



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA
DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA DELL'INFORMAZIONE

**Corso di Laurea Magistrale in
Bioingegneria Industriale**

TESI DI LAUREA MAGISTRALE

SINTESI E STAMPA 3D DI SCAFFOLDS A BASE
DI BIOVETRO 70S30C SUPPORTATE DA
EMULSIONI IN POLIMERO PRECERAMICO

Relatore: Prof. Enrico Bernardo

Laureanda: Elena Tagliabue

Correlatore: PhD. Hamada Elsayed

Matricola n° 2015555

Anno accademico 2021-2022

18 Ottobre 2022

“Intelligence is the ability to adapt to change”
Stephen Hawking

INDICE

SOMMARIO	I
1. ANATOMIA E PATOLOGIA DEL TESSUTO OSSEO.....	1
1.1. ANATOMIA DEL TESSUTO OSSEO.....	1
1.1.1. STRUTTURA E FUNZIONE DELL'OSSO	1
1.2. PATOLOGIA DEL TESSUTO OSSEO	6
1.2.1. OSTEOPOROSI.....	6
1.2.2. FRATTURE OSSEE.....	7
1.2.3. TUMORI DELL'OSSO	8
2. COMPORTAMENTO MECCANICO DEL TESSUTO OSSEO	11
2.1. TESSUTO OSSEO CORTICALE.....	11
2.2. TESSUTO OSSEO TRABECOLARE	13
2.3. PROPRIETÀ MECCANICHE DELL'OSSO INTERO	15
2.4. VISCO IPERELASTICITÀ DEL TESSUTO OSSEO	16
3. STATO DELL'ARTE DELLA RIPARAZIONE DEL TESSUTO OSSEO.....	19
3.1.1. BIOMATERIALI DI PRIMA GENERAZIONE	21
3.1.2. POLIMERI.....	22
3.1.3. METALLI	24
3.1.4. CERAMICI	25
3.2. BIOMATERIALI DI SECONDA GENERAZIONE.....	27
3.2.1. POLIMERI.....	27
3.2.2. METALLI	28
3.2.3. CERAMICI	28
3.3. BIOMATERIALI DI TERZA GENERAZIONE	30
3.3.1. INGEGNERIA TISSUTALE DELL'OSSO	30
3.3.2. CASI DI STUDIO	32
4. IL BIOVETRO	35

4.1.	STORIA DEL BIOVETRO	35
4.1.1.	L'IPOTESI DEL BIOVETRO (1967-1969).....	35
4.1.2.	LA SCOPERTA DEL BIOVETRO (1967-1971).....	36
4.1.3.	IL LEGAME CON IL TESSUTO OSSEO (1969-1978)	36
4.2.	MECCANISMO DI BIOATTIVITÀ	38
4.2.1.	FORMAZIONE DELLO STRATO DI HCA	39
4.2.2.	DISSOLUZIONE DEI PRODOTTI IONICI E OSTEOGENESI	40
4.3.	VARIANTI DEL BIOGLASS 45S5®	41
4.4.	APPLICAZIONI E PRODUZIONE DEL BIOGLASS®	42
4.4.1.	APPLICAZIONI	42
4.4.2.	PROCESSO SOL-GEL	43
5.	I MATERIALI CELLULARI	47
5.1.	INTRODUZIONE.....	47
5.1.1.	BENDING-DOMINATED.....	47
5.1.2.	STRETCH-DOMINATED.....	49
5.1.3.	CONFRONTO DELLE PROPRIETÀ TRA UNA STRUTTURA BENDING-DOMINATED E UNA STRETCH-DOMINATED	50
5.2.	TASSONOMIA.....	51
5.3.	PARAMETRI DESCRITTIVI I MATERIALI CELLULARI.....	52
5.4.	FABBRICAZIONE DEI MATERIALI CELLULARI	53
5.4.1.	BINDER JETTING	54
5.4.2.	MATERIAL EXTRUSION AND JETTING	54
5.4.3.	VAT POLYMERIZATION/STEREOLITHOGRAPHY	55
5.4.4.	DIRECT ENERGY DEPOSITION	56
5.4.5.	POWER BED FUSION	56
6.	MATERIALI E METODI.....	59
6.1.	MATERIALI	59

6.2.	STRUMENTAZIONE	62
6.2.1.	PRODUZIONE DEGLI SCAFFOLDS	62
6.2.2.	CARATTERIZZAZIONE DEGLI SCAFFOLDS.....	63
7.	RISULTATI.....	69
7.1.	CARATTERIZZAZIONE MICROSTRUTTURALE.....	69
7.1.1.	FOTO DEI CAMPIONI.....	69
7.1.2.	FOTO AL MICROSCOPIO OTTICO	71
7.1.3.	FOTO AL SEM	76
7.1.4.	MISURE DI DENSITÀ	81
7.1.5.	PROVE DI COMPRESSIONE	82
7.1.6.	ANALISI XRD	84
7.1.7.	ANALISI FTIR	86
7.1.8.	ANALISI RAMAN	87
7.1.9.	ANALISI AL SEM	88
7.1.10.	VALUTAZIONE DEL pH	98
7.1.11.	EFFETTO FOTOTERMICO	99
8.	CONCLUSIONI.....	101
	BIBLIOGRAFIA.....	103

SOMMARIO

L'apparato muscolo scheletrico ha lo scopo di sostenere il corpo, di proteggere gli organi interni e consentire la locomozione grazie all'azione dei muscoli legati attraverso i tendini alle ossa le quali costituiscono circa il 35% della massa corporea e sono più di 200, suddivise in ossa lunghe, brevi e piatte. Esse sono formate da tessuto osseo, un tessuto connettivo di sostegno reso rigido dalla mineralizzazione della matrice extracellulare che lo compone in cui avviene un continuo processo di rimodellamento per adattare il tessuto al cambiamento naturale delle condizioni di carico e dell'ambiente biologico che avviene nel corso della vita. Questo rimodellamento è possibile grazie all'azione sinergica degli osteoblasti, che producono nuova matrice, e degli osteoclasti, cellule multinucleate che digeriscono la matrice grazie a degli enzimi.

Diverse patologie ed eventi traumatici possono portare ad un'alterazione dell'omeostasi in questo tessuto come, per esempio, una frattura, l'asportazione di una parte di tessuto osseo in seguito alla rimozione di un tumore o l'indebolimento della matrice per l'insorgere di una condizione di osteopenia o di osteoporosi. Nel caso di una frattura, l'approccio standard è l'immobilizzazione della zona interessata in modo da alleggerire il carico a cui normalmente è sottoposta per consentire un'adeguata guarigione della ferita. Nel caso di fratture più gravi si utilizzano anche dei fissatori in metallo (solitamente barre in titanio o rivestite in titanio) per allineare i frammenti ossei.

La ricerca del campo dei biomateriali per la riparazione del tessuto osseo si sta focalizzando verso la scoperta e il miglioramento di materiali innovativi bioattivi di seconda e terza generazione che non solo supportano meccanicamente l'osso danneggiato ma stimolano il corpo stesso a produrre nuovo tessuto sano grazie alla degradazione e al rilascio di molecole chimiche osteoconduttrici ed osteoprodottrici. Tra i materiali più utilizzati ci sono i biovetri che devono la loro origine al Bioglass® propriamente detto scoperto da Larry L. Hench nel 1969, un vetro bioattivo composto dal 45% di ossido di silicio, dal 24.5% di ossido di sodio, dal 24.5% di ossido di calcio e dal 6% di ossido di potassio che si biodegrada nel corpo consentendo una contemporanea formazione di uno strato di idrossiapatite, la stessa componente inorganica presente nel tessuto osseo. Un'ulteriore innovazione è stata introdotta con la stampa additiva, comunemente detta stampa 3D perché, dopo aver ottenuto immagini TAC o MR, attraverso opportuni software, è possibile ottenere il modello tridimensionale paziente-specifico della zona in cui il tessuto deve essere sostituito o integrato.

Lo scopo del lavoro descritto in questa tesi è quello della sintesi e della stampa stereolitografica di scaffold in biovetro con il 70% di ossido di silicio e il 30% di ossido di calcio. Successivamente alla stampa, viene applicato un trattamento termico per convertire il polimero preceramico in materiale completamente ceramico. Sono state eseguite numerose analisi per valutare la morfologia, la composizione, la porosità e la resistenza meccanica degli scaffold in biovetro 70S30C derivanti da polimero preceramico contenente o non contenente FS, un precursore utilizzato nel processo di sol-gel che assicura un reticolo di silice resistente, e sono stati messi a confronto per valutare la possibilità di escludere questo precursore per ottenere degli scaffold solamente da polimero.

1. ANATOMIA E PATOLOGIA DEL TESSUTO OSSEO

1.1. ANATOMIA DEL TESSUTO OSSEO

I tessuti connettivi sono presenti in tutto il corpo e hanno la peculiarità di non essere mai a contatto con l'ambiente esterno. Essi sono classificati in *tessuto connettivo propriamente detto*, *tessuto connettivo liquido* e *tessuto connettivo di sostegno*. Questi tre tipi di tessuto connettivo presentano delle differenze sostanziali ma tutti e tre hanno *cellule specializzate*, *fibre proteiche* e *sostanza di fondo*.

Le funzioni di questi tessuti sono molteplici:

- Formare un'impalcatura di sostegno per il corpo;
- Trasportare fluidi e le sostanze disciolte nei vari distretti corporei;
- Proteggere gli organi delicati;
- Sostenere, avvolgere e connettere tessuti diversi;
- Immagazzinare riserve di energia sotto forma, per esempio, di lipidi;
- Proteggere il corpo da microrganismi.

Il tessuto osseo è un tessuto connettivo di sostegno come la cartilagine e presenta un numero di cellule contenuto, una matrice di fibre ben impaccate e, a differenza della cartilagine, depositi minerali che conferiscono la tipica resistenza e rigidità all'osso (*matrice calcificata*).

Nello specifico le funzioni del tessuto osseo sono:

- Supporto strutturale;
- Deposito di minerali come il calcio;
- Produzione di cellule del sangue nel midollo osseo rosso;
- Protezione di tessuti e organi delicati;
- Sistema di leve.

1.1.1. STRUTTURA E FUNZIONE DELL'OSSO

Il tessuto osseo contiene cellule specializzate e una matrice extracellulare composta da fibre proteiche e sostanza fondamentale. La matrice è dura e resistente a causa della deposizione di sali di calcio attorno alle fibre proteiche. Infine, il tessuto osseo è separato dagli altri tessuti dal *periostio fibroso* mentre lo strato interno che lo divide da altri tessuti è detto *endostio cellulare* (Figura 1). (1)

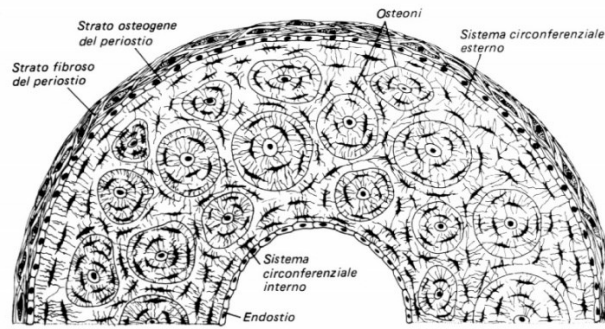


Figura 1: Periostio ed Endostio

Organizzazione istologica dell'osso maturo

L'osso consiste in cellule intrappolate in una matrice, una rete gerarchica composta da due nanofasi: fibre di collagene di tipo I e nanocristalli di idrossiapatite. Il processo di self-assembly delle molecole di collagene definisce i vincoli spaziali per la nucleazione e la propagazione dell'idrossiapatite. (2)

Il fosfato di calcio $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, presente nel tessuto, reagisce con l'idrossido di calcio $\text{Ca}(\text{OH})_2$ formando l'idrossiapatite $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ che costituisce circa il 70% della massa dell'osso. (3) Queste componenti inorganiche conferiscono una notevole resistenza alla compressione all'osso mentre le componenti organiche consentono all'osso di resistere in trazione, flessione e torsione. Infine, le cellule costituiscono solamente il 2% della massa e sono di quattro differenti tipi, rappresentati in Figura 2:

1. *Osteociti*: sono cellule dell'osso maturo e controllano la concentrazione di proteine e minerali nella matrice in cui sono avvolti. Sono addetti alla deposizione dei sali di calcio e al rilascio del calcio nel sangue. Queste cellule si trovano in lacune comprese tra le lamelle di matrice calcificata e, tra lacuna e lacuna, si irradiano dei canalicoli riempiti da prolungamenti citoplasmatici e sostanza fondamentale. Giunzioni comunicanti interconnettono gli osteociti e forniscono un mezzo per la diffusione dei nutrienti e prodotti di rifiuto;
2. *Osteoblasti*: sono cellule disposte in uno strato singolo sulle superfici interne ed esterne dell'osso e secernono la matrice ossea, l'*osteoides*, che viene successivamente mineralizzato. Sono quindi responsabili di quel processo chiamato *osteogenesi* e quando un osteoblasto viene circondato dalla matrice diventa un osteocita;
3. *Cellule osteoprogenitrici*: questo tipo di cellule sono staminali appiattite e si trovano nello strato più interno del periostio ed endostio e sono in grado di differenziarsi in osteoblasti;
4. *Osteoclasti*: sono cellule multinucleate che derivano dalle stesse cellule staminali che possono differenziarsi in monociti e granulociti neutrofili. Essi secernono acidi che sciolgono la matrice

ossea mediante quel processo chiamato *osteolisi* aumentando, così, la concentrazione di fosfato e calcio nei fluidi corporei. (1)

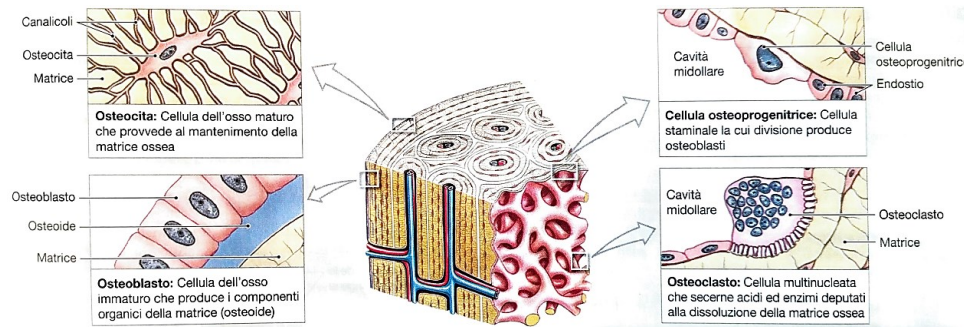


Figura 2: i quattro tipi cellulari del tessuto osseo: Osteocita, Osteoblasto, Cellula Osteoprogenitrice, Osteoclasto

Osso corticale e osso trabecolare

L'*osso corticale* e l'*osso trabecolare* sono entrambi presenti nelle ossa lunghe: il primo forma le pareti mentre il secondo riveste la cavità midollare che contiene il *midollo osseo* giallo (se contiene in prevalenza adipociti) o rosso (se contiene cellule del sangue e cellule staminali ematopoietiche). La composizione chimica dei due tipi di tessuto osseo è la medesima, ciò che cambia è la disposizione tridimensionale degli osteociti, dei canalicoli e delle lamelle.

Nel tessuto osseo corticale (o compatto) l'unità funzionale è l'*osteone* in cui gli osteociti si dispongono in strati concentrici attorno ad un canale centrale parallelo alla superficie dell'osso, il *canale di Havers*, che ha lo scopo di nutrire l'osteone stesso. I *canali di Volkmann*, invece, attraversano l'osso in senso perpendicolare ai canali di Havers e vascolarizzano gli osteoni più interni e la cavità midollare. In particolare, in ciascun osteone, ci sono tre tipi di lamelle:

1. *Lamelle concentriche*: sono cilindriche ed allineate parallelamente all'asse dell'osso;
2. *Lamelle interstiziali*: riempiono lo spazio tra gli osteoni;
3. *Lamelle circonferenziali*: sono presente sulla superficie interna ed esterna dell'osso.

Lo spessore dello strato corticale varia a seconda della regione ed è più spesso nelle zone sottoposte a sollecitazioni in direzioni limitate. Essendo gli osteoni orientati verso una direzione preferenziale, questo tipo di tessuto è molto resistente in compressione lungo l'asse dell'osso ma fragile in trazione e in direzione ortogonale all'asse. Le componenti appena citate sono rappresentate in Figura 3.

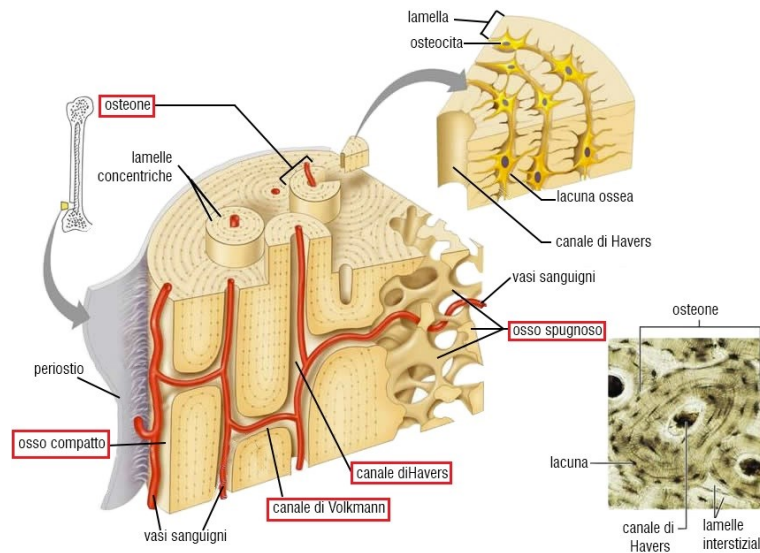


Figura 3: componenti principali del tessuto osseo. In basso a destra l'istologia dell'osteone.

Nell'osso trabecolare, invece, le lamelle sono concentriche ed intrecciate in modo da formare le trabecole lasciando degli spazi comunicanti. Costituendo quindi una rete, questo tessuto è più leggero rispetto al tessuto corticale ed è dotato di notevole resistenza, se rapportata al peso. Questo tessuto si trova in regioni sottoposte a carichi minori ma provenienti da qualunque direzione e le trabecole sono orientate localmente lungo la direzione di maggiore sollecitazione (Figura 4).

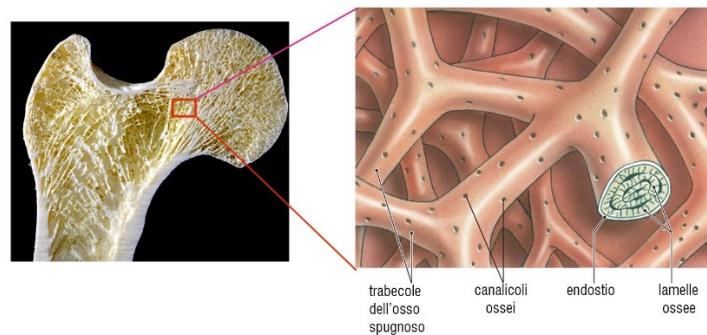


Figura 4: Osso trabecolare. Si nota, nella figura di sinistra, come le trabecole si orientino nella direzione di maggior sollecitazione

Sia l'osso corticale che l'osso trabecolare sono nutriti da una ricca rete vascolare caratterizzata da quattro tipi di vasi sanguigni:

- Arterie e vene nutritizie che penetrano nell'osso attraverso il *forame nutritizio*;
- Vasi metafisari;
- Vasi epifisari;
- Vasi periostali. (1)

Fattori che regolano l'accrescimento osseo

La crescita e il mantenimento del tessuto osseo dipendono da diversi fattori sia nutrizionali che ormonali quali:

1. *Minerali* come il calcio e il fosforo ma anche il magnesio, carbonato e sodio;
2. *Vitamina A* che stimola l'attività degli osteoblasti e *Vitamina C*, coinvolta nella sintesi del collagene e nella differenziazione degli osteoblasti;
3. *Calcitriolo* e *Vitamina D₃*, importanti per l'assorbimento e il trasporto degli ioni di calcio e fosfato;
4. *Paratormone*, che stimola l'attività di osteoclasti e osteoblasti, aumenta la velocità di assorbimento del calcio a livello dell'intestino tenue e diminuisce il rilascio di calcio con le urine;
5. *Calcitonina*, che aumenta il rilascio del calcio con le urine;
6. *Ormone della crescita* e *tiroxina*, che stimolano la crescita ossea fino alla pubertà;
7. *Ormoni sessuali*, che stimolano gli osteoblasti a produrre tessuto osseo più velocemente dalla pubertà in poi. (1)

Mantenimento, rimodellamento e riparazione delle ossa

Il mantenimento dell'osso è dato dall'omeostasi garantita dall'azione degli osteoblasti che bilancia l'azione degli osteoclasti consentendo un continuo ricambio della matrice mineralizzata durante la vita. Il rimodellamento osseo, invece, può determinare una modifica della forma, della struttura o della quantità di minerali dell'osso in seguito ad un cambiamento delle condizioni ambientali.

(1) Nello specifico, il ciclo di rimodellamento consiste in tre fasi consecutive rappresentate in Figura 5: il *riassorbimento*, dato dalla migrazione dei preosteoclasti che differenziano in osteoclasti maturi una volta raggiunto il sito, l'*inversione*, durante la quale avviene la preparazione della superficie per la deposizione di nuovo tessuto e l'invio di segnali biochimici per la migrazione e il differenziamento degli osteoblasti, ed, infine, la *formazione*, in cui nuovo tessuto osseo viene depositato da parte degli osteoblasti. (4)

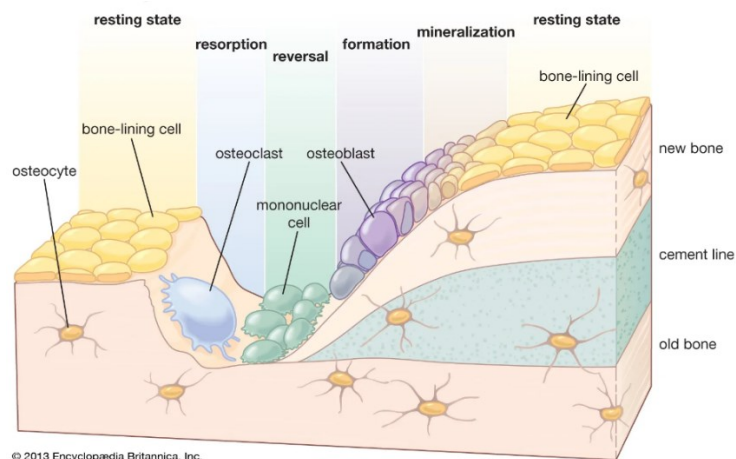


Figura 5: Ciclo del rimodellamento osseo

1.2. PATOLOGIA DEL TESSUTO OSSEO

Varie sono le cause che possono portare ad un'alterazione dell'osso: un difetto nella produzione e nel trasporto dei fattori che regolano l'accrescimento osseo elencati nel §1.1.1 può alterare la deposizione o il riassorbimento. L'invecchiamento determina una condizione di *osteopenia* fisiologica, ovvero una maggiore attività degli osteoclasti a discapito della deposizione della matrice da parte degli osteoblasti. Nei casi più gravi, insorge l'*osteoporosi*, che indica una riduzione della massa ossea e modifiche microstrutturali senza alterare la componente percentuale della parte minerale, aumentando il rischio di *fratture*.

Anche nel caso di tumore dell'osso, si ha un'alterazione dell'omeostasi del tessuto osseo soprattutto nel caso in cui è necessario esportare una parte di tessuto. (1)

1.2.1. OSTEOPOROSI

Nell'individuo soggetto ad osteoporosi si riscontra un tessuto osseo più fino, debole e maggiormente a rischio di fratture. Questa malattia è comune soprattutto nelle donne dopo la menopausa perché, come descritto nel §1.1.1, gli ormoni sessuali sono un fattore determinante per il mantenimento dell'osso. Con l'età, l'azione degli osteoclasti sovrasta quella degli osteoblasti riducendo la massa del tessuto osseo effettiva, come si nota nelle immagini al microscopio in Figura 6. Oltre all'alterazione della produzione di ormoni sessuali e all'età, anche una predisposizione genetica, l'assunzione di alcuni farmaci, problemi di salute riguardanti altri organi, scarsa nutrizione (scarso apporto di calcio e Vitamina D) e uno stile di vita non sano

possono aumentare il rischio di insorgenza di questa malattia. I trattamenti per l'osteoporosi sono solamente farmacologici che aiutano a rallentare il decorso della malattia. (5)

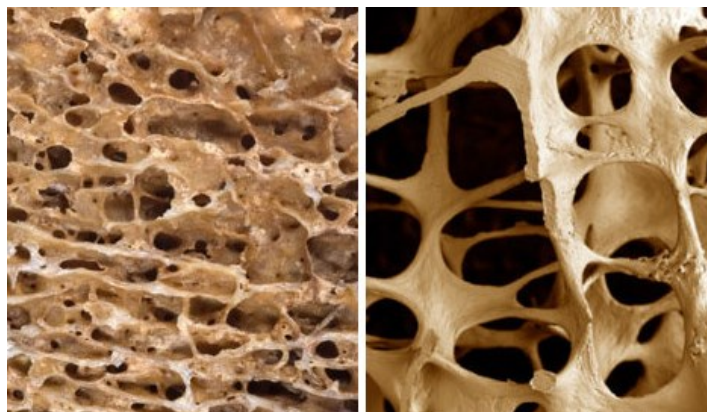


Figura 6: A sinistra, osso sano. A destra, osso affetto da osteoporosi.

1.2.2.FRATTURE OSSEE

Una frattura ossea è un'interruzione strutturale del tessuto osseo e, a seconda della gravità della rottura, può causare un danneggiamento anche ai tessuti circostanti. Sia che sia causata da un trauma sia che sia una conseguenza di un indebolimento del tessuto osseo, lo stadio immediatamente successivo alla frattura è la guarigione che può essere di tipo *primario* o di tipo *secondario*. Nel primo caso durante la guarigione non si ha la formazione del callo e questo si verifica se la frattura viene ridotta, immobilizzata e riabilitata. Il secondo tipo, invece, include la formazione di un callo e il successivo rimodellamento. Nello specifico, la guarigione secondaria è descritta in quattro passaggi principali illustrati in Figura 7:

1. La *formazione dell'ematoma* (dal giorno 1 al giorno 5), causato dalla rottura dei vasi sanguigni, il quale coagula e forma una guida per la guarigione. In questa fase vengono rilasciati dei fattori che richiamano le cellule infiammatorie per ripulire il sito e iniziare la guarigione;
2. La *formazione di un callo fibrocartilagineo* (dal giorno 5 al giorno 11), ovvero un tessuto ricco di fibrina che viene poi popolato dalle cellule mesenchimali. Quest'ultime iniziano a differenziarsi in fibroblasti, condroblasti e osteoblasti (*condrogenesi*) delineando il confine della frattura con uno strato di cartilagine ialina attorno;
3. La *formazione del callo osseo* (dal giorno 11 al giorno 28) durante il quale il callo fibrocartilagineo viene riassorbito e calcificato e i nuovi vasi sanguigni continuano a proliferare portando nuove cellule staminali mesenchimali. Alla fine di questa fase si forma un callo calcificato di osso immaturo;

4. Il *rimodellamento osseo* (dal giorno 28 fino ai mesi o anni successivi) durante il quale avviene il rimodellamento accoppiato del callo, ovvero la deposizione di nuovo tessuto da parte di osteoblasti in contemporanea al riassorbimento del tessuto da parte degli osteoclasti.

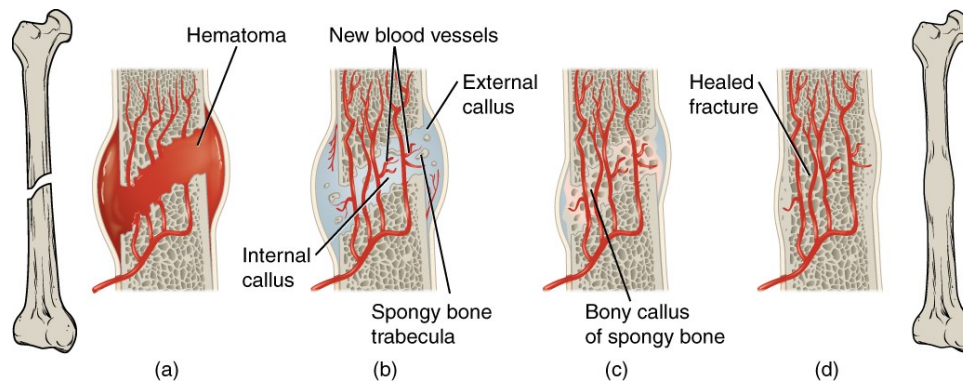


Figura 7: Fasi della riparazione della frattura.

Diversi fattori possono alterare il processo di guarigione. Essi possono essere *locali* come l'infezione, lo scarso apporto di sangue, l'eccessivo movimento o disallineamento, oppure *sistemici*, come l'età, l'obesità, l'anemia, malnutrizione, fumo e problemi endocrini.

Metodi diversi possono essere adottati per promuovere la guarigione di una ferita come l'integrazione di calcio e vitamina D, stimolatori dell'osso di tipo elettrico, elettromagnetico o ultrasuoni oppure innesti di tipo autologo o allogenico (da donatore). (6)

1.2.3. TUMORI DELL'OSSO

I tumori dell'osso sono causati dalla differenziazione incontrollata delle cellule che formano poi una massa anormale. La maggior parte sono *benigni* ovvero curabili ed asportabili senza il rischio di diffusione in altre parti del corpo. Alcuni, però, sono *maligni* e il trattamento consiste in una combinazione tra chemioterapia, radiazioni e intervento chirurgico.

Un tumore dell'osso può svilupparsi in qualsiasi zona, anche nel midollo osseo, distruggendo ed indebolendo il tessuto sano. Un tumore maligno può essere *primario*, se la sua origine è nell'osso, oppure *secondario*, se il tumore ha origine in un altro organo (seno, polmoni, tiroide, reni, prostata) e raggiunge poi il tessuto osseo.

Tra i tumori benigni si identificano per esempio l'ostecondroma e il condroblastoma mentre tra i tumori maligni sono inclusi l'osteosarcoma (in Figura 8) e il condrosarcoma. In questi ultimi casi, può risultare necessario un intervento chirurgico per asportare la massa tumorale e una parte

di tessuto sano ma, se il tumore è troppo esteso e coinvolge anche nervi e vasi sanguigni, si ricorre all'amputazione (nel caso di arti). (7)



Figura 8: Osteosarcoma del femore a livello distale

2. COMPORTAMENTO MECCANICO DEL TESSUTO OSSEO

OSSEO

La distinzione tra tessuto osseo corticale e tessuto osseo trabecolare può essere fatta principalmente sulla base della porosità. Infatti il tessuto corticale ha una porosità che varia dal 5% al 15% mentre il trabecolare ha una porosità varia dal 40% al 95% e ne consegue un diverso comportamento meccanico dei due tessuti.

2.1. TESSUTO OSSEO CORTICALE

Il comportamento meccanico del tessuto corticale è anisotropo: la resistenza e i moduli di trazione e compressione lungo la direzione longitudinale sono notevolmente maggiori rispetto a quelli in direzione radiale e circonferenziale. Infatti è un materiale definito ortotropo, cioè presenta un modulo di rigidezza longitudinale, circonferenziale e radiale e moduli di Poisson e di taglio diversi ma talvolta si preferisce considerare un comportamento meccanico di tipo trasversalmente isotropo, ovvero si considerano i moduli di rigidezza circonferenziale e radiale uguali dato che hanno un valore simile (da 6 GPa a 10 GPa) e inferiore rispetto a quello longitudinale (ha valori da 17 GPa a 20 GPa), attribuito alla direzione di trazione e di maggiore rigidezza.

Il tessuto osseo corticale ha un comportamento plastico in direzione longitudinale con un punto di snervamento ben marcato: in trazione, come si vede in Figura 9, si ha una deformazione a frattura del 3% mentre in compressione dell'1.5% ma la tensione di snervamento, in quest'ultimo caso, è molto maggiore. In direzione trasversale, si ha un comportamento marcatamente più fragile.

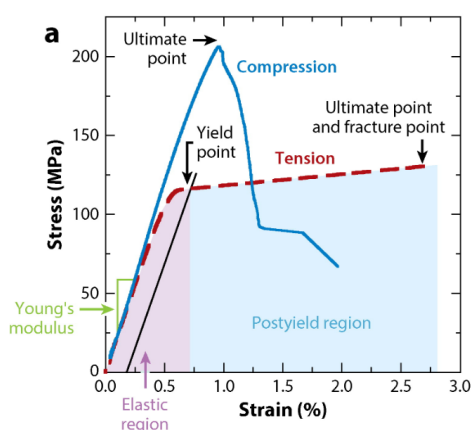


Figura 9: Andamento della tensione in funzione della deformazione in compressione e in trazione nell'osso corticale

Gli effetti della velocità di deformazione sono modesti durante una normale attività fisica ma durante carichi a impatto essa può aumentare da 0.1-1.0%/s a 10%/s e, perciò, si è osservato che l'osso corticale ha un comportamento più rigido ma fragile ad alte velocità di deformazione.

Inoltre, si è verificato che il numero di volte in cui viene applicato il carico influisce sull'accumulo di danno. Nello specifico, quando l'osso viene caricato al di sopra del punto di snervamento, esso accumula una degradazione delle proprietà meccaniche, chiamata anche *microdanno*. Quest'ultimo ha una certa entità fisiologica come conseguenza di un carico naturale e può essere attribuito a un distacco degli aggregati di idrossiapatite o ad uno scorrimento tra le lamelle che provoca una deformazione plastica residua. Il danno a livello microscopico causa un incremento della fragilità dell'osso (danno In vivo) ma può anche rappresentare un meccanismo di rafforzamento (danno De novo). (8) Quest'ultimo avviene durante i test meccanici come quello ad impatto, di tenacità o di resistenza ed è una caratteristica del materiale di resistere alla rottura indurendo il tessuto con l'aumento della grandezza della frattura. (9)

Lo studio della frattura spiega che essa si propaga in direzione perpendicolare rispetto a quella di trazione come si osserva in Figura 10, ortogonale quindi agli osteoni e ha maggiori possibilità di deviare rispetto ad una cricca longitudinale perché diminuisce la forza motrice che è necessaria a propagare la cricca. Questo è indice del comportamento anisotropo del materiale che ha, appunto, una maggiore resistenza in direzione longitudinale.

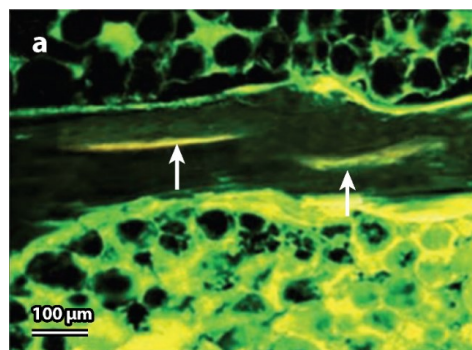


Figura 10: Presenza di microfratture

Le proprietà meccaniche sono influenzate anche dalla porosità e dalla mineralizzazione. La porosità corticale è negativamente correlata con il modulo di Young, la tensione ultima a compressione e la tenacità a frattura. Infatti, dei cambiamenti in termini di porosità portano ad un'alta variabilità nella resistenza dell'osso corticale e i microdanni localizzati vicino ai pori possono provocare una frattura più facilmente rispetto a quelli posti in regioni con alto contenuto di minerali.

