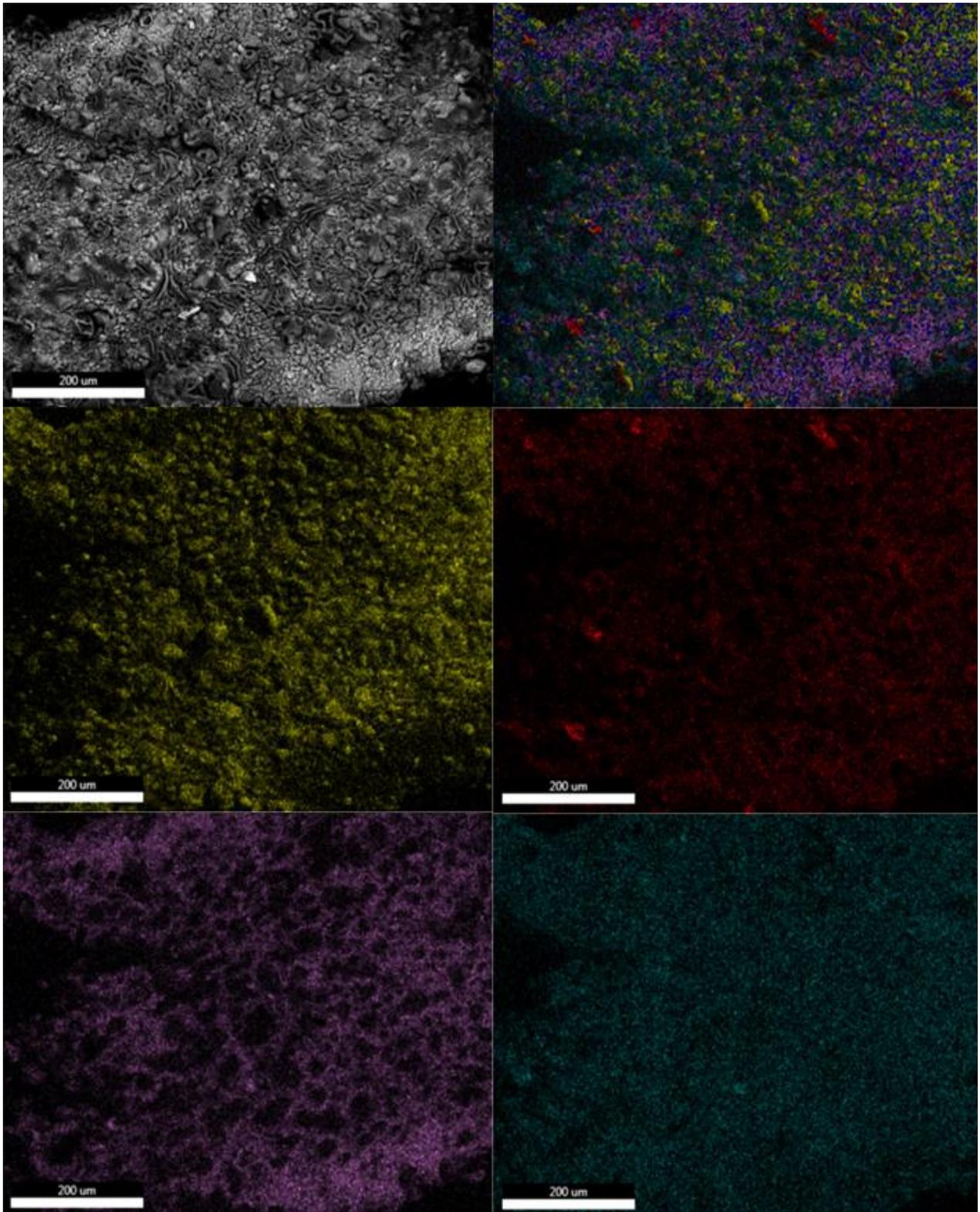


Fig. 7.21: Mappe EDS per scaffold di composizione 70S15C15N-SA post trattamento termico. In alto a sinistra immagine da SEM dell'area indagata, in alto a destra la sovrapposizione delle mappe EDS dei vari elementi indagati; le immagini sottostanti sono mappe EDS per atomi di calcio (verde), sodio (rosso), silice (viola) e carbonio (giallo).

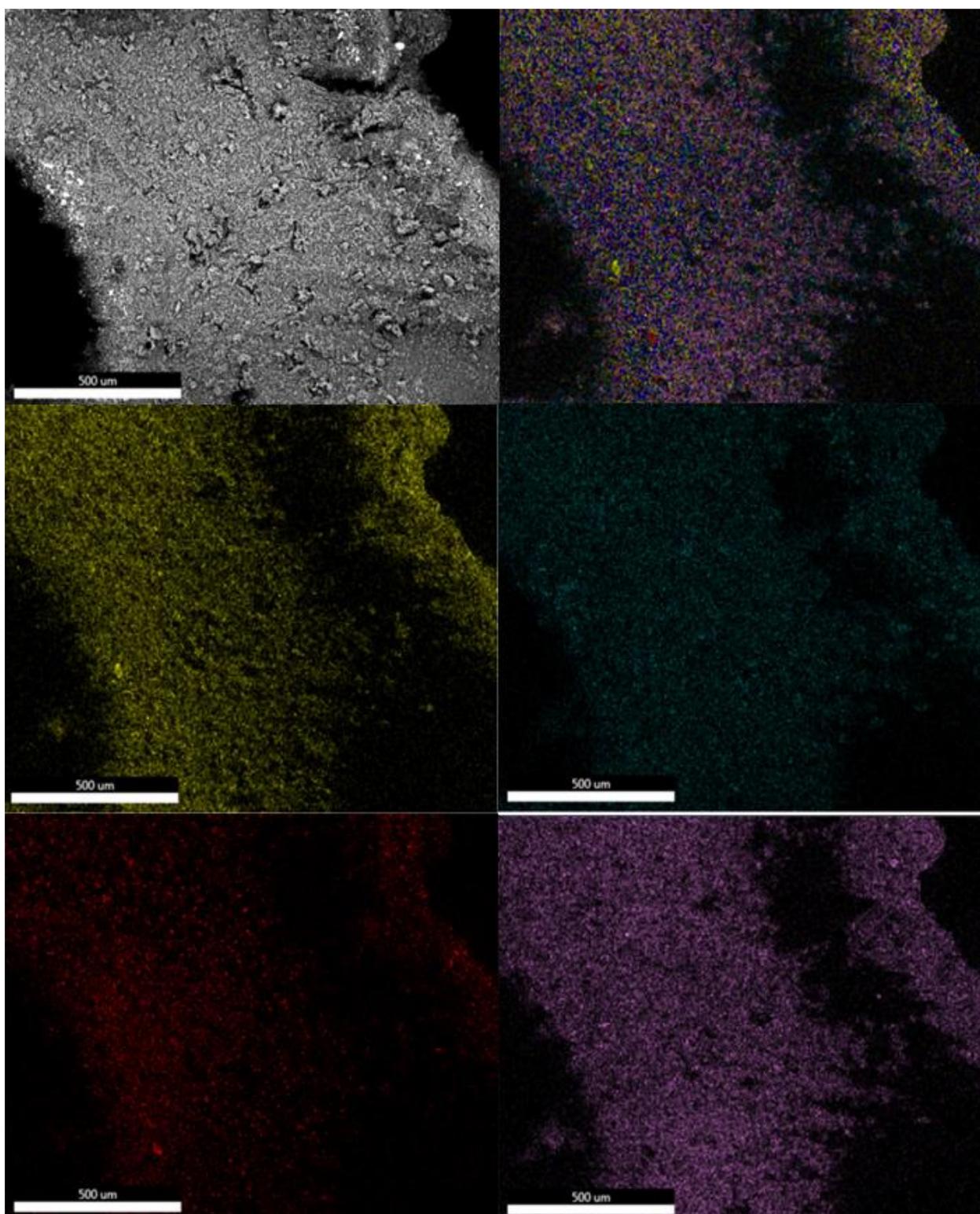


Fig. 7.22: Mappe EDS per scaffold di composizione 70S15C15N-SA pre trattamento termico. In alto a sinistra immagine da SEM dell'area indagata, in alto a destra la sovrapposizione delle mappe EDS dei vari elementi indagati; le immagini sottostanti sono mappe EDS per atomi di calcio (verde), sodio (rosso), silice (viola) e carbonio (giallo).