Con l'avanzare dell'età, si registra un aumento della porosità, della mineralizzazione, dell'accumulo di microdanni e una diminuzione delle proteine diverse dal collagene portando ad una diminuzione della resistenza a tensione e compressione del 2% ogni dieci anni a partire dai trent'anni. La deformazione ultima a trazione diminuisce del 10% per decade partendo da un 5% in giovane età adulta fino ad arrivare ad un 1% sopra gli ottant'anni. (8)

Come già citato nel §1.2, non è solo l'età ad indebolire il tessuto osseo ma anche malattie come l'osteoporosi e il diabete. Nel caso del diabete, la perdita di tenacità ad un accumulo di AGE (Advanced Glycation Endproducts). (10) Malattie meno comuni, come l'osteogenesi imperfecta, malattia di Paget, bassi livelli di vitamina D e la malattia cronica del rene possono portare ad una diminuzione della rigidità e tenacità o ad una modifica della propagazione della frattura. (8)

2.2. TESSUTO OSSEO TRABECOLARE

Il tessuto osseo trabecolare è considerato un materiale altamente poroso con comportamento anisotropo. Le proprietà meccaniche sono, dunque, principalmente dettate dalla porosità ma un contributo minore è affidato anche all'architettura della rete trabecolare e alle proprietà delle trabecole stesse.

Come nel tessuto corticale, le proprietà meccaniche sono migliori in compressione rispetto alla trazione ma la curva tensione-deformazione non ha un punto di snervamento ben definito come nel tessuto corticale (Figura 11).

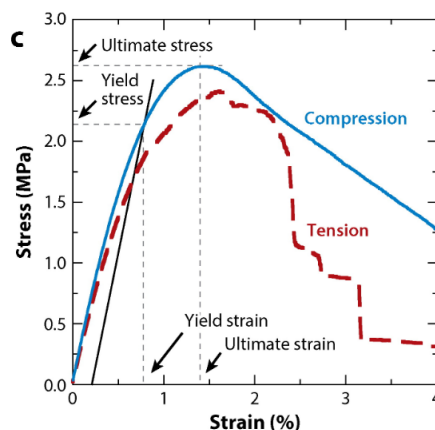


Figura 11: Andamento della tensione in funzione della deformazione in compressione e in trazione nell'osso trabecolare

Possono essere eseguite differenti misure quantitative dell'architettura trabecolare come lo spessore trabecolare, lo spazio trabecolare, il numero delle trabecole, la densità di connessioni e il grado di anisotropia, un numero scalare che indica l'orientazione preferenziale delle trabecole, utilizzando un metodo chiamato *Mean Intercept Length* (MIL) che quantifica la densità direzionale del tessuto.

Questo tessuto può esibire un'elevata eterogeneità spaziale anche all'interno dello stesso sito anatomico che si riflettono in un comportamento meccanico altrettanto eterogeneo. Anche in questo caso si è in presenza di un comportamento ortotropo ma in alcune regioni, come nelle vertebre, si può considerare un comportamento trasversalmente isotropo.

La deformazione di snervamento in compressione aumenta lievemente con l'aumentare della densità dell'osso trabecolare ma, dove quest'ultimo è più denso, non c'è dipendenza.

Per quanto riguarda la viscoelasticità, anche il tessuto trabecolare presenta un modulo di rigidezza e una tensione a compressione dipendenti dalla velocità di deformazione. Nello specifico, la curva di creep è simile a quella dell'osso corticale e presenta un rapido incremento iniziale seguito da una fase statica per poi terminare con un'altra fase di incremento appena prima della frattura.

Il danno che si può creare come conseguenza di un sovraccarico è presente all'interno delle trabecole come microfratture (più che come rottura della trabecola intera) e questo causa una diminuzione del modulo apparente. Con l'età il microdanno aumenta e il suo manifestarsi dipende dai parametri di architettura e dalla frazione di volume sia nella condizione di pre snervamento che di post.

Rispetto alla caratterizzazione del tessuto corticale, nel caso del tessuto trabecolare individuare il comportamento a fatica e frattura è più difficile a causa dell'elevata porosità. Comunque, con un carico ciclico si osserva una perdita di rigidezza e forza e un accumulo di deformazione residua.

Con l'avanzare dell'età, come nel caso dell'osso corticale, si riscontra una sostanziale modifica della densità e dell'architettura dell'osso trabecolare, ovvero le trabecole diventano più fine e dunque più distanti. In alcuni siti anatomici, come nel corpo vertebrale e nella tibia prossimale, questo si riflette in un aumento dell'anisotropia, come dimostrato in Figura 12.

Il modulo e la forza diminuiscono con l'età, più nello specifico del 10% per decade e questo è strettamente correlato con la modifica della densità. Anche nel caso dell'osteoartrite c'è una modifica della densità e per lo stesso motivo si riscontra una diminuzione del modulo di rigidezza dell'osso. (8)

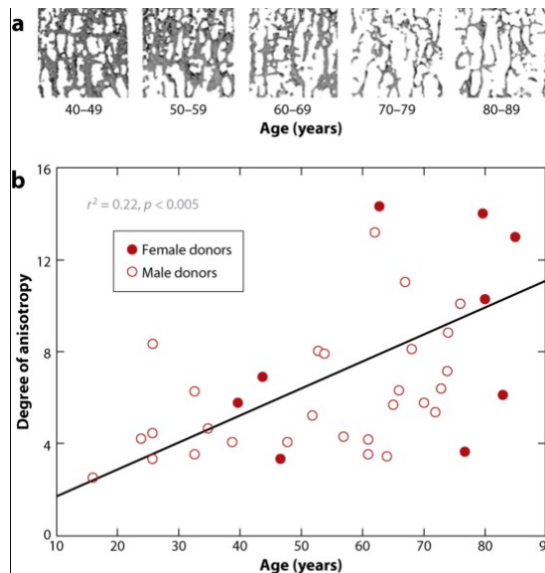


Figura 12: a) Assottigliamento delle trabecole con l'avanzare dell'età
 b) aumento del grado di anisotropia con l'avanzare dell'età

2.3. PROPRIETÀ MECCANICHE DELL'OSSO INTERO

Nonostante lo studio del tessuto osseo corticale e trabecolare separati sia importante per capire il ruolo della geometria nelle proprietà meccaniche, è l'osso intero e dunque l'accoppiamento dei due tessuti a dettare il comportamento meccanico dell'osso.

Sia in compressione che in trazione, la rigidità assiale dipende dall'area su cui agisce la forza mentre le rigidità flessionali e torsionali dipendono da come il materiale (in questo caso il tessuto) è distribuito attorno all'asse di flessione o torsione. Il momento di inerzia dell'area e quello polare permettono di quantificare questa rigidità, in particolare moltiplicandoli per il modulo di Young e per il modulo di taglio rispettivamente. Dato che il materiale non è omogeneo e ha una geometria irregolare, è difficile calcolare l'effettivo modulo di Young o di taglio del materiale: si possono stimare se si tiene conto della variazione della geometria dell'area. Per avere una quantificazione più precisa del modulo di Young, esiste un software sviluppato all'Istituto Ortopedico Rizzoli a Bologna, Italia, chiamato Bonemat® che è in grado di mappare in un modello 3D agli elementi finiti di una certa struttura ossea proprietà meccaniche come il modulo di Young derivate dalla tomografia computerizzata (Figura 13). Più in dettaglio, dalla scala di grigi ottenuta dalle immagini biomediche, si ricava un valore di densità che viene poi correlata con il modulo di Young attraverso opportune relazioni matematiche. Questi valori vengono successivamente mappati nel modello 3D dell'osso così da individuare le regioni a maggiore o minore rigidità. (11)

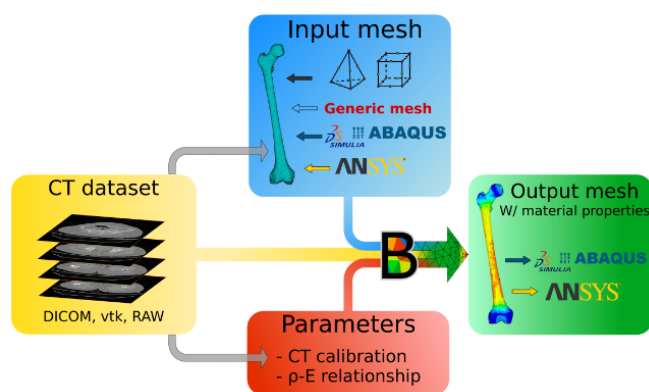


Figura 13: Schema che illustra i parametri di input e di output del software Bonemat

Sia l'osso trabecolare che l'osso corticale perdono rigidità all'avanzare dell'età e di conseguenza anche l'osso nel suo complesso ha lo stesso comportamento: si ha un assottigliamento della cortecchia e una sezione trasversale minore nonostante l'aumento del diametro periostale. Queste modificazioni differiscono a seconda del sesso del soggetto (maggiore diminuzione nelle femmine) e della zona (maggiore diminuzione nella zona lombare rispetto a quella toracica, nel caso delle vertebre).

2.4. VISCO IPERELASTICITÀ DEL TESSUTO OSSEO

Si è dimostrato che il tessuto osseo ha un comportamento dipendente dal tempo, perciò viene considerato come un materiale viscoelastico. Questa caratteristica è dovuta alla presenza del collagene nella parte organica che costituisce la matrice extracellulare dell'osso: questa proteina ha una natura fortemente viscoelastica perché, se viene sollecitato con una bassa velocità di deformazione, oppone una lieve resistenza perché gli viene concesso il tempo sufficiente per lo sgrigliamento dei filamenti. Se invece viene sollecitato con un'alta velocità di deformazione, il collagene ha un comportamento molto rigido perché non ha il tempo di distendere le fibre. La componente prettamente elastica delle proprietà meccaniche è attribuita, invece, alla parte minerale dell'osso. I parametri visco iperelastici si possono ottenere da prove di stress relaxation, considerando un modello Neo Hookeiano per descrivere il comportamento iperelastico e una serie di Prony per ricavare il modulo di taglio e il modulo volumetrico dipendenti dal tempo di rilassamento. Accoppiando, poi, un modello agli elementi finiti con un algoritmo di ottimizzazione si possono ottenere i parametri ottimi per descrivere le proprietà visco iperelastiche. (12)

Inoltre, grazie alla spettroscopia Raman e alla nanoindentazione, si possono identificare la composizione tissutale e le proprietà viscoelastiche del tessuto osservando che i moduli di creep sono

linearmente correlati con la cristallinità, nello specifico aumentano all'aumentare della cristallinità. (13)

Un test di creep a più cicli suggerisce l'esistenza di una soglia sopra alla quale l'effetto tempo-dipendente domina la risposta del materiale e, inoltre, il rilassamento delle tensioni nell'osso corticale dipende dalla quantità di acqua contenuta nel tessuto. (14)

3. STATO DELL'ARTE DELLA RIPARAZIONE DEL TESSUTO OSSEO

Negli anni sessanta e settanta è nata l'idea di progettare delle *endoprotesi* di un materiale compatibile con il corpo umano. Da questo si è sviluppata anche l'importanza dello studio della meccanica dei tessuti biologici, specialmente dell'osso, per progettare dei biomateriali sempre più affini al tessuto che devono sostituire o sostenere. Negli anni ottanta lo stato dell'arte vantava più di cinquanta protesi impiantabili in uso clinico costruiti con quaranta materiali diversi considerati inerti e già presenti in commercio ma resi non tossici e poco corrodibili. Questi biomateriali utilizzati rientrano nei *biomateriali di prima generazione*, ovvero quei materiali ad uso clinico non assorbibili ed inerti che non interagiscono né positivamente né negativamente ma vengono accettati dal corpo e isolati in quella che viene chiamata capsula fibrotica (in dettaglio nel §3.3.1).

Nel 1971 Hench pubblicò la formulazione del Bioglass® capace di legarsi al tessuto osseo e di dissolversi grazie ad uno scambio ionico lasciando spazio al nuovo tessuto ma dal 1984 è avvenuto uno sviluppo notevole dei *biomateriali di seconda generazione*, materiali biocompatibili, biodegradabili e bioattivi. Per esempio, è stata importante la scoperta di fili di sutura biodegradabili in acido polilattico o poliglicolico. Nonostante il notevole miglioramento tra i biomateriali di prima generazione e quelli di seconda generazione, i materiali fatti dall'uomo hanno un limite nelle loro proprietà perché non rispondono agli stimoli biochimici e ai carichi fisiologici come sono in grado di fare i tessuti naturali viventi. Ne consegue in una vita limitata delle protesi che richiede poi un'ulteriore operazione che ha un costo sia per il paziente che economico. Entrano in gioco i *biomateriali di terza generazione* che hanno come intento la rigenerazione e non il rimpiazzo del tessuto, producendo una serie di stimoli biochimici in grado di stimolare un certo tipo cellulare. Per fare ciò, materiali bioattivi sono stati resi biorisorbibili e materiali biorisorbibili sono stati resi bioattivi per consentire un'opportuna interazione con le integrine (proteine di adesione) portando quindi alla proliferazione e alla differenziazione delle cellule e alla produzione della matrice extracellulare.

Le caratteristiche delle tre generazioni di biomateriali sono riassunte in Figura 14.

La rigenerazione tissutale può avvenire in due modi:

- Tramite *l'ingegneria tissutale*, ovvero tramite l'impianto di cellule all'interno di scaffold 3D che crescono e si differenziano mimando il tessuto naturale. Dopo l'impianto, lo scaffold viene riassorbito con un'opportuna velocità lasciando spazio al nuovo tessuto;

- Tramite la *rigenerazione in situ*, cioè l'uso del biomateriale in forma di polvere, soluzione o nanoparticelle per stimolare la rigenerazione in loco. Certe formulazioni rilasciano delle molecole in forma di prodotti ionici di dissoluzione o fattori di crescita che stimolano le cellule. Quest'ultime producono fattori di crescita aggiuntivi che incentivano a loro volta la produzione di altri fattori di crescita. (15)

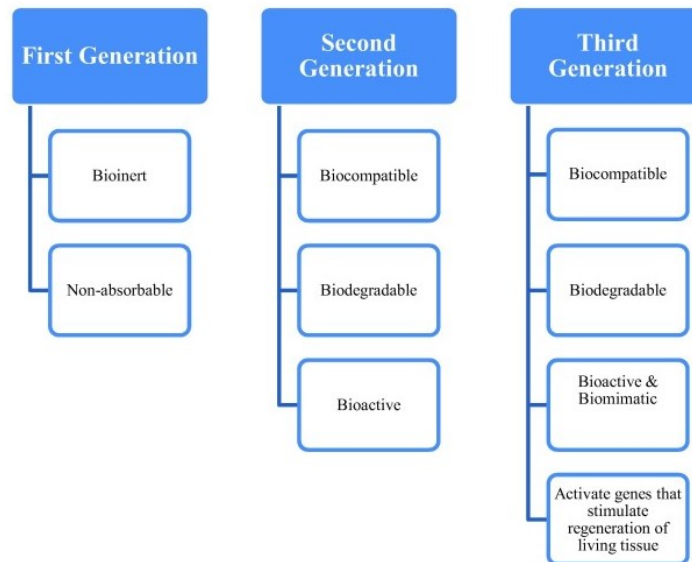


Figura 14: Generazioni di biomateriali

I tessuti che possono essere rigenerati con l'ingegneria tissutale sono molti e, per quanto riguarda l'osso, ci sono vari fattori da prendere in considerazione per il trattamento dei difetti ossei:

1. Cause dei difetti ossei:
 - Malattia;
 - Trauma;
 - Stress esagerato.
2. Sito anatomico del difetto:
 - Portante del carico;
 - Non portante del carico.
3. Età del paziente;
4. Fratture non unite;
5. Storia medica precedente del paziente;
6. Uso abituale di narcotici.

I materiali più utilizzati per la sostituzione ossea sono ceramici, compositi, metalli e polimeri.

Per quanto riguarda i *ceramici*, i primi ad essere utilizzati in campo dentale ed ortopedico sono l'allumina e la zirconia, materiali inerti con un alto modulo elastico (200÷400 GPa). Con lo sviluppo dei biomateriali di seconda generazione si è diffuso l'uso dell'idrossiapatite, trifosfato di calcio e vetri bioattivi. Colonizzando con cellule del tessuto osseo, gli osteblasti, degli scaffold 3D di questi materiali, si ottengono i biomateriali di terza generazione. (15)

I *polimeri*, invece, sono largamente utilizzati per i tessuti molli ma anche per i tessuti duri come l'osso perché hanno una biodegradazione controllabile, buone proprietà meccaniche, alta porosità, un'alta flessibilità di design. Essi possono essere *naturali* (proteine come la fibroina della seta, gelatina, acido ialuronico, ...; polisaccaridi come chitosano, GAG, ...; materiali basati sui polinucleotidi) o *sintetici* (PLA, PGA, PEG, ...). Entrambi i tipi di polimeri hanno dei vantaggi e degli svantaggi: i polimeri naturali mimano fedelmente l'ambiente biologico dato la loro somiglianza con la ECM ma sono difficilmente riproducibili e controllabili (nel grado di dissoluzione, porosità, ecc), sono costosi e, essendo di origine naturale, possono provocare reazioni immunitarie mentre i polimeri sintetici possono essere facilmente prodotti secondo specifiche caratteristiche e sono più economici ma sono meno biocompatibili, meno bioattivi e i prodotti di degradazione stimolano in modo modesto l'adesione delle cellule sulla superficie. Modifiche superficiali sono utili per migliorare le prestazioni di questi polimeri.

Infine, i *metalli*: sono utilizzati da molto tempo nel campo dell'ortopedia grazie alla loro stabilità meccanica. I più comuni sono l'acciaio inossidabile 316L, il titanio e le sue leghe, leghe di cobalto e cromo, magnesio e le sue leghe. Oltre che per la guarigione dell'osso, i metalli sono impiegati anche nella produzione di stent, di valvole cardiache, di sostituti articolari, di pacemaker e molto altro. L'acciaio inossidabile, il titanio e le leghe di cobalto-cromo sono metalli inerti e dunque costituiscono dei sistemi di fissaggio e di sostegno permanenti (a meno che non vengano rimossi). Le leghe di magnesio invece sono biodegradabili e rilasciano degli ioni (come zinco, calcio, silicio, rame, argento, ecc) che hanno un effetto positivo nella rigenerazione dell'osso. Questo vale anche per le leghe di ferro e di zinco che si dissolvono più lentamente del magnesio il quale ha una velocità troppo alta di dissoluzione. Al contrario, ferro e zinco hanno velocità troppo bassa e questo non è compatibile con il processo di guarigione dell'osso.

3.1.1. BIOMATERIALI DI PRIMA GENERAZIONE

I biomateriali di prima generazione sono inerti e hanno un ruolo prettamente strutturale e di supporto. Non hanno alcun effetto di stimolazione per la rigenerazione del tessuto ma generalmente non costituiscono un problema per il corpo. Nel campo dell'ortopedia possono

essere utilizzati degli impianti polimerici, metallici o ceramici, ciascuno con dei vantaggi e con degli svantaggi. A seconda quindi dell'utilizzo, viene scelto il materiale più idoneo, valutando le proprietà meccaniche, la lavorabilità, l'estetica e il costo. A seguire, alcuni esempi.

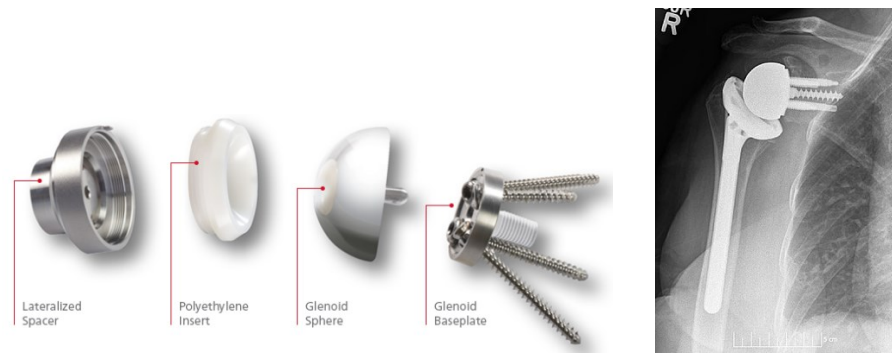
3.1.2. POLIMERI

UHMWPE

Il polietilene ad altissimo peso molecolare è ampiamente utilizzato in campo medico perché ha un'alta resistenza chimica, è biocompatibile e ha ottime proprietà meccaniche. (16) È un polimero che ha un grado di polimerizzazione di 36000 (ISO) o di 110000 (ASTM) ed è semicristallino presentando delle zone completamente cristalline, dove le catene sono ordinatamente collegate, ed altre completamente amorfe, dove si formano degli entanglement casuali. Questo materiale è utilizzato principalmente per protesi d'anca, di ginocchio e discali e viene accoppiato con un materiale metallico o ceramico. A causa dell'usura però queste protesi hanno una vita limitata e nel sito dell'impianto induce l'osteolisi che allenta poi l'impianto con il successivo fallimento dello stesso. Per questo motivo, vengono effettuate delle modifiche superficiali per migliorare le prestazioni di questo materiale. (17)

Nel caso di cranioplastica, l'UHMWPE si dimostra molto leggero ma allo stesso tempo resistente quindi sostituisce con successo precedenti impianti in metallo o in osso artificiale di materiale ceramico. (18)

Esempi più comuni sono quelli della protesi d'anca dove la coppa acetabolare è costituita da polietilene ad altissimo peso molecolare in cui ruota la testa sferica metallica della protesi e della protesi della spalla (Figura 15). Anche in questo caso si ha un componente con la testa sferica e una parte concava gleonoidale in polietilene in cui ruota la testa. Uno svantaggio di questo materiale è, però, la non polarità e l'inerzia che rende difficoltoso l'osteointegrazione del materiale con conseguente distacco della protesi. (19) Infine, l'UHMWPE viene utilizzato anche per la creazione di protesi discali: nonostante non riesca a simulare la struttura complessa del disco naturale, ha delle proprietà elastiche e viscosi simili al disco naturale.



*Figura 15: Esempio di protesi di spalla rovescia (la parte concava è inserita nell'omero).
Esploso e radiografia dell'impianto.*

PEEK

Il polietereeterchetone è un polimero termoplastico parzialmente cristallino, poliaromatico e lineare. Ha molti vantaggi in campo medico: ha una stabilità ad alte temperature sopra ai 300°C, ottime proprietà meccaniche, lavorabilità e si presta ad una produzione di massa. Inoltre ha una radiolucenza naturale, è compatibile con la risonanza magnetica ed è facilmente sterilizzabile. Rispetto ai metalli ha maggiore resistenza nonostante un modulo elastico minore e questo riduce il fenomeno di osteolisi e consente la dispersione uniforme della tensione (che non si accumula nel materiale perché non è eccessivamente rigido). (20) Il PEEK è utilizzato soprattutto per le procedure di cranioplastica e maxillofacciali dove una parte di cranio, di zigomo, di mandibola o di mascella devono essere sostituiti a causa di un tumore o un trauma. In Figura 16 sono rappresentati degli esempi di cranioplastiche in PEEK. Come è evidente, la procedura di riparazione di un danno osseo nel cranio è paziente-specifico quindi la procedura ha inizio analizzando le immagini TAC ed estraendo il modello 3D della zona da rimpiazzare. Con la stampa 3D viene realizzata la protesi che viene valutata in termini biomeccanici tramite un software agli elementi finiti. Il gold standard per risolvere dei difetti nel cranio è il trapianto autologo: le proprietà strutturali e di istocompatibilità per l'osteointegrazione sono ineguagliabili e c'è una bassa risposta immunitaria ma questo approccio causa un danno al sito donatore, presente nel paziente stesso. (21)

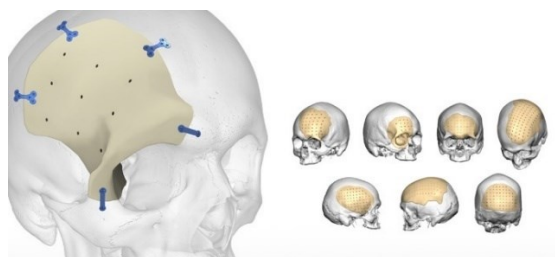


Figura 16: Esempi di cranioplastica in PEEK

3.1.3. METALLI

Acciaio inossidabile 316L

L'acciaio inossidabile è il primo metallo ad essere utilizzato in campo ortopedico. Nello specifico si tratta dell'acciaio inossidabile 316L che deriva dal comune acciaio inossidabile 18-8 (18% di cromo e 8% di nickel) e dove "L" sta per un livello basso di carbonio. Rispetto al titanio, ha un modulo elastico maggiore, è più economico e facilmente fabbricabile. Nonostante abbia una buona resistenza alla corrosione, l'acciaio 316L è soggetto a corrosione da stress e fratture quindi è adatto a situazioni in cui non è necessario un impianto soggetto ad un carico di lunga durata. I prodotti della corrosione possono causare reazioni allergiche (specialmente nel caso del Nickel) e anche carcinogeniche portando ad un rigetto immuno-mediato dell'impianto. (22)

Questo acciaio è piuttosto radiolucido ma l'aggiunta di altri metalli come coating (come l'oro, il platino o il tantalio) o la modifica della composizione chimica possono aumentare la radiopacità e le proprietà di resistenza alla corrosione da stress. (23)

Con questo metallo si producono, perciò, piastre (Figura 17), viti, chiodi e ferri chirurgici.

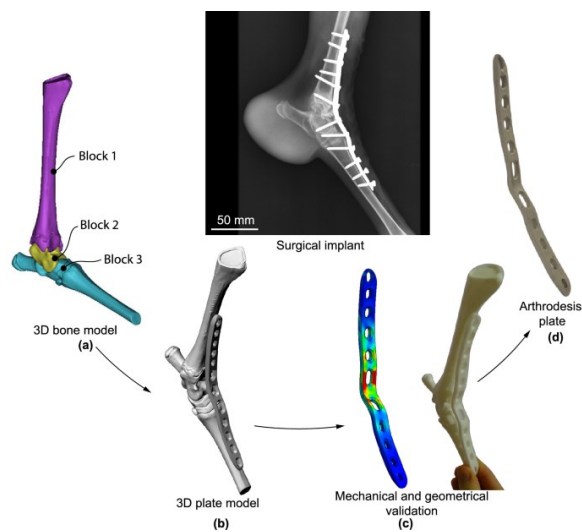


Figura 17: Piastra forata in acciaio inox 316L paziente specifico. Studio veterinario.

Titanio

Il titanio è un ottimo biomateriale perché, nonostante abbia un modulo elastico minore dell'acciaio, la resistenza specifica risulta maggiore dell'acciaio 316L e ha una buona biocompatibilità, nonché una resistenza alla corrosione maggiore grazie alla naturale propensione alla passivazione. La passivazione è l'ossidazione della superficie dell'impianto in titanio per uno spessore di 3-6 mm che impedisce l'avanzare della corrosione. Questa passivazione viene però

commercialmente indotta con degli acidi inorganici in modo da controllare lo strato di ossido e rendere la superficie uniforme. L'unica lega in titanio utilizzata in ambito medico è denominata Ti6Al4V (6% di alluminio e 4% di vanadio). Le leghe nickel/titanio hanno la proprietà di essere leghe a memoria di forma e sono utilizzate per esempio per clip per aneurismi intracranici, stent autoespandibili per angioplastica e per le valvole transcutanee. (24) Il titanio e le sue leghe sono maggiormente utilizzate per la sostituzione articolare per esempio dell'anca e del ginocchio (Figura 18) e in ambito dentale. Come tutti i metalli, il titanio presenta uno svantaggio: avendo un modulo di Young molto superiore a quello dell'osso, si presenta il fenomeno chiamato *stress shielding*, mostrato in Figura 18 con un esempio numerico tramite un'analisi della compressione di una protesi discale con il software Abaqus: normalmente è l'osso a farsi carico in modo uniforme e ben proporzionato del peso ma con l'inserimento di un impianto molto rigido, è quest'ultimo a concentrare le tensioni alleggerendo dunque il tessuto. Questo può avere un effetto positivo in fase di guarigione ma a lungo andare causa il riassorbimento osseo perché il tessuto, sottoposto ad un peso minore, si assottiglia portando ad una decrescita della sua massa e al fallimento dell'impianto stesso. (25)

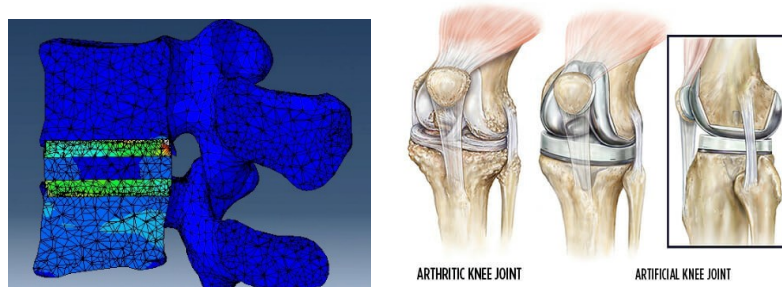


Figura 18: A sinistra, analisi numerica di carico a livello delle vertebre L3 e L4 con sostituzione del disco: fenomeno dello *stress shielding*. A destra, protesi totale di ginocchio in titanio e polietilene.

3.1.4. CERAMICI

Allumina

Negli anni settanta, l'allumina (Al_2O_3) è stato il primo materiale ceramico ad essere utilizzato per le protesi d'anca per risolvere il problema di usura del polietilene. Viene utilizzata inoltre per le protesi di ginocchio, nella ricostruzione ossea delle estremità articolari, mandibola, radici dentali, ecc.

Viene utilizzata per gli impianti allumina su allumina cioè, nel caso della protesi d'anca, viene realizzata in materiale ceramico sia la coppa acetabolare sia la testa dello stelo in modo da ridurre al minimo i detriti da usura grazie alla bassa frizione. Questo ceramico essendo altamente ossidato

ha un'alta biocompatibilità. Negli anni questo materiale è stato notevolmente migliorato, aumentando la densità, diminuendo la porosità e la dimensione dei grani diventando più resistente all'usura.

Essendo un materiale ceramico, l'allumina è comunque fragile e rigida e, in caso di osteoporosi, l'osso indebolito fatica a sostenere l'impianto (questo spiega il maggior successo dell'impianto in soggetti giovani). (26)

Per compensare le problematiche che si possono riscontrare negli impianti interamente in allumina, si creano dei materiali compositi come la zirconia rinforzata con allumina oppure il titanio rivestito con allumina per unire le proprietà meccaniche del titanio con quelle di biocompatibilità dell'allumina.

Zirconia

La zirconia, ZrO_2 , si trova in natura in forma minerale ma non si può utilizzare come materia prima perché contiene delle impurità di vari metalli. Essa è un materiale polimorfo che esiste in tre forme: monoclina (stabile sotto i $1170^\circ C$), tetragonale (stabile tra i $1170^\circ C$ e i $2370^\circ C$) e cubica (stabile sopra ai $2370^\circ C$).

Per stabilizzare la fase tetragonale o cubica vengono aggiunti degli ossidi come quello di magnesio, di calcio, di ittrio consentendo una generazione di materiali conosciuti come *zirconia parzialmente stabilizzata* (PSZ), costituiti a temperatura ambiente da zirconia cubica con precipitati minori di zirconia tetragonale. Questo è possibile soltanto se nella zirconia cubica sono presenti dei piccoli precipitati di zirconia tetragonale che non sono in grado di trasformarsi in monoclini. A percentuali maggiori di ossido aggiunto, si può ottenere la *zirconia totalmente stabilizzata* (FSZ) che rimane in forma cubica anche dopo essere stata raffreddata. A percentuali minori di ossido, invece, la zirconia si definisce *tetragonale policristallina* (TZP) in cui prevale la forma tetragonale. (27) Nel campo della biomedicina, la zirconia è prevalentemente usata per la fabbricazione di impianti dentali. Questo materiale presenta dei vantaggi rispetto al titanio, anch'esso impiegato nel campo dell'ortodonzia: la prima grande differenza si nota dal punto di vista estetico perché la zirconia è traslucida quasi come il dente naturale. Inoltre nonostante sia un materiale inerte, presenta una buona adesione cellulare e un alto grado di biocompatibilità e si osserva la formazione di nuovo tessuto osseo intorno all'impianto e una buona sopravvivenza e crescita degli osteoblasti. (28)

Un altro aspetto interessante nel campo dell'ortodonzia è l'adesione dei batteri: si osserva che la zirconia riduce la formazione della placca sulla superficie dell'impianto anche se non si nota una importante differenza tra la colonizzazione batterica sulla zirconia rispetto al titanio. (29)

3.2. BIOMATERIALI DI SECONDA GENERAZIONE

I biomateriali di seconda generazione sono bioattivi e/o biorisorbibili e hanno un ruolo strutturale e di supporto ma anche di stimolazione per la generazione di tessuto sano. Sono quindi ben accettati all'interno del corpo e interagiscono positivamente con esso dunque non si forma la capsula fibrotica. A seguire, alcuni esempi di biomateriali riassorbibili polimerici, metallici e ceramici.

3.2.1. POLIMERI

I polimeri di seconda generazione sono stati introdotti per sostituire i polimeri inerti. Sono infatti biodegradabili, biocompatibili e non tossici e possono essere sia sintetici come il PVA e il PMMA o naturali come il chitosano, l'alginate e la cellulosa. In quest'ultimo caso, per risolvere il problema di deboli proprietà meccaniche, si creano degli scaffold in forma di fibre, film, hydrogel, spugne e nanoparticelle (Figura 19: possibili scaffold in biopolimero a seconda dello scopo finale. Le nanoparticelle polimeriche, per esempio, sono utilizzate nella terapia genica per il trasporto dei geni nel sito di interesse o per il rilascio controllato di farmaci.

In campo ortopedico, il chitosano può essere utilizzato anche per la rigenerazione dell'osso perché esprime una buona osteointegrazione, buone proprietà meccaniche, è in grado di accumulare idrossiapatite e si può stampare in 3D. Per migliorarne le proprietà, è possibile creare uno scaffold di chitosano e fosfato di calcio, dove il chitosano ha il ruolo di creare un'impalcatura per gli osteoblasti richiamati dal fosfato di calcio. (30)

Un altro esempio di scaffold polimerico è quello di un hydrogel in PVA arricchito con acido ialuronico e idrossiapatite per mimare le proprietà della matrice extracellulare e avere proprietà osteoconduttrici per l'adesione degli osteoblasti. (31)

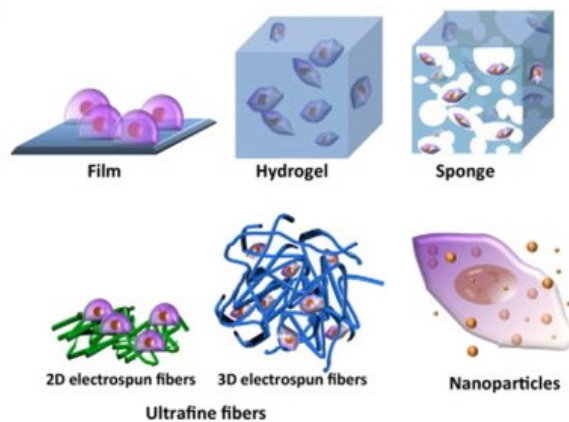


Figura 19: possibili scaffold in biopolimero

3.2.2. METALLI

Metalli biodegradabili

Idealmente un materiale per il supporto del tessuto osseo dovrebbe lasciar posto al nuovo tessuto al momento della guarigione. I metalli inerti hanno un'elevata rigidità e sono permanenti e in questo modo non consentono la rimodellazione ossea perché la tensione si concentra sul metallo. Un'alternativa è la creazione di scaffold porosi in magnesio, altamente biocompatibile e osteoconduttivo ma, da solo, è poco resistente: si utilizzano quindi delle leghe a base di ferro con aggiunta di altri componenti come il fosforo che ha dei benefici nella densità di sinterizzazione e la forza meccanica. (32) Un altro esempio è dato dalla lega di magnesio, litio e zinco, una lega molto leggera che ha la proprietà di supporto meccanico e di inibizione delle cellule tumorali. (33) Queste leghe rilasciano degli ioni che stimolano l'angiogenesi, come si vede in Figura 20 grazie alla lenta corrosione del metallo in particolare grazie agli ioni zinco che stimolano la migrazione cellulare delle cellule HUVEC (human umbilical vein endothelial cells) aumentando l'espressione genica dei geni proangiogenici. (34)

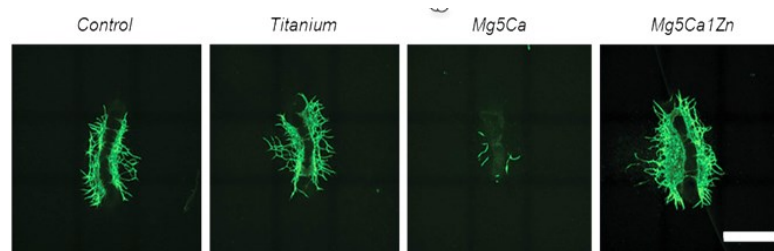


Figura 20: Differenze tra i vari materiali nella capacità di promuovere l'angiogenesi.
Il controllo è l'EGM, endothelial growth medium.