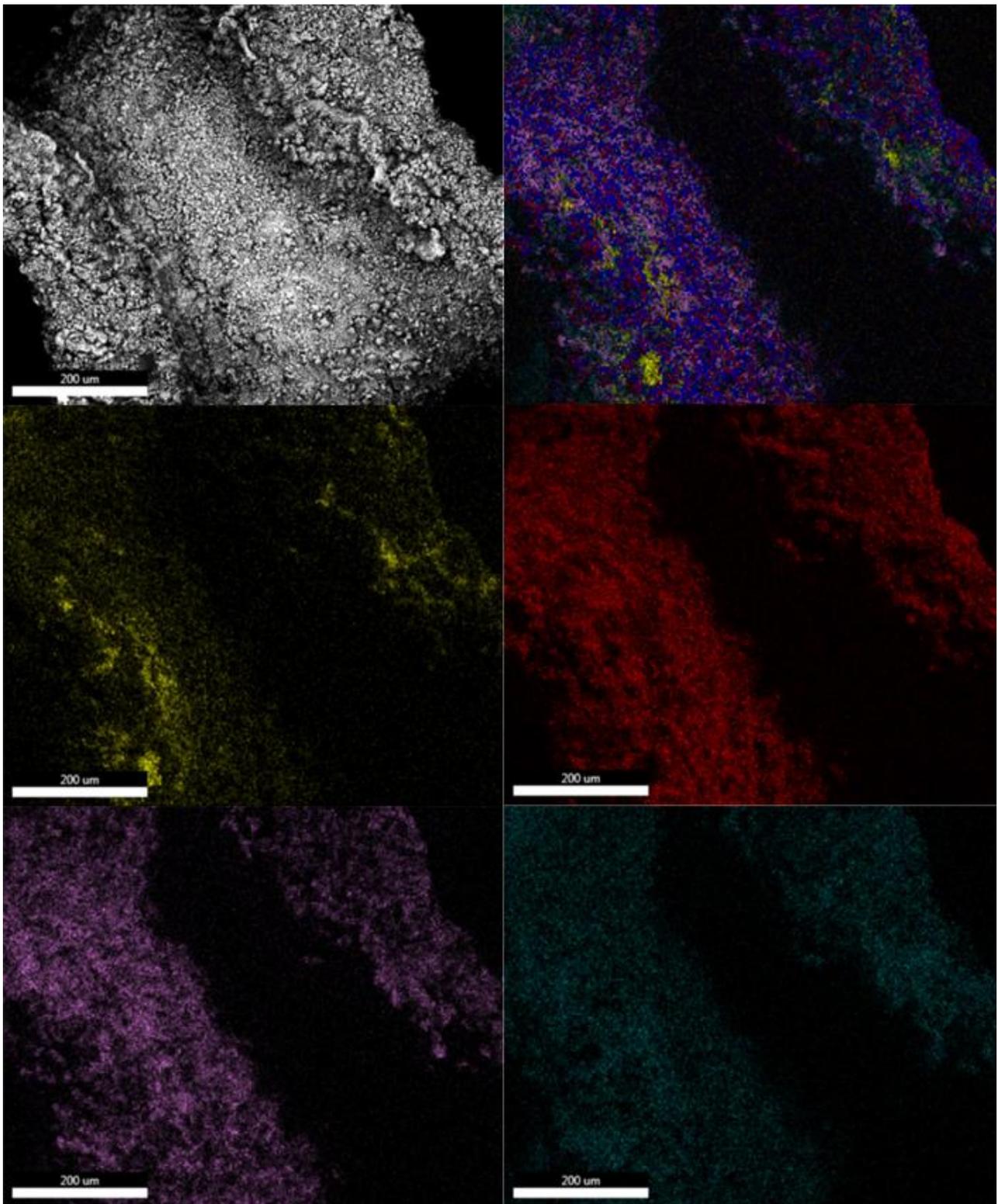


Fig. 7.23: Mappe EDS per scaffold di composizione 50S25C25N-SA post trattamento termico. In alto a sinistra immagine da SEM dell'area indagata, in alto a destra la sovrapposizione delle mappe EDS dei vari elementi indagati; le immagini sottostanti sono mappe EDS per atomi di calcio (verde), sodio (rosso), silice (viola) e carbonio (giallo).

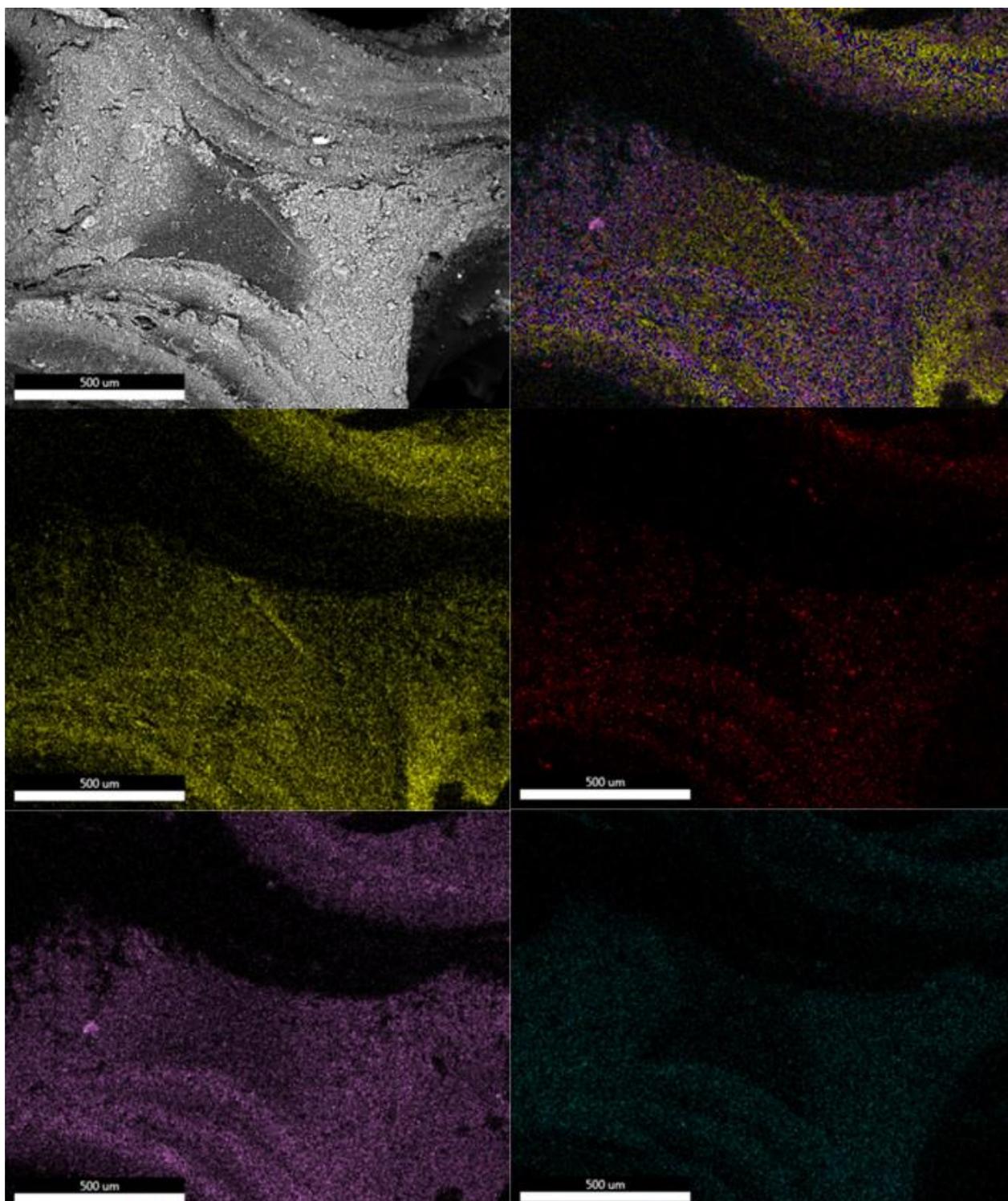


Fig. 7.24: Mappe EDS per scaffold di composizione 50S25C25N-SA pre trattamento termico. In alto a sinistra immagine da SEM dell'area indagata, in alto a destra la sovrapposizione delle mappe EDS dei vari elementi indagati; le immagini sottostanti sono mappe EDS per atomi di calcio (verde), sodio (rosso), silice (viola) e carbonio (giallo).