3.2.3. CERAMICI

Il principale materiale ceramico bioattivo è il fosfato di calcio che, a seconda del rapporto tra calcio e fosfato, dell'umidità e della temperatura cristallizza in due forme: idrossiapatite o β -trifosfato di calcio.

Idrossiapatite (HA)

L'idrossiapatite, o idrossifosfato di calcio, si forma in ambiente umido e a temperature inferiori di 900°C ed è un componente dell'osso naturale. È perciò altamente biocompatibile e già dopo quattro settimane si nota un legame con l'osso impedendo la formazione della capsula fibrotica attorno all'impianto. (24) Solitamente viene utilizzata per ricoprire impianti in titanio per aumentarne la biocompatibilità, la resistenza all'usura e accelerare il processo di formazione di

nuovo tessuto osseo. Il coating di idrossiapatite può essere creato in vari modi come con la tecnica del plasma spray che presenta però lo svantaggio di non ricoprire uniformemente superfici complesse. Altre tecniche come il Chemical Vapor Deposition (CVD), il Physical Vapor Deposition (PVD) e il wet-precipitation method risultano più adatte. Malgrado questo la risposta del corpo al rivestimento dipende anche dalla cristallinità perché una fase amorfa induce una maggiore stabilità di legame. (35) (36)

β -Trifosfato di calcio (β -TCP)

Il trifosfato di calcio si forma in ambiente secco e a temperatura superiore ai 900°C e non è solubile in condizioni fisiologiche ma è riassorbito dalle cellule, generalmente gli osteoclasti. (37) Ponendo l'attenzione sull'importanza del microambiente extracellulare, si nota come la struttura ad alveare del β -TCP con pori di 300 μm sia altamente osteoinduttiva e può controllare la differenziazione cellulare cambiando la struttura geometrica e promuovere la differenziazione di condrociti e osteoblasti. Rispetto ai vetri bioattivi e all'idrossiapatite, il TCP ha una maggiore resistenza e biorisorbibilità e non necessita di una funzionalizzazione per esempio con dei fattori di crescita per aumentarne le prestazioni. (38)

Il TCP è spesso presente nella HA e può esistere in tre forme differenti: β , α , α_s ma solo la forma β è stabile a temperatura ambiente mentre le forme α e α_s si formano a temperature superiori a 1290°C. Queste trasformazioni provocano una diminuzione del volume che, all'interno dell'HA, provocano tensioni interne e dunque cricche. La presenza quindi dello TCP all'interno della HA è dannosa perché ne modifica la struttura cristallina come la presenza di ioni estranei. Nel caso però di ioni chelanti, cioè che legano stabilmente gli ioni Ca^{2+} e PO_4^{3-} , essi stabilizzano il TCP rallentando la sua dissoluzione e la formazione dell'apatite. (24) In Figura 21 si osserva la microstruttura del TCP in forma granulare o fibrosa.

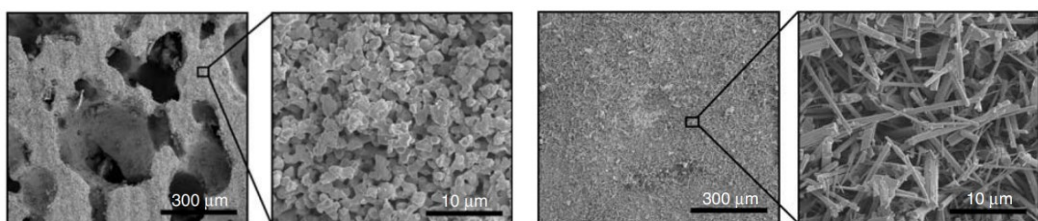


Figura 21: A sinistra, TCP da polveri. A destra, fibre di TCP.

I vetri biologici

I vetri biologici o, impropriamente, biovetri sono materiali ceramici che fanno parte della famiglia delle vetroceramiche. Il biovetro (Bioglass®) propriamente detto è stato scoperto da Lerry Hench nel 1969 ed è composto da ossido di silicio, di calcio, di sodio e di altri componenti in grado di biodegradarsi e legarsi al tessuto osseo. I vetri bioattivi verranno descritti in modo più approfondito nel Capitolo 4. Un'altra vetroceramica commerciale è il Ceravital®, una ceramica non porosa a base di calcio silicato che contiene gli stessi ossidi del Bioglass® ma anche l'ossido di potassio e di magnesio. Questo materiale ha una debole bioattività e in vivo si ha la formazione della capsula fibrotica attorno all'impianto (39) mentre il Bioglass® ha un tempo di dissoluzione maggiore e una forte interazione con l'ambiente biologico. Il Ceravital® può essere anche non bioattivo se contiene anche ossido di alluminio (allumina), di titanio (titania) e di tantalio che hanno lo scopo di regolare la velocità di dissoluzione degli ioni presenti nel materiale. Gli ioni Al^{3+} , La^{3+} e Ta^{3+} hanno la proprietà di rendere più fitta la trama molecolare del vetro, stringendo i canali attraverso cui avviene il flusso di ioni, rallentandolo o impedendolo. (24)

Altri materiali ceramici

Altri materiali ceramici usati sono l'ossido di titanio (TiO_2), il titanato di bario ($BaTiO_3$) e combinazioni di calcio alluminato ($CaO \cdot Al_2O_3$) e tricalcio fosfato [$Ca_3(PO_4)_2$]. La titania o ossido di titanio è stato proposto come componente di cementi ossei o come materiale esposto al flusso sanguigno mentre il titanato di bario è stato impiegato per migliorare il fissaggio delle protesi dell'osso grazie alla proprietà piezoelettrica, quindi di indurre la formazione di nuovo tessuto osseo grazie a segnali elettrici. (24)

3.3. BIOMATERIALI DI TERZA GENERAZIONE

3.3.1. INGEGNERIA TISSUTALE DELL'OSSO

Come anticipato nel §1.2.2 e nel §1.2.3, in caso di danno esteso al tessuto osseo a causa di una frattura o dell'esportazione di una massa tumorale, è necessario un supporto esterno per la formazione di nuovo tessuto osseo con caratteristiche fisiche e meccaniche ottimali. Come nel caso dell'impianto di qualsiasi materiale all'interno del corpo, la prima risposta che si innesca è quella infiammatoria e si ha il popolamento da parte di fluidi, cellule e proteine. Successivamente si ha la formazione di un trombo ricco di fattori di crescita e citochine che richiamano in loco le cellule del sistema immunitario. Queste cellule hanno lo scopo di pulire la ferita ed eliminare i

detriti del tessuto danneggiato dall'inserimento del biomateriale. (40) Le cellule del sistema immunitario, in particolare i macrofagi, mirano a fagocitare l'elemento non autologo e, se una sola cellula è insufficiente (*fagocitosi frustrata*), essi si uniscono a formare cellule multinucleate dando origine a quella che viene chiamata *risposta da corpo estraneo* (24). Questo processo termina con l'isolamento dell'impianto all'interno di una capsula fibrotica, come rappresentato in Figura 22. In questo modo, però, non si ha l'integrazione a livello chimico e biologico del biomateriale e sono impediti i processi di riassorbimento e di azione bioattiva.

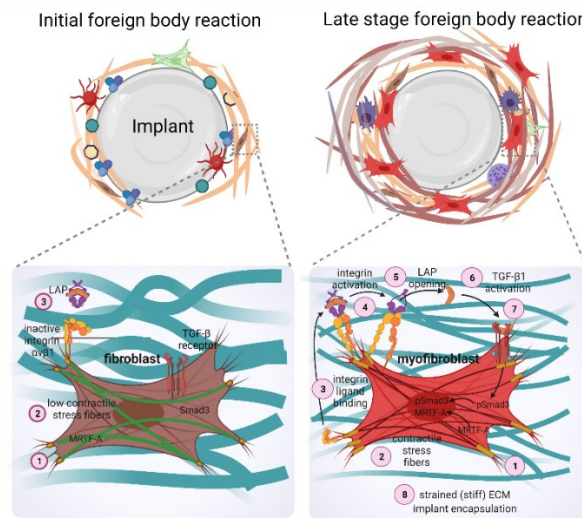


Figura 22: Disegno rappresentativo la formazione della capsula fibrotica attorno ad un generico impianto.

Per questi motivi, il biomateriale impiantato deve avere delle caratteristiche di biocompatibilità, morfologiche e chimiche specifiche per rendere possibile l'interazione tra l'ambiente biologico e l'impianto, fondamentale nel caso di materiali bioattivi e bioriassorbibili come gli scaffolds per la rigenerazione del tessuto osseo. In particolare, un ruolo fondamentale ce l'hanno la rugosità superficiale, la porosità, la connessione tra i pori, la velocità di degradazione, le proprietà meccaniche e, naturalmente, la biocompatibilità che devono essere scelte in modo da garantire non soltanto l'*osteointegrazione* dell'impianto ma anche l'*osteoinduzione* e l'*osteoconduzione*. Per esempio, nel caso di un impianto in lega di magnesio, si nota una maggiore proliferazione delle cellule e un'adesione più forte nel caso di superficie ruvida. (41)

L'ingegneria tissutale è un ambito innovativo che si impegna ad andare oltre alla semplice riparazione inerte di un danno ad un tessuto, studiando dei materiali che consentono una rigenerazione del tessuto autologo fornendo degli stimoli bioattivi dati dal materiale stesso e da una funzionalizzazione superficiale dell'impianto. Per questo motivo, scaffold porosi per la

ricostruzione ossea possono essere utilizzati da soli o arricchiti ex vivo con dei fattori di crescita e cellule osteoprogenitrici autologhe che aiutano il corpo a rigenerare il tessuto danneggiato. (42)

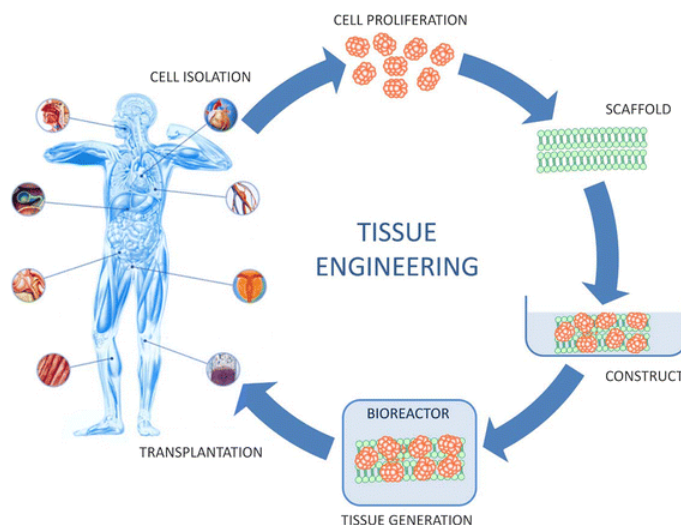


Figura 23: Schema tipico dell'ingegneria tissutale. Dopo aver isolato e proliferato le cellule di interesse e prodotto lo scaffold, questi due elementi vengono uniti per creare uno scaffold bioattivo, maturato all'interno di un bioreattore.

3.3.2. CASI DI STUDIO

Nell'ambito dei biomateriali di terza generazione non è netta la distinzione tra materiale polimerico, metallico o ceramico perché vari materiali possono essere combinati insieme e funzionalizzati con molecole e elementi biologici.

La modifica superficiale di materiali metallici e polimerici è da molto tempo oggetto di ricerca data la loro scarsa abilità di integrarsi mentre la biofunzionalizzazione di materiali ceramici è una novità. Un esempio è quello di scaffold a base di wollastonite, CaSiO_3 , e diopside, $\text{CaMgSi}_2\text{O}_6$, che presenta intrinsecamente un'alta bioattività e biodegradabilità date dai silicati di calcio e alte prestazioni meccaniche grazie ai silicati di calcio-magnesio. Dato che uno scaffold ideale dovrebbe mimare la matrice extracellulare nativa, la funzionalizzazione biochimica covalente migliora l'adesione e la crescita cellulare. In particolare, all'Università degli Studi di Padova, è stata individuata una sequenza di 9 amminoacidi dalla vitronectina chiamata HVP, capace di promuovere gli osteoblasti tramite l'interazione tra i proteoglicani transmembrana e le sequenze che legano l'eparina presenti nella ECM. (43)

Un'altra applicazione dell'HVP è nel rivestimento di un vetro silanizzato, ovvero trattato con APTES in modo da esporre dei gruppi NH_2 importante per l'adesione del peptide. Una difficoltà

che si incontra funzionalizzando le superfici con dei peptidi è quella della degradazione enzimatica presenti nel siero. Per ovviare a questo problema, sono stati sintetizzati degli analoghi dell'HVP: il peptide retroinverso DHVP, la sequenza doppia 2HVP e la loro combinazione D-2HVP. La sequenza doppia aumenta le zone di possibile ancoraggio mentre il peptide retroinverso non viene degradato dagli enzimi perché la sequenza non viene riconosciuta. (44)

Un altro esempio è il miglioramento della superficie della lega Ti6Al4V con uno strato di idrossiapatite arricchita con magnesio (rimpiazza gli ioni calcio), silicio (forma gruppi Si-OH che supportano la migrazione e il deposito di ioni calcio e fosfato) o titanio (biocompatibile e supporta la crescita cellulare) a sua volta ricoperta da uno strato di SAP. Il termine SAP significa Self Assembling Peptide e sono delle particolari sequenze di nucleotidi sintetiche che si autoassemblano in ambiente acquoso formando uno scaffold che mima la matrice extracellulare fornendo così un supporto per la crescita di cellule specifiche come gli osteoblasti. (45)

Oltre al composito wollastonite diopside, anche la zirconia può essere funzionalizzata ricoprendo l'impianto con materiali a base di fosfato di calcio come l'idrossiapatite (HA) e il tricalcio fosfato (TCP). Questi due composti però sono poco stabili e formano un legame debole. Si combina perciò le proprietà meccaniche della zirconia tetragonale con le proprietà di biocompatibilità e bioattività dei fosfati di calcio rivestendo degli impianti in titanio con questo composito. (46)

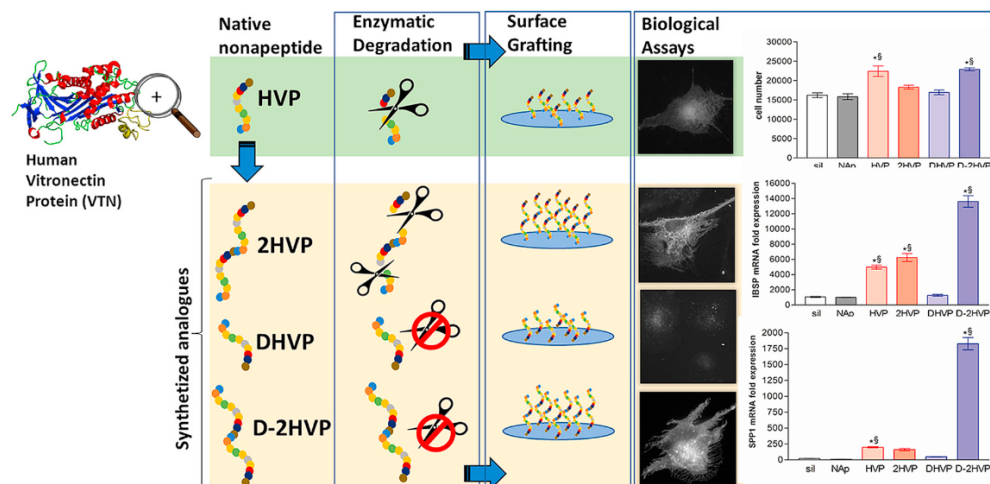


Figura 24: Funzionalizzazione con HVP e analoghi sintetici di un vetro silanizzato. Il primo istogramma rappresenta il numero di cellule mentre il secondo e il terzo l'espressione del folding del mRNA

4. IL BIOVETRO

4.1. STORIA DEL BIOVETRO

Il Bioglass® è stato formulato da Larry L. Hench (Figura 25) alla fine degli anni sessanta. Il suo primo approccio con nuovi materiali ceramici fu nel 1959 nel campo dell'ingegneria aerospaziale e poi nella progettazione del primo motore per un razzo atomico. Dagli anni sessanta cominciò a studiare i meccanismi molecolari che determinano la nucleazione della fase cristallina delle vetroceramiche e, con due collaboratori, Steve Freiman e Don Kinser, delineò le basi per quello che sarebbe poi stato il comportamento molecolare del sistema complesso $\text{SiO}_2\text{-CaO-Na}_2\text{O-P}_2\text{O}_5$ che sta alla base del Bioglass®. Nel 1967 incontrò un colonnello dell'esercito di ritorno dal Vietnam il quale pose a Hench questa domanda: *“Se sei in grado di produrre un materiale che resiste all'esposizione alla radiazione ad alta energia, sei in grado di produrre un materiale che resiste all'esposizione al corpo umano?”*. Il colonnello durante la guerra assistette a numerose amputazioni a causa del rigetto dei supporti metallici e plastici disponibili. Questa provocazione portò Hench a formulare un materiale che non causa la formazione di tessuto cicatriziale ma crea un legame con il tessuto del paziente.



Figura 25: Larry L. Hench, professore di materiali ceramici all' Imperial College di Londra nel 2001

4.1.1. L'IPOTESI DEL BIOVETRO (1967-1969)

L'ipotesi di quello che sarà il Bioglass® propriamente detto nacque dunque nel 1967 grazie al finanziamento dell'esercito americano ed era basata su un semplice principio: *“Il corpo umano rigetta i materiali metallici e polimerici sintetici formando un tessuto cicatriziale perché i tessuti viventi non sono composti di quei materiali. L'osso è formato di idrossiapatite e perciò se un materiale è capace di formare uno strato di idrossiapatite in vivo, non verrà rigettato dal corpo”*.

4.1.2.LA SCOPERTA DEL BIOVETRO (1967-1971)

Per definire la prima composizione, Hench utilizzò il diagramma di $\text{Na}_2\text{O}-\text{CaO}-\text{SiO}_2$ mostrato in Figura 26 in cui definì una combinazione di 45% di silice, 24.5% di ossido di sodio, 24.5% ossido di calcio e 6% di ossido di fosforo per fornire una quantità abbondante di ossido di calcio con un po' di ossido di fosforo in una matrice di $\text{Na}_2\text{O}-\text{SiO}_2$.

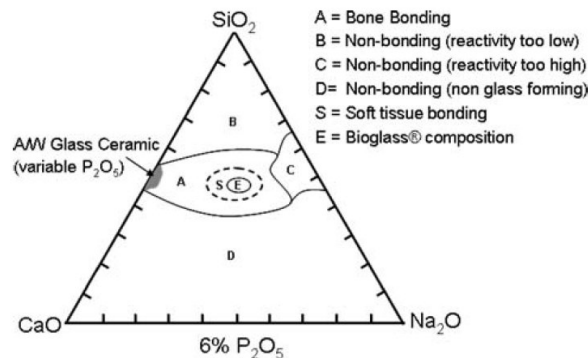


Figura 26: Diagramma $\text{Na}_2\text{O}-\text{CaO}-\text{SiO}_2$ che mostra il legame con l'osso a seconda della percentuale degli ossidi.

Questa composizione è vicina ad una eutettica ternaria ed è facile da fondere. Fu perciò fusa per creare dei provini rettangolari per eseguire i test in vivo. Ne risultò la seguente affermazione: "Questi impianti ceramici non escono dall'osso. Sono legati in loco. Posso spingerli, fare pressione su di essi, posso colpirli e non si muovono. I campioni di controllo scivolano via facilmente". Nel 1971 fu pubblicato il primo articolo nel Journal of Biomedical Materials Research in cui vennero delineati i risultati in vivo e in vitro del Bioglass 45S5®: in vitro questa composizione sviluppa uno strato di idrossiapatite in una soluzione che non contiene ioni calcio e fosfato. Questa veloce formazione di idrossiapatite era compatibile con quella osservata in vivo, in cui i cristalli di calcio fosfato erano legati a strati di fibrille di collagene prodotti nell'interfaccia con gli osteoblasti.

4.1.3. IL LEGAME CON IL TESSUTO OSSEO (1969-1978)

Con la scoperta che il biovetro è in grado di legarsi all'osso, nuove domande sono state formulate a cui è stata trovata una risposta nella decade '69-'79:

- Qual è la natura di questo legame?
- Qual è il meccanismo di reazione che consente questo legame?
- Qual è la velocità di formazione del legame?
- Qual è la forza di legame?

- La composizione dell'impianto influenza la velocità di formazione del legame, le sue proprietà e la sua stabilità?
- Il legame può essere ottenuto nell'interfaccia con protesi che sostengono un carico?
- Qual è la risposta degli altri tessuti al materiale bioattivo?

La domanda più difficile a cui rispondere a quel tempo fu quella riguardante la forza di questo legame: grazie ad otto differenti test biomeccanici in vivo si è osservato che il legame tra il Bioglass® e l'osso corticale è ugualmente forte a quello dell'osso nativo se non anche più resistente.

Il legame con l'osso è un susseguirsi di rapide reazioni chimiche e nel 1981 fu pubblicato un articolo che delineava la cinetica delle reazioni di superficie. (47)

Il Bioglass® è un vetro silicato caratterizzato dalla presenza di silice sottoforma di rete la cui unità base è l'ortosilicato (SiO_4) che forma quattro legami silicio-ossigeno. Il sodio e il calcio agiscono come modificatori del reticolo che creano legami di ossigeno non pontante rappresentato del disegno in Figura 27.

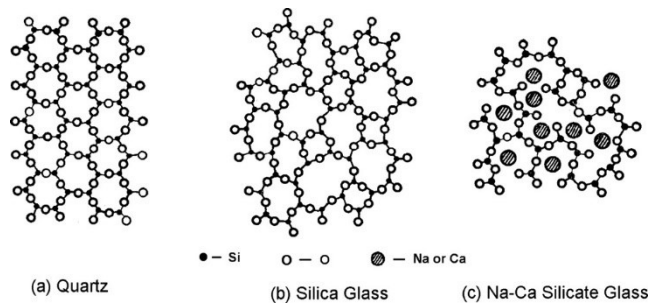


Figura 27: Differenze nel reticolo tra il quarzo (reticolo ordinato), il vetro di silicio (reticolo non ordinato) e un vetro di silicio modificato con sodio e calcio.

Considerando un materiale generico che entra a contatto con il corpo umano è importante il concetto di bioattività e di biocompatibilità la quale può essere raggiunta stimolando fisiologicamente la crescita tissutale sulla superficie del materiale bioattivo. Il legame tra il materiale e il tessuto dipende dal materiale usato che determina l'entità, il tipo e il tempo di legame. In particolare si definisce l'indice di bioattività come:

$$I_B = \frac{100}{t_{0.5bb}}$$

con $t_{0.5bb}$ definito come il tempo necessario a metà superficie per creare il legame con il tessuto. Considerando il tessuto osseo, ci sono quattro caratteristiche che un materiale di innesto dovrebbe esibire:

1. *Osteointegrazione*: abilità di stabilire un legame chimico con il tessuto senza formare tessuto cicatriziale;
2. *Osteoconduzione*: abilità di supportare la crescita di nuovo tessuto osseo consentendo l'angiogenesi e la creazione di un nuovo sistema Haversiano;
3. *Osteoinduzione*: abilità di stimolazione e attivazione delle cellule staminali pluripotenti portando alla loro differenziazione in osteoblasti;
4. *Osteogenesi*: abilità di indurre la formazione di nuovo osso da parte di osteoblasti presenti nell'innesto (se colonizzato pre impianto) o che hanno colonizzato il materiale dopo l'impianto.

L. L. Hench classificò i materiali in due classi di bioattività sulla base del livello di interazione con il tessuto intorno. La *Classe A* include quei materiali che sono osteoconduttivi e osteoproduttivi grazie al rapido meccanismo di reazione che porta alla dissoluzione di una concentrazione consistente di silice e ioni calcio. La *Classe B* mostra solamente proprietà osteoconduttive determinate solamente da fattori extracellulari. Un esempio è l'idrossiapatite. Il Bioglass 45S5® è un esempio di materiale di classe A perché ha effetti intracellulari sulla proliferazione ossea grazie al rilascio di silice e ioni di altre specie (come calcio e sodio) ma anche extracellulare grazie all'elevata superficie e porosità a livello nanoscopico del gel idrato di silice e dell'apatite idrossicarbonata che si formano rapidamente.

4.2. MECCANISMO DI BIOATTIVITÀ

Il meccanismo di dissoluzione proposto da Hench (e ancora accettato) è basato su undici fasi sintetizzate in Figura 28 e divise in due macro-fasi:

1. La formazione dell'idrossicarbonatoapatite (HCA) che include le prime cinque fasi;
2. La dissoluzione dei prodotti ionici dalla superficie del biovetro e l'osteogenesi. (48)

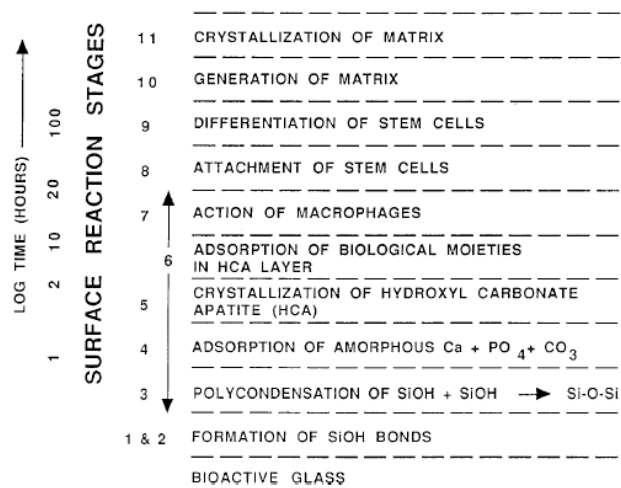


Figura 28: Fasi che descrivono l'interazione tra il biovetro e il tessuto osseo.

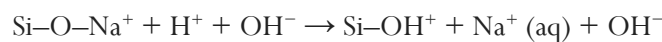
Lo strato di HCA che si forma sulla superficie del biovetro nelle prime fasi di dissoluzione deve essere compatibile con la mitosi degli osteoblasti: ci sono poche cellule osteoprogenitrici nell'osso maturo che possono dare origine a nuove cellule quindi devono ricevere gli stimoli precisi e corretti dall'ambiente circostante per entrare nel ciclo di divisione cellulare.

Un altro aspetto importante è la natura degli ioni modificatori: la presenza degli ioni di argento hanno effetti sia batteriostatici che battericidi sull'e. coli e batteri gram positivi e gram negativi senza danneggiare le cellule umane. (47)

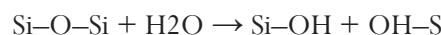
4.2.1. FORMAZIONE DELLO STRATO DI HCA

Questa prima fase si osserva grazie alla successione di cinque passaggi di seguito elencati:

1. Scambio ionico tra Ca^{2+} e Na^+ presenti nel materiale e H^+ e H_3O^+ provenienti dall'ambiente circostante. Si formano così legami silanici (Si-OH) sulla superficie del materiale e si ha un innalzamento del pH dovuto al rilascio di ioni alcalini. Anche gli ioni fosfato PO_4^{3-} sono rilasciati e si ha la formazione di uno strato ricco di silicio sulla superficie del vetro. Questa reazione, riportata di seguito, avviene in pochi minuti dall'esposizione ai fluidi corporei e si ha una dealcalinizzazione della superficie che risulta avere una carica negativa.



2. L'alto valore di pH determina la rottura del legame silicio-ossigeno (e quindi del reticolo) per opera dei gruppi OH^- . Silice solubile viene rilasciata sottoforma di $\text{Si}(\text{OH})_4$ e i gruppi silani sono esposti sulla superficie. L'equazione che descrive questo è la seguente:



È stato dimostrato che la silice solubile rilasciata ha un grande impatto nella proliferazione delle cellule responsabili della formazione di nuovo tessuto osseo.

3. Successivamente avviene la condensazione dei gruppi silani e la ripolimerizzazione di una silice amorfa povera di ioni sodio e calcio. Si forma uno strato spesso 1-2 μm caratterizzato da una microporosità con pori di diametro che variano dai 30 ai 50 Å e con una superficie effettiva di $100 \text{ m}^2/\text{g}$.
4. Si ha poi la migrazione sulla superficie di ioni calcio e gruppi fosfato attraverso lo strato ricco di silice sia dal materiale che dalla soluzione circostante. Si forma così un secondo strato composto da calcio fosfato amorfo (ACP).
5. Gruppi idrossili e carbonati vengono incorporati dalla soluzione mentre la dissoluzione continua. Si ha poi la cristallizzazione dello strato amorfo in idrossicarbonatoapatite. Essa è simile all'osso naturale in termini di composizione e strutturali portando al diretto ancoraggio dell'impianto nel tessuto. Lo spessore dell'HCA aumenta all'aumentare del tempo fino a 100 μm . Come già menzionato, la velocità di formazione dell'HCA dipende dalla composizione e la connettività del reticolo dipende dai cationi modificatori che, a seconda della natura (Ca, Na, Al, Ti, Ta) possono rallentare o accelerare la velocità di dissoluzione.

4.2.2. DISSOLUZIONE DEI PRODOTTI IONICI E OSTEOGENESI

Gli stadi successivi alla formazione dell'HCA non sono del tutto compresi. Ciò che è noto è la promozione dell'adsorbimento proteico che porta all'ancoraggio, alla proliferazione e al successivo differenziamento cellulare. In sintesi le altre fasi sono:

6. Adsorbimento di specie organiche come le proteine e i fattori di crescita che sono responsabili delle caratteristiche dello strato di HCA;
7. Inizio della rigenerazione tissutale sancito dai macrofagi che hanno il ruolo di pulire il sito di impianto;
8. Colonizzazione da parte delle cellule staminali;
9. Proliferazione e differenziamento delle cellule staminali in osteoblasti maturi;
10. Produzione di fattori di crescita da parte degli osteoblasti che consentono la mitosi e l'attacco delle cellule come anche la sintesi delle proteine della matrice extracellulare;
11. Mineralizzazione della matrice.

4.3.VARIANTI DEL BIOGLASS 45S5®

Oltre al Bioglass 45S5®, sono state formulate altre composizioni di cui sono riportate le composizioni percentuali nella Tabella 1. Per esempio il biovetro 13-93 ha un contenuto maggiore di silice rispetto al Bioglass® con una conseguente degradazione e conversione in idrossiapatite più lenta sia in vitro che in vivo. Comunque, è più facilmente lavorabile e ha una tensione a compressione maggiore rispetto al 45S5, nonché una temperatura di transizione vetrosa marcatamente più bassa di quella di cristallizzazione che facilita la densificazione senza la creazione di fasi cristalline. (49) La presenza dell'ossido di potassio, come nel biovetro 6P53B, diminuisce la tendenza del vetro a cristallizzare. (50) Il biovetro ternario 58S, invece, presenta proprietà meccaniche migliore del 45S5 che, anche se ha un'ottima biocompatibilità, ha proprietà meccaniche insufficienti. (51) Il biovetro 70S30C è un vetro binario e non presenta né l'ossido di sodio né l'ossido di potassio ma, nonostante questo, è stato dimostrato essere un biovetro di Classe A con una bioattività comparabile con i biovetri 45S5® e 58S. Il 70S30C ha una velocità di dissoluzione iniziale maggiore, probabilmente dovuto al maggior contenuto di calcio che porta ad una rottura più rapida del reticolo. Successivamente, la velocità decresce ed è comparabile con quella del 58S e 45S5®. (52)

Composizione (wt.%)	45S5®	13-93	6P53B	58S	70S30C
Na ₂ O	24.5	6.0	10.3	0	0
K ₂ O	0	12.0	2.8	0	0
MgO	0	5.0	10.2	0	0
CaO	24.5	20.0	18.0	32.6	28.6
SiO ₂	45	53	52.7	58.2	71.4
P ₂ O ₅	6.0	4.0	6.0	9.2	0
B ₂ O ₃	0	0	0	0	0

Tabella 1: Composizioni percentuali di diversi biovetri.

4.4. APPLICAZIONI E PRODUZIONE DEL BIOGLASS®

4.4.1. APPLICAZIONI

Il primo dispositivo in biovetro fu il MEP® (Middle Ear Prothesis), usato per la riparazione dell'ipoacusia conduttiva rimpiazzando le ossa dell'orecchio medio. Era un materiale solido che aveva lo scopo di condurre il suono dalla membrana timpanica alla coclea grazie alla capacità del materiale di legarsi sia al tessuto osseo che ai tessuti molli come il timpano. Un altro impianto fu l'ERMI® (Endosseous Ridge Maintenance Implant) utilizzato per supportare i piatti linguali e labiali delle radici naturali dei denti e consentire un ponte rigido per la ricostruzione endossea.

Con la scoperta dei materiali di terza generazione, il concetto di bioattività e di bioriassorbibilità si sono uniti e, nel caso dei biovetri, nuove formulazioni, compositi, materiali ibridi e schiume macroporose sono state formulate per attivare geni che stimolano la rigenerazione dei tessuti. Questo è, al giorno d'oggi, reso possibile in due modi già introdotti nel §3.3.1: tramite la *Tissue Engineering*, quindi tramite la produzione di scaffold bioattivi e riassorbibili in cui vengono coltivate le cellule ex vivo e poi vengono impiantati nel sito di interesse o tramite la *In situ Tissue Engineering*, cioè l'impiego di polveri, soluzioni o microparticelle che stimolano in loco la rigenerazione del tessuto grazie al rilascio di ioni o fattori di crescita ad una velocità controllata che stimolano le cellule. Esempi commerciali sono il NovaBone®, il NovaMin® (Figura 29) e il NovaThera®.

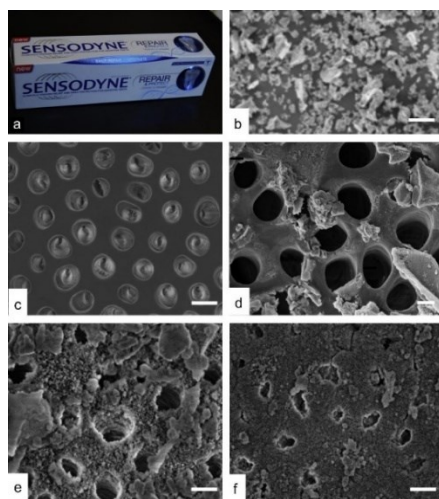


Figura 29: a) Sensodyne Repair con particelle di NovaMin®, particolato di Bioglass 45S5®, b) particelle di NovaMin® (barra=20µm), c) dentina non trattata (barra=1µm), d) dentina dopo 5 giorni.

4.4.2. PROCESSO SOL-GEL

Inizialmente i vetri e le ceramiche bioattive erano ottenuti da fusione della fase vetrosa ad alte temperature seguita poi dalla colata in uno stampo o dalla tempra. Hench et al. hanno dimostrato che un vetro bioattivo sottoforma di gel si può produrre con il processo di sol-gel. (47)

Il processo sol-gel consiste nella connessione di blocchi molecolari come il SiO_4 attraverso degli step e i materiali ottenuti con questo processo sono metastabili, provenienti da una reazione cinematicamente controllata da precursori molecolari.

Il *sol* è una sospensione colloidale stabile di nanoparticelle (amorfe o cristalline con substruttura densa, porosa o polimerica) in un liquido mentre il *gel* è una rete porosa continua che circonda e supporta la fase liquida. Nella maggior parte dei casi, la gelazione, la formazione del gel, è dovuta a legami covalenti tra le particelle presenti nel *sol* e la struttura del reticolo dipende dalla natura delle particelle. Quest'ultime si aggregano grazie anche alle forze di van der Waals e alla minimizzazione della superficie o dell'energia totale che rendono la reazione reversibile. Per stabilizzare il sol sono necessarie delle forze repulsive tra le particelle che devono essere vinte successivamente per consentire la gelazione e questo è possibile grazie, per esempio, all'ingombro sterico di uno strato organico o alla repulsione elettrostatica. Dal *sol* possono avvenire due cose: può esserci una rapida gelazione tramite evaporazione del solvente che consente la formazione di quello che si chiama *xerogel film* oppure di fibre. Dall'essiccazione, invece, del gel a reticolo tramite l'evaporazione del solvente si ottiene lo *Xerogel* in cui non vengono mantenuti i pori del gel. Se invece l'asciugatura consente il mantenimento del reticolo, si ottiene l'*Aerogel*. I precedenti passaggi sono riassunti in Figura 30. Sia lo *Xerogel film* che lo *Xerogel*, dopo il trattamento termico, diventano delle ceramiche dense.

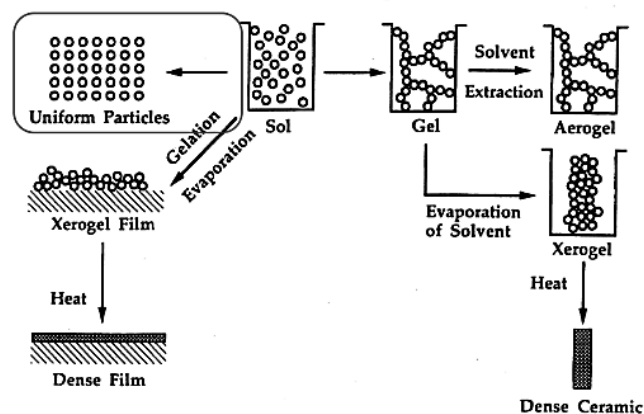


Figura 30: Schema illustrativo del processo sol-gel

Processo chimico

Il principio chimico base del processo sol-gel dei materiali a base di silice è la trasformazione di specie contenenti gruppi Si-OR e Si-OH in composti silossanici.

Da un punto di vista strutturale, questo si ottiene connettendo i tetraedri SiO₄ o RSiO₃ in materiali ibridi tramite i vertici. Per ottenere un gel stabile si deve massimizzare il numero dei legami silossanici Si-O-Si e il numero di Si-OH e Si-OR dev'essere minimizzato. I precursori più comuni sono soluzioni acquose di silicati e alcossidi siliconici come il TMOS (tetrametossisilano) e il TEOS (tetraetossisilano). Il TMOS rilascia metanolo che è tossico perciò non si utilizza in campo biomedico. Il punto di carica nulla (PZC) di specie che contengono i gruppi Si-OH è tra 1.5 e 4.5 di pH. Acidificando la soluzione sotto il PZC significa che le specie contenenti silicio sono cariche positivamente. Al contrario, alzando il pH sopra il PZC le specie sono cariche negativamente. Le reazioni chimiche che riassumono il processo sol-gel sono mostrate in Figura 31: in presenza di gruppi Si-OR, l'idrolisi precede il processo di condensazione per produrre i gruppi Si-OH necessari per la condensazione. Quest'ultima avviene grazie all'eliminazione di alcol o acqua.

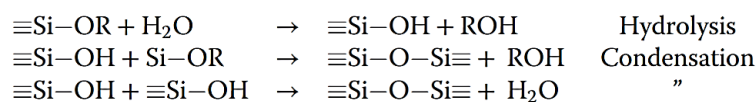


Figura 31: Reazioni base del processo sol-gel

Una caratteristica degli alcossidi siliconici è che l'idrolisi e la condensazione competono tra loro e ne consegue che, come mostrato in Figura 32, da un ipotetico trisilossano lineare, possono esserci diverse possibilità di reazione che interessano le specie monomeriche, oligomeriche o strutture a base di silicio. La situazione è più complessa se si considera che ogni possibilità avviene con una velocità di reazione diversa influenzata dai parametri di reazione e dunque ogni intermedio ha il suo set di parametri cinetici. Come mostrato in Figura 32c, si possono creare anche strutture chiuse e anche strutture 3D come delle nanosfere di silice o, insufflando gas ed inserendo tensioattivi, si possono creare delle schiume (Figura 33). (53)

Le nanosfere sono impiegate nella drug delivery, nella cromatografia ad alte prestazioni, nei biosensori, nella cosmetica, come nanocompositi polimerici, come coating ma anche come materiale da costruzione come cemento. (54) Le schiume, invece, sono scaffold random impiegati nella tissue engineering.

I parametri che influenzano la velocità di idrolisi e condensazione sono vari tra cui:

- Il tipo di precursore;

- Il pH o altri catalizzatori: se il pH è minore di 5 è favorita l'idrolisi, altrimenti è favorita la condensazione;
- La temperatura;
- Il tipo di solvente. (53)

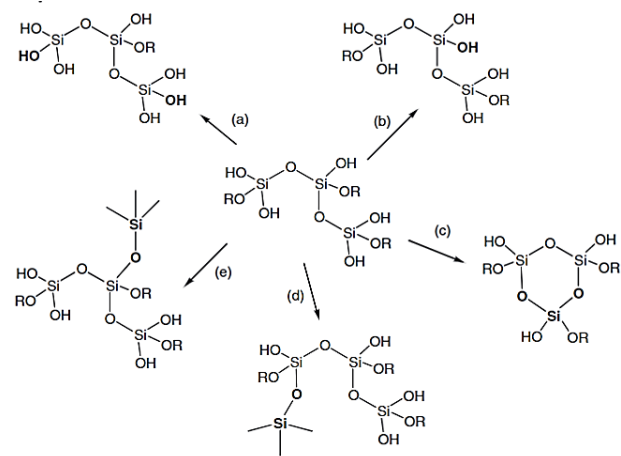


Figura 32: Possibilità di reazione di un ipotetico trisilossano lineare

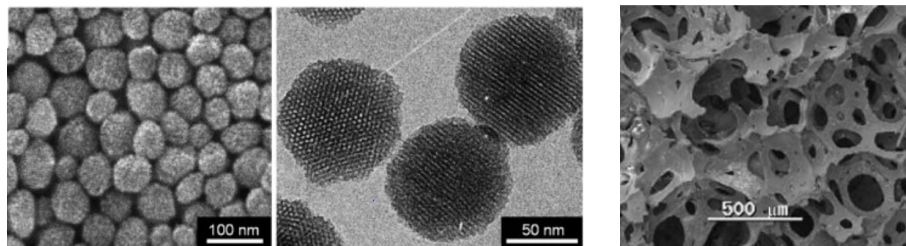


Figura 33: A sinistra, nanoparticelle di silice; A destra, schiuma di vetro bioattivo.
Ottenuti entrambi con processo sol-gel.

5. I MATERIALI CELLULARI

5.1. INTRODUZIONE

I solidi cellulari sono delle reti di travicelle o membrane connesse tra loro e hanno proprietà che dipendono da tre fattori principali:

- Le *proprietà* del *solido* che costituisce la matrice cellulare;
- La *topologia* e la *forma* delle *celle*;
- La *densità relativa* definita come $\rho_{rel} = \frac{\rho}{\rho_s}$ dove ρ = densità della schiuma e ρ_s = densità del solido. Per definire un materiale come cellulare la porosità deve essere almeno del 70% con una ρ_{rel} di al più 0.3.

Questi materiali sono costituiti da un'unità monomerica più o meno simmetrica e ripetitiva nell'ordine del millimetro o del micrometro e hanno delle proprietà proprie in aggiunta a quelle del solido di cui sono composti.

A seconda della struttura della cella, questi solidi possono essere *bending-dominated* o *stretch-dominated*. Il criterio di stabilità di Maxwell stabilisce che, in presenza di una struttura incernierata ai nodi, si ha $M = b - 2j + 3 = 0$ in 2D e $M = b - 2j + 6 = 0$ in 3D (dove b è il numero delle travicelle e j il numero delle cerniere) per avere una struttura staticamente e dinamicamente determinata. Se M è negativo come in Figura 34a si è in presenza di una struttura bending-dominated mentre se M è maggiore o uguale a 0 come in Figura 34b si è in presenza di una struttura stretch-dominated.

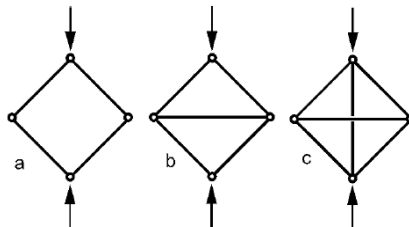


Figura 34: a) struttura bending-dominated, b) e c) struttura stretch-dominated secondo Maxwell.

5.1.1. BENDING-DOMINATED

In Figura 36 a sinistra è mostrato un esempio di struttura a celle aperte di tipo bending-dominated: si nota una bassa connettività, cioè poche travicelle si incontrano nello stesso nodo. In Figura 35 è rappresentata una modellizzazione di una cella secondo il modello di Gibson Ashby in cui si suppone che lo spessore delle travicelle sia molto inferiore alla dimensione della cella.

Si ottiene la seguente relazione:

$$\rho_{rel} = C_1 \left(\frac{t}{L}\right)^2$$

Che indica la proporzionalità tra la densità relativa e il rapporto tra lo spessore delle travicelle e la larghezza della cella.

In Figura 36 è rappresentata anche la curva sforzo-deformazione: si ha un comportamento elastico lineare fino alla rottura dopo la quale il corpo continua a rompersi ad una tensione costante. Alla fine la tensione risale nuovamente quando tutto il vuoto è stato eliminato e il materiale è impaccato.

La relazione tra il modulo di Young della schiuma, il modulo di Young del solido da cui è composta e la densità relativa è la seguente:

$$\frac{E}{E_S} \approx (\rho_{rel})^2$$

La tensione a compressione, invece, è legata con la tensione a flessione della fase solida e la densità relativa con la seguente relazione:

$$\frac{\sigma_{cr}}{\sigma_{fs}} \approx 0.2(\rho_{rel})^2$$

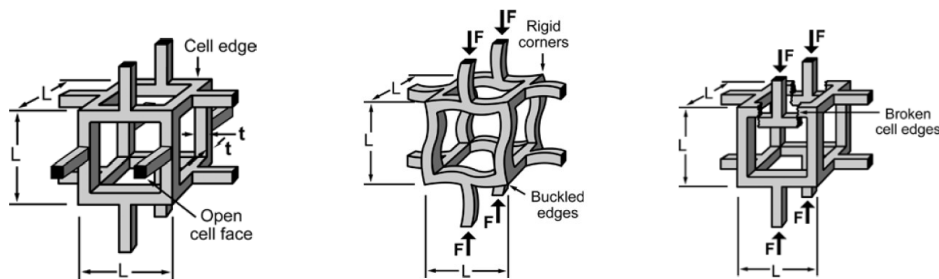


Figura 35: modello di Gibson Ashby di cella aperta bending dominated. In centro cella deformata nel caso di un materiale polimerico, a destra cella deformata nel caso di materiale fragile.

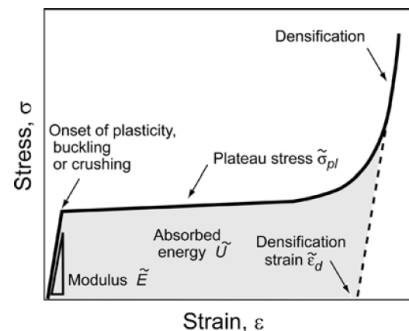
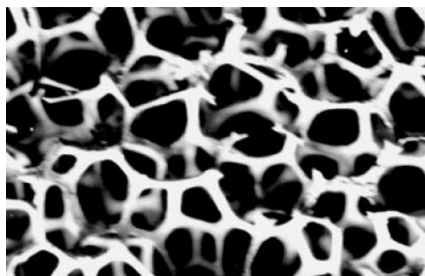


Figura 36: a sinistra, un esempio di schiuma a celle aperte. A destra, tensione in funzione della deformazione agenti su una cella.

5.1.2. STRETCH-DOMINATED

In Figura 37 è rappresentata una struttura a microtraliccio: M è maggiore o uguale a zero quindi la struttura è sovralegata e la risposta meccanica è stretch-dominated. Questo significa che gli elementi trasversali vanno in trazione e compressione ma mai in flessione.

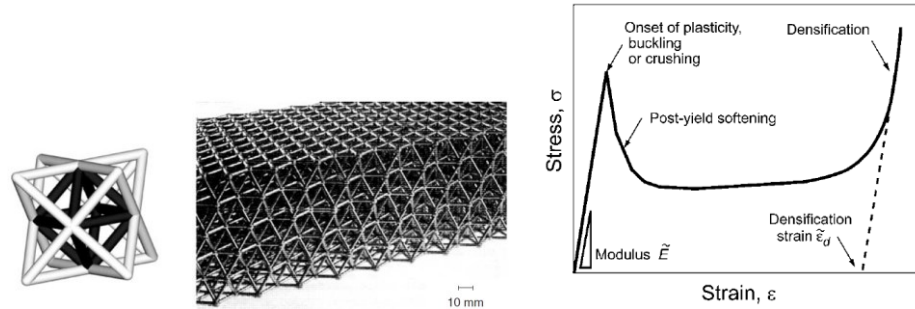


Figura 37: a sinistra, un esempio di struttura a microtraliccio.
A destra, tensione in funzione della deformazione agenti su una cella.

La relazione tra il modulo di Young della schiuma, il modulo di Young del solido da cui è composta e la densità relativa è la seguente:

$$\frac{E}{E_S} \approx (\rho_{rel})$$

Si osserva che, a differenza del caso bending-dominated, il rapporto tra il modulo elastico del materiale cellulare e quello del solido dipende da $(1-P)$, quindi dalla densità relativa, e non dal suo quadrato e questo significa che a parità di porosità, il modulo elastico risulta molto più elevato, senza mettere membrane.

Analogamente, la tensione a compressione è legata con la tensione a flessione della fase solida e la densità relativa con la seguente relazione:

$$\frac{\sigma_{cr}}{\sigma_{fs}} \approx (\rho_{rel})$$

Nella Figura 37 si osserva che il modulo e la tensione iniziale di collasso (la tensione alla quale inizia a rompersi la struttura) sono molto maggiori rispetto a quelli di una struttura bending-dominated quindi queste strutture rappresentano una buona soluzione per un materiale leggero ma molto resistente.

5.1.3. CONFRONTO DELLE PROPRIETÀ TRA UNA STRUTTURA BENDING-DOMINATED E UNA STRETCH-DOMINATED

In Figura 38 sono riportati due grafici: il grafico a sinistra indica il modulo relativo confrontato con la densità relativa in scala logaritmica per differenti topologie. Le strutture bending-dominated seguono la retta con pendenza 2 mentre le stretch-dominated seguono la retta con pendenza 1. Analogamente, il grafico a destra mostra la densità relativa in funzione della densità relativa. Le strutture bending-dominated seguono la retta con pendenza 1.5 mentre le stretch-dominated seguono la retta con pendenza 1. (55)

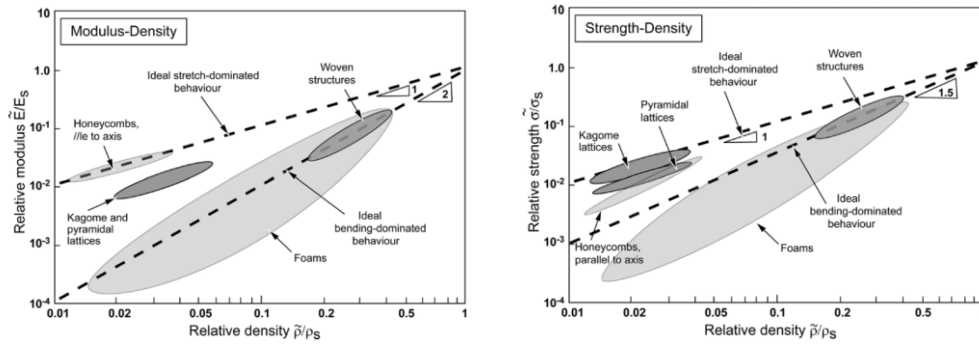


Figura 38: a sinistra, modulo relativo in funzione della densità relativa. A destra, tensione relativa in funzione della densità relativa.

Indici di schiuma

Indice di schiuma è un parametro che consente di valutare il miglioramento delle proprietà meccaniche del materiale cellulare rispetto al solido di cui è fatto. Si osserva come le proprietà siano migliori in relazione alla densità.

Per le strutture bending-dominated si ha:

$$I = \frac{E^{1/3}}{\rho} = \frac{E_S^{1/3}}{\rho_S} \cdot \frac{1}{(1-P)^{1/3}} = I_s \cdot \frac{1}{(1-P)^{1/3}}$$

Per le strutture stretch-dominated si ha:

$$I = \frac{E^{1/3}}{\rho} = \frac{E_S^{1/3}}{\rho_S} \cdot \frac{1}{(1-P)^{2/3}} = I_s \cdot \frac{1}{(1-P)^{2/3}}$$

Con:

I, I_s = indice della schiuma e del solido;

E, E_s = modulo di Young della schiuma e del solido;

ρ, ρ_s = densità della schiuma e del solido;

P = porosità;

$$\frac{1}{(1-P)^{1/3}}, \frac{1}{(1-P)^{2/3}} = \text{Fattori di miglioramento.}$$

Si osserva come, nel caso delle strutture bending-dominated, ci sia un miglioramento di $\frac{1}{(1-P)^{1/3}}$ rispetto al solido, un valore molto maggiore di 1. Con una porosità del 90%, si ha un incremento di efficienza maggiore di 2. Nel caso di strutture stretch-dominated si ha un miglioramento di $\frac{1}{(1-P)^{2/3}}$ che è maggiore di $\frac{1}{(1-P)^{1/3}}$. Con una porosità del 90%, infatti, si ha un incremento di efficienza maggiore di 4,5. (56)

5.2. TASSONOMIA

In letteratura la classificazione dei materiali cellulari è varia. Una classificazione è quella vista nel §5.1, cioè tra solidi cellulari bending-dominated e stretch-dominated. Un'altra classificazione è basata sulla geometria e sull'organizzazione delle celle. Un'ulteriore distinzione può essere fatta in base alla configurazione geometrica 2D o 3D. In Figura 39 è descritta una classificazione esaustiva che considera la geometria del materiale cellulare osservando anche la distribuzione delle celle nell'intera struttura, la topologia cellulare e geometria e la dimensione dell'elemento cellulare. (57)

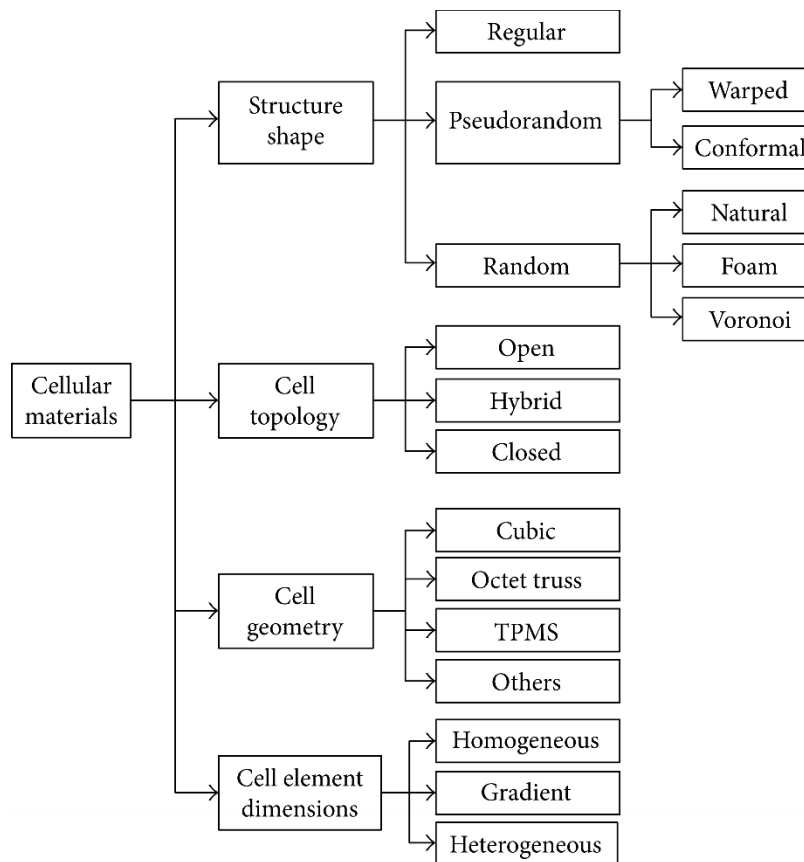


Figura 39: classificazione dei materiali cellulari.

5.3. PARAMETRI DESCRITTIVI I MATERIALI CELLULARI

Nei materiali cellulari ci sono tre diverse densità che si possono valutare: la densità geometrica, la densità apparente e la densità vera.

La densità geometrica è la densità calcolata considerando l'intero volume del solido senza escludere le porosità. Essa è definita come:

$$\rho_{geom} = \frac{m}{V}$$

La densità apparente tiene conto anche delle porosità aperte ed è definita come:

$$\rho_{app} = \frac{m}{V - V_{PA}}$$

Infine, la densità vera è definita tenendo conto delle porosità aperte e delle porosità chiuse presenti all'interno delle travicelle stesse del materiale cellulare ed è definita come:

$$\rho_{true} = \frac{m}{V - V_{PA} - V_{PC}}$$

Da queste relazioni si possono anche ottenere le frazioni di porosità aperta, f_{PA} , e chiusa, f_{PC} , parametri che hanno un valore compreso tra 0 e 1.

In particolare, si ha:

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

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

Si può così calcolare la porosità aperta, chiusa e totale in questo modo:

$$\% PA = f_{PA} \cdot 100$$

$$\% PC = f_{PC} \cdot 100$$

$$\% P_{tot} = \% PA + \% PC$$

La densità relativa e perciò definita come:

$$\rho_{rel} = 1 - P_{tot}$$

Nella meccanica dei solidi la tensione a compressione è calcolata come il rapporto della forza agente su un'area e l'area stessa. È ovvio però che nei solidi cellulari l'area su cui effettivamente agisce la forza è notevolmente inferiore rispetto all'area geometrica per cui si utilizza una relazione che mette in relazione la tensione a compressione con la tensione a flessione e la densità relativa:

$$\sigma_C = 0.2 \cdot \sigma_{bend} \cdot (\rho_{rel})^{1.5}$$

Da cui si ricava che la resistenza a flessione del solido, nei solidi bending-dominated, è:

$$\sigma_{bend} = 5 \cdot \sigma_C \cdot (\rho_{rel})^{-1.5}$$

Queste relazioni sono state ricavate da Gibson e Ashby (GA) per descrivere il modello bending-dominated, un modello che, approssimativamente, si focalizza sulla fase solida che costituisce la struttura cellulare. Un altro modello è quello chiamato Minimum Solid Area (MSA) che si concentra, invece, sulla fase gassosa, quindi sulla porosità e la sua distribuzione. (56) Per i modelli studiati in questa tesi verrà preso in considerazione il modello GA.

5.4. FABBRICAZIONE DEI MATERIALI CELLULARI

Le strutture cellulari in materiale ceramico in campo biologico vengono prodotte principalmente attraverso la fabbricazione additiva: il solido viene creato strato dopo strato seguendo un modello digitale. Questa tecnologia comprende diverse tecniche a seconda se il punto di partenza è una polvere, una pasta o un liquido. In questo modo si possono creare delle strutture di qualsiasi forma: in campo biomedico si possono così fabbricare degli scaffold porosi con una porosità ideale e paziente specifico. Dalle immagini di risonanza magnetica o TAC, attraverso opportuni software (come Mimics®), si ricava il modello tridimensionale della zona di interesse in formato .st. Un esempio applicativo è mostrato in Figura 40.

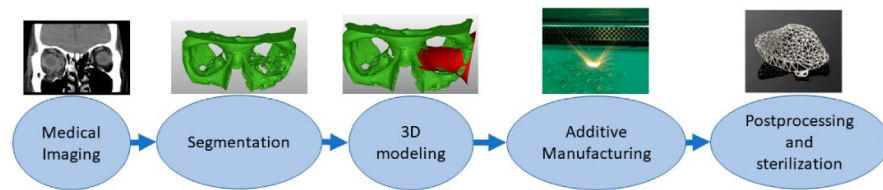


Figura 40: Processo esempio per la stampa di uno scaffold paziente specifico.

Nella Figura 41 sono riportate le cinque tipologie di stampa additiva acellulare: binder jetting, material extrusion and jetting, vat polymerization, direct energy deposition e powder bed fusion, ognuna delle quale a sua volta è caratterizzata da varie tecniche. Di seguito è riportata una breve spiegazione di ogni tecnica e in Figura 43 sono schematizzati i cinque processi.

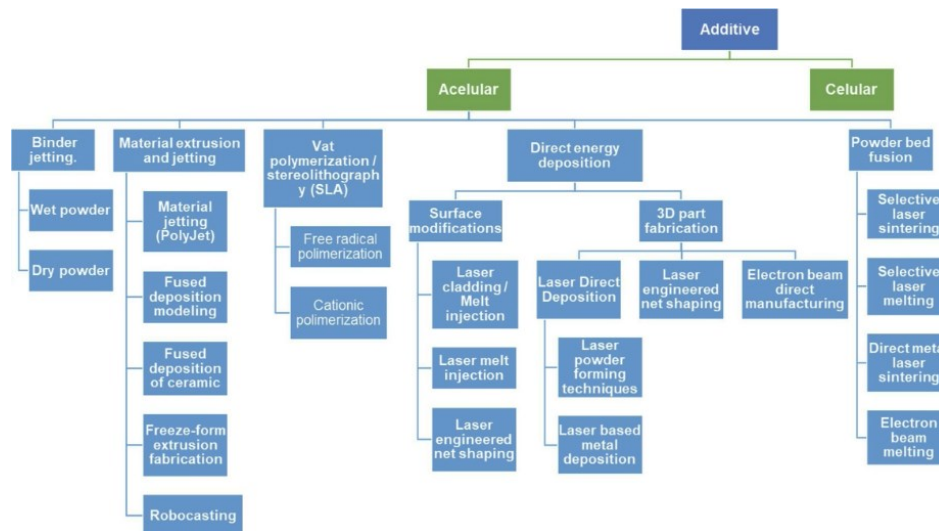


Figura 41: Tipologie di stampa additiva acellulare

5.4.1. BINDER JETTING

Il binder jetting utilizza due materiali, uno a base di polvere e uno è un binder solitamente in forma liquida che agisce come un adesivo tra le particelle di polvere ceramica. Una testa deposita strati alternati di polvere e binding muovendosi orizzontalmente e, dopo ogni strato, la piattaforma si sposta verso il basso e il processo è ripetuto sopra allo strato precedente. Questa tecnologia di stampa ha dei vantaggi come la versatilità (va bene con polveri metalliche, polimeriche e ceramiche e numerosi binder) ma lo svantaggio è l'alta porosità e dunque le scarse proprietà meccaniche a causa del movimento tra le particelle e la loro agglomerazione random. Inoltre non esiste una forza esterna che comprime le polveri. Questo tipo di stampa, dunque, non è consigliata per produrre parti strutturali.

5.4.2. MATERIAL EXTRUSION AND JETTING

Nel processo di estrusione il materiale viene riscaldato ed estruso tramite un ugello e si deposita, strato dopo strato, su una piattaforma. Questa tecnologia (FDM, fused deposition modeling) è la più utilizzata ed economica ma è più lenta rispetto ad altre tipologie di stampa additiva: il diametro dell'ugello limita l'accuratezza ed è necessario controllare la velocità di estrusione e fornire un flusso costante di estrusione. Un tipo diverso di estrusione è il material jetting dove il materiale viene depositato sotto forma di gocce immediatamente sottoposte a radiazione ultravioletta per indurire lo strato. La tecnica del Robocasting, invece, consente di estrarre un filamento di una

pasta, chiamata inchiostro, che esce con una forma precisa e non è necessario attendere la solidificazione dello strato. (58)

5.4.3. VAT POLYMERIZATION/STEREOLITHOGRAPHY

L'approccio della stereolitografia è basato su un processo di polimerizzazione localizzata grazie ad una luce ultravioletta e avviene in una vaschetta contenente un liquido più o meno viscoso formato da una resina fotosensibile ed altre componenti. È una tecnologia che permette la stampa di solidi complessi ed è quella utilizzata per la creazione degli scaffold studiati in questa tesi.

L'idea della stereolitografia è nata negli anni '70 da Swainson e Herbert che unirono la possibilità di creare un oggetto 3D attraverso la radiazione e la formazione del solido strato dopo strato utilizzando un polimero fotosensibile. In questi anni questa tecnica si è evoluta in quattro generazioni: la prima, rappresentata in Figura 43E, consisteva nella scansione attraverso un fascio laser sopra il materiale liquido. La seconda generazione è nata per superare la bassa efficienza della prima ed è nota come stereolitografia a proiezione: è in grado di eseguire il curing su ogni strato simultaneamente tramite una maschera. La terza generazione è nata nel 2015 ed è denominata CLIP (continuous liquid interface production): ha una velocità di stampa molto maggiore rispetto alla precedente generazione. L'ultima generazione è in grado di creare oggetti 3D con la formazione di volumi come unità di riferimento e, dunque, non è un processo a strati. (59)

In particolare, il tipo di stereolitografia utilizzata per la creazione degli scaffold presentati in questa tesi è chiamata MSLA (masked stereolithography) in cui strati molto sottili di resina fotosensibile inserita nel fondo del vat (vaschetta), costituito da un foglio di FEP (fluorinated ethylene propylene), vengono induriti grazie ad una luce UV che passa attraverso uno schermo LCD sottostante al vat stesso. La luce, proveniente da un array di LED, passa solo attraverso i pixel bianchi del display, indurendo il materiale fotosensibile e definendo un'area di proiezione per ogni strato stampato. (60)

In Figura 42 è rappresentato un disegno che indica il processo di stampa tramite masked stereolithography.

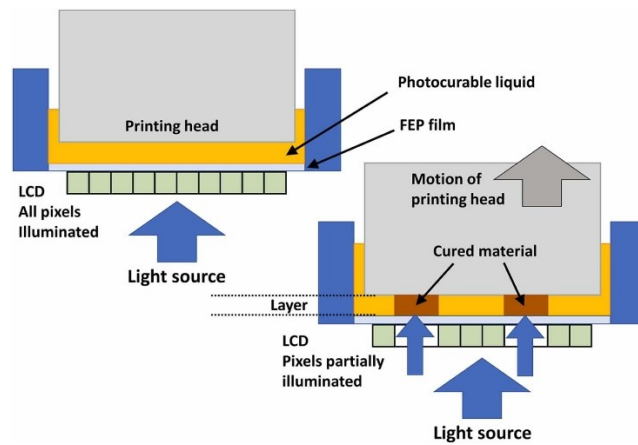


Figura 42: Disegno schematico della masked stereolithography

5.4.4. DIRECT ENERGY DEPOSITION

La direct energy deposition (DED) è un processo più complesso: la macchina consiste in un ugello montato in un ugello multiassiale che deposita materiale fuso (tramite un laser, un fascio di elettroni o un arco plasma) su una superficie dove solidifica. Il pezzo viene abbassato di una distanza equivalente allo spessore imposto dello strato. Questa tecnica è usata specialmente per i metalli ma può essere utilizzata anche per polimeri e ceramici, con i quali si ottiene quasi una densità del 100% e si evitano distorsioni.

5.4.5. POWER BED FUSION

Il power bed fusion include il selective laser sintering (SLS), il direct metal laser sintering (DMLS), il selective laser melting (SLM) e l'electron beam melting (EBM). Tutte e quattro usano il calore per fondere la polvere e la differenza sta nella sorgente di calore: SLS, DMLS e SLM usano un laser mentre EBM utilizzano un fascio di elettroni. Il processo inizia con il deposito di uno strato di materiale sopra ad una piattaforma e la sorgente di energia fonde il primo strato o la prima sezione trasversale del modello. La piattaforma viene poi abbassata e un nuovo strato di polvere viene disposto sulla superficie usando un rullo. Come nella DED, la velocità di stampa è alta e non è necessario un debinder perché il legante non è presente. Infine, la sinterizzazione avviene in poco tempo anche se l'alta temperatura può portare a shock termici causando delle cricche. Questo problema viene risolto pre-riscaldando la polvere. (58)

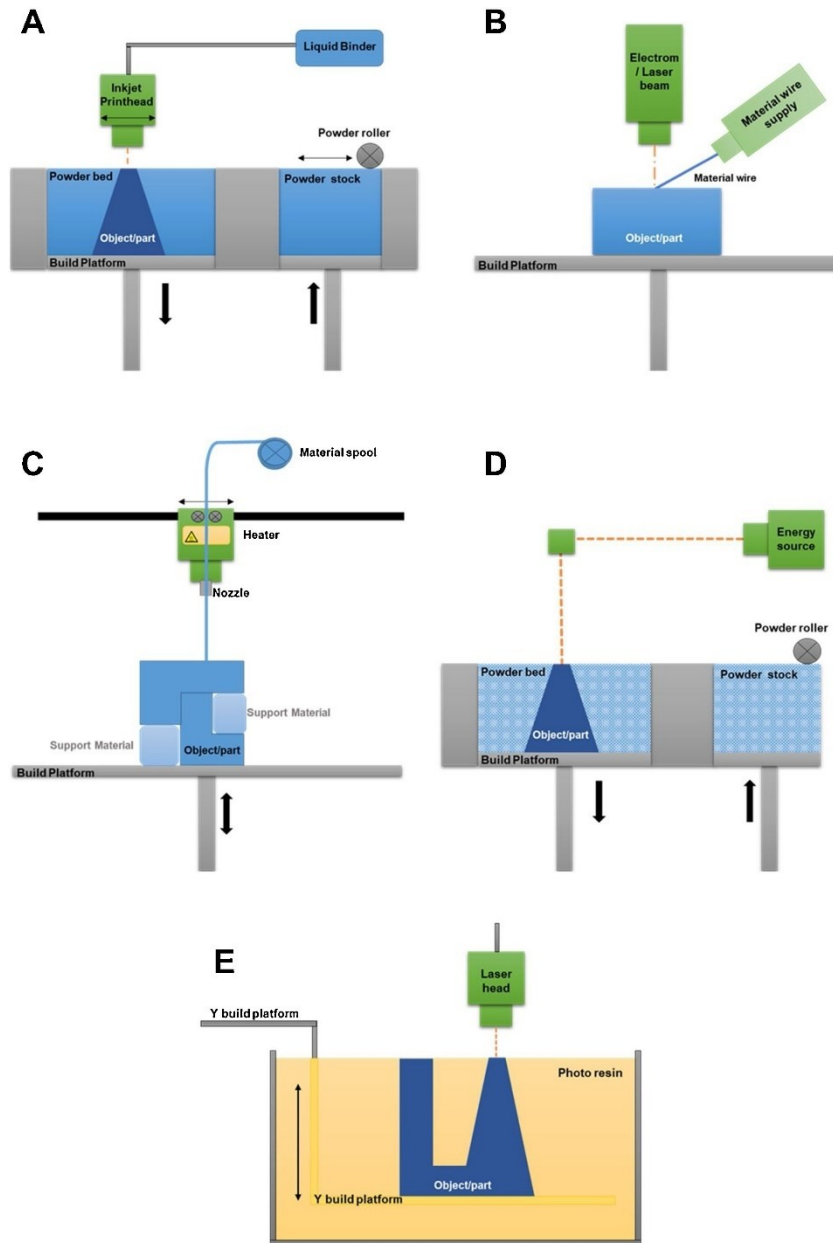


Figura 43: A) Binder Jetting Printing, B) Direct Energy deposition, C) Material Extrusion and Jetting ,D) Powder Bed Fusion, E) Vat Polymerization

6. MATERIALI E METODI

6.1. MATERIALI

I polimeri preceramici sono stati suggeriti 40 anni fa come precursori per la fabbricazione di materiali ceramici avanzati a base di silicio aprendo le porte ad una vasta gamma di applicazioni in diversi campi come quello dell'ingegneria aerospaziale, dell'energia, elettronica e delle biotecnologie. Il precursore polimerico è un sistema inorganico/organometallico che risulta in un ceramico con composizione chimica personalizzata e una organizzazione nanostrutturale quasi definita grazie a trattamenti termici in atmosfera controllata. I ceramici tradizionali derivano da polveri che necessitano di additivi per la sinterizzazione e le applicazioni tecniche sono limitate. Nel caso di ceramici che derivano da polimero, essi non implicano l'uso di polveri ma di miscele più o meno viscosi contenenti precursori degli ossidi che caratterizzano i materiali ceramici e sono applicabili le normali tecniche di produzione dei polimeri come injection molding, estrusione ma anche la stampa additiva. (61)

In questa tesi sono presentati degli scaffold in biovetro 70S30C ottenuti da polimero preceramico attraverso una stampa di tipo MSLA.