Le mappe EDS permettono di analizzare la distribuzione dei singoli atomi di carbonio, sodio, calcio e silice sia nei campioni pre trattamento che post trattamento. Le immagini proposte confermano la distribuzione uniforme con assenza di gradienti degli atomi analizzati; solamente nel campione 50S25C25N-SA pirolizzato si possono notare dei piccoli raggruppamenti di atomi di carbonio.

Le zone scure presenti in tutte le immagini sono zone d'ombra derivate dalla morfologia della zona indagata.

Le mappe EDS effettuate per gli scaffolds prodotti non presentano quindi gradienti, esibiscono invece una distribuzione uniforme degli atomi di Si, Ca e Na, confermando la creazione di vetri.

## **7.4 ANALISI DELLE CARATTERISTICHE BIOLOGICHE**

### **7.4.1 Studio dell'evoluzione del pH**

Grazie alla loro struttura amorfa, i vetri non dipendono da una stechiometria specifica come i cristalli e consentono una maggiore flessibilità nella composizione. Ciò rende possibile incorporare nei vetri bioattivi concentrazioni variabili di ioni che mostrano attività fisiologica e proprietà terapeutiche. Quando i vetri si degradano, rilasciano continuamente questi ioni, rendendo i vetri bioattivi interessanti come dispositivi a rilascio controllato [69].

Clark e Hench sono stati i primi a dettagliare una serie di fasi sequenziali nella reattività in vitro e in vivo dei vetri bioattivi, responsabili della capacità di adesione ossea di questi materiali. In breve, si tratta del rilascio di cationi dal vetro con conseguente aumento del pH nella soluzione, della formazione di uno strato ricco di silice e della precipitazione di uno strato ricco di Ca-P che cristallizza ulteriormente come HCA [70].

Oltre a fornire gli elementi fondamentali dell'osso (Ca e P), i prodotti di dissoluzione del bioglass sono anche in grado di stimolare l'attività degli osteoblasti [71].

È quindi logico supporre che le prime fasi della reazione, compreso il rilascio di cationi, avranno una profonda influenza sulle fasi successive delle reazioni della superficie del vetro e, in definitiva, sulla bioattività del materiale.

L'analisi del pH è stata effettuata immergendo i campioni in acqua distillata per 25 ore totali, in contenitori da 60 ml chiusi e separati tenuti a temperatura ambiente.

La proporzione utilizzata tra acqua distillata e peso dello scaffold è stata: 1g – 155,5 ml. L'analisi del pH è stata eseguita su scaffolds modello diamante di composizioni 70S15C15N-SA e 50S25C25N-SA, di peso 0,3217 g e 0,3129 g rispettivamente.

Come riferimento sono stati utilizzati due scaffolds di Biosilicate (ottenuto da una cristallizzazione controllata del Bioglass® 45S5) uno trattato in aria ed un altro in atmosfera inerte.

È stato misurato il pH ad ogni ora per le prime 5 ore e infine a 24 e 25 ore tramite cartine tornasole. Tali misurazioni sono riportate nei due grafici in Figura 7.25.

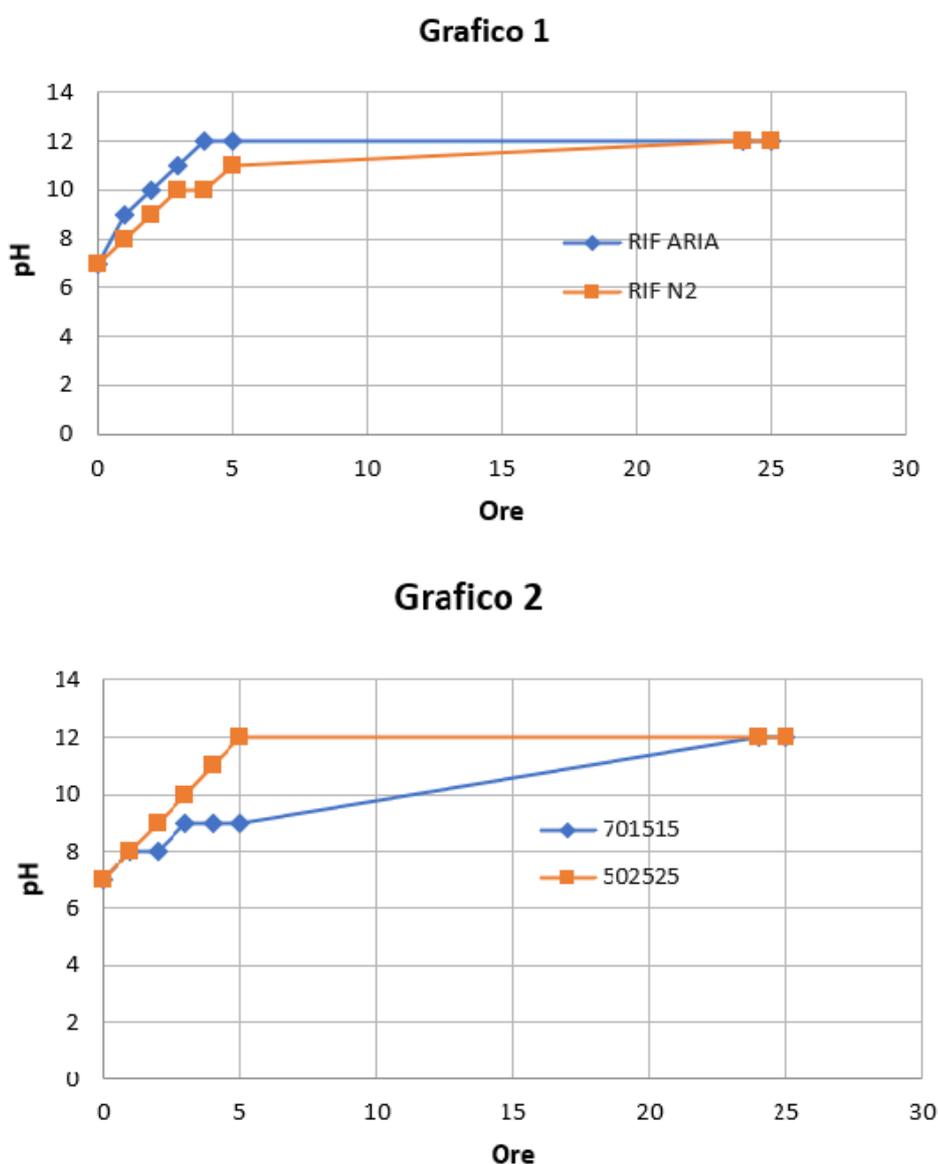


Fig. 7.25: Grafici riportanti le misurazioni del pH per gli scaffolds di riferimento (Grafico 1) e scaffold di composizione 70S15C15N-SA e 50S25C25N-SA (Grafico 2).