La creazione del precursore siliconico del biovetro 70S30C avviene attraverso la produzione di due fasi, una oleosa e una acquosa.

La *fase oleosa* consiste nello sciogliere l'H44, una resina siliconica sotto forma di polvere (poly-methyl-phenyl-silsesquioxane, Wacker-Chemie GmbH, Munich, Germany), in 17 g di resina FunToDo, una resina acrilica fotosensibile di colore giallo trasparente (acrylate monomers and glycol diacrylate monomers mixed with phosphine oxide-based photo initiator, SB, Fun To Do, Alkmaar, The Netherlands) mescolando manualmente. Questa miscela viene lasciata riposare un giorno in modo da consentire lo scioglimento omogeneo della polvere.

Viene poi creata la *fase acquosa*: vengono mescolati 3 g di resina FunToDo con lo Span 80 (Sorbitan Monooleate, Tokyo Chemical Industry co., Tokyo, Japan), un surfactante che consente di disperdere omogeneamente la fase acquosa in quella oleosa e vengono mescolati per pochi minuti sopra un agitatore magnetico. Viene poi aggiunta la silice idrofoba (Aerosil R106 Fumed Silica Cyclotetrasiloxane, Octamethyl-, $C_8H_{24}O_4Si_4$, Evonik Industries AG, Hanau, Germany) e, dopo aver mescolato manualmente, la miscela viene sottoposta ad ultrasuono a punta (Sonopuls, Bandelin, Berlin, Germany) ad una potenza del 50% a 5 cicli per 2 minuti mantenendo azionato il miscelatore

magnetico. Viene infine aggiunto il calcio nitrato tetraidrato ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, Scharlau, Istanbul, Turkey) che viene sciolto tramite l'ultrasuono a punta al 90% di potenza a 0 cicli per 15 minuti.

Infine vengono mescolate manualmente la fase oleosa con quella acquosa.

I precursori della silice sono, perciò, l'H44 e la silice idrofoba che, dopo trattamento in N_2 a 700°C , consentono di ottenere una percentuale di ossido di silice del 70%. Il precursore dell'ossido di calcio è il calcio nitrato tetraidrato da cui deriva una percentuale di ossido di calcio del 30%.

Lo scopo di questa tesi è quello di confrontare le proprietà meccaniche e biologiche di scaffold la cui percentuale di silice deriva dalla presenza della silice idrofoba e dell'H44 con quelli la cui silice deriva solamente dalla presenza dell'H44. Questo perché lo scopo della stampa di biovetro 70S30C è l'ottenimento di scaffold da polimero preceramico senza dover utilizzare dei precursori per sol-gel. Questi precursori, in questo caso la silice idrofoba (FS), danno la sicurezza di una buona riuscita di stampa ma si vuole ottenere gli stessi risultati utilizzando solamente la resina siliconica.

Per fare questo è stata formulata una miscela non contenente FS e, per ottenere dopo il trattamento termico il 70% di silice, è maggiore la dose di resina siliconica (H44). La procedura di preparazione della miscela è la stessa a meno del passaggio che include lo scioglimento della silice idrofoba con l'ultrasuono a punta.

Le masse dei precursori utilizzati per ottenere una miscela che consenta una stampa sono riportate in Tabella 2 per la miscela contenente la FS e in Tabella 3 per la miscela senza FS.

Nome del composto	Massa [g]
Resina acrilica FunToDo	20
Silres H44	6.11
Span 80	1
Silice idrofoba	1
Calcio nitrato tetraidrato	5.61

Tabella 2: Dosi dei composti utilizzati per una miscela contenente silice idrofoba per una stampa MSLA di scaffold in biovetro 70S30C

Nome del composto	Massa [g]
Resina acrilica FunToDo	20
Silres H44	8.74
Span 80	1
Calcio nitrato tetraidrato	5.61

Tabella 3: Dosi dei composti utilizzati per una miscela non contenente silice idrofoba per una stampa MSLA di scaffold in biovetro 70S30C

In Figura 44 è riportato lo schema che rappresenta ciò che avviene durante il trattamento termico a 700°C in azoto: l'H44 e la FS (se presente) danno come prodotto la silice e gas. L'H44 produce anche una notevole quantità di carbonio amorfo separato, ovvero carbonio grafítico (o pirolitico) tramite la seguente reazione (62):



Il nitrato di calcio dà origine all'ossido di calcio oltre che ad una fase gassosa. Il prodotto finale è uno scaffold in biovetro formato da ossido di silicio e ossido di calcio combinato con una fase distinta di carbonio pirolitico.

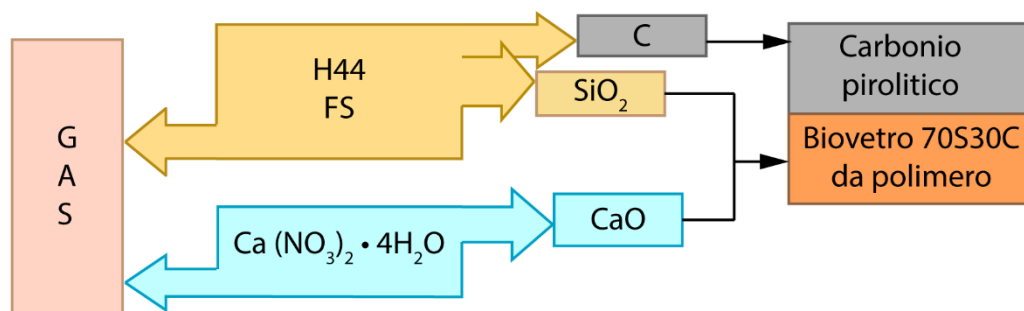


Figura 44: Schema rappresentativo del trattamento termico in azoto

La Tabella 4 e la Tabella 5 forniscono delle informazioni riguardo alla miscela preceramFSica da un altro punto di vista: sono riportati solamente i precursori da cui derivano gli ossidi che compongono il biovetro 70S30C. In particolare, le dosi scritte sono state normalizzate in modo da ottenere 1g di silice: il 70% della silice origina dall'H44 e il 30% dalla FS nel caso in cui essa sia presente mentre, per quanto riguarda la miscela contenente solo H44, quest'ultimo è presente in quantità maggiori per assicurare sempre un 70% di silice nel prodotto finale.

Ossidi nel Biovetro 70S30C	Quantità di ossidi riferiti a 1 g di SiO ₂ (g) nel Biovetro 70S30C	Quantità di precursore riferito a 1 g di SiO ₂ (g) / Precursore
SiO ₂ (71%)	1	0.70
		0.30
CaO (29%)	0.40	1.68/Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O

Tabella 4: Formulazione normalizzata a 1g di silice per il biovetro 70S30C da polimero preceramico contenente silice idrofoba (FS)

Ossidi nel Biovetro 70S30C	Quantità di ossidi riferiti a 1 g di SiO ₂ (g) nel Biovetro 70S30C	Quantità di precursore riferito a 1 g di SiO ₂ (g) / Precursore
SiO ₂ (71%)	1	2.6/H44
CaO (29%)	0.4	1.68/Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O

Tabella 5: Formulazione normalizzata a 1g di silice per il biovetro 70S30C da polimero preceramico non contenente silice idrofoba (FS)

6.2. STRUMENTAZIONE

6.2.1. PRODUZIONE DEGLI SCAFFOLDS

Per la stampa dello scaffold in biovetro 70S30C è stato necessario definire i modelli geometrici: un modello a diamante con porosità 85% e un modello a giroide, riportato in Figura 45, con porosità al 90% in formato STL (Standard Triangulation Language). Il modello creato appositamente per questa tesi corrisponde a sei scaffold a diamante cubici con lato di 15 mm mentre, per quanto riguarda gli scaffold a giroide, il modello ne contiene otto, ciascuno di lato 10 mm. La struttura a diamante deve la sua porosità allo spazio tra le travicelle interconnesse mentre la struttura a giroide è formata da membrane incurvate che formano degli spazi elicoidali. Questi modelli sono superfici triplo periodiche definite lungo x, y e z con una curvatura media nulla, definita come:

$$\frac{2\pi x}{cs} \cdot \cos\left(\frac{2\pi y}{cs}\right) + \sin\left(\frac{2\pi y}{cs}\right) \cdot \cos\left(\frac{2\pi z}{cs}\right) + \sin\left(\frac{2\pi z}{cs}\right) \cdot \cos\left(\frac{2\pi x}{cs}\right) = 0$$

con cs =cell size. (63)

Gli scaffold sono stati prodotti con una stampante per masked stereolithography (Original Prusa SL-1, Prusa Research a.s., Prague, Czech Republic) che opera con una luce avente lunghezza d'onda di 405 nm. Lo spessore e il tempo di esposizione per il primo strato è stato impostato a 25" mentre per gli altri strati a 13". A fine della stampa, i campioni sono stati puliti con aria compressa ed isopropanolo e induriti ulteriormente in una camera UV (405 nm) per 10 minuti (Original Prusa CW1, Prusa Research a.s., Prague, Czech Republic). Infine sono stati ceramizzati in azoto con un trattamento termico a due step: 0.3°C/min fino a 500 °C per 5 h seguito poi da un incremento di 1 °C/min up to 700 °C for 1 h.

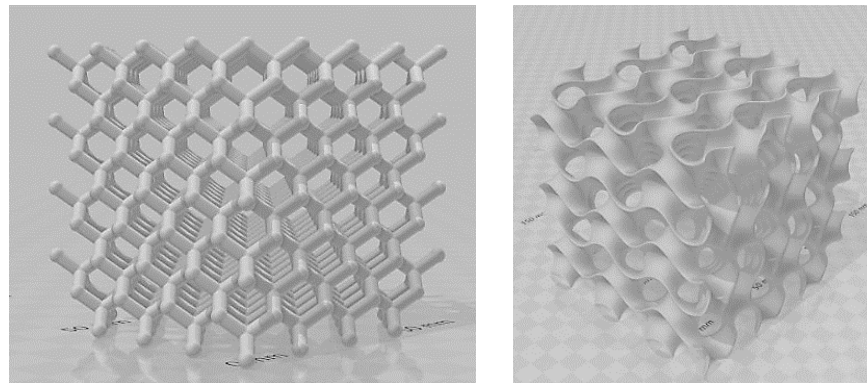


Figura 45: A sinistra, modello a diamante con porosità dell'85%. A destra, modello a giroide con porosità dell'90%.

6.2.2. CARATTERIZZAZIONE DEGLI SCAFFOLDS

Caratterizzazione microstrutturale

Una prima valutazione qualitativa degli scaffold ottenuti è stata eseguita con l'utilizzo del microscopio ottico (Stemi 2000-C, Zeiss, Jena, Germany) per osservare l'eventuale formazione di crepe, bolle d'aria e depositi superficiali. Una caratterizzazione più accurata della morfologia dei campioni, invece, è stata resa possibile tramite il microscopio a scansione elettronica (SEM, FEI Quanta 200 ESEM, Eindhoven, The Netherlands).

Successivamente è stata fatta una valutazione della resistenza meccanica degli scaffold: sono state eseguite delle prove di compressione sui campioni di forma cubica quasi regolare (~9 mm x 9 mm x 9 mm per gli scaffold a diamante e ~5,3 mm x 5,3 mm x 5,3 mm per gli scaffold a giroide,

misure ricavate con un calibro digitale) dopo il trattamento termico in azoto utilizzando un macchinario universale per testare provini (Quasar 25, Galdabini, Cardano, Italy) che opera con una velocità di 1 mm min^{-1} . Sono stati testati 15 campioni con struttura a diamante con silice colloidale e 10 senza silice colloidale. Successivamente sono stati testati 10 campioni con struttura a giroide, 5 con silice colloidale e 5 senza silice.

È stata poi svolta un'analisi mineralogica su polveri ottenute dalla frantumazione dei residui delle prove meccaniche utilizzando la diffrazione ai raggi X (XRD, Bruker AXS D8 Advance, Bruker, Germany), supportato dal programma Match! (Crystal Impact GbR, Bonn, Germany). I parametri utilizzati sono 40 mA e 40 kV ed è stato considerato un range di angoli da 5° a 80° con un incremento di 0.05 ogni secondo.

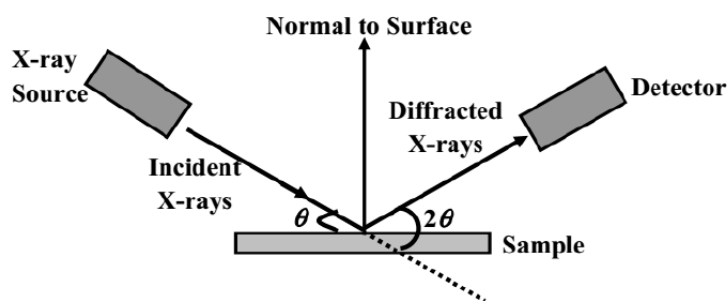


Figura 46: Schema del principio della diffrazione ai raggi X

La diffrazione ai raggi X è basata su un'interferenza costruttiva di raggi X monocromatici e un campione cristallino. Questi raggi sono generati da un tubo catodico e sono poi filtrati e concentrati verso il campione. Questa interferenza avviene se è soddisfatta la legge di Bragg:

$$2 \cdot d \cdot \sin \vartheta = n \cdot \lambda$$

che lega la lunghezza d'onda (λ) di una radiazione elettromagnetica con l'angolo di diffrazione (ϑ) e la spaziatura del reticolo (d) in un campione cristallino. Questi raggi che originano dalla diffrazione arrivano al detector e, scansionando il campione in un range di $2 \cdot \vartheta$ angoli, si ottengono tutte le direzioni possibili di diffrazione che il reticolo può avere grazie alla disposizione random dei cristalli nel materiale polverizzato. Dai picchi di diffrazione si può calcolare quindi la spaziatura d che permette di identificare il materiale perché ognuno ha un set di spaziature univoche per quel materiale e questo è possibile grazie alla comparazione con un database. Il software collegato al macchinario permette di leggere un grafico che presenta nell'asse orizzontale il range dei $2 \cdot \vartheta$ angoli e nell'asse verticale l'intensità dei picchi. (64)

Ulteriori analisi della composizione chimica sono state eseguite tramite una spettroscopia ad infrarosso FTIR (Fourier Transform Infrared Spectroscopy) (FT/IR-4200, Jasco, Tokyo, Japan) e una spettroscopia Raman. La spettroscopia FTIR si basa sul principio che, quando una radiazione infrarossa passa attraverso un campione, una parte viene assorbita e una parte passa attraverso, la quale viene registrata ed è caratteristica di una specifica molecola. La trasformata di Fourier è una funzione matematica che permette di ricavare la frequenza basata sul tempo di un'onda. Infatti, l'interferometro restituisce l'interferogramma e la FT lo converte nello spettro spettroscopico ad infrarossi che viene utilizzato per analizzare il campione. (65) Questa tecnica opera in un range molto ampio di lunghezze d'onda, in questo caso da 4000 a 400 cm^{-1} , e permette di studiare i gruppi funzionali presenti nel campione (66). La spettroscopia Raman, invece, è uno strumento ancor più potente per caratterizzare differenti tipi di materiali ma soprattutto per distinguere gli allotropi del carbonio. Il carbonio è un materiale polimorfo perché esiste in molte forme diverse come in forma di diamante, di grafite, di grafene, di nanotubi, di fullerene (C_{60} o C_{70}) e di carbonio pirolitico, una forma grafitica non regolare che deriva dalla trasformazione in ambiente non completamente ossidante di materiale organico. Questo è possibile perché gli atomi di carbonio possono formare tre o quattro legami di tipo covalente, quindi avere un'ibridazione sp^2 o sp^3 . (67) Gli spettri sono stati raccolti con un sistema micro-Raman con uno spettrografo per imaging (Triax-320, Horiba Jobin Yvon, Edison, NJ, USA) con una lunghezza focale di 320 mm. Quest'ultimo è dotato di un reticolo olografico da 1800 g/mm e di un detector CCD raffreddato ad azoto liquido (Spectrum One, ISA Instruments Jobin-Yvon Spex, Edison, NJ, USA). La sorgente di eccitazione è un laser Ar+ Spectra-Physics (Stabilite 2017-06S, Spectra-Physics, Mountain View, CA, USA) operante a 514.5 nm ed è stato utilizzato un filtro che lascia passare solo le lunghezze d'onda lunghe (Semrock Filters, IDEX Health & Science, LLC, Rochester, NY, USA) per ridurre la luce parassita. Infine, un microscopio ottico dotato di tre obiettivi, 20X/0.35, 50X/0.75 e 100X/0.90, otticamente accoppiato con lo spettrografo, è stato usato per registrare gli spettri Raman (Olympus BX 40, Olympus Co., Tokyo, Japan). (68)

Infine è stata eseguita una verifica della composizione ricavando spettri EDS (o EDX, Energy Dispersive X-ray Spectroscopy) attraverso un microscopio a scansione elettronica di tipo SEM-EDX. Questa tecnica sfrutta l'emissione di raggi X generati da un fascio elettronico accelerato incidente sul campione. Nello specifico, un emettitore costituito da un filamento di tungsteno (o esaboruro di lantanio) viene portato ad una temperatura superiore ai 1000°C per riscaldamento elettrico e funge da sorgente di elettroni per effetto termoionico. Poi, grazie all'applicazione di una differenza di potenziale di 0.3-30 kV, il fascio elettronico viene accelerato e deflesso

attraverso un collimatore elettromagnetico ed infine collimato verso il campione. La scansione avviene sottovuoto per eliminare le interazioni tra gli elettroni e l'aria. Il rivelatore che riceve l'onda riflessa dal campione. Con questa tecnica è possibile confermare se il materiale prodotto è effettivamente composto dal 70% di silice e dal 30% di ossido di calcio. Infine, attraverso delle mappe ESD, si ottengono segnali di fluorescenza X separati di Si, Ca, e Na per definire se sono presenti delle fasi cristalline o se il materiale è completamente amorfo (e quindi un vetro al 100%) valutando la presenza di gradienti.

Il trattamento termico in azoto porta alla formazione di carbonio pirolitico che, oltre ad essere un materiale altamente biocompatibile e non trombogenico (per esempio, la struttura rigida delle valvole artificiali meccaniche bileaflet è in carbonio pirolitico), ha proprietà fototermiche, cioè, sotto ad una luce ad infrarosso, è in grado di convertire l'energia in calore. Attraverso una fotocamera termica (FLIR ONE Pro, TELEDYNE FLIR, Milano, Italia) sono state scattate delle foto prima dell'accensione della luce e dopo 30 s dall'accensione per registrare la temperatura massima raggiunta dai campioni in comparazione con un campione in Biosilicate®. Questa caratteristica può essere sfruttata per la terapia fototermica e fotodinamica del cancro (PTT/PDT) perché ha bassi effetti collaterali e tossicità sistemica ma anche per sterilizzare il materiale che, nel caso del carbonio pirolitico, avviene con trattamento termico in atmosfera inerte. (68)

È stato eseguito inoltre un semplice test qualitativo del pH per osservare la rapidità di rilascio di ioni Ca^{2+} in acqua distillata. L'esperimento è stato eseguito con un campione da polimero preceramico contenente FS e uno senza FS comparati con altri due campioni in Biosilicate®, uno trattato termicamente in aria e l'altro in azoto. In particolare, avendo a disposizione un contenitore chiuso, è stata misurata la quantità massima di acqua che questo contenitore è in grado di contenere. Nel contenitore con la quantità massima di acqua è stato inserito il campione con massa maggiore. Avendo a disposizione, poi, la massa degli altri campioni è stata calcolata, con una proporzione, la quantità di acqua da inserire negli altri contenitori in cui sono stati inseriti gli altri tre campioni. È stato misurato il pH con la cartina tornasole ogni ora per cinque ore e successivamente dopo 24 ore.

Per la valutazione della porosità, necessaria per calcolare la tensione a flessione per caratterizzare il comportamento meccanico dei campioni, è stato utilizzato il picnometro ad elio (Ultrapyc 3000,

Anton Paar, Graz, Austria) per misurare la densità apparente dei campioni interi e la densità vera utilizzando la polvere dei campioni.

Il picnometro è stato utilizzato anche per misurare la densità apparente di scaffold verdi (non trattati termicamente) con struttura a diamante per valutare l'accuratezza di stampa e dunque lo scattering comparando i risultati ottenuti con campioni in sola resina FunToDo con campioni in biovetro 70S30C.

7. RISULTATI

7.1. CARATTERIZZAZIONE MICROSTRUTTURALE

7.1.1. FOTO DEI CAMPIONI

Prima del trattamento termico in azoto

In Figura 47 è riportata una foto di un campione in sola resina FunToDo dopo la MSLA con struttura a diamante. In Figura 48, invece, si osservano due campioni in biovetro 70S30C da polimero preceramico contenente FS (a sinistra) e non contenente FS (a destra) con struttura a diamante con porosità dell'85% mentre i campioni in Figura 49 hanno una struttura a giroide con una porosità del 90%. Non si nota una sostanziale differenza tra i campioni stampati con le due miscele ma quella contenente solo H44 è meno viscosa e consente di stampare degli scaffold con travicelle o membrane meno spesse rispetto all'altra miscela.



Figura 47: Foto di un campione di sola resina con struttura a diamante



Figura 48: A sinistra, foto di un campione da polimero preceramico contenente FS con struttura a diamante.
A destra, foto di un campione da polimero preceramico non contenente FS con struttura a diamante.



Figura 49: A sinistra, foto di un campione da polimero preceramico contenente FS con struttura a giroide.
A destra, foto di un campione da polimero preceramico non contenente FS con struttura a giroide.

Dopo il trattamento termico in azoto

In Figura 50 sono riportate le foto di un campione da polimero preceramico contenente (a sinistra) e non contenente (a destra) FS dopo il trattamento termico in azoto con struttura a diamante. Qualitativamente si nota una maggiore lucentezza nel campione la cui componente di silice deriva solamente dall'H44. In Figura 51, invece, sono riportate le foto di un campione da polimero preceramico contenente (a sinistra) e non contenente (a destra) FS dopo il trattamento termico in azoto con struttura a giroide. Anche in questo caso si nota una differenza nella lucentezza ma i campioni sono molto simili.



Figura 50: A sinistra, foto di un campione da polimero preceramico contenente FS con struttura a diamante.
A destra, foto di un campione da polimero preceramico non contenente FS con struttura a diamante.



Figura 51: A sinistra, foto di un campione da polimero preceramico contenente FS con struttura a giroide.
A destra, foto di un campione da polimero preceramico non contenente FS con struttura a giroide.

7.1.2.FOTO AL MICROSCOPIO OTTICO

Prima del trattamento termico in azoto

In Figura 52 si osserva una foto al microscopio ottico di un campione in sola resina con struttura a diamante. Si percepisce un'ottima qualità di stampa e affidabilità al modello. In Figura 53, invece, sono riportate delle foto al microscopio ottico di un campione da polimero preceramico contenente (a sinistra) e non contenente (a destra) FS con struttura a diamante. Nella foto a sinistra si osservano delle bolle (zone di colore più chiaro) che sono state poi studiate con un maggior ingrandimento (Figura 54). Queste bolle derivano dall'inclusione di aria nella miscela durante la preparazione ma esse vengono eliminate dal successivo trattamento termico.

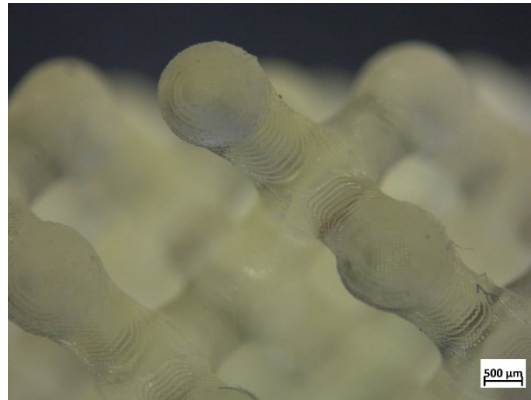


Figura 52: Foto al microscopio ottico del campione in sola resina con struttura a diamante.

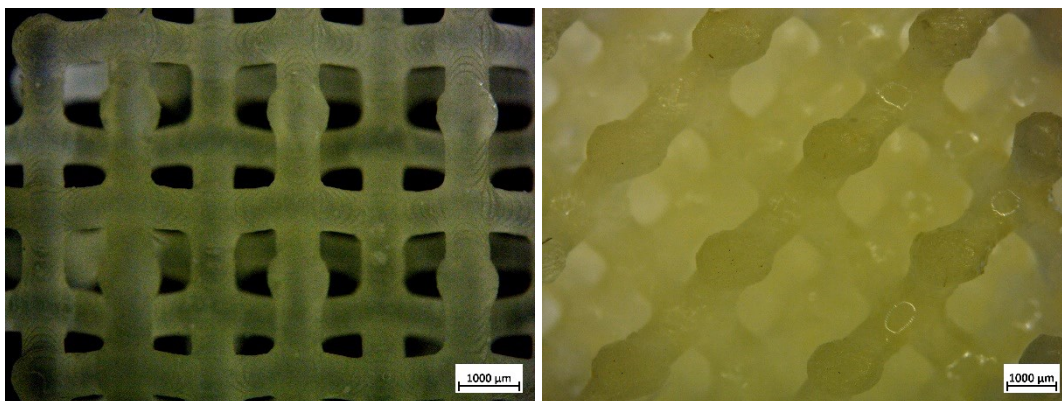


Figura 53: A sinistra, foto al microscopio ottico di un campione con struttura a diamante da polimero preceramico contenente FS. A destra, foto al microscopio ottico di un campione con struttura a diamante da polimero preceramico non contenente FS.

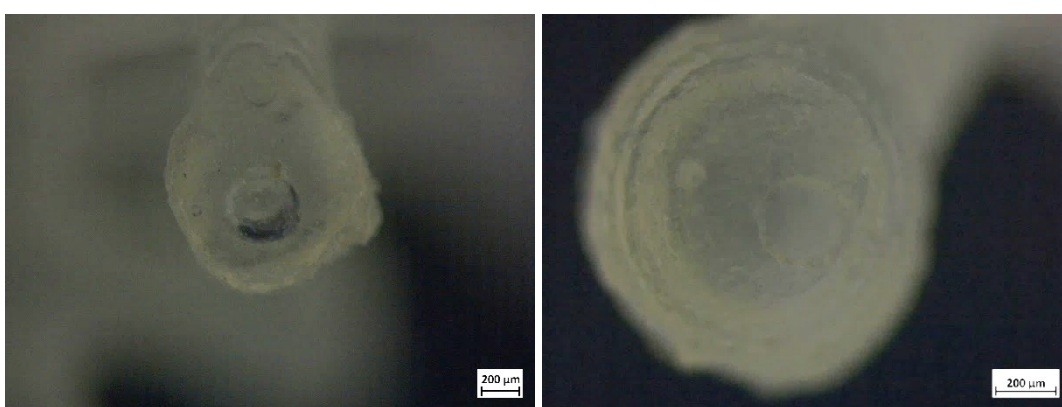


Figura 54: Foto dettagliate al microscopio ottico di bolle di aria all'interno di un campione da polimero preceramico contenente FS.

Ingrandimenti al microscopio ottico degli scaffold con struttura a giroide sono riportati in Figura 55 : il campione di sinistra deriva da una miscela contenente FS mentre quello di sinistra deriva da una miscela che include solo l'H44 come precursore della silice. Osservando i campioni stampati, non si nota una particolare differenza tra l'affidabilità di stampa delle due miscele.

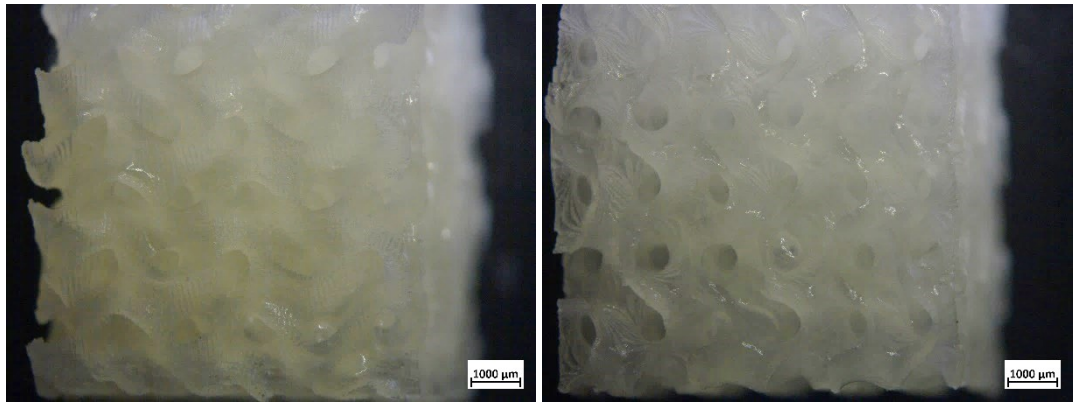


Figura 55: A sinistra, foto al microscopio ottico di un campione con struttura a giroide da polimero preceramico contenente FS. A destra, foto al microscopio ottico di un campione con struttura a giroide da polimero preceramico contenente FS.

Dopo il trattamento termico in azoto

In Figura 56 sono riportate le foto al microscopio ottico degli scaffold con struttura a diamante dopo il trattamento termico. In particolare, il campione di sinistra contiene ossido di silicio derivante sia da H44 che da FS mentre il campione di destra contiene silice che deriva solamente da H44. Osservando la scala, si nota che i campioni perdono più del 50% del volume durante il trattamento termico in azoto perché la componente polimerica, presente in quantità importante, brucia e ciò che rimane è un vetro di silice e ossido di calcio con una fase di carbonio pirolitico.

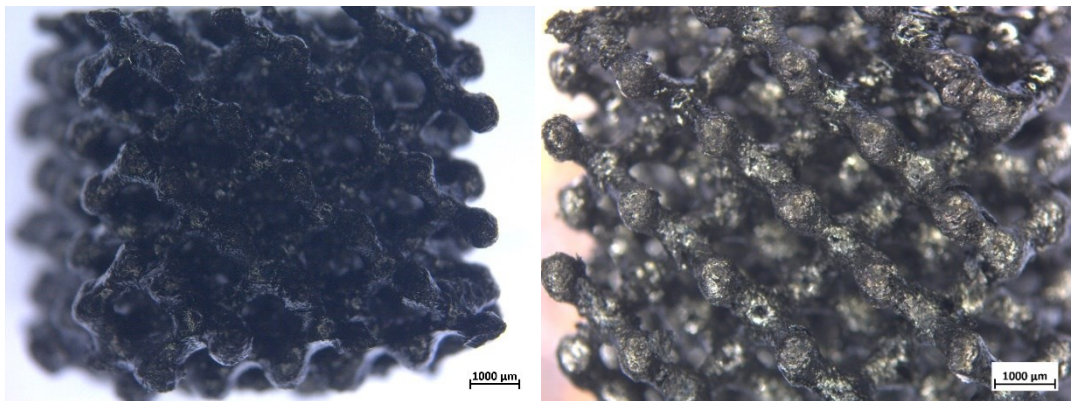


Figura 56: A sinistra, foto al microscopio ottico di un campione con struttura a diamante da polimero preceramico contenente FS. A destra, foto al microscopio ottico di un campione con struttura a diamante da polimero preceramico contenente FS.

In Figura 57 si osservano degli ingrandimenti di alcuni dettagli degli scaffold con struttura a diamante in cui si notano delle cricche. Questo avviene soprattutto negli ultimi strati di stampa o nelle parti più esposte ad eventuali urti.

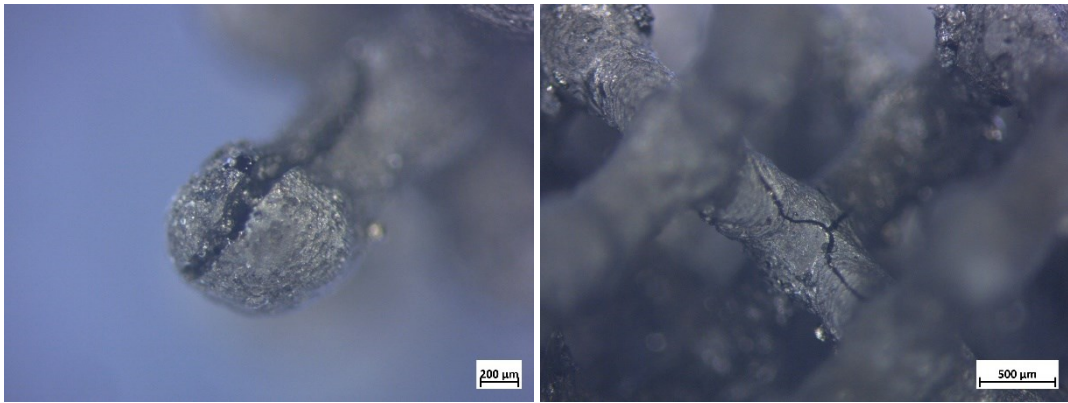


Figura 57: Foto dettagliate al microscopio ottico di cricche in un campione con struttura a diamante da polimero preceramico contenente FS.

In Figura 58 è riportata una foto a maggior ingrandimento di uno scaffold da polimero preceramico non contenente FS: anche in questo caso si nota la lucentezza del materiale ma anche l'assenza di cricche.

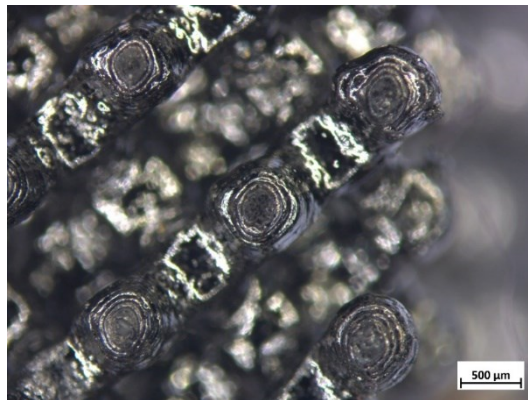


Figura 58: Foto dettagliata di un campione con struttura a diamante da polimero preceramico non contenente silice idrofoba.

Nella Figura 59 si vede uno scaffold in biovetro 70S30C con struttura a giroide da polimero preceramico contenente FS (a sinistra) e non contenente FS (a destra): anche in questo caso, osservando la scala, si osserva che con il trattamento termico il volume del campione si riduce notevolmente ma in modo omogeneo come lo dimostra il mantenimento della topologia della giroide.

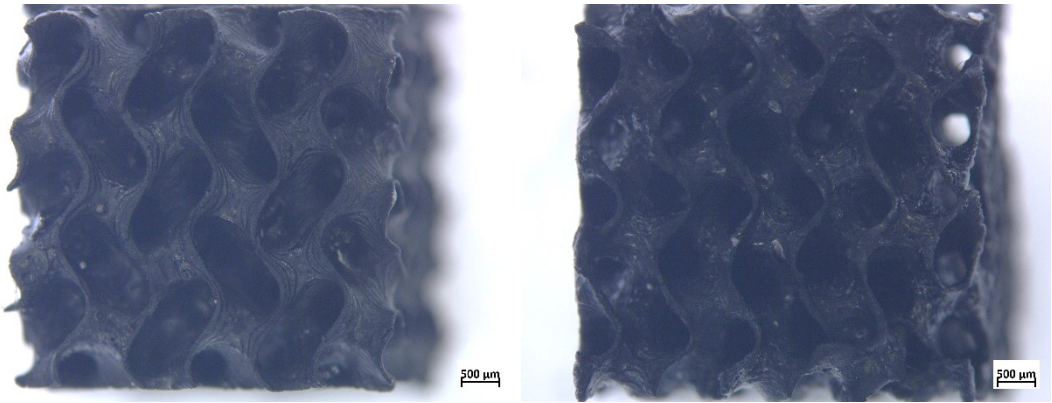


Figura 59: A sinistra, foto al microscopio ottico di un campione con struttura a giroide da polimero preceramico contenente FS. A destra, foto al microscopio ottico di un campione con struttura a giroide da polimero preceramico non contenente FS.

In Figura 60 si osserva in dettaglio un campione con struttura a giroide da polimero preceramico non contenente FS. A parte qualche bolla isolata, lo scaffold ha una struttura e un colore omogenei e regolari.

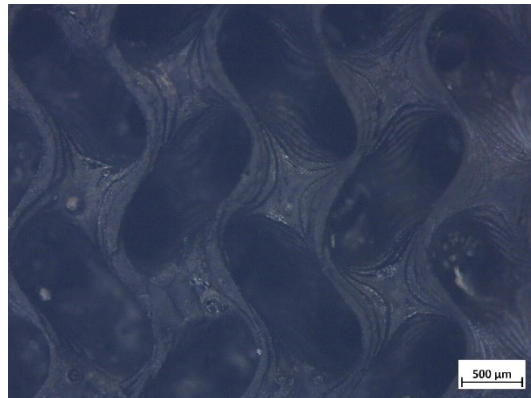


Figura 60: Foto dettagliata di un campione con struttura a giroide da polimero preceramico non contenente FS.

7.1.3. FOTO AL SEM

Oltre alle foto al microscopio elettronico, sono state scattate delle foto al microscopio elettronico a scansione osservando principalmente la composizione e non la topologia. Le gradazioni di grigio sono, perciò, dovute ad una diversa composizione e densità: le zone più chiare sono attribuite ad elementi più pesanti. Questo è reso possibile da un detector apposito che riesce a ricevere gli elettroni emessi da strati più profondi che forniscono delle informazioni più dettagliate sulla struttura cellulare a differenza degli elettroni emessi dalla superficie che danno un'informazione prettamente morfologica. Nelle immagini morfologiche le zone più chiare sono date da un accumulo di cariche. Infatti, queste analisi sono state fatte in basso vuoto, ovvero è presente vapore acqueo carico positivamente che, condensando, compensa le cariche negative in eccesso ma fino a saturazione quindi è possibile osservare delle zone di notevole accumulo. Nelle analisi non in basso vuoto, è presente anche un film metallico che toglie tutti gli elettroni in eccesso.

Prima del trattamento termico

In Figura 61 si vede uno scaffold verde (non trattato termicamente) in biovetro 70S30C da polimero preceramico contenente FS a diversi ingrandimenti: sono ben visibili gli strati di stampa a causa dello scattering durante la stampa e numerose porosità dovute al rilascio di gas. Sono di maggior interesse le zone più chiare, ben visibili in Figura 61f, di forma circolare e attribuite alla formazione di calcite, analizzate più in dettaglio nel §7.1.9.

In Figura 62 è mostrato, invece, uno scaffold verde in biovetro 70S30C da polimero preceramico non contenente FS a diversi ingrandimenti: rispetto allo scaffold in Figura 61, gli strati di stampa sono impercettibili grazie ad uno scattering minore durante il processo di MSLA e il tasso di porosità nella matrice è ridotto. D'altro canto, le zone di formazione del carbonato di calcio hanno una grandezza che spazia un ampio range e sono più diffuse.

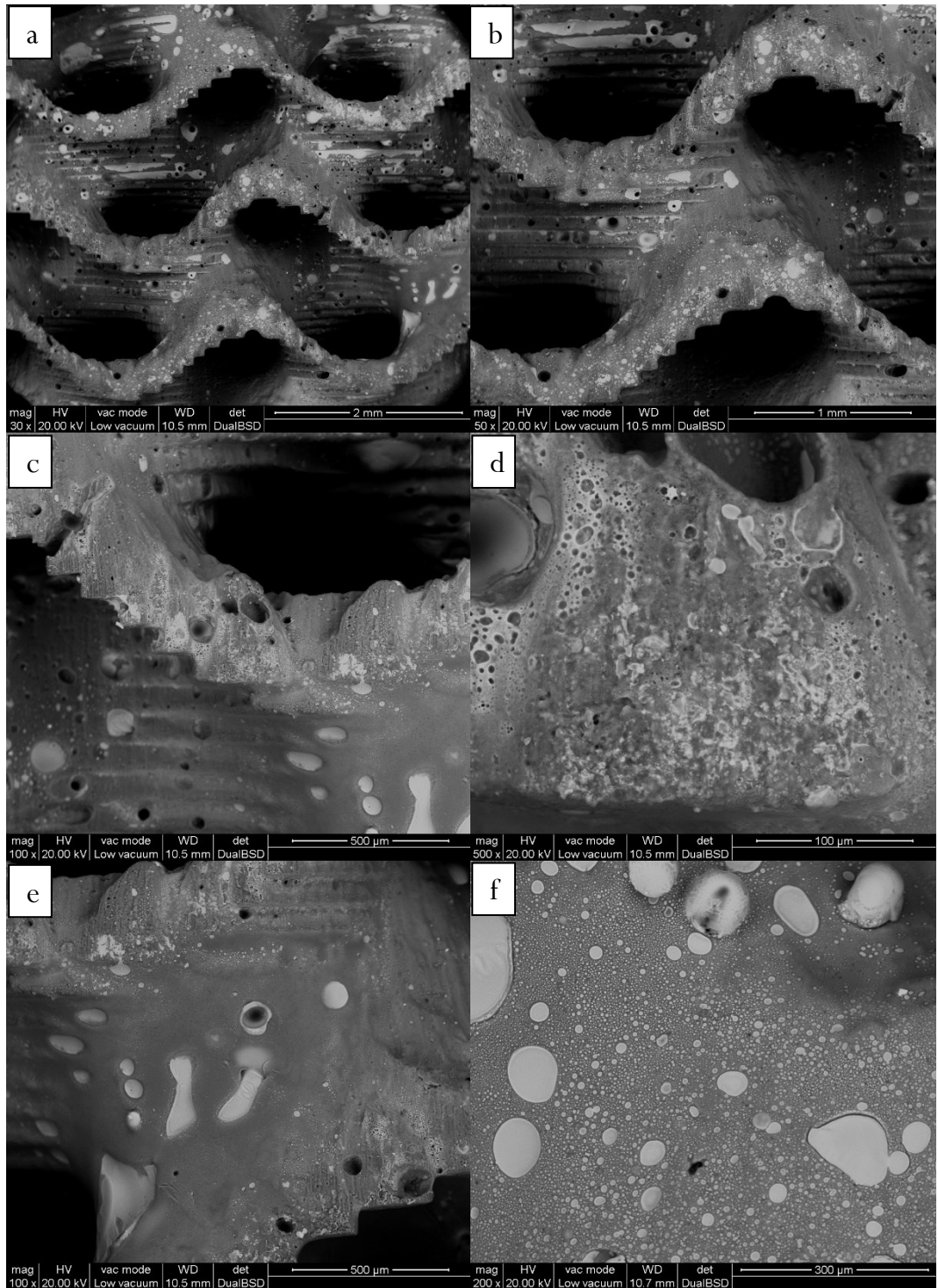


Figura 61: foto al SEM di uno scaffold in biovetro 70S30C da polimero preceramico con FS con struttura a giroide non trattato termicamente a diversi ingrandimenti: a) 30x, b) 50x, c) 100x, d) 500x, e) 100x, f) 200x. Sono ben visibili le zone di accumulo della calcite (macchie bianche) e porosità.

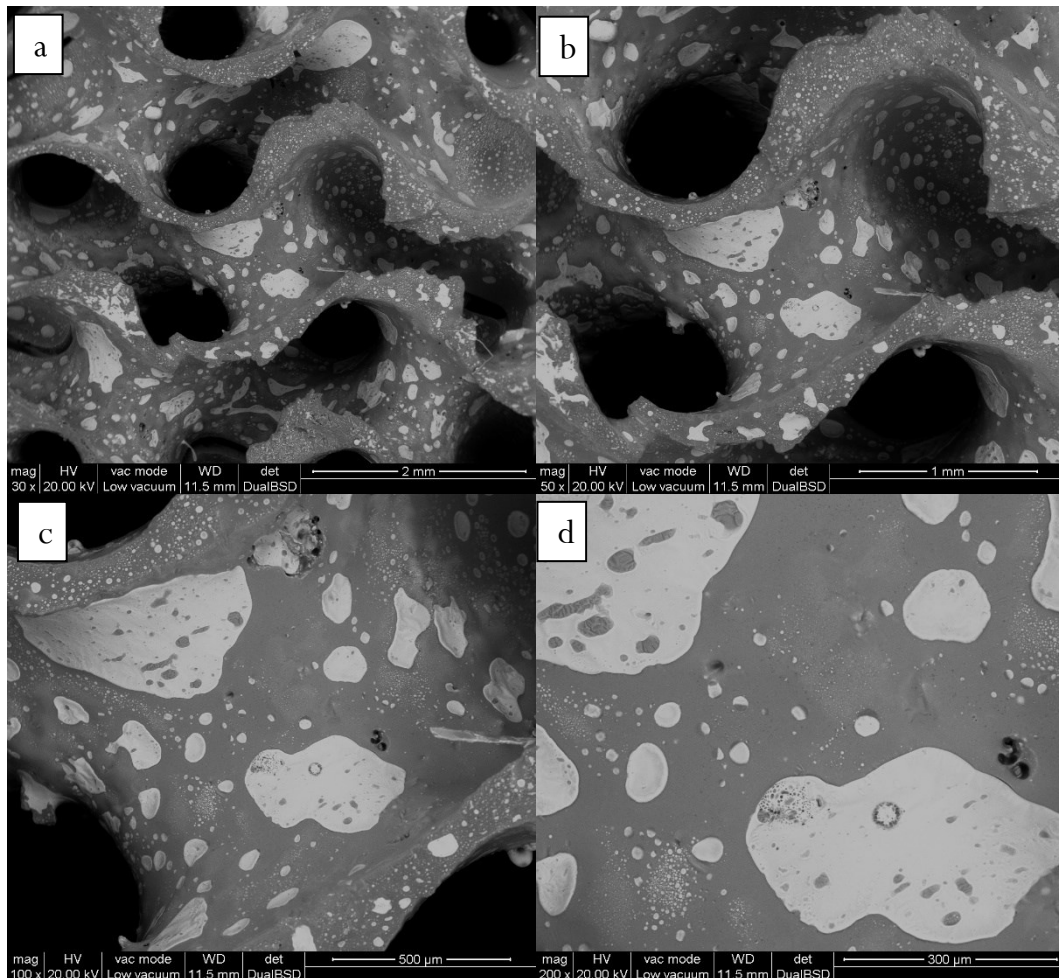


Figura 62: foto al SEM di uno scaffold in biovetro 70S30C da polimero preceramico senza FS con struttura a giroide non trattato termicamente a diversi ingrandimenti: a) 30x, b) 50x, c) 100x, d) 200x. Sono ben visibili le zone di accumulo della calcite (macchie bianche) in quantità maggiore rispetto agli scaffold precedenti.

Dopo il trattamento termico

In Figura 63 si osservano delle immagini al microscopio elettronico a diversi ingrandimenti di uno scaffold in biovetro 70S30C da polimero preceramico contenente FS dopo trattamento termico in azoto a 700°C. Rispetto alla stessa tipologia di campione prima del trattamento termico, questo scaffold presenta una quantità di zone bianche inferiore e il numero delle porosità si è ridotto grazie alla riduzione del volume e impaccamento durante la ceramizzazione. Si vedono delle piccole bolle dovute al rilascio della fase gassosa e, nella Figura 63c, non si osservano cricature intorno alla zona di calcite.

In Figura 64, infine, sono riportate delle foto al SEM a diversi ingrandimenti di uno scaffold in biovetro 70S30C da polimero preceramico non contenente FS dopo trattamento termico. Come già osservato nello scaffold verde, non si vedono gli strati di stampa e il campione è più omogeneo.

Sono presenti delle zone di carbonato di calcio piuttosto grandi (fino a 300 μm) e in Figura 64d si nota la formazione di cricche nella zona di interfaccia tra la matrice e la calcite dovute ad un'azione termomeccanica.

In entrambi i casi, si osserva come il trattamento termico riduca drasticamente la quantità di calcite.

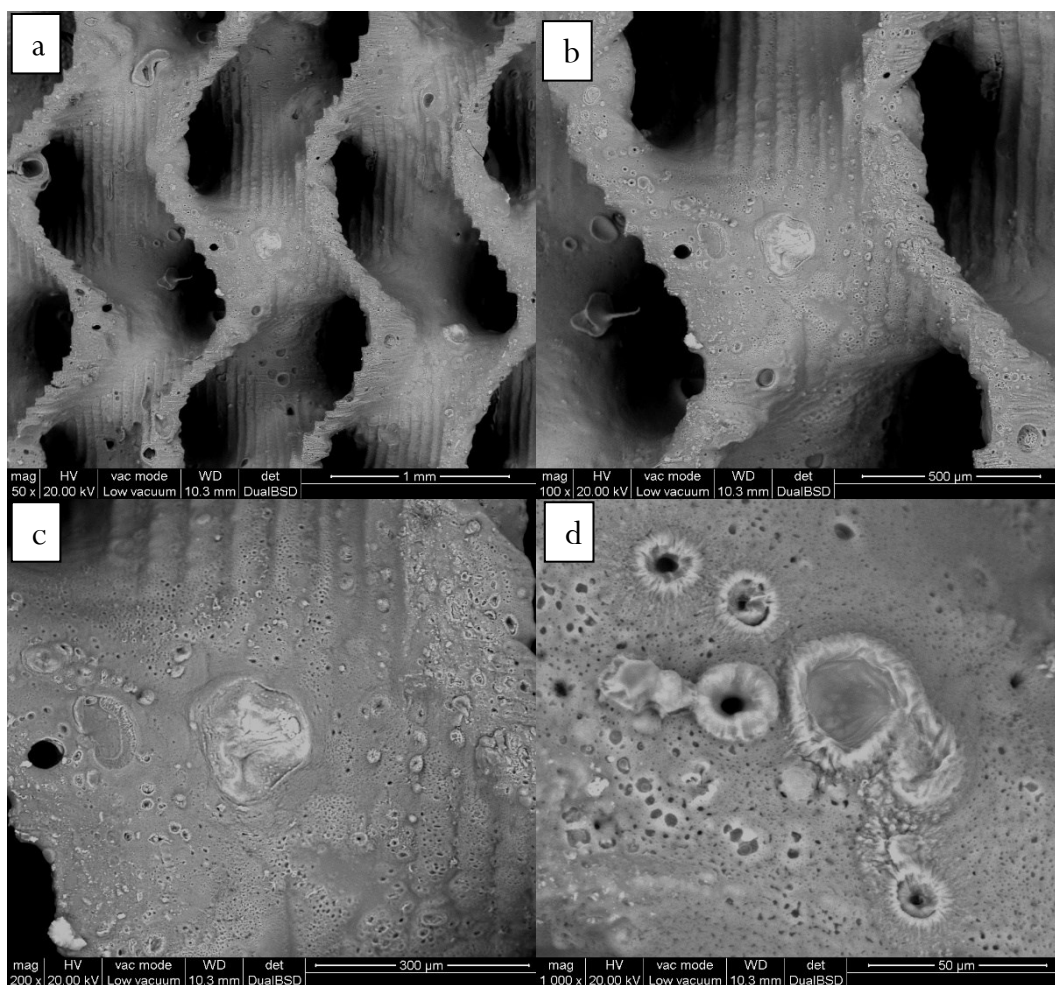


Figura 63: foto al SEM di uno scaffold in biovetro 70S30C da polimero preceramico con FS con struttura a giroide trattato termicamente a diversi ingrandimenti: a) 50x, b) 100x, c) 200x, d) 1000x. In figura c) è visibile un accumulo di calcite mentre in figura a) e d) si notano delle porosità.

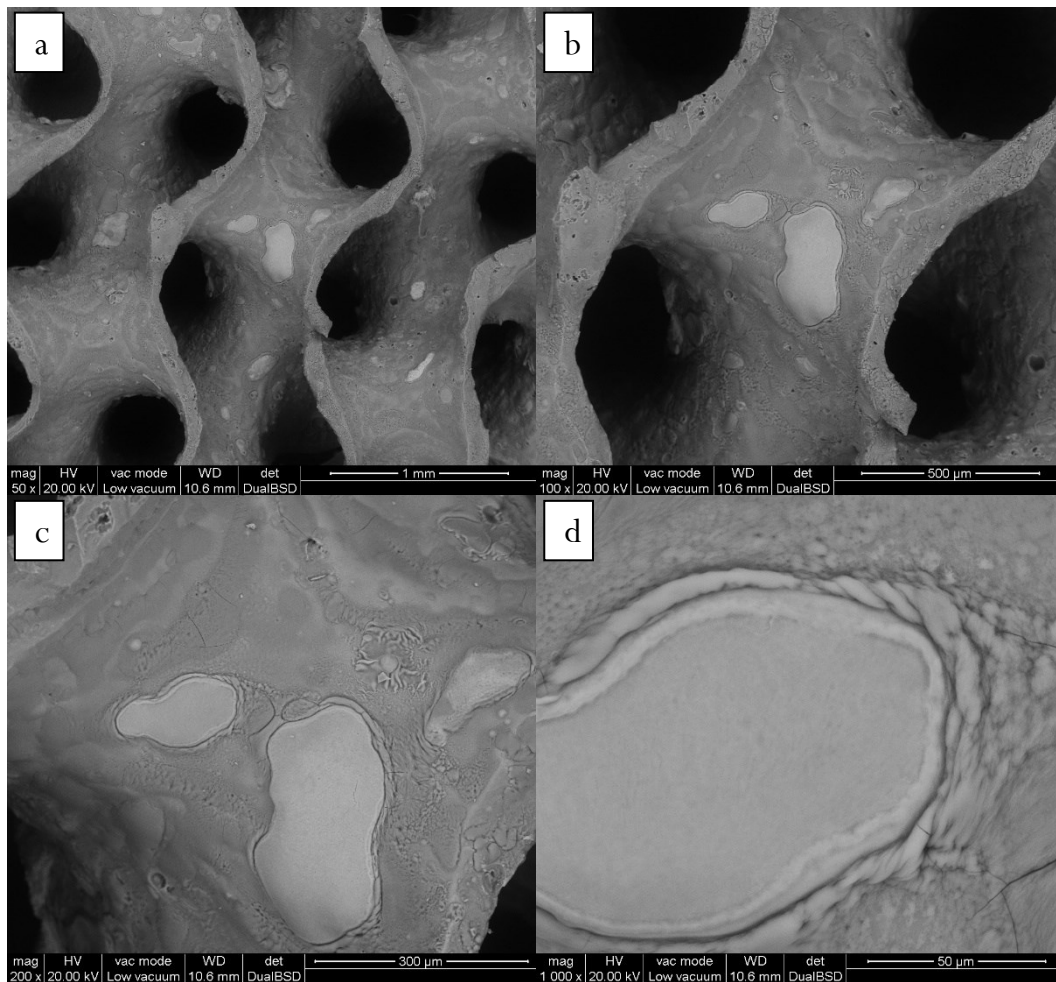


Figura 64: foto al SEM di uno scaffold in biovetro 70S30C da polimero preceramico senza FS con struttura a giroide trattato termicamente a diversi ingrandimenti: a) 50x, b) 100x, c) 200x, d) 1000x. In tutte le figure si nota un accumulo di calcite e in figura d) si osservano delle cricche tra la matrice e la zona più chiara.

7.1.4. MISURE DI DENSITÀ

Nella Tabella 6 sono riportati i valori misurati con il picnometro ad elio. Per quanto riguarda gli scaffold la densità misurata è quella apparente mentre nel caso del campione in forma di polvere la densità è quella vera. Confrontando i risultati ottenuti di densità vera con un dato in letteratura che risulta essere di circa $2,7 \text{ g/cm}^3$ (69), si conclude che sono inferiori. Si considera, perciò, un valore medio di $2,2 \text{ g/cm}^3$.

Campione	Massa [g]	Densità [g/cm³]	Volume medio [cm³]	Varianza [%]
Scaffold a diamante con FS	0,232	1,9577	0,1185	0,3192
Scaffold a diamante senza FS	0,252	1,883	0,1335	0,2319
Scaffold a giroide con FS	0,085	2,0759	0,0409	0,346
Scaffold a giroide senza FS	0,071	2,0236	0,0351	0,7619
Polvere con FS	0,524	0,1986	0,2638	0,361
Polvere senza FS	0,266	2,1791	0,1221	0,2776

Tabella 6: Valori misurati con il picnometro ad elio utilizzando campioni trattati termicamente.

Sono state eseguite delle misure di densità apparente (riportate in Tabella 7) anche su scaffold non trattati termicamente con struttura a diamante per valutare l'affidabilità di stampa e lo scattering delle miscele.

Lo scaffold in sola resina ha dimensioni $14,3 \times 14,3 \times 13,7$ e quindi un volume geometrico di $2801,51 \text{ cm}^3$. La densità geometrica risulta di $0,2841 \text{ g/cm}^3$ da cui risulta una porosità del 77,17%. La densità geometrica dello scaffold contenente FS è di $0,2665 \text{ g/cm}^3$ da cui si ottiene una porosità dell'80% mentre la densità geometrica dello scaffold non contenente FS è di $0,3382 \text{ g/cm}^3$ da cui risulta una porosità del 74,50 %. Le porosità ottenute sono tutte inferiori a quella teorica imposta all'85%: nel caso dello scaffold in resina è da considerare la permeabilità del gas utilizzato dal picnometro nel polimero mentre si osserva una permeabilità combinata ad uno scattering nei campioni in polimero preceramico.

Campione	Massa [g]	Densità [g/cm³]	Volume medio [cm³]	Varianza [%]
Scaffold a diamante con FS	1,124	1,3262	0,8476	0,1540
Scaffold a diamante senza FS	0,855	1,3420	0,6371	0,2257
Scaffold in sola resina	0,866	1,2445	0,6959	0,1906

Tabella 7: Valori misurati con il picnometro ad elio utilizzando campioni non trattati termicamente.

7.1.5. PROVE DI COMPRESSIONE

Nella Tabella 8 sono riportate le densità: la prima densità considerata è la densità geometrica, calcolata a partire dal volume nominale e dalla massa dei campioni. Questa densità, però, tiene conto di un volume che include le porosità. È stato perciò necessario calcolare la densità apparente, cioè la densità che esclude la porosità aperta, e la densità vera, che esclude sia la porosità aperta che quella chiusa, tramite le relazioni illustrate nel §5.3. Nella Tabella 9 sono riportate la porosità aperta e la porosità totale, dalle quali si può dedurre la porosità chiusa. Sono inoltre inseriti i valori di densità relativa e i valori di tensione a compressione. Quest'ultima è stata calcolata utilizzando, per ogni tipologia di campione, una media di cinque valori di forza misurata con il test di compressione. Utilizzando i valori di densità relativa e di tensione a compressione si è potuto calcolare la tensione a flessione, un parametro che indica la resistenza di un materiale cellulare con struttura a travicelle (come la struttura a diamante) utilizzando la relazione di Gibson-Ashby descritta nel §5.3. Infatti, la tensione a compressione non ha significato nel determinare la resistenza a compressione di uno scaffold ad elevata porosità perché la forza insiste su un'area molto ridotta. La struttura a giroide non è una struttura a travicelle ma viene calcolata la tensione a flessione allo stesso modo per comparare questi scaffold con quelli a diamante.

Nella Tabella 10 e nella Tabella 11 sono riportati gli stessi dati delle tabelle precedenti ma basati su una porosità vera di 2,2 g/cm³.

Nello specifico, si osserva che la porosità totale è inferiore rispetto alle aspettative date dal modello a causa dello scattering dato dalla stampa. Ne consegue una tensione a flessione relativamente bassa per gli scaffold a diamante dato che la tensione a compressione di un vetro è circa di 70 MPa. Questo non vale, però, per gli scaffold a giroide perché, anche se la porosità ottenuta è inferiore a quella del modello, la tensione a flessione è molto elevata a dimostrazione del fatto che questa topologia consente di ottenere degli scaffold altamente porosi e resistenti.

CAMPIONE	ρ_{geom}	ρ_{app}	ρ_{true}
Struttura a diamante con Silice Colloidale	$0,4217 \pm 0,1147$	$1,9577 \pm 0,0565$	$1,986 \pm 0,6008$
Struttura a diamante senza Silice Colloidale	$0,348 \pm 0,0734$	$1,8247 \pm 0,0551$	$2,1791 \pm 0,5269$
Struttura a giroide con Silice Colloidale	$0,7978 \pm 0,0944$	$2,0759 \pm 0,0588$	$1,986 \pm 0,6008$
Struttura a giroide senza Silice Colloidale	$0,5789 \pm 0,0696$	$2,0236 \pm 0,0873$	$2,1791 \pm 0,5269$

Tabella 8: Densità calcolate e misurate relative ad ogni tipologia di campione in g/cm^3

CAMPIONE	PA	PT	ρ_{rel}	σ_c	σ_{bending}
Struttura a diamante con Silice Colloidale	78,4594	78,7664	0,2123	$0,4181 \pm 0,1668$	21,3655
Struttura a diamante senza Silice Colloidale	80,9284	84,0301	0,1597	$0,3458 \pm 0,2686$	27,0920
Struttura a giroide con Silice Colloidale	61,5685	59,8288	0,4017	$4,4695 \pm 1,8601$	87,7722
Struttura a giroide senza Silice Colloidale	71,3926	73,4340	0,2657	$2,2555 \pm 0,8166$	82,3613

Tabella 9: Porosità (in %) e tensioni (in MPa) misurate e calcolate per ogni tipologia di campione

CAMPIONE	ρ_{geom}	ρ_{app}	ρ_{true}
Struttura a diamante con Silice Colloidale	$0,4217 \pm 0,1147$	$1,9577 \pm 0,0565$	$2,2 \pm 0,6008$
Struttura a diamante senza Silice Colloidale	$0,348 \pm 0,0734$	$1,8247 \pm 0,0551$	$2,2 \pm 0,5269$
Struttura a giroide con Silice Colloidale	$0,7978 \pm 0,0944$	$2,0759 \pm 0,0588$	$2,2 \pm 0,6008$
Struttura a giroide senza Silice Colloidale	$0,5789 \pm 0,0696$	$2,0236 \pm 0,0873$	$2,2 \pm 0,5269$

Tabella 10: Densità calcolate e misurate relative ad ogni tipologia di campione in g/cm^3 con densità vera pari a $2.2 g/cm^3$

CAMPIONE	PA	PT	ρ_{rel}	σ_c	σ_{bending}
Struttura a diamante con Silice Colloidale	78,4594	80,8318	0,1917	$0,4181 \pm 0,1668$	24,9103
Struttura a diamante senza Silice Colloidale	80,9284	84,1818	0,1582	$0,3458 \pm 0,2686$	27,4827
Struttura a giroide con Silice Colloidale	61,5685	63,7364	0,3626	$4,4695 \pm 1,8601$	102,3345
Struttura a giroide senza Silice Colloidale	71,3926	73,6864	0,2631	$2,2555 \pm 0,8166$	83,5491

Tabella 11: Porosità (in %) e tensioni (in MPa) misurate e calcolate per ogni tipologia di campione relativi ad una densità vera di $2,2 g/cm^3$

7.1.6. ANALISI XRD

In Figura 65 e in Figura 66 è mostrato lo spettro XRD di polvere di campioni ottenuti da polimero preceramico contenente e non contenente FS rispettivamente. I campioni, essendo di fatto in vetro, dovrebbero fornire uno spettro tipicamente amorfo, senza picchi particolari. Si osserva invece la presenza di picchi a circa $2\theta = 29^\circ, 36^\circ, 39.5^\circ, 43^\circ, 47^\circ$ e 48.5° corrispondenti alla calcite ($CaCO_3$). Per questo motivo, il materiale ottenuto non è un vetro al 100% e ne risentono le

proprietà meccaniche. In termini biologici, però, la calcite è altamente biocompatibile. Infatti, tra i primi sostituti ossei è stato utilizzato il corallo marino composto dal 99% di calcite perché in grado di unire la biocompatibilità e la osteoconduttività con la porosità simile all'osso trabecolare. Ha un comportamento comparabile con l'idrossiapatite bioattiva anche se ha una degradazione maggiore.

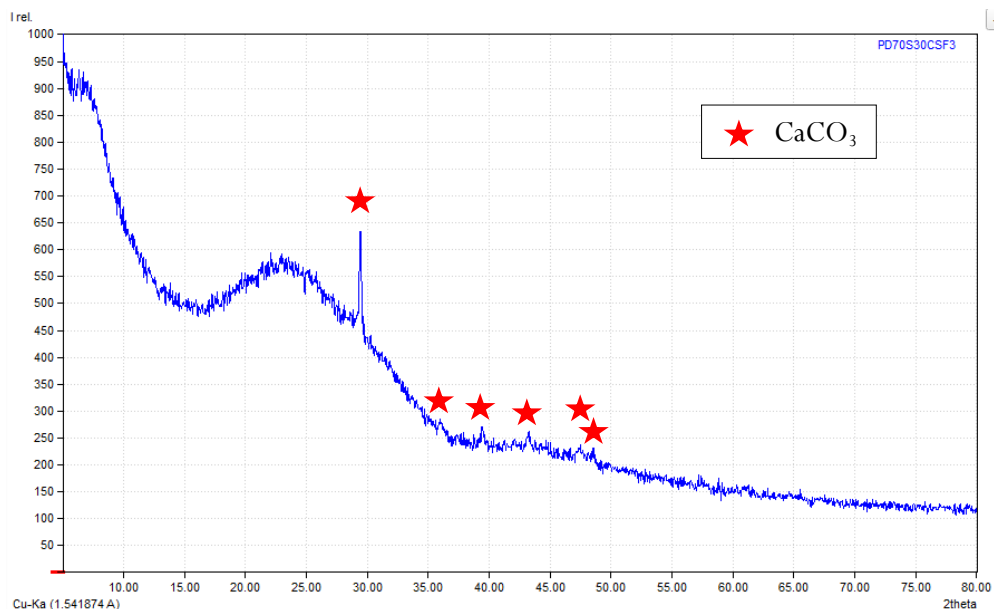


Figura 65: Analisi XRD del biovetro 70S30C con polimero preceramico contenente FS

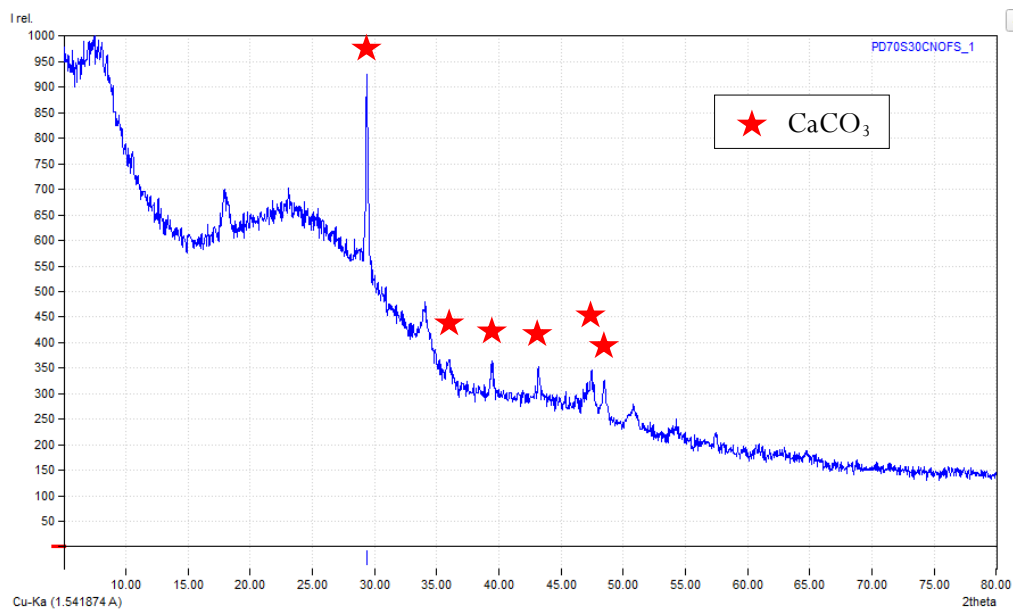


Figura 66: Analisi XRD del biovetro 70S30C da polimero preceramico non contenente FS.