Dai grafici si può notare un rapido aumento del pH nelle prime 5 ore ed un raggiungimento di un plateau alle 24 ore ad un pH di  $\sim 12$  per gli scaffolds Biosilicate di riferimento e per la composizione 50S25C25N-SA, mentre per la composizione 70S15C15N-SA l'aumento del pH è più lento, corrispondente ad un basso rilascio di ioni. La differenza tra le due composizioni è dovuta alla percentuale di ossidi di calcio e sodio presenti, poiché con il 70S15C15N-SA sono presenti 70% di ossidi silice in peso ed un 30% di ossidi di calcio e sodio, mentre nel 50S25C25N-SA la percentuale passa ad un 50%; questo si traduce in un rilascio maggiore di ioni calcio e sodio dallo scaffold al liquido.

#### **7.4.2 Effetto fototermico**

I tumori ossei sono una delle malattie più problematiche che causano una mortalità particolarmente elevata e compromettono seriamente la qualità di vita del paziente. L'intervento chirurgico è stato una strategia terapeutica efficace per i tumori ossei, tuttavia, questa strategia porta alla formazione di difetti ossei, che di solito non possono guarire naturalmente, e le cellule tumorali residue proliferano e causano la recidiva del cancro dopo la resezione. Pertanto, è urgente sviluppare biomateriali per promuovere l'osteogenesi e rimuovere le cellule tumorali residue nel sito di resezione [74].

È noto che il tessuto tumorale è molto sensibile all'aumento di temperatura a causa del limitato apporto di vasi sanguigni. A temperature comprese tra 41°C e 45°C, le funzioni metaboliche delle cellule tumorali possono essere interrotte o bloccate.

La membrana delle cellule tumorali collassa e si verifica la denaturazione delle proteine a temperature superiori a 50°C. Rispetto alla terapia tumorale tradizionale, come la radioterapia e la chemioterapia, la terapia fototermica impiega il calore generato dalla luce nel vicino infrarosso assorbita per eliminare il tumore e presenta i vantaggi della bassa tossicità, dell'alta selettività e dell'efficienza terapeutica [75].

Anche le infezioni batteriche sono diventate una delle maggiori sfide sanitarie, si stima che la maggior parte delle infezioni batteriche sia causata da biofilm batterici, che sono comunità microbiche strutturate composte tipicamente da più specie racchiuse in una matrice extracellulare autoprodotta. Inoltre, le infezioni batteriche continuano a causare circa il 4%-6% dei fallimenti degli impianti durante il periodo iniziale dell'impianto, perché i biofilm conferiscono resistenza agli agenti antimicrobici e fungono da serbatoi di batteri che possono

causare infezioni persistenti e croniche. Oltre alle strategie chimiche, i processi di riscaldamento, come la pastorizzazione, sono stati applicati come attività antibatteriche fisiche fin da prima della scoperta della penicillina.

Si ritiene che i batteri comuni vengano disinfettati a una temperatura superiore a 55 °C a causa della denaturizzazione delle proteine da shock termico. Tuttavia, tali processi sono solitamente limitati alla produzione e alla conservazione degli alimenti, sebbene un calore sufficiente possa uccidere un ampio spettro di batteri. Pertanto, si prevede di esplorare nuovi metodi in grado di generare calore con elevata biocompatibilità ed efficienza per scopi medici [74].

Negli ultimi anni è stato riportato che l'effetto fototermico possiede un'elevata efficienza di conversione luce-calore sotto l'irradiazione della luce del vicino infrarosso.

Con una lunghezza d'onda compresa tra 700 e 1400 nm, la luce nel vicino infrarosso ha una buona capacità di penetrare nei corpi dei mammiferi, causando al contempo danni minimi ai tessuti normali. Il calore generato può inibire lo sviluppo di batteri resistenti ai farmaci e prevenire la formazione di strutture di biofilm. Pertanto, la terapia fototermica è considerata una strategia sicura ed efficace per affrontare le infezioni batteriche [73].

Per questo motivo conviene combinare le proprietà osteogeniche del vetro bioattivo con materiali fototermici. I materiali a base di carbonio hanno un potenziale come reagenti fototermici grazie alla loro ampia capacità di assorbimento nel vicino infrarosso. Le proprietà dei nanomateriali di carbonio dipendono fortemente dalle proprietà fisico-chimiche dei precursori, anche se la loro relazione struttura-attività non è stata completamente compresa [72].

Si può definire l'effetto fototermico come un fenomeno associato alla radiazione elettromagnetica prodotta dalla foto eccitazione dei materiali, la quale si traduce in produzione di calore.

È stato quindi analizzato l'effetto fototermico degli scaffolds di composizione 70S15C15N-SA e 50S25C25N-SA. I campioni di scaffolds selezionati sono stati collocati al centro di una base in legno come illustrato nella Figura 7.26.

Una lampada IR è stata posizionata al di sopra dei campioni, a una distanza di ~ 5 cm dal supporto. I campioni sono stati monitorati tramite una termocamera a infrarossi (termocamera FLIR-ONE PRO), la quale ha consentito di registrare la temperatura dei campioni durante l'esposizione infrarossa. Le prove si sono sviluppate sottoponendo un campione alla volta alla lampada IR, ponendolo sulla base di legno e registrando la temperatura dello scaffold a temperatura ambiente.

Successivamente la lampada è stata accesa e si sono registrate le temperature di ogni campione al raggiungimento di 30 secondi di esposizione. Dopodiché la lampada è stata spenta e la temperatura dei campioni ha raggiunto nuovamente la temperatura ambiente.

La temperatura degli scaffolds 70S15C15N-SA e 50S25C25N-SA dopo i 30 secondi di esposizione è aumentata arrivando a 75,3 °C e 63,5 °C rispettivamente. Il campione di riferimento Biosilicate (trattato termicamente in azoto) raggiunge gli 80,8 °C, il riferimento Biosilicate (trattato termicamente in aria) invece non manifesta aumenti di temperatura, e quindi un effetto fototermico, non presentando fasi di carbonio.

Le immagini termiche dei campioni prima della prova (temperatura ambiente) e dopo il tempo di esposizione sono riportate in Figura 7.27 e Figura 7.28 rispettivamente.



Fig. 7.26: Immagine di uno scaffold di composizione 502525 e uno scaffold Biosilicate (trattato in aria), prima dell'esposizione infrarossa.

L'effetto fototermico dei campioni prodotti è confermato dalla prova effettuata; il valore maggiore di temperatura è stato ottenuto dallo scaffold che presenta composizione 70S15C15N-SA, tuttavia entrambe le composizioni 70S15C15N-SA e 50S25C25N-SA esibiscono una temperatura che si avvicina a quella del riferimento (Biosilicate trattato in azoto) discostandosi di 5,5 e 17,3 °C rispettivamente.

La differenza di temperatura finale con il riferimento non incide sui potenziali effetti biocidi su cellule tumorali e batteri, poiché sono raggiunte le temperature che causano la denaturazione delle proteine provocando lo shock termico (~50-55 °C) ed entrambi i campioni presentano una temperatura superiore a questa soglia.