7.1.7. ANALISI FTIR

Sono state eseguite delle analisi FTIR per indagare le tipologie di legami presenti nel materiale dopo il trattamento termico. In Figura 67 è riportato lo spettro dell'assorbanza riferito a polveri di un campione da polimero preceramico con FS mentre in Figura 68 è riportato lo spettro dell'assorbanza riferito a polveri di un campione da polimero preceramico non contenente FS. In entrambi i casi sono evidenti i picchi riferiti al legame Si-O-Si ad un numero d'onda di circa 1030 cm^{-1} che caratterizza il reticolo di silice ma prevale anche il picco del legame tra il silicio e il carbonio amorfo a circa 1400 cm^{-1} . Dalle analisi eseguite al microscopio elettronico a scansione, come descritto nel §7.1.9, si osserva una quantità di ossido di silicio superiore al 70% atteso ma è da considerare che una parte di questo silicio non è effettivamente legato all'ossigeno ma al carbonio (non si può misurare il carburo di silicio con l'analisi degli ossidi). Osservando i grafici FTIR, si nota anche un picco di modesta ampiezza dovuto al legame Si-C a circa 790 cm^{-1} . (70) (71) (72)

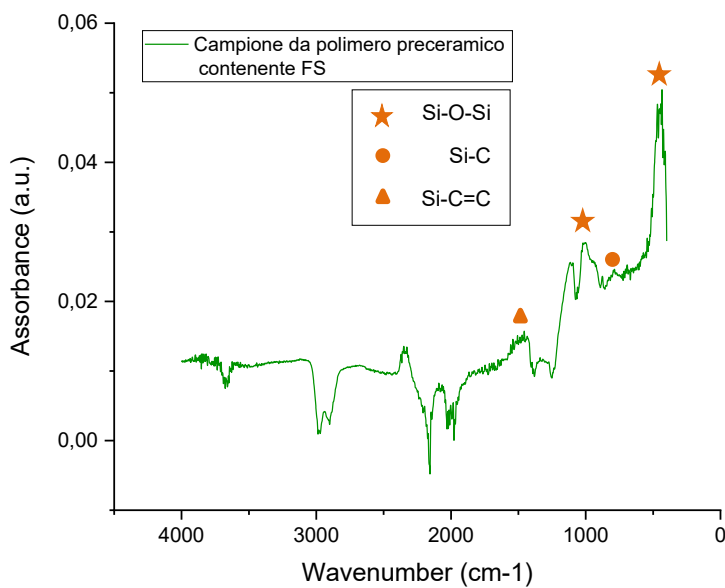


Figura 67: Spettro FTIR di polvere di biovetro 70S30C da polimero preceramico con FS.

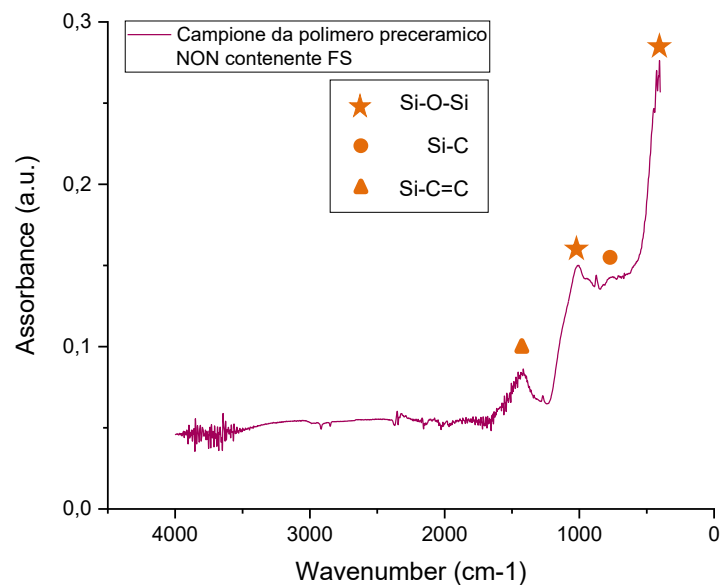


Figura 68: Spettro FTIR di polvere di biovetro 70S30C da polimero preceramico senza FS.

7.1.8. ANALISI RAMAN

In Figura 69 sono confrontati gli spettri Raman delle polveri ottenute dalla frantumazione di scaffold in biovetro 70S30C da polimero preceramico contenente silice idrofoba (in verde) e non contenente silice idrofoba (in magenta). Gli spettri sono molto simili e caratteristici di carbonio grafittico (carbonio pirolitico), sia per quanto riguarda le bande del primo ordine a 1300 e 1600 cm^{-1} che per quelle del secondo ordine fra 2500 e 3250 cm^{-1} . Nella Figura 70 sono riportati lo spettro del C_{70} cristallino (blu) e del campione da polimero preceramico non contenente FS (arancio): si osserva che tra i due spettri non c'è corrispondenza dei picchi indice del fatto che non è presente carbonio cristallino.

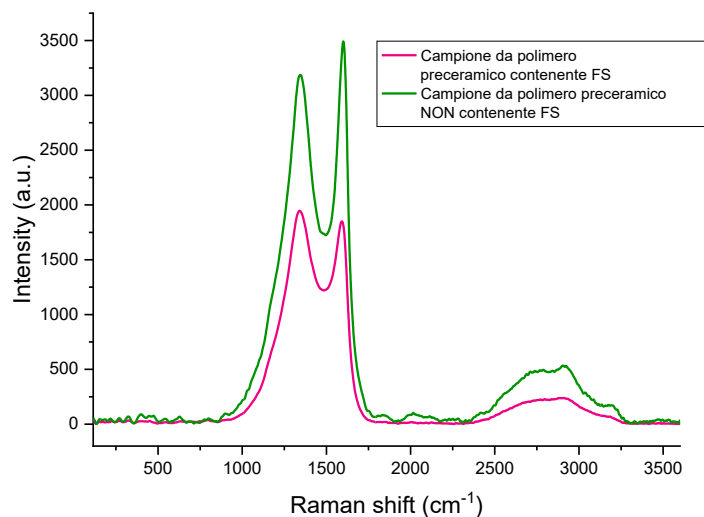


Figura 69: Spettri Raman dei campioni 70S30C da polimero preceramico contenente FS (in verde) e non contenente FS (in magenta) a confronto.

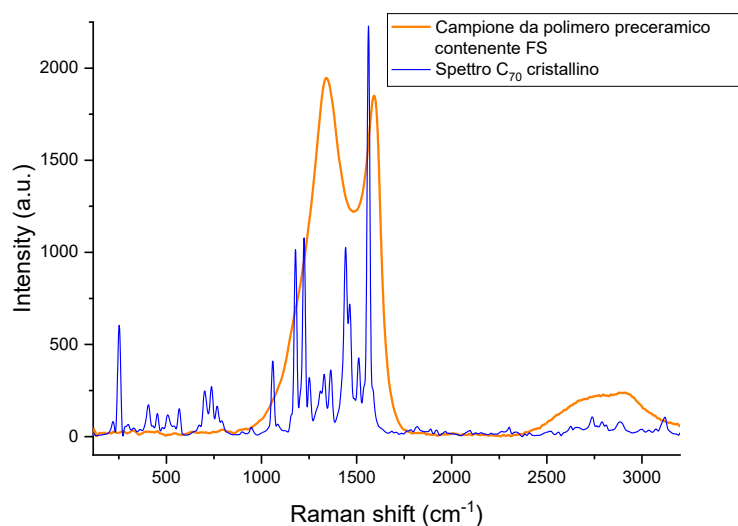


Figura 70: Spettro del carbonio C₇₀ cristallino (in blu) a confronto con lo spettro di campione 70S30C da polimero preceramico contenente FS (in arancione)

7.1.9. ANALISI AL SEM

Spettri EDS

Con l'utilizzo della Spettroscopia EDS si possono ricavare gli spettri EDS. Questi spettri possono essere sfruttati per valutare l'effettiva composizione della matrice del biovetro in esame.

In Figura 71 è mostrato lo spettro EDS rilevato in una zona ad alta concentrazione di calcite di uno scaffold verde in biovetro 70S30C da polimero preceramico senza FS: si osserva come il picco

relativo al calcio e all'ossigeno sia molto maggiore rispetto a quello relativo al silicio. Si nota anche la presenza di carbonio e di azoto. Quest'ultimo è presente perché, essendo un campione non trattato termicamente, c'è una concentrazione di calcio nitrato, precursore dell'ossido di calcio ma anche della calcite.

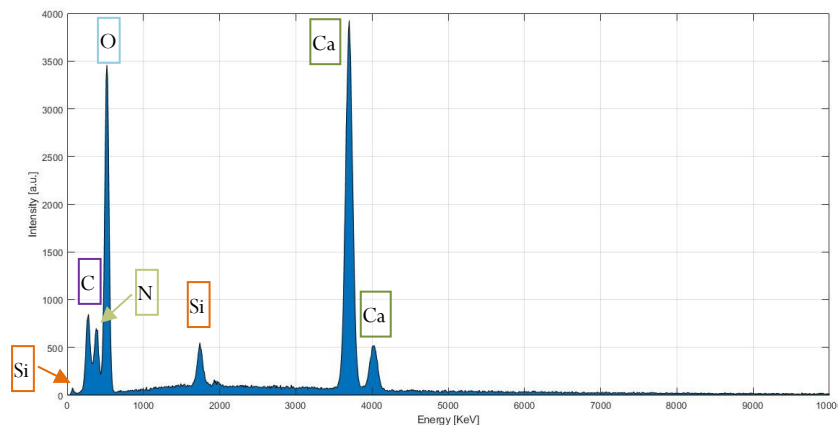


Figura 71: Spettro EDS in una zona ad alta concentrazione di calcite di uno scaffold in biovetro 70S30C da polimero preceramico non contenente FS con struttura a giroide prima del trattamento termico.

In Figura 72 è mostrato lo spettro EDS rilevato nella matrice di uno scaffold in biovetro 70S30C da polimero preceramico con FS: come ci si aspetta, prevale la concentrazione di silicio e ossigeno grazie alla presenza dei numerosi legami Si-O-Si. È presente anche il calcio e il carbonio dato soprattutto dal carbonio pirolitico nella matrice. È assente il picco relativo all'azoto e questo indica che non ci sono residui di calcio nitrato nel campione ceramizzato. In Figura 73 è, invece, riportato lo spettro EDS rilevato in una zona ad alta concentrazione di calcite di uno scaffold in biovetro 70S30C da polimero preceramico con FS: come nel caso non trattato termicamente, l'altezza del picco del calcio prevale su quella relativa al picco del silicio ma, a differenza dello spettro in Figura 71, l'altezza del picco del calcio è la metà e la quantità di ossigeno è inferiore.

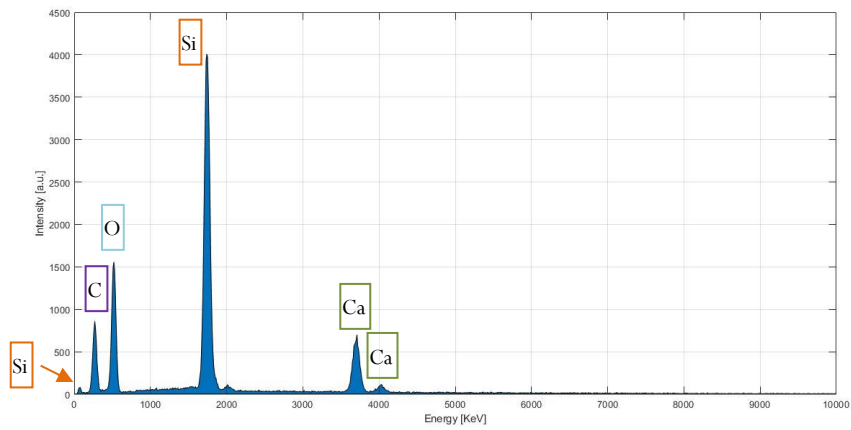


Figura 72: Spettro EDS della matrice di uno scaffold in biovetro 70S30C da polimero preceramico contenente FS con struttura a giroide dopo il trattamento termico.

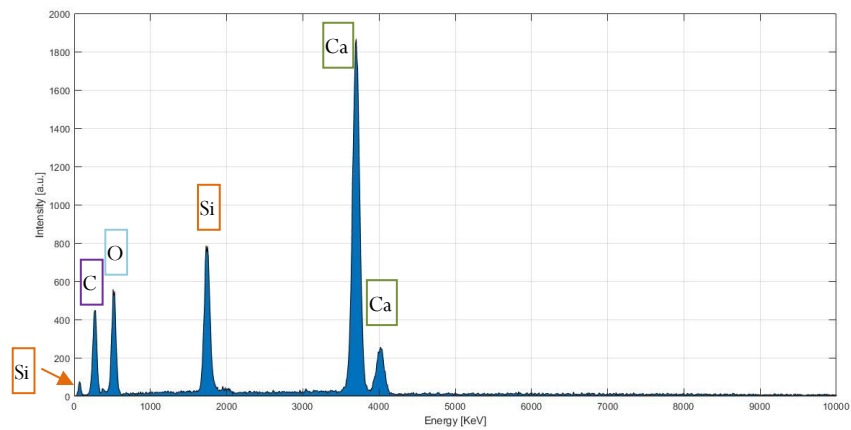


Figura 73: Spettro EDS in una zona ad alta concentrazione di calcite di uno scaffold in biovetro 70S30C da polimero preceramico contenente FS con struttura a giroide dopo il trattamento termico.

Le stesse osservazioni si possono fare osservando gli spettri EDS di uno scaffold in biovetro 70S30C da polimero preceramico senza FS: in Figura 74 è riportato lo spettro relativo alla matrice e la quantità di silicio è comparabile con quella registrata nello scaffold da polimero preceramico con FS mentre la quantità di calcio è lievemente inferiore. In Figura 75, invece, è mostrato lo spettro relativo ad una zona di alta concentrazione di calcite e, come previsto, il picco del calcio prevale sugli altri, soprattutto su quello relativo al silicio.

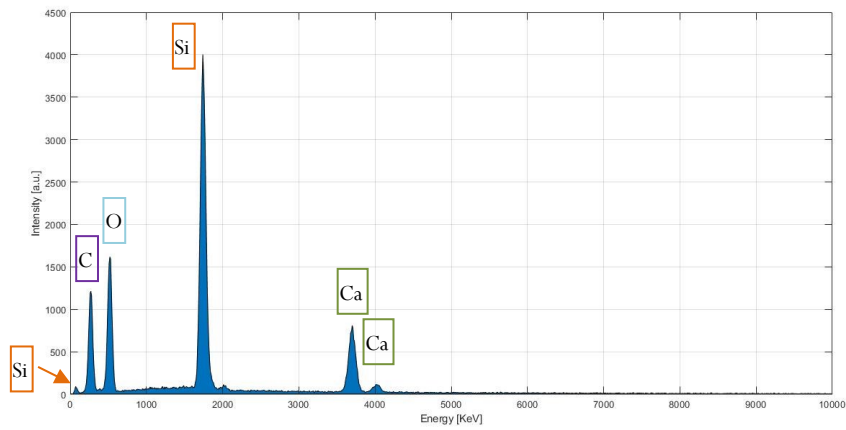


Figura 74: Spettro EDS della matrice di uno scaffold in biovetro 70S30C da polimero preceramico non contenente FS con struttura a giroide dopo il trattamento termico.

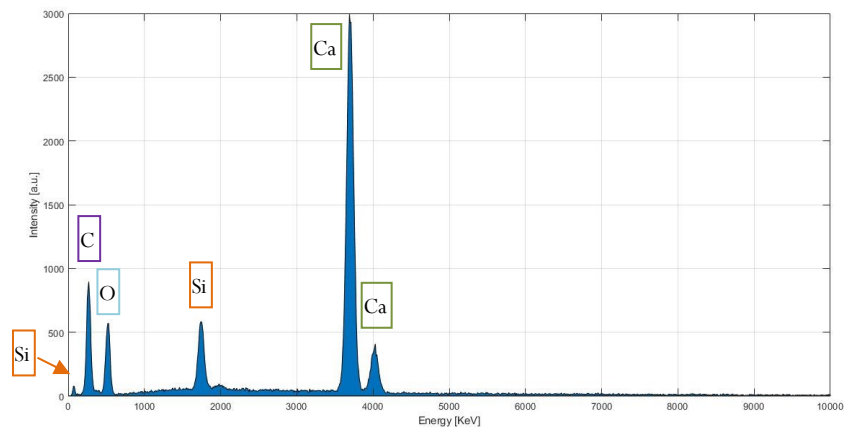


Figura 75: Spettro EDS in una zona ad alta concentrazione di calcite di uno scaffold in biovetro 70S30C da polimero preceramico non contenente FS con struttura a giroide dopo il trattamento termico.

Conferma della composizione del biovetro 70S30C

Dagli spettri EDS si può ricavare la quantità relativa agli elementi presenti e agli ossidi. È interessante considerare gli ossidi di silicio e di calcio per confermare l'effettiva composizione del biovetro che teoricamente è composto dal 70% di SiO_2 e dal 30% di CaO . Per quanto riguarda lo scaffold da polimero preceramico contenente FS, l'ossido di silicio è presente all' 80,41% mentre l'ossido di calcio al 19,59%. Lo spettro relativo allo scaffold da polimero preceramico non contenente FS, invece, fornisce il 77,09% di ossido di silicio e il 22,91% di ossido di calcio. Questi risultati sono stati calcolati considerando i valori di mole %. In entrambi i casi, la percentuale di ossido di silicio è maggiore al valore atteso: è necessario considerare che una minima parte del silicio si lega al carbonio per formare il carburo di silicio che non è rilevabile con l'analisi degli ossidi. Dall'altra parte, la percentuale di ossido di calcio è inferiore al valore atteso: questo indica

che una parte del calcio forma ossido di calcio mentre una parte degli atomi di calcio sono concentrati nelle zone attribuite alla calcite.

È stata eseguita un'analisi degli ossidi anche in una zona ad alta concentrazione di calcite in uno scaffold verde da polimero preceramico non contenente FS. La percentuale di ossido di azoto e di calcio prevalgono notevolmente sulla silice ma è più corretto affermare che sono gli atomi di azoto e di calcio ad essere presenti in grande quantità perché il campione non è ceramizzato. Gli atomi di azoto e calcio sono attribuibili al calcio nitrato che diventa poi calcite nella zona analizzata.

Miscela	Ossido	Peso [%]	Mole [%]	%
Con FS	SiO ₂	35,92	29,68	80,41
	CaO	8,17	7,23	19,59
Senza FS	SiO ₂	28,69	23,19	77,09
	CaO	7,95	6,89	22,91
Senza FS pre trattamento termico in una zona di concentrazione della calcite	N ₂ O ₅	49,55	32,07	42,41
	SiO ₂	2,52	2,93	3,87
	CaO	32,58	40,62	53,72

Tabella 12: Percentuali di ossidi negli scaffold ottenuti con i due tipi di miscele.

Verifica della distribuzione dei principali elementi nei campioni

Oltre alla misurazione dei raggi X emessi dagli elettroni durante un'analisi al microscopio elettronico a scansione, possono essere catturati dei segnali di fluorescenza X attraverso delle mappe EDS. In Figura 76a è riportata l'immagine di riferimento su cui si basa l'analisi in un campione verde contenente FS e si osservano molte zone in cui è accumulato il calcio nitrato da cui origina la calcite. In Figura 76b si osservano le mappe di fluorescenza di carbonio, azoto, ossigeno silicio e calcio combinate insieme mentre in Figura 76c,d,e,f si osservano le mappe per ogni singolo elemento. Confrontando la mappa del calcio con l'immagine di riferimento si osserva come in corrispondenza delle zone chiare ci sia un'alta concentrazione di calcio ma anche di azoto al contrario del silicio che sembra non essere presente. Quest'ultimo è omogeneamente distribuito nel resto dell'area così come il carbonio e l'ossigeno. In Figura 77a è riportata la foto

di riferimento di un campione verde senza silice colloidale mentre in Figura 77b si osservano le mappe di fluorescenza degli elementi analizzati. Confrontando l'immagine di riferimento con quella in Figura 77g si vede, come nel caso precedente, che le zone più chiare sono associate ad un'alta concentrazione di calcio ma anche di ossigeno e azoto come mostrato nelle mappe relative a questi elementi. Il carbonio e il silicio sono distribuiti in modo uniforme nella matrice come si vede in Figura 77c e f.

Le figure successive sono, invece, riferite a campioni trattati termicamente in azoto. In particolare in Figura 78 si osserva un'area sulla superficie di un campione da polimero preceramico contenente FS mentre in Figura 79 si osserva un'area sulla superficie di un campione da polimero preceramico non contenente FS. Rispetto ai campioni non trattati termicamente, si nota una maggiore omogeneizzazione generale degli elementi in entrambi i casi ad eccezione delle zone in cui c'è un accumulo di calcite dove si concentra il calcio e il silicio è quasi assente come mostrato in Figura 78e ed f. In Figura 79 si nota come nel campione da polimero preceramico non contenente FS la distribuzione degli elementi sia molto omogenea ma, a differenza del campione in Figura 78, si notano delle striature associate ad una separazione di fase: è presente una fase vetrosa meno calcica dove è maggiore il contenuto di silicio e una fase prettamente calcica che dà origine ai carbonati in cui c'è maggior concentrazione di calcio.

In conclusione, l'aggiunta della silice colloidale sfavorisce la formazione di un materiale bifasico consentendo una minore fuoriuscita del sale di calcio da cui origina la calcite ma la miscela favorisce lo scattering e sono più marcati gli strati di stampa.

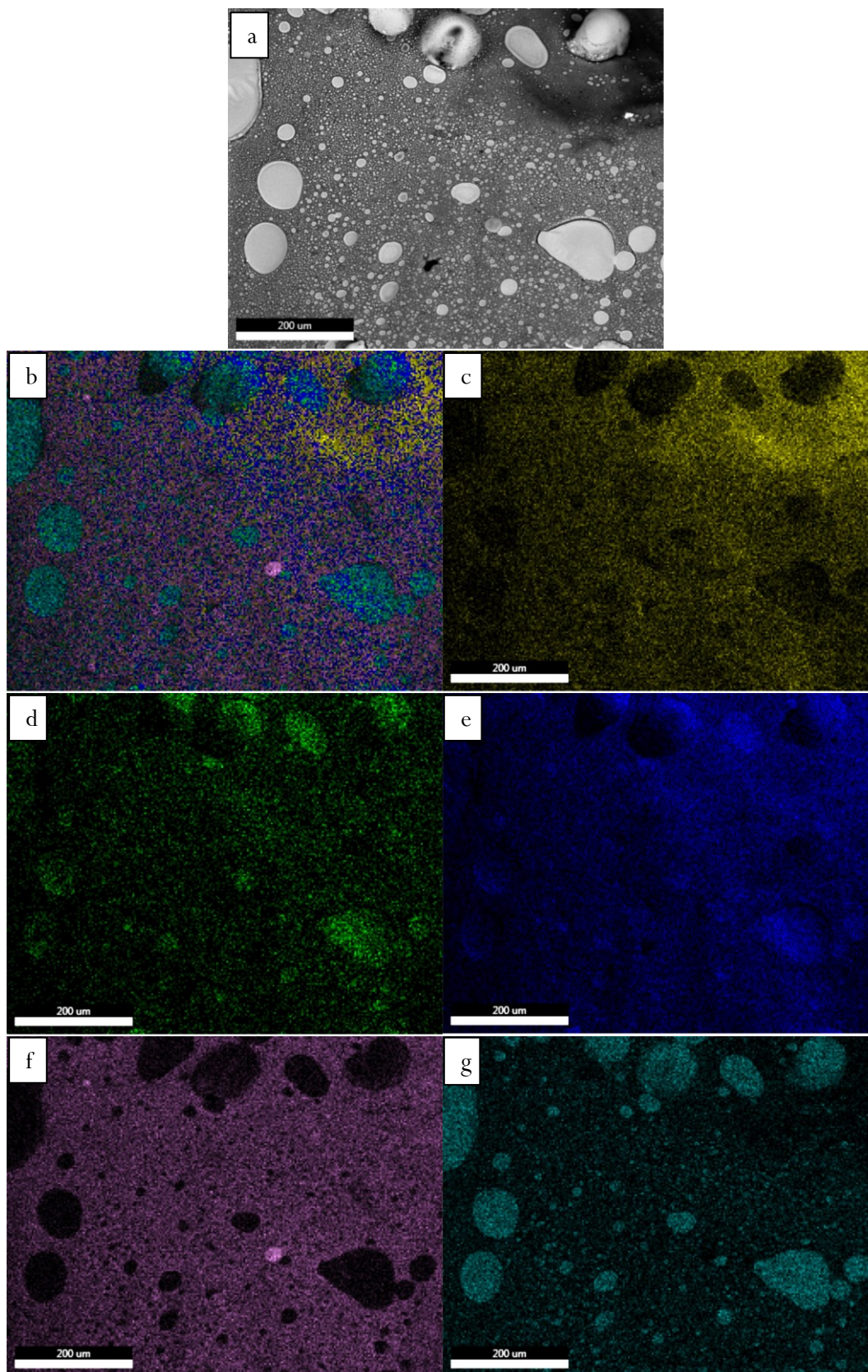


Figura 76: Mappe EDS di un campione verde con FS. a) area di riferimento; b) mappa combinata di C, N, O, Si e Ca; c) mappa di C (16%); d) mappa di N (3%); e) mappa di O (25%); f) mappa di Si (39%); g) mappa di Ca (17%)

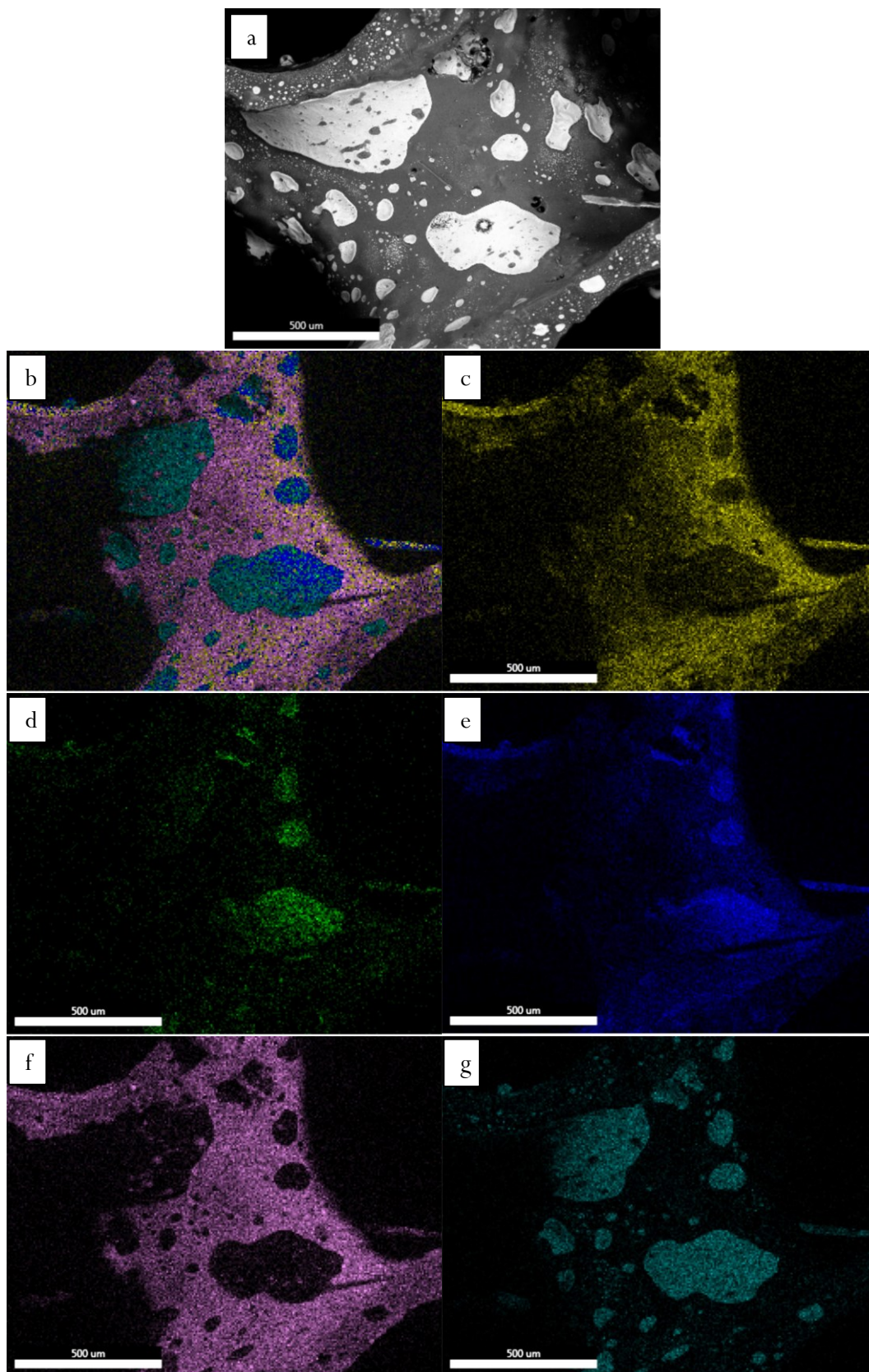


Figura 77: Mappe EDS di un campione verde senza FS. a) area di riferimento; b) mappa combinata di C, N, O, Si e Ca; c) mappa di C (20%); d) mappa di N (2%); e) mappa di O (24%); f) mappa di Si (35%); g) mappa di Ca (18%)

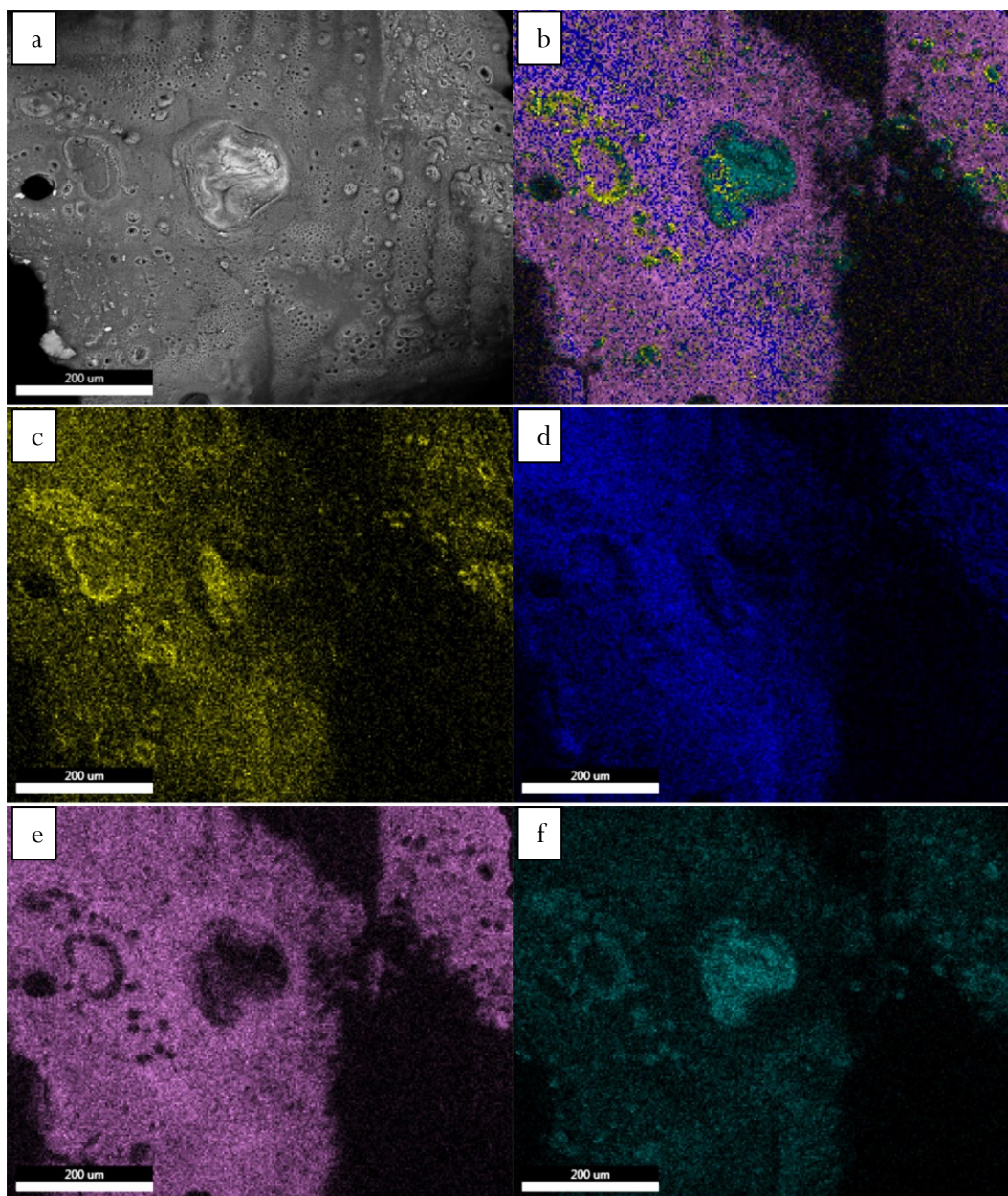


Figura 78: Mappe EDS di un campione da polimero preceramico contenente FS. a) area di riferimento; b) mappa combinata di C, O, Si e Ca; c) mappa di C (10%); d) mappa di O (19%); e) mappa di Si (54%); f) mappa di Ca (17%)

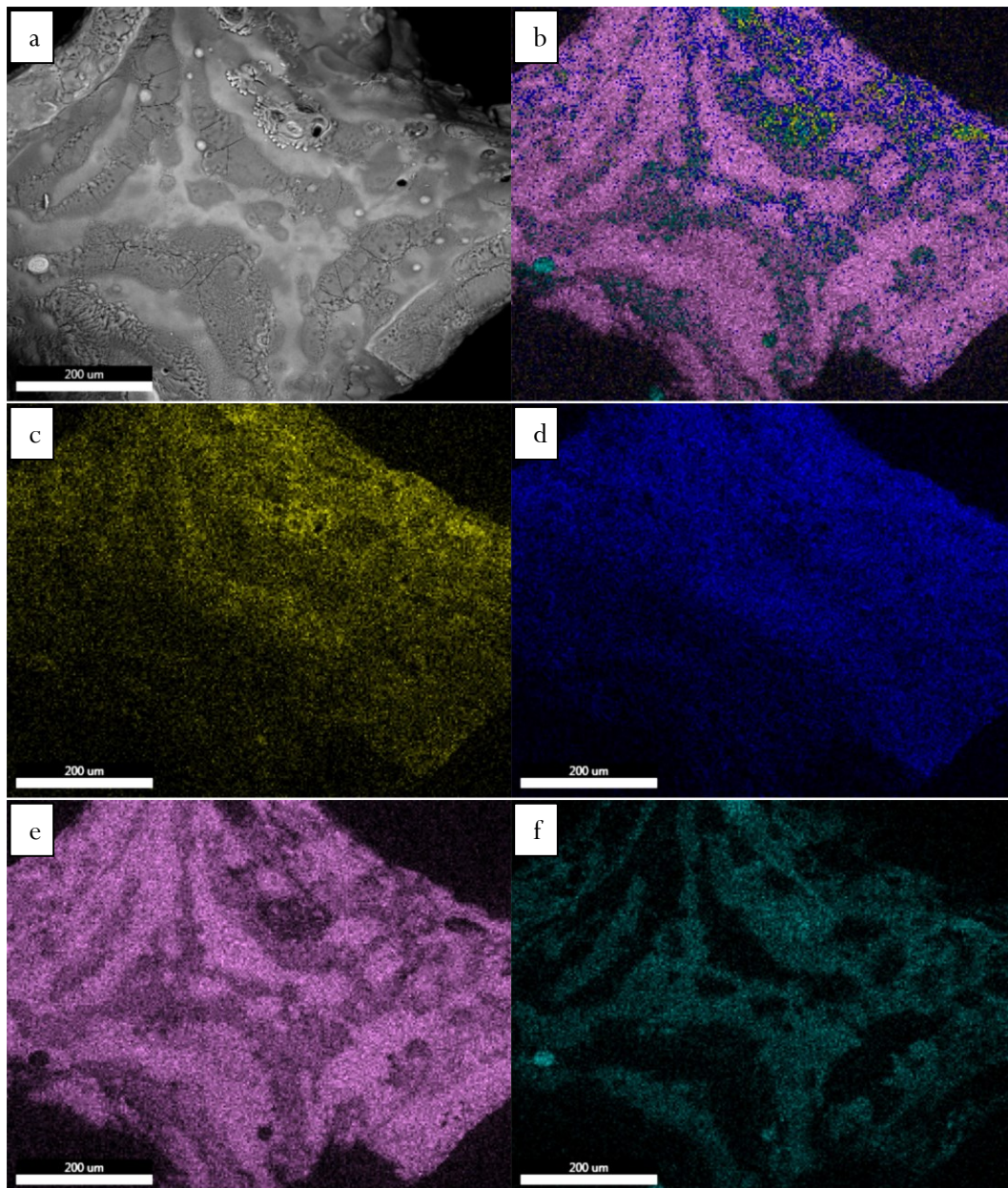


Figura 79: Mappe EDS di un campione da polimero preceramico non contenente FS. a) area di riferimento; b) mappa combinata di C, O, Si e Ca; c) mappa di C (9%); d) mappa di O (16%); e) mappa di Si (61%); f) mappa di Ca (13%)

7.1.10. VALUTAZIONE DEL pH

Il contenitore utilizzato per questo esperimento contiene 50 mL di acqua distillata. Il campione con massa maggiore (m_{max}) è un campione di biovetro 70S1515 (70% ossido di silicio, 15% ossido di calcio e 15% ossido di sodio) ed è stato preso come riferimento ed immerso in 50 mL di acqua. I campioni di riferimento e i campioni in biovetro 70S30C sono stati immersi in una minore quantità di acqua perché hanno massa minore.