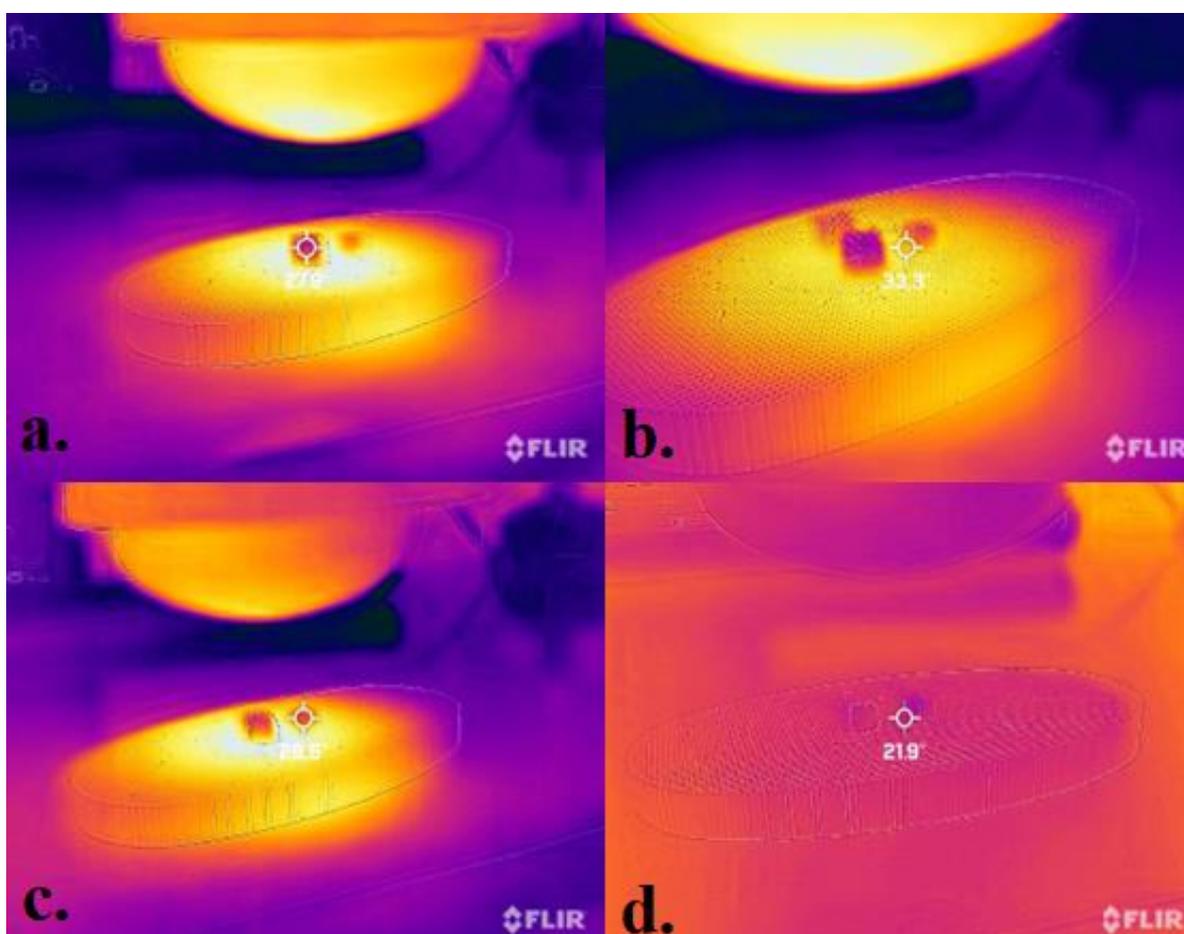


Fig. 7.27: Foto termiche dei campioni prima dell'esposizione a lampada UV (temperatura ambiente): a) 50S25C25N-SA (27,9 °C), b) 70S15C15N-SA (33,3 °C), c) biosilicate trattato in azoto (28,6 °C), d) biosilicate trattato in aria (21,9°C).

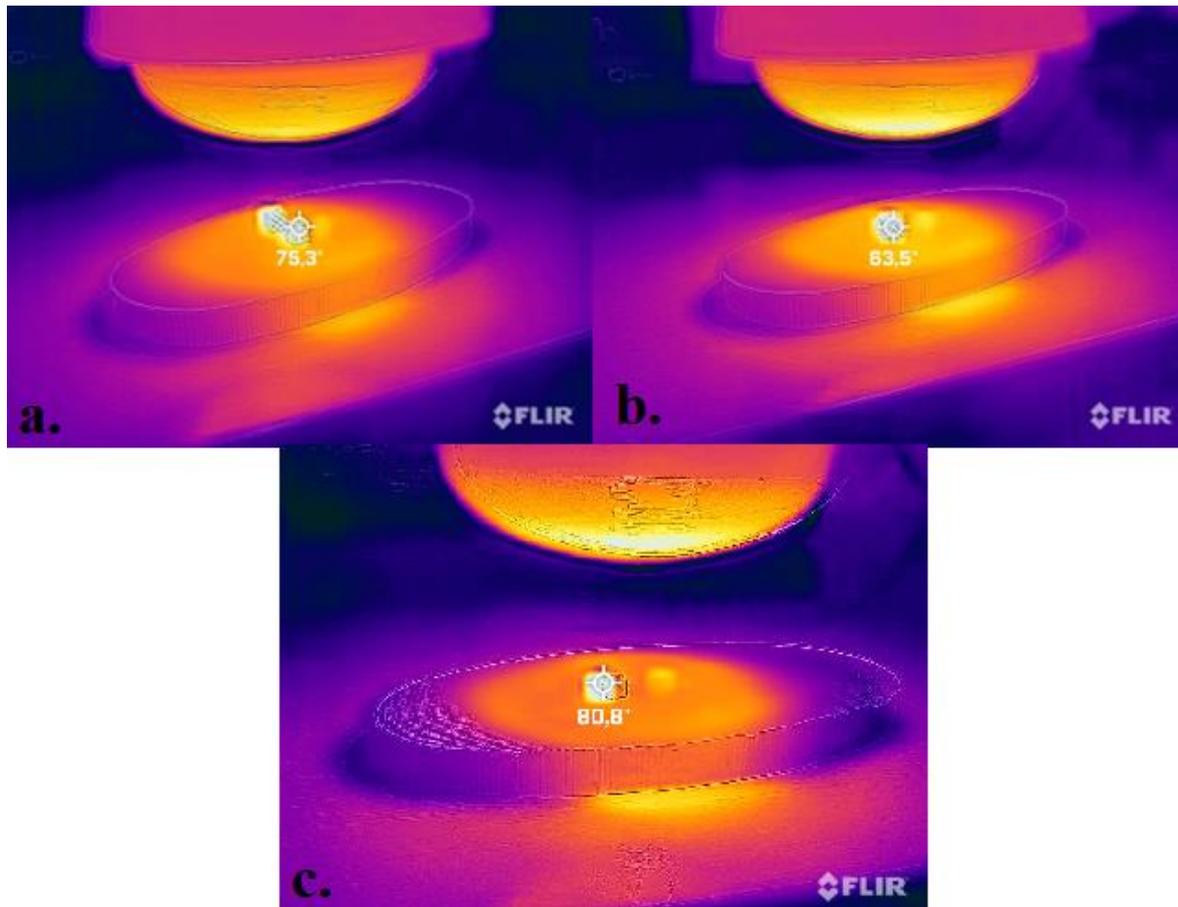


Fig. 7.28: Foto termiche dei campioni dopo 30 secondi di esposizione a lampada UV: a) 70S15C15N-SA (75,3 °C), b) 50S25C25N-SA (63,5 °C), c) biosilicate trattato in azoto (80,8 °C).

## CAPITOLO 8: CONCLUSIONI

Le misurazioni della porosità effettuate sugli scaffolds prodotti definiscono una diminuzione della porosità misurata rispetto a quella teorica, tenendo conto della precisione di stampa del 93% ottenuta dalla stampa di sola resina fotopolimerizzante. La differenza di porosità con il modello CAD è osservabile specialmente nei modelli giroide, mentre gli scaffolds a modello a diamante hanno una porosità che più si avvicina a quella teorica. Si può anche notare che la porosità teorica è meglio rappresentata dai modelli aventi sodio nitrato presente nella miscela, mentre la presenza di sodio acetato rende la miscela più densa, incrementando i fenomeni di scattering durante la stampa, rendendo così la struttura meno porosa.

Inoltre, le strutture a giroide presentano una densità relativa maggiore dei modelli a diamante (~0,36 e ~0,21 rispettivamente), ma anche una resistenza a compressione 4 volte maggiore, tanto che la resistenza a compressione dei modelli a giroide (~5,5 MPa) risulta in pieno range per gli scaffolds utilizzati per la rigenerazione ossea (2-12 MPa).

Per i modelli a diamante è stato possibile definire tramite le formule di Gibson-Ashby la resistenza a flessione, la quale si avvicina molto al valore medio per il vetro standard (~70 Mpa); le composizioni con risultati migliori sono state la 70S15C15N-SN (69,4 MPa) e la 50S25C25N-SN (73,3 MPa).

Le analisi di spettroscopia a raggi X permettono di identificare la formazione di fasi cristalline (carbonati di calcio) negli scaffolds aventi sodio nitrato come precursore degli ossidi di sodio (70S15C15N-SN e 50S25C25N-SN), mentre l'utilizzo del sodio acetato nella miscela iniziale porta alla creazione di scaffolds completamente amorfi (70S15C15N-SA e 50S25C25N-SA).

Le analisi di spettroscopia FTIR confermano la presenza di una rete di silice legata da ossigeni pontanti tipica dei vetri silicatici per la presenza dei legami Si-O-Si in tutti gli scaffolds creati, viene anche convalidata la presenza del carbonio incorporato nella matrice per la presenza dei legami SiOC (ossicarburo di silice) dovuti al trattamento in atmosfera inerte. La spettroscopia Raman ha permesso di definire il carbonio presente negli scaffolds come carbonio amorfo 'turbostatico'.

Tramite microscopia ottica ed elettronica è stato possibile apprezzare la geometria tridimensionale dei campioni creati, la quale rispecchia i modelli teorici delle strutture cellulari

aperte giroide e diamante. Nei modelli a diamante post trattamento termico che presentano sodio acetato come precursore (70S15C15N-SA e 50S25C25N-SA) si è potuta notare la presenza di bolle, caratteristica che scompare nei modelli giroide per le stesse composizioni e negli scaffolds aventi sodio nitrato come precursore. Le analisi microscopiche hanno anche permesso di registrare l'assenza di cricche o microcricche per gli scaffolds di tutte le composizioni.

Attraverso le analisi degli spettri EDS tramite SEM sono state valutate le composizioni in moli di ossidi per gli scaffolds 70S15C15N-SA e 50S25C25N-SA confrontandole con quelle teoriche. I risultati mostrano un buon bilanciamento per gli scaffolds 70S15C15N-SA, mentre i campioni 50S25C25N-SA sa mostrano una sproporzione degli ossidi di sodio rispetto gli ossidi di silice e di calcio.

Mediante le mappe EDS è stato possibile verificare la completa uniformità degli atomi di silice, sodio, ossigeno, carbonio e calcio negli scaffolds, confermando in questo modo l'effettiva creazione di vetri.

L'analisi dell'evoluzione del pH per 25 ore rivela un aumento del pH simile ai riferimenti di Biosilicate per tutte le tipologie di scaffolds creati specialmente per gli scaffolds 50S25C25N-SA e 50S25C25N-SN i quali infatti più si avvicinano alla composizione del riferimento. Infine, entrambi gli scaffolds testati (70S15C15N-SA e 50S25C25N-SA) hanno sviluppato un effetto fototermico raggiungendo temperature  $>55$  °C (soglia teorica per l'ottenimento di effetti biocidi) in un intervallo temporale di 30 secondi.

Pertanto, l'utilizzo del sodio nitrato come precursore rende la stampa precisa, riproducendo fedelmente la porosità del modello teorico, ma promuove la formazione di una fase cristallina di carbonato di calcio. L'uso del sodio acetato come precursore degli ossidi di sodio invece porta alla produzione di scaffolds con struttura completamente amorfa, la porosità però risulta meno precisa rispetto al modello. I modelli giroide prodotti posseggono una struttura vetrosa avente buone proprietà meccaniche con valori di resistenza a compressione paragonabili a quelli del tessuto osseo trabecolare. Questi scaffolds hanno anche prodotto promettenti risultati per quanto riguarda il rilascio di pH, di fondamentale rilevanza nel meccanismo di bioattività del biovetro; anche ottimi esiti ha fornito la valutazione dell'effetto fototermico, con il raggiungimento in pochi secondi di temperature tali da garantire un effetto biocida su cellule tumorali o batteri.

In conclusione, questo lavoro ha raggiunto lo scopo di produrre biovetri silico-sodico-calcici

utilizzando polimeri siliconici come precursori ceramici mediante tecniche di fabbricazione polimeriche come la stampa stereolitografica, replicando con precisione una geometria direttamente da un modello 3D replicante le impalcature per l'ingegneria dei tessuti. Il trattamento in atmosfera non ossidante ha fornito agli scaffolds ottime proprietà meccaniche e promettenti effetti biologici.

Le proprietà biologiche potrebbero essere valutate tramite saggi di adesione cellulare e mineralizzazione. Altri sviluppi futuri potrebbero essere l'utilizzo di resine siliconiche come unici precursori di silice o l'utilizzo di strutture tridimensionali e composizioni degli scaffolds differenti. L'uso di diverse resine fotopolimerizzanti potrebbero riuscire a diminuire lo scattering rilevato in fase di stampa.

L'ingegneria tissutale ha un grande significato nella medicina rigenerativa, che è una componente essenziale di tutte le specialità chirurgiche e affini. Gli studi nell'ambito dell'ingegneria tissutale, settore tuttora in grande espansione, hanno permesso lo sviluppo di una sempre maggiore varietà di costrutti ingegnerizzati, con la prospettiva di non dover far più ricorso al trapianto di organi, pratica costosa e pericolosa, consentendo ai tessuti danneggiati o malati di rigenerare sé stessi. L'ingegneria biomedica promette un miglioramento sostenibile della qualità della vita umana, con una riduzione dei costi sociali ed economici associati all'assistenza sanitaria e all'aspettativa di vita. L'obiettivo finale è il monitoraggio completo, la riparazione e il miglioramento di tutti i sistemi biologici umani per garantire una qualità di vita migliore e sostenibile, con la salute come obiettivo primario.



# BIBLIOGRAFIA

1. Rinaldo Florencio-Silva, Gisela Rodrigues da Silva Sasso, Estela Sasso-Cerri, Manuel Jesus Simões, Paulo Sérgio Cerri. *Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells*, BioMed Research International, 2015.
2. Patricia A. Downey, Michael I. Siegel. *Bone Biology and the Clinical Implications for Osteoporosis*, Physical Therapy, Volume 86, Issue 1, Pages 77–91, 1 January 2006.
3. Boskey AL. *Bone composition: relationship to bone fragility and antiosteoporotic drug effects*. Bonekey, Rep. 2013.
4. Elif Bilgiç, Özge Boyacıoğlu, Merve Gizer, Petek Korkusuz, Feza Korkusuz. *Chapter 6 - Architecture of bone tissue and its adaptation to pathological conditions*, Comparative Kinesiology of the Human Body, Academic Press, 2020.
5. Bala, Y., Farlay, D. & Boivin, G. Bone mineralization: from tissue to crystal in normal and pathological contexts. *Osteoporos Int* 24, 2153–2166, 2013.
6. Kong Wah Ng, Evangelos Romas, Leo Donnan, David M. Findlay. *Bone biology*, Baillière's Clinical Endocrinology and Metabolism, Volume 11, Issue 1, Pages 1-22, 1997.
7. Laura del-Mazo-Barbara, Maria-Pau Ginebra. *Rheological characterisation of ceramic inks for 3D direct ink writing: A review*, Journal of the European Ceramic Society, Volume 41, Issue 16, Pages 18-33, 2021.
8. Jae-Young Rho, Liisa Kuhn-Spearing, Peter Zioupos. *Mechanical properties and the hierarchical structure of bone*, Medical Engineering & Physics, Volume 20, Issue 2, Pages 92-102, 1998.
9. Bigham-Sadegh, A. and Oryan, A. *Basic concepts regarding fracture healing and the current options and future directions in managing bone fractures*. *Int Wound J*, 2015.
10. Richard Marsell, Thomas A. Einhorn. *The biology of fracture healing, Injury*, Volume 42, Issue 6, Pages 551-555, 2011.
11. Salhotra, A., Shah, H.N., Levi, B. *et al. Mechanisms of bone development and repair*. *Nat Rev Mol Cell Biol* 21, 696–711, 2020.