Nello specifico l'acqua è stata calcolata con la proporzione:

$$50 \text{ (mL)} : m_{max} \text{ (g)} = x \text{ (mL)} : m_{campione} \text{ (g)}$$

Confrontando i campioni in biovetro 70S30C con quelli in Biosilicate®, si osserva nel grafico in Figura 80 un maggior rilascio di ioni, soprattutto nel caso del riferimento trattato termicamente in aria. Tutti i campioni presentano un rapido rilascio nelle prime ore confermato da un aumento del pH e un plateau dopo 5 ore.

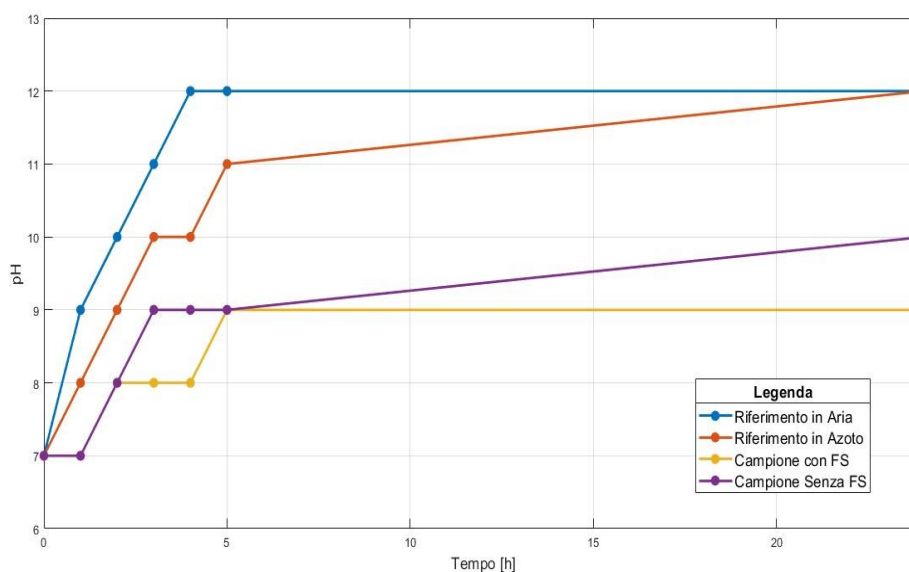


Figura 80: Variazione del pH dei campioni in acqua distillata

7.1.11.EFFETTO FOTOTERMICO

Per valutare l'effetto fototermico, è stato allestito un semplice set up sperimentale come mostrato in Figura 81 posizionando i campioni sopra una piastra refrattaria e sotto ad una lampada UV posta ad una distanza di circa 5 cm. In Figura 82 a sinistra è misurata la temperatura dei campioni di riferimento in Biosilicate® prima di accendere la lampada: si nota che i campioni sono dello stesso colore e quindi sono entrambi alla stessa temperatura di circa 22°C. A destra, invece, è misurata la temperatura del campione trattato termicamente in azoto dopo 30 s e si osserva come rapidamente esso abbia raggiunto una temperatura di circa 81°C al contrario del campione ceramizzato in aria che, nonostante accumuli calore, ha una temperatura notevolmente minore. In Figura 83 a sinistra è riportata la foto termica che indica la temperatura dello scaffold a diamante contenente silice idrofoba a luce spenta. A destra, è riportata la temperatura dello scaffold dopo 30 s dall'accensione della luce UV: viene raggiunta una temperatura inferiore (circa 74°C) rispetto al riferimento in Biosilicate® ma comunque sufficiente per l'eventuale sterilizzazione. In Figura 84 a sinistra è riportata la foto termica che indica la temperatura dello scaffold a diamante non contenente silice idrofoba a luce spenta. A destra, è riportata la temperatura dello scaffold dopo 30 s dall'accensione della luce UV: anche in questo caso viene raggiunta una temperatura inferiore (circa 76°C) rispetto al riferimento in Biosilicate®.

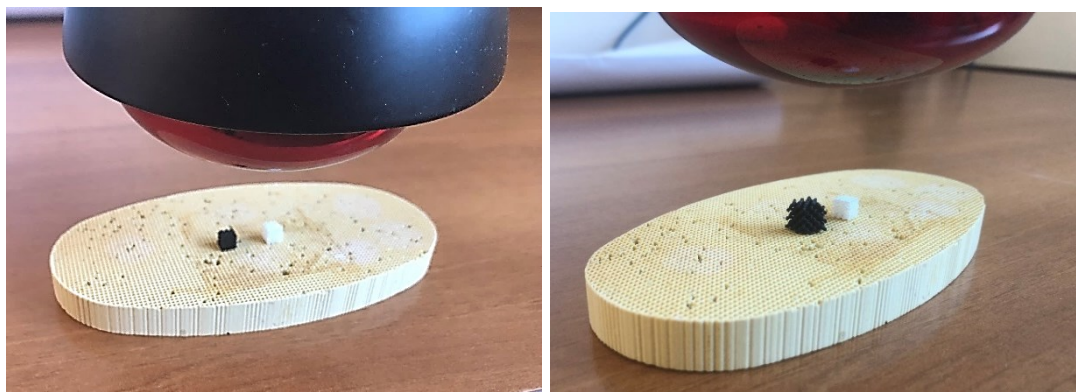


Figura 81: Set up sperimentale. A sinistra, campioni in Biosilicate®e trattati termicamente in azoto (campione scuro) e in aria (campione bianco). A destra, campione in biovetro 70S30C (scaffold a diamante) con a fianco il campione in Biosilicate® in aria.

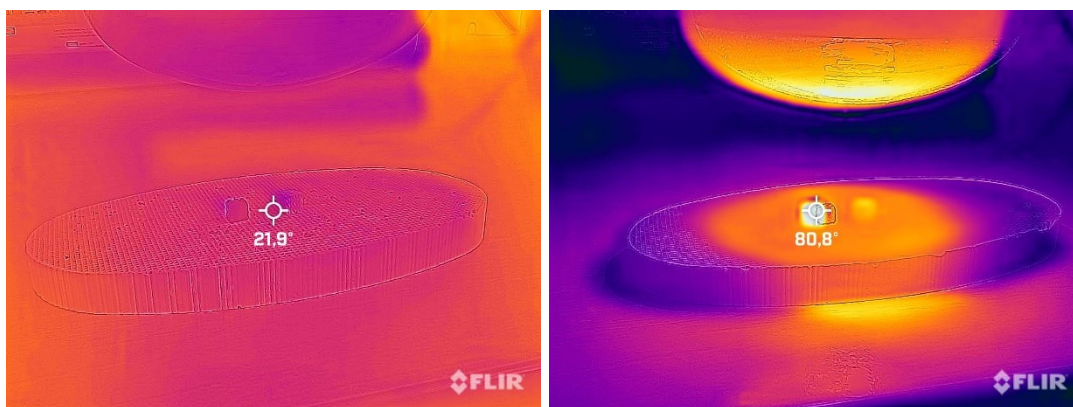


Figura 82: Foto termiche. A sinistra, temperatura dei campioni di riferimento con luce UV spenta. A destra, temperatura del campione di riferimento ceramizzato in azoto dopo 30 s di esposizione alla luce UV.

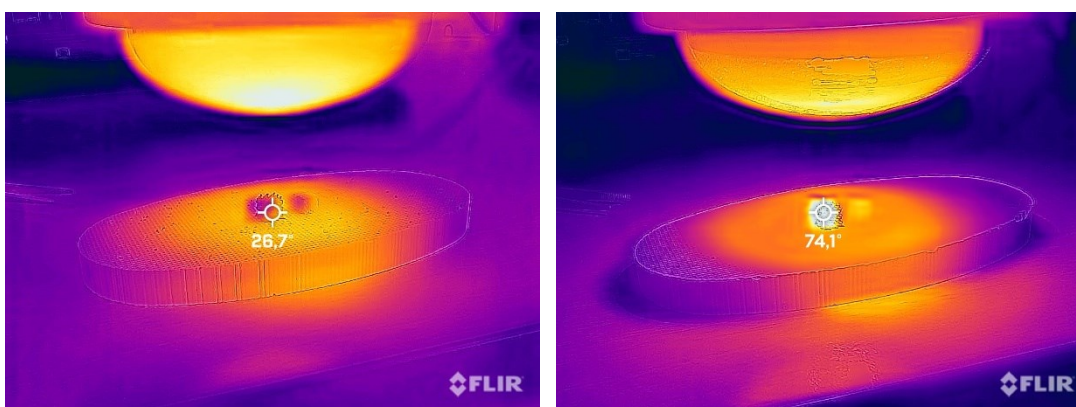


Figura 83: Foto termiche. A sinistra, temperatura dei campioni con luce UV spenta. A destra, temperatura del campione ceramizzato con FS in azoto dopo 30 s di esposizione alla luce UV.

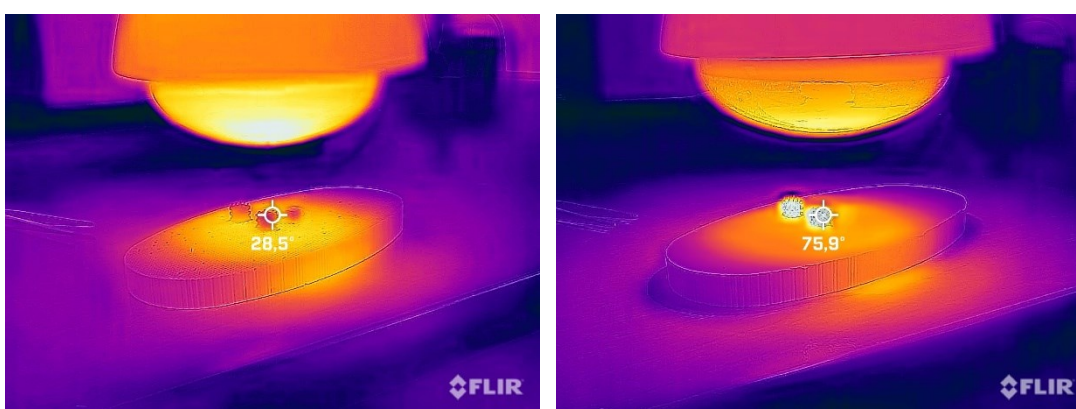


Figura 84: Foto termiche. A sinistra, temperatura dei campioni con luce UV spenta. A destra, temperatura del campione non contenente FS ceramizzato in azoto dopo 30 s di esposizione alla luce UV.

8. CONCLUSIONI

Durante il lavoro svolto per questa tesi, è stato studiato e analizzato il biovetro 70S30C che ha una composizione chimica meno ricca rispetto al Bioglass® ma è altrettanto biocompatibile, biodegradabile e bioattivo. La tecnologia utilizzata è la stampa additiva di tipo stereolitografico (in particolare MSLA), una tecnica più nuova e semplice rispetto al sol-gel già in uso per la produzione dei vetri bioattivi. Le miscele prodotte, sia quella contenente FS che quella senza FS, sono facilmente stampabili anche se la seconda non è stabile e con il tempo si formano dei sedimenti di sale.

I risultati ottenuti dalle prove di compressione combinati con le relazioni del modello di Gibson-Ashby hanno permesso di ricavare l'effettiva resistenza degli scaffold che risulta essere notevolmente maggiore nel caso della struttura a giroide come ci si aspettava date le caratteristiche particolari del modello stesso che consentono di distribuire il carico in modo più uniforme anche con una porosità maggiore.

Dalle immagini al microscopio ottico non si notano particolari depositi superficiali o separazioni di fase ma, osservando i campioni con struttura a giroide al microscopio elettronico a scansione, si nota la presenza di zone sia superficiali che profonde ad alta concentrazione di carbonato di calcio, soprattutto nei campioni non trattati termicamente. Attraverso l'analisi XRD si conclude che il materiale ottenuto è amorfo a meno della formazione della fase cristallina riconducibile alla calcite e la spettroscopia Raman conferma che non sono presenti fasi di carbonio cristallino. La spettroscopia FTIR mostra un'elevata quantità di legami Si-O-Si caratteristici del reticolo di silice e di legami Si-C=C che indica l'interazione tra gli atomi di silicio del reticolo vetroso con la fase di carbonio amorfo o pirolitico che si è confermato avere un marcato effetto fototermico quando il campione viene esposto a luce infrarossa. Ulteriori analisi sono state eseguite al SEM rilevando di spettri EDS: la composizione del biovetro 70S30C è stata confermata con l'analisi degli ossidi e nelle zone chiare è presente un'alta concentrazione di calcio, carbonio e ossigeno, ulteriore conferma della presenza di zone ad alta concentrazione di carbonato di calcio. Infine, sono state analizzate delle mappe EDS che mostrano i segnali di fluorescenza X del calcio e del silicio: si osserva come entrambi gli elementi siano distribuiti in modo uniforme nella matrice tranne nelle zone chiare dove c'è un'elevata concentrazione di calcio.

La formazione della calcite non è un problema dal punto di vista biologico perché è biocompatibile e, attraverso una veloce analisi del pH, il rilascio di ioni alza moderatamente il pH fino ad un valore tollerato dalle cellule ma la sua formazione crea un materiale bifasico, una fase vetrosa e una fase calcica che porta alla nascita dei carbonati. La presenza di due fasi peggiora le performance meccaniche perché si possono creare delle cricche tra le due a causa di una concentrazione delle tensioni nella zona di discontinuità materiale. Inoltre, l'osservazione al SEM della composizione degli scaffold non trattati termicamente

permette di concludere che il carbonato di calcio è in quantità notevolmente maggiore negli scaffold verdi e che il trattamento termico ne elimina gran parte.

I risultati ottenuti mostrano con successo che è possibile ottenere uno scaffold in biovetro 70S30C paziente specifico ad elevata resistenza e porosità con tecnica additiva, più semplice e meno costosa rispetto al processo sol-gel. Inoltre, rispetto ai generici materiali ceramici, questo materiale viene trattato termicamente a bassa temperatura e la fase di carbonio amorfo rende il materiale adatto ad una sterilizzazione ad infrarossi.

Per valutare l'effettiva biocompatibilità e bioattività del materiale nonché la reazione all'innalzamento del pH da parte del corpo, devono essere eseguiti dei saggi in vitro per osservare l'adesione e la proliferazione di cellule osteoprogenitrici.

Sviluppi futuri prevedono l'utilizzo di una resina colorata per capire se durante la stampa stereolitografica si ottiene un elevato grado di polimerizzazione e un indurimento maggiore del reticolo che imprigiona gli ioni Ca^{2+} e non permette la formazione della calcite. Un'altra modifica può essere eseguita durante la preparazione delle miscele: è possibile che lo scioglimento del sale di calcio non sia completo e la macinazione o l'aumento del tempo a cui la miscela è sottoposta agli ultrasuoni può migliorare la dispersione del sale.

La formazione di zone in cui si concentra il calcio nitrato negli scaffold verdi può essere sfruttata per la creazione di nuove porosità: immergendo i campioni in acqua sufficientemente calda, il calcio nitrato superficiale si scioglie rendendo la superficie più porosa e più rugosa, condizioni molto apprezzate dalle cellule.

Un'altra modifica può essere fatta a livello composizionale, includendo anche dei precursori dell'ossido di sodio e di fosforo, presenti nel Bioglass 45S5® che rendono il materiale più solubile e bioattivo.

Questi studi hanno lo scopo di sviluppare una nuova tecnologia di produzione dei vetri bioattivi in modo da consentire una futura commercializzazione di sostituti ossei paziente-specifico più economici e più veloci da produrre. La bioingegneria nel campo dei biomateriali indica il lavoro sinergico dell'ingegneria dei materiali, delle biotecnologie, della chimica e della medicina per migliorare e formulare materiali innovativi per la sostituzione degli organi o parte di essi con l'obiettivo, un giorno, di risolvere il problema della carenza di organi da donatore che vanno incontro a incompatibilità con il ricevente e, soprattutto, provengono da pazienti anziani e dunque hanno una funzionalità già in parte compromessa.

BIBLIOGRAFIA

1. Martini, Tallitsch, Nath. *Anatomia Umana*. s.l. : EdiSES UNIVERSITÀ, 2020.
2. *Hierarchical Structures of Bone and Bioinspired Bone Tissue Engineering*. Yan Liu, Dan Luo, Tie Wang. 2016, Small.
3. *Biomimetic and mesoporous nano-hydroxyapatite for bone tissue application: a short review*. Giulia Molino, Maria Chiara Palmieri, Giorgia Montalbano, Sonia Fiorilli and Chiara Vitale-Brovarone.
4. *Bone remodeling*. Hadjidakis DJ, Androulakis II. 2006.
5. OrthoInfo. [Online] American Academy of Orthopaedic Surgeons, 1995. [Riportato: 13 luglio 2022.] <https://orthoinfo.aaos.org/en/diseases--conditions/osteoporosis/>.
6. *Fracture Healing Overview*. Jonathon R. Sheen, Vishnu V. Garla. 2022.
7. OrthoInfo. [Online] American Academy of Orthopaedic Surgeons, 1995. [Riportato: 13 luglio 2022.] <https://orthoinfo.aaos.org/en/diseases--conditions/bone-tumor/>.
8. *Bone Mechanical Properties in Healthy and Diseased States*. Elise F. Morgan, Ginu U. Unnikrisnan, and Amira I. Hussein. 2018.
9. *Influence of microdamage on fracture toughness of the human femur and tibia*. T.L.Norman, Y.N.Yeni, C.U.Brown, Z.Wang. 1998.
10. *Advanced Glycation Endproducts and Bone Material Properties in Type 1 Diabetic Mice*. Rubin MR, Paschalis EP, Poundarik A, Sroga GE, McMahon DJ, Gamsjaeger S, et al. 2016.
11. Bonemat. [Online] BIOENGINEERING AND COMPUTING LABORATORY (BIC), 2019. <http://www.bonemat.org/>.
12. *Characterization and comparison of hyper-viscoelastic properties of normal and osteoporotic bone using stress-relaxation experiment*. Yasaman Niki, Alireza Seifzadeh. s.l. : Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials, 2021, Vol. 123.
13. *Relationships between tissue composition and viscoelastic properties in human trabecular bone*. X. Ojanen, H. Isaksson, J. Töyräs, M.J. Turunen, M.K.H. Malo, A. Halvari, J.S. Jurvelin. s.l. : Journal of Biomechanics, 2015, Vol. 48.
14. *Analysis of anisotropic viscoelastoplastic properties of cortical bone tissues*. Adel A. Abdel-Wahab, Khurshid Alam, Vadim V. Silberschmidt. s.l. : Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials, 2011, Vol. 4.
15. *Twenty-first century challenges for biomaterials*. Larry L. Hench, Ian Thompson. s.l. : Journal of the royal society interface, 2010.

16. *Ultra-High Molecular Weight Polyethylene/Titanium-Hybrid Implant for Bone-Defect Replacement.* Maksimkin, A.V., et al. s.l. : Materials, 2020, Vol. 13.
17. *Ultra-High-Molecular-Weight-Polyethylene (UHMWPE) as a Promising Polymer Material for Biomedical Applications: A Concise Review.* Hussain, M., et al. 323, s.l. : Polymers , 2020, Vol. 12.
18. *Ultra-high-molecular-weight Polyethylene (UHMWPE) Wing Method for Strong Cranioplasty.* Kazuki KOBAYASHI, Tadato YUKIUE, Hideyuki YOSHIDA, Nobushige TSUBOI, Yuu TAKAHASHI, Keigo MAKINO, Ryu KIMURA, Ryo MIZUTA, Susumu SASADA, Tomoyuki OGAWA, Noriyuki NAGAYAMA, Takao YASUHARA, Isao DATE. s.l. : Neurologia medico-chirurgica, 2021, Vol. 61.
19. *Improving the surface properties of an UHMWPE shoulder implant with an atmospheric pressure plasma jet.* Van Vrekhem, S., Vloebergh, K., Asadian, M. et al. 4720, s.l. : scientific reports, 2018, Vol. 8.
20. *Adaptive Mechanism for Designing a Personalized Cranial Implant and Its 3D Printing Using PEEK.* Mian, S.H., et al. 1266, s.l. : Polymers, 2022, Vol. 14.
21. *Clinical application of 3D-printed PEEK implants for repairing mandibular defects.* Yunpeng Li, Zhiye Li, Lei Tian, Dichen Li, Bin Lu, Changquan Shi, Qiang Niu, Fuwei Liu, Liang Kong, Junrui Zhang. s.l. : Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery, 2022.
22. *The Chronicle of a Stainless Steel Orthopaedic Implant.* Kempland C. Walley BcS, Mergim Bajraliu BcS, Tyler Gonzalez MD, MBA, Ara Nazarian PhD. s.l. : The Orthopaedic Journal, 2016, Vol. 17.
23. *A review on nanostructured stainless steel implants for biomedical application.* Peyman Mahmoudi Hashemi, Ehsan Borhani , Mohammad Sadegh Nourbakhsh. s.l. : Nanomedicine Journal, 2016, Vol. 3.
24. Carlo Di Bello, Andrea Bagno. *Biomateriali: dalla scienza dei materiali alle applicazioni cliniche.* s.l. : Pàtron Editore, 2018.
25. *Review on titanium and titanium based alloys as biomaterials for orthopaedic applications.* Manmeet Kaur, K. Singh. s.l. : Materials Science and Engineering, 2019, Vol. 102.
26. *Evolution of Alumina-on-Alumina Implants.* Sedel, Laurent MD. s.l. : Clinical Orthopaedics and Related Research, 2000, Vol. 379.
27. *Basic properties and types of zirconia: An overview.* Serkan Saridag, Onjen Tak, Gamze Alniacik. s.l. : World Journal of Stomatology, 2013, Vol. 2.
28. *Is zirconia a viable alternative to titanium for oral implant? A critical review.* Karthik Sivaraman, Aditi Chopra, Aparna I. Narayan, Dhanasekar Balakrishnan. s.l. : Journal of Prosthodontic Research, 2018, Vol. 62.
29. *Zirconia versus titanium in dentistry: A review.* HANAWA, Takao. s.l. : Dental Materials Journal, 2020, Vol. 39.

30. 5 - *Biopolymer-based biodegradable biomaterials for in vivo and in vitro biomedical applications*. S.I. Magagula, M. Mohapi, N. Jafta, M.J. Mochane, K. Lebelo, G.G. Lenetha. s.l. : Polymeric Biomaterials for Healthcare Applications, 2022.
31. *In Situ Hydroxyapatite Synthesis Enhances Biocompatibility of PVA/HA Hydrogels*. Chocholata P, Kulda V, Dvorakova J, Supova M, Zaloudkova M, Babuska V. s.l. : International Journal of Molecular Sciences, 2021, Vol. 22.
32. *Development of a novel biodegradable porous iron-based implant for bone replacement*. Wegener, B., Sichler, A., Milz, S. et al. 9141, s.l. : scientific reports, 2020, Vol. 10.
33. *Investigation of Mg-xLi-Zn alloys for potential application of biodegradable bone implant materials*. Li, J., Zhou, P., Wang, L. et al. 43, s.l. : Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 2021, Vol. 32.
34. *Biodegradable Magnesium Alloys Promote Angio-Osteogenesis to Enhance Bone Repair*. Hyung-Seop Han, Indong Jun, Hyun-Kwang Seok, Kang-Sik Lee, Kyungwoo Lee, Frank Witte, Diego Mantovani, Yu-Chan Kim, Sion Glyn-Jones, James R. Edwards. 15, s.l. : Advanced Science, 2020, Vol. 7.
35. *Hydroxyapatite reinforced Ti6Al4V composites for load-bearing implants*. Jose D. Avila, Kevin Stenberg, Susmita Bose, Amit Bandyopadhyay. s.l. : Acta Biomaterialia, 2021, Vol. 123.
36. *Synthetic hydroxyapatite and its use in bioactive coatings*. Luis Daniel Guillen-Romero, Mercedes Teresita Oropeza-Guzmán, Eduardo Alberto López-Maldonado, Ana Leticia Iglesias, Juan Antonio Paz-González, Theodore Ng, Eduardo Serena-Gómez, Luis Jesús Villarreal-Gómez. s.l. : Journal of applied biomaterials & functional materials, 2019, Vol. 17.
37. *β -tricalcium phosphate for bone substitution: Synthesis and properties*. Marc Bohner, Bastien Le Gars Santoni, Nicola Döbelin. s.l. : Acta Biomaterialia, 2020, Vol. 113.
38. *Effect of Honeycomb β -TCP Geometrical Structure on Bone Tissue Regeneration in Skull Defect*. Watanabe T, Takabatake K, Tsujigiwa H, Watanabe S, Nakagiri R, Nakano K, Nagatsuka H, Kimata Y. s.l. : Materials, 2020, Vol. 13.
39. *Ceravital in ossiculoplasty: Experimental studies and early clinical results*. Blayney, A., Bebear, J., Williams, K., & Portmann, M. s.l. : The Journal of Laryngology & Otology, 1986, Vol. 100.
40. *An introduction to bone tissue engineering*. Perić Kačarević, Željka & Rider, Patrick & Alkildani, Said & Retnasingh, Sujith & Čandrlić, Marija & Schnettler, Reinhard & Gosau, Martin & Smeets, Ralf & Jung, Ole & Barbeck, Mike. s.l. : The International Journal of Artificial Organs, 2019.
41. *Magnesium Alloys With Tunable Interfaces as Bone Implant Materials*. Rahman, Mostafizur & Dutta, Naba & Roy Choudhury, Namita. 2020, Vol. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology.
42. *Scaffold-based Bone Tissue Engineering*. Holzapfel, B.M., Rudert, M. & Hutmacher, D.W. 2017.

43. *Biofunctionalization of bioactive ceramic scaffolds to increase the cell response for bone regeneration*. Annj Zamuner, Paola Brun, Roberta Ciccimarra, Francesca Ravanetti, Lorenzo Veschini, Hamada Elsayed, Stefano Sivoletta, Giovanna Iucci, Andrea Porzionato, Lucy Di Silvio. 5, s.l. : Biomedical Materials, 2021, Vol. 16.
44. *Smart biomaterials: Surfaces functionalized with proteolytically stable osteoblast-adhesive peptides*. Annj Zamuner, Paola Brun, Michele Scorzeto, Giuseppe Sica, Ignazio Castagliuolo, Monica Dettin. s.l. : Bioactive Materials, 2017, Vol. 2.
45. *Hydroxyapatite Surfaces Functionalized with a Self-Assembling Peptide: XPS, RAIRS and NEXAFS Study*. Secchi V, Franchi S, Dettin M, Zamuner A, Beranová K, Vladescu A, Battocchio C, Graziani V, Tortora L, Iucci G. s.l. : Nanomaterials, 2020, Vol. 10.
46. *Mixed zirconia calcium phosphate coatings for dental implants: Tailoring coating stability and bioactivity potential*. Karoline Pardun, Laura Treccani, Eike Volkmann, Philipp Streckbein, Christian Heiss, Giovanni Li Destri, Giovanni Marletta, Kurosch Rezwan. s.l. : Materials Science and Engineering, 2015, Vol. 48.
47. *The story of Bioglass®*. Hench, Larry L. s.l. : Journal of Materials Science, 2006.
48. *Bioactive Glasses: From Parent 45S5 Composition to Scaffold-Assisted Tissue-Healing Therapies*. Fiume E, Barberi J, Verné E, Baino F. s.l. : Journal of Functional Biomaterials, 2018, Vol. 9.
49. *Reinforcing 13–93 bioglass scaffolds fabricated by robocasting and pressureless spark plasma sintering with graphene oxide*. Azadeh Motealleh, Siamak Eqtesadi, Fidel H. Perera, Angel L. Ortiz, Pedro Miranda, Antonia Pajares, Rune Wendelbo. s.l. : Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials, 2019, Vol. 97.
50. *Calcium and potassium addition to facilitate the sintering of bioactive glasses*. Devis Bellucci, Valeria Cannillo, Antonella Sola. s.l. : Materials Letters, 2011, Vol. 65.
51. *Synthesis, Characterization, and Bioactivity Evaluation of Amorphous and Crystallized 58S Bioglass Nanopowders*. Majid Taghian Dehaghani, Mehdi Ahmadian, Mohammadhossein Fathi. s.l. : Applied Ceramic Technology, 2014, Vol. 12.
52. *Bioactivity of gel–glass powders in the CaO-SiO₂ system: A comparison with ternary (CaO-P₂O₅-SiO₂) and quaternary glasses (SiO₂-CaO-P₂O₅-Na₂O)*. Priya Saravanapavan, Julian R. Jones, Russell S. Pryce, Larry L. Hench. 1, s.l. : Journal of Biomedical Materials Research, 2003, Vol. 66A.
53. Schubert, Ulrich. *Chemistry and Fundamentals of the Sol–Gel Process*. [aut. libro] Marcos Zayat David Levy. *The Sol-Gel Handbook*. 2015.
54. *Sol-Gel processing of silica nanoparticles and their applications*. Lok P. Singh, Sriman K. Bhattacharyya, Rahul Kumar, Geetika Mishra, Usha Sharma, Garima Singh, Saurabh Ahalawat. s.l. : Advances in Colloid and Interface Science, 2014, Vol. 214.

55. M. Scheffler, P. Colombo. *Cellular Ceramics: Structure, Manufacturing, Properties and Applications*. 2005.
56. Colombo P., Bernardo E. Cellular Structures. [aut. libro] Chen I-Wei Riedel Ralf. *Ceramics Science and Technology. Vol.1: Structures*. 2008.
57. *Geometric Modeling of Cellular Materials for Additive Manufacturing in Biomedical Field: A Review*. Gianpaolo Savio, Stefano Rosso, Roberto Meneghello, and Gianmaria Concheri. s.l. : Applied Bionics and Biomechanics, 2018, Vol. 2018.
58. *Additive manufacturing of ceramics for dental applications: A review*. Raquel Galante, Celio G. Figueiredo-Pina, Ana Paula Serro. 6, s.l. : Dental Materials, 2019, Vol. 35.
59. *A Review of Stereolithography: Processes and Systems. Processes*. . Huang J, Qin Q, Wang J. s.l. : Process, 2020, Vol. 8.
60. *Engineering of silicone-based blends for the masked stereolithography of biosilicate/carbon composite scaffolds*. Paulina Ožóg, Hamada Elsayed, Luca Grigolato, Gianpaolo Savio, Jozef Kraxner, Dušan Galusek, Enrico Bernardo. s.l. : Journal of the European Ceramic Society, 2022, Vol. 42.
61. Paolo Colombo, Gabriela Mera, Ralf Riedel, Gian Domenico Sorarù. Chapter 7-Polymer-Derived Ceramics: 40 Years of Research and Innovation in Advanced Ceramics. [aut. libro] I-Wei Chen Ralf Riedel. *Ceramics Science and Technology*. 2013.
62. *Polymer-Derived Biosilicate®-like Glass-Ceramics: Engineering of Formulations and Additive Manufacturing of Three-Dimensional Scaffolds*. Dogrul F, Ožóg P, Michálek M, Elsayed H, Galusek D, Liverani L, Boccaccini AR, Bernardo E. 18, s.l. : Materials, 2021, Vol. 14.
63. *Engineering of silicone-based blends for the masked stereolithography of biosilicate/carbon composite scaffolds*. Paulina Ožóg, Hamada Elsayed, Luca Grigolato, Gianpaolo Savio, Jozef Kraxner, Dušan Galusek, Enrico Bernardo. 13, s.l. : Journal of the European Ceramic Society, 2022, Vol. 42.
64. Barbara L Dutrow, Louisiana State University, Christine M. Clark, Eastern Michigan University. Montana State University. *Montana Nanotechnology Facility*. [Online] SERC, 31 August 2022. [Riportato: 2 settembre 2022.]
[https://serc.carleton.edu/msu_nanotech/methods/XRD.html#:~:text=Fundamental%20Principles%20of%20X%20Ray%20Powder%20Diffraction%20\(XRD\)&text=X%20Ray%20diffraction%20is%20based,and%20directed%20toward%20the%20sample..](https://serc.carleton.edu/msu_nanotech/methods/XRD.html#:~:text=Fundamental%20Principles%20of%20X%20Ray%20Powder%20Diffraction%20(XRD)&text=X%20Ray%20diffraction%20is%20based,and%20directed%20toward%20the%20sample..)
65. What is FTIR Spectroscopy? *Merck*. [Online] Merck KGaA, 2022. [Riportato: 2 settembre 2022.]
<https://www.sigmaaldrich.com/IT/it/technical-documents/technical-article/analytical-chemistry/photometry-and-reflectometry/ftir-spectroscopy>.

66. Song, K. 4 - Interphase characterization in rubber nanocomposites. [aut. libro] Hanna J. Maria Sabu Thomas. *In Woodhead Publishing Series in Composites Science and Engineering, Progress in Rubber Nanocomposites*. s.l. : Woodhead Publishing, 2017.
67. Yutaka Kaburagi, Akira Yoshida, Yoshihiro Hishiyama. Raman Spectroscopy-Chapter 7. [aut. libro] Feiyu Kang Michio Inagaki. *Materials Science and Engineering of Carbon*. s.l. : Butterworth-Heinemann, 2016.
68. *Polymer-derived Biosilicate-C composite foams: Phase development and photothermal effect*. Fulden Dogrul, Stefano Bortolin, Davide Del Col, Nicola Dengo, Danilo Pedron, Martin Michalek, Hamada Elsayed, Dušan Galusek, Enrico Bernardo. 16, s.l. : Journal of the European Ceramic Society, 2021, Vol. 41.
69. *Preconditioned 70S30C bioactive glass foams promote osteogenesis in vivo*. Swati Midha, Taek Bo Kim, Wouter van den Bergh, Peter D. Lee, Julian R. Jones, Christopher A. Mitchell. 11, s.l. : Acta Biomaterialia, 2013, Vol. 9.
70. *Preceramic polymer-derived SiOC fibers by electrospinning*. Anran Guo, Martina Roso, Michele Modesti, Jiachen Liu, Paolo Colombo. 3, s.l. : Applied Polymer Science, 2013, Vol. 131.
71. *Additive manufacturing of ceramics from preceramic polymers: A versatile stereolithographic approach assisted by thiol-ene click chemistry*. Xifan Wang, Franziska Schmidt, Dorian Hanaor, Paul H. Kamm, Shuang Li, Aleksander Gurlo. s.l. : Additive Manufacturing, 2019, Vol. 27.
72. *Biosilicate® — A multipurpose, highly bioactive glass-ceramic. In vitro, in vivo and clinical trials*. Murilo C. Crovace, Marina T. Souza, Clever R. Chinaglia, Oscar Peitl, Edgar D. Zanotto. Part A, s.l. : Journal of Non-Crystalline Solids, 2016, Vol. 432.