12. *Wheater's Functional Histology. A Text and Colour Atlas - Sixth edition*, EDRA LSWR, 2014.
13. Audrey Remedios. *Bone and Bone Healing, Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, Volume 29, Issue 5, Pages 1029-1044, 1999.
14. Fillingham Y. and Jacobs J. *Bone grafts and their substitutes*, The Bone & Joint Journal 2016 98-B:1\_Supple\_A, 6-9, 2016.
15. Navarro M, Michiardi A, Castaño O, Planell JA. *Biomaterials in orthopaedics*. J R Soc Interface, 2008.
16. Wenhao Wang, Kelvin W.K. Yeung. *Bone grafts and biomaterials substitutes for bone defect repair: A review*, Bioactive Materials, Volume 2, Issue 4, Pages 224-247, 2017.
17. Buddy D. Ratner, Allan S. Hoffman, Frederick J. Schoen, Jack E. Lemons. *Introduction - Biomaterials Science: An Evolving, Multidisciplinary Endeavor*, Biomaterials Science (Third Edition), Academic Press, 2013.
18. Parida, Patitapabana & Behera, Ajit & Mishra, Subash. *Classification of Biomaterials used in Medicine*. International Journal of Advances in Applied Sciences, 2012.
19. Nadim James Hallab, Joshua J. Jacobs, 2.5.4 - *Orthopedic Applications*, Biomaterials Science (Fourth Edition), Academic Press, Pages 1079-1118, 2020.
20. Sidra Ajmal, Farzan Athar Hashmi, Iffat Imran. *Recent progress in development and applications of biomaterials*, Materials Today: Proceedings, Volume 62, Part 1, Pages 385-391, 2022.
21. Andrew H. Schmidt, *Autologous bone graft: Is it still the gold standard?*, Injury, Volume 52, Supplement 2, Pages S18-S22, 2021.
22. Carlo di Bello, Andrea Bagno. *Biomateriali: dalla scienza dei materiali alle applicazioni cliniche*, Pàtron Editore, 2018.
23. Joshua S. Carson, Mathias P.G. Bostrom. *Synthetic bone scaffolds and fracture repair*, Injury, Volume 38, Issue 1, Supplement, Pages S33-S37, 2007.
24. Timothy T. Roberts & Andrew J. Rosenbaum. *Bone grafts, bone substitutes and orthobiologics*, Organogenesis, 8:4, 114-124, 2012.

25. Timothy T. Roberts & Andrew J. Rosenbaum. *Bone grafts, bone substitutes and orthobiologics*, Organogenesis, 8:4, 114-124, 2012.
26. Kovar, F., Wozasek, G. *Bone graft harvesting using the RIA (reaming irrigation aspirator) system – a quantitative assessment*. Wien Klin Wochenschr 123, 285–290, 2011.
27. Webb J. C. J. and Spencer R. F. *The role of polymethylmethacrylate bone cement in modern orthopaedic surgery*, The Journal of Bone and Joint Surgery. British volume 2007 89-B:7, 851-857.
28. Robert W. Bucholz, Ann Carlton, Ralph E. Holmes. *Hydroxyapatite and Tricalcium Phosphate Bone Graft Substitutes*, Orthopedic Clinics of North America, Volume 18, Issue 2, Pages 323-334, 1987.
29. Rahaman MN, Day DE, Bal BS, Fu Q, Jung SB, Bonewald LF, Tomsia AP. *Bioactive glass in tissue engineering*, Acta Biomater, 2011.
30. Julian R. Jones. *Review of bioactive glass: From Hench to hybrids*, Acta Biomaterialia, Volume 9, Issue 1, Pages 4457-4486, 2013.
31. Cannio M, Bellucci D, Roether JA, Boccaccini DN, Cannillo V. *Bioactive Glass Applications: A Literature Review of Human Clinical Trials*, Materials (Basel), 2021.
32. Shivani Punj, Jashandeep Singh, K. Singh. *Ceramic biomaterials: Properties, state of the art and future prospectives*, Ceramics International, Volume 47, Issue 20, Pages 28059-28074, 2021.
33. Fiume E, Barberi J, Verné E, Baino F. *Bioactive Glasses: From Parent 45S5 Composition to Scaffold-Assisted Tissue-Healing Therapies*. J Funct Biomater, 2018.
34. Montazerian, M, Zanotto, ED. *History and trends of bioactive glass-ceramics*. J Biomed Mater Res Part A 2016; 104A: 1231– 1249, 2016.
35. Gerhardt LC, Boccaccini AR. *Bioactive Glass and Glass-Ceramic Scaffolds for Bone Tissue Engineering*. Materials (Basel), 2010.
36. Fu Q, Saiz E, Rahaman MN, Tomsia AP. *Bioactive glass scaffolds for bone tissue engineering: state of the art and future perspectives*. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl. 2011.
37. Wanpeng Cao, Larry L. Hench, *Bioactive materials*, Ceramics International, Volume 22, Issue 6, Pages 493-507, 1996.

38. Hench, L.L. *The story of Bioglass*<sup>®</sup>. *J Mater Sci: Mater Med* **17**, 2006.
39. Morgan EF, Unnikrisnan GU, Hussein AI. *Bone Mechanical Properties in Healthy and Diseased States*. *Annu Rev Biomed Eng.* 2018.
40. Jonathan Massera, *10 - Bioactive glass-ceramics: From macro-to nano*, In Woodhead Publishing Series in Biomaterials, *Nanostructured Biomaterials for Regenerative Medicine*, Pages 275-292, 2020.
41. Raghvendra Pratap Chaudhary, Chithra Parameswaran, Muhammad Idrees, Abolaji Sefiu Rasaki, Changyong Liu, Zhangwei Chen, Paolo Colombo. *Additive manufacturing of polymer-derived ceramics: Materials, technologies, properties and potential applications*, *Progress in Materials Science*, Volume 128, 2022.
42. Tobias Maconachie, Martin Leary, Bill Lozanovski, Xuezhe Zhang, Ma Qian, Omar Faruque, Milan Brandt. *SLM lattice structures: Properties, performance, applications and challenges*, *Materials & Design*, Volume 183, 2019.
43. V.S. Deshpande, M.F. Ashby, N.A. Fleck. *Foam topology: bending versus stretching dominated architectures*, *Acta Materialia*, Volume 49, Issue 6, Pages 1035-1040, 2001.
44. Lorna J. Gibson. *Biomechanics of cellular solids*, *Journal of Biomechanics*, Volume 38, Issue 3, Pages 377-399, 2005.
45. Colombo, P., Mera, G., Riedel, R. and Sorarù, G.D. *Polymer-Derived Ceramics: 40 Years of Research and Innovation in Advanced Ceramics*. In *Ceramics Science and Technology* (eds R. Riedel and I.-W. Chen). 2013.
46. A Francis. *Progress in polymer-derived functional silicon-based ceramic composites for biomedical and engineering applications*, *Materials Research Express*, Volume 5, Number 6, 2018.
47. P. Colombo, E. Bernardo, G. Parciannello. *Multifunctional advanced ceramics from preceramic polymers and nano-sized active fillers*, *Journal of the European Ceramic Society*, Volume 33, Issue 3, Pages 453-469, 2013.
48. Fiocco, L, Bernardo, E, Colombo, P, Cacciotti, I, Bianco, A, Bellucci, D, Sola, A, Cannillo, V. *Novel processing of bioglass ceramics from silicone resins containing micro- and nano-sized oxide particle fillers*. *J Biomed Mater Res Part A* 2014; 102A: 2502– 2510. 2014.

49. Hamada Elsayed, Andrea Zocca, Enrico Bernardo, Cynthia M. Gomes, Jens Günster, Paolo Colombo, *Development of bioactive silicate-based glass-ceramics from preceramic polymer and fillers*, Journal of the European Ceramic Society, Volume 35, Issue 2, Pages 731-739, 2015.
50. Saha, A., Raj, R. and Williamson, D.L. *A Model for the Nanodomains in Polymer-Derived SiCO*. Journal of the American Ceramic Society, 89: 2188-2195. 2006.
51. Paulina Ozóg, Hamada Elsayed, Luca Grigolato, Gianpaolo Savio, Jozef Kraxner, Dušan Galusek, Enrico Bernardo, *Engineering of silicone-based blends for the masked stereolithography of biosilicate/carbon composite scaffolds*, Journal of the European Ceramic Society, Volume 42, Issue 13, Pages 6192-6198, 2022.
52. Guo, A., Roso, M., Modesti, M., Liu, J. and Colombo, P. *Preceramic polymer-derived SiOC fibers by electrospinning*. *J. Appl. Polym. Sci.*, 131. 2014.
53. S.M. Ahmadi, G. Campoli, S. Amin Yavari, B. Sajadi, R. Wauthle, J. Schrooten, H. Weinans, A.A. Zadpoor, *Mechanical behavior of regular open-cell porous biomaterials made of diamond lattice unit cells*, Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials, Volume 34, Pages 106-115, 2014.
54. A. Yáñez, A. Herrera, O. Martel, D. Monopoli, H. Afonso. *Compressive behaviour of gyroid lattice structures for human cancellous bone implant applications*, Materials Science and Engineering: C, Volume 68, Pages 445-448, 2016.
55. Kathy Lu. *Porous and high surface area silicon oxycarbide-based materials—A review*, Materials Science and Engineering: R: Reports, Volume 97, Pages 23-49, 2015.
56. Stabler, C, Ionescu, E, Graczyk-Zajac, M, Gonzalo-Juan, I, Riedel, R. *Silicon oxycarbide glasses and glass-ceramics: “All-Rounder” materials for advanced structural and functional applications*. *J Am Ceram Soc.* 2018; 101: 4817– 4856.
57. Gibson, L., & Ashby, M. *Cellular Solids: Structure and Properties* (2nd ed., Cambridge Solid State Science Series). Cambridge: Cambridge University Press, 1997.
58. Hamada Elsayed, Paolo Colombo, Murilo C. Crovace, Edgar D. Zanotto, Enrico Bernardo. *Suitability of Biosilicate® glass-ceramic powder for additive manufacturing of highly porous scaffolds*, Ceramics International, Volume 47, Issue 6, Pages 8200-8207, 2021.
59. E. López-Honorato, P.J. Meadows, R.A. Shatwell, P. Xiao. *Characterization of the anisotropy of pyrolytic carbon by Raman spectroscopy*, Carbon, Volume 48, Issue 3, Pages 881-890, 2010.

60. Masoud Mozafari, Sara Banijamali, Francesco Baino, Saeid Kargozar, Robert G. Hill. *Calcium carbonate: Adored and ignored in bioactivity assessment*, Acta Biomaterialia, Volume 91, Pages 35-47, 2019.
61. Rodríguez-Sánchez, J, Myszka, B, Boccaccini, AR, Dysthe, DK. *Settings behavior and bioactivity assesment of calcium carbonate cements*. J Am Ceram Soc. 2019.
62. A. Francis, R. Detsch, A.R. Boccaccini. *Fabrication and cytotoxicity assessment of novel polysiloxane/bioactive glass films for biomedical applications*, Ceramics International, Volume 42, Issue 14, Pages 15442-15448, 2016.
63. Murilo C. Crovace, Marina T. Souza, Clever R. Chinaglia, Oscar Peitl, Edgar D. Zanotto. *Biosilicate® — A multipurpose, highly bioactive glass-ceramic. In vitro, in vivo and clinical trials*, Journal of Non-Crystalline Solids, Volume 432, Part A, Pages 90-110, 2016.
64. Xifan Wang, Franziska Schmidt, Dorian Hanaor, Paul H. Kamm, Shuang Li, Aleksander Gurlo. *Additive manufacturing of ceramics from preceramic polymers: A versatile stereolithographic approach assisted by thiol-ene click chemistry*, Additive Manufacturing, Volume 27, Pages 80-90, 2019.
65. Oscar Peitl, Edgar Dutra Zanotto, Larry L. Hench. *Highly bioactive P2O5–Na2O–CaO–SiO2 glass-ceramics*, Journal of Non-Crystalline Solids, Volume 292, Issues 1–3, Pages 115-126, 2001.
66. Xie, F, Gonzalo-Juan, I, Breitzke, H, et al. *Effect of Ca and B incorporation into silicon oxycarbide on its microstructure and phase composition*. J Am Ceram Soc. 2019.
67. Oana Bretcanu, Xanthippi Chatzistavrou, Konstantinos Paraskevopoulos, Reinhard Conradt, Ian Thompson, Aldo R. Boccaccini. *Sintering and crystallisation of 45S5 Bioglass® powder*, Journal of the European Ceramic Society, Volume 29, Issue 16, Pages 3299-3306, 2009.
68. Li, S., Ni, J., Liu, X., Zhang, X., Yin, S., Rong, M., Guo, Z. and Zhou, L. *Surface characteristics and biocompatibility of sandblasted and acid-etched titanium surface modified by ultraviolet irradiation: An in vitro study*, J. Biomed. Mater. Res., 100B: 1587-1598. 2012.
69. Raika Brückner, Maxi Tylkowski, Leena Hupa, Delia S. Brauer. *Controlling the ion release from mixed alkali bioactive glasses by varying modifier ionic radii and molar volume*, Journal of Materials Chemistry B, Issue 18, 2016.

70. Marta Cerruti, David Greenspan, Kevin Powers. *Effect of pH and ionic strength on the reactivity of Bioglass® 45S5*, *Biomaterials*, Volume 26, Issue 14, Pages 1665-1674, 2005.
71. Saima Begum, William E. Johnson, Tony Worthington, Richard A Martin. *The influence of pH and fluid dynamics on the antibacterial efficacy of 45S5 Bioglass*, *Biomedical Materials*, Volume 11, Number 1, 2016.
72. Steven Yee, Louisa Oney, Tyler Cosby, David P. Durkin, and Hatem ElBidweihy. *Photothermal actuation of levitated pyrolytic graphite revised*, *APL Materials* 9, 2021.
73. Fulden Dogrul, Stefano Bortolin, Davide Del Col, Nicola Dengo, Danilo Pedron, Martin Michalek, Hamada Elsayed, Dušan Galusek, Enrico Bernardo. *Polymer-derived Biosilicate-C composite foams: Phase development and photothermal effect*, *Journal of the European Ceramic Society*, Volume 41, Issue 16, Pages 380-388, 2021.
74. Zhen Yang, Fujian Zhao, Wen Zhang, Zhengyu Yang, Man Luo, Lu Liu, Xiaodong Cao, Dafu Chen, Xiaofeng Chen. *Degradable photothermal bioactive glass composite hydrogel for the sequential treatment of tumor-related bone defects: From anti-tumor to repairing bone defects*, *Chemical Engineering Journal*, Volume 419, 2021.
75. Jing-Wei Xu, Ke Yao, Zhi-Kang Xu. *Nanomaterials with a photothermal effect for antibacterial activities: an overview*, *Nanoscale*, Issue 18, 2019.