

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA INDUSTRIALE
CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN INGEGNERIA DEI MATERIALI



TESI DI LAUREA MAGISTRALE

**SINTESI DI MELILITI COMPLESSE DA POLIMERI
PRECERAMICI E FILLERS**

Relatore: Prof. Enrico Bernardo

Correlatori: Dott. Hamada Elsayed

Laureando: RICCARDO DOTTO

ANNO ACCADEMICO 2016 – 2017

Indice

INTRODUZIONE.....	1
CAPITOLO 1 - BIOCERAMICI E LORO APPLICAZIONI	5
1.1 Definizione e classificazione dei biomateriali	5
1.2 Prestazioni dei biomateriali nell'ambiente biologico	8
1.2.1 Tessuto osseo naturale	13
1.3 I bioceramici	14
1.3.1 Ceramici silicatici bioattivi	17
1.3.1.1 <i>Approccio per incrementare le prestazioni</i>	20
1.3.2 Le meliliti e la loro struttura cristallina	22
1.3.2.1 <i>Hardystonite</i>	25
1.3.2.2 <i>Approfondimento sulla soluzione solida</i>	28
CAPITOLO 2 – IL PROCESSO PDCs.....	29
2.1 La tecnologia PDCs	29
2.1.1 I polimeri preceramici	30
2.1.1.1 <i>Polisilossani</i>	32
2.2 Aggiunta di fillers boratici	35
2.2.1 Fillers passivi	36
2.2.2 Fillers attivi	36
2.3 Fasi del processo PDCs	39
2.3.1 Formatura	39
2.3.1.1 <i>Formatura tramite Robocasting/Direct Ink Writing (DIW)</i>	41
2.3.2 Reticolazione	43
2.3.3 Conversione da polimero a ceramico	44
2.4 Evoluzione del processo PDCs	46
CAPITOLO 3 – SINTESI DI MELILITI COMPLESSE CON BORO	49
3.1 Formulazione della composizione	50
3.2 Preparazione delle pastiglie	51
3.2.1 Miscelazione e ceramizzazione delle polveri.....	51
3.2.1.1 <i>Miscelazione e formatura delle pastiglie</i>	52
3.2.1.2 <i>Prime formulazioni adottate e reagenti</i>	54

3.2.2	Analisi XRD e discussione dei risultati	55
3.2.2.1	<i>Effetto dell'incorporazione di stronzio</i>	56
3.2.2.2	<i>Effetto dell'incorporazione di magnesio</i>	58
3.2.2.3	<i>Effetto dell'incorporazione di stronzio e magnesio</i>	59
3.2.2.4	<i>Soluzione 67% HT – 33% OK</i>	61
3.3	Confronto con altri precursori di silice	63
3.3.1	Analisi XRD e discussione dei risultati	64
3.4	Misure delle proprietà fisiche: ritiro geometrico	65
3.5	Ottimizzazione de trattamento termico	66
3.6	Test di citotossicità	68
3.6.1	Saggio MTT (MTT cell viability assay)	68
CAPITOLO 4 – SINTESI DI MELILITI COMPLESSE SENZA BORO		71
4.1	Formulazione della composizione	71
4.2	Preparazione delle pastiglie	73
4.2.1	Miscelazione e ceramizzazione delle polveri	73
4.2.1.1	<i>Miscelazione e formatura delle pastiglie</i>	74
4.2.1.2	<i>Formulazioni adottate e reagenti</i>	75
4.2.2	Analisi XRD e discussione dei risultati	76
4.3	Vetro come filler attivo	78
4.3.1	Sintesi di vetro SrMg100HT	79
4.3.2	Pastiglia low glass approach	81
4.3.2.1	<i>Formulazioni adottate e reagenti</i>	81
4.3.3	Analisi XRD e discussione dei risultati	81
4.4	Misure delle proprietà fisiche: ritiro geometrico	83
4.5	Ottimizzazione de trattamento termico	84
4.6	Test di citotossicità	86
4.6.1	Saggio MTT (MTT cell viability assay)	86
CAPITOLO 5 – SVILUPPO DI SOLIDI CELLULARI A BASE DI MELILITI COMPLESSE		89
5.1	Gli scaffolds	89
5.1.1	Criteri di idealità di uno scaffolds	90
5.2	Schiume ceramiche a base di meliliti complesse	91
5.2.1	Formulazioni con boro	91
5.2.1.1	<i>Preparazione della miscela, schiumaggio e ceramizzazione</i>	92
5.2.2	Formulazioni senza boro	95

5.2.2.1 Preparazione della miscela, schiumaggio e ceramizzazione.....	96
5.3 Discussione dei risultati ottenuti.....	100
5.4 Analisi ottiche e SEM.....	101
5.5 Misura delle proprietà fisiche e meccaniche	103
5.5.1 Densità e porosità	103
5.5.2 Resistenza meccanica	105
5.6 Stampa Robocasting di scaffolds 3D.....	107
5.6.1 Preparazione dell'inchiostro di stampa	108
5.6.2 Stampa Robocasting e ceramizzazione	112
5.7 Discussione dei risultati ottenuti.....	115
5.8 Analisi ottiche e SEM.....	116
5.9 Misura delle proprietà fisiche e meccaniche	120
5.9.1 Ritiro geometrico.....	120
5.9.2 Densità e porosità	121
5.9.3 Resistenza meccanica	123
5.9.4 Sviluppi futuri.....	126
CONCLUSIONI	129
APPENDICE – METODI DI CARATTERIZZAZIONE	133
A.1 DIFFRATTOMETRIA A RAGGI X - ANALISI XRD	133
A.2 ANALISI DTA E TG	135
A.3 MISURE PICNOMETRICHE	136
A.4 MICROSCOPIO ELETTRONICO A SCANSIONE - ANALISI SEM	137
A.5 PROVE MECCANICHE IN COMPRESSIONE	139
RINGRAZIAMENTI	143
RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI.....	145

Introduzione

Il presente lavoro di Tesi trae ispirazione dalla crescente attenzione che stanno ottenendo i bioceramici silicatici cristallini per le loro applicazioni di rigenerazione di tessuti ossei e per l'elevata osteostimolazione.

Prendendo ispirazione dagli sviluppi nel campo dei biovetri e delle vetroceramiche bioattive, sono stati sviluppati negli ultimi anni sempre più ceramici silicatici di ossidi binari, ternari e quaternari che, al contrario dei convenzionali bioceramici a base di fosfati di calcio, offrono maggiori varietà di composizione utili per poter aggiustare le proprietà fisico-chimiche come resistenza meccanica, bioattività e degradazione.

Interessanti da questo punto di vista sono i ceramici silicatici appartenenti al gruppo delle meliliti, formula generale $A_2[T_1][T_2]_2O_7$, costituito da soluzioni solide tra i termini puri (*end-members*) gehlenite $[Ca_2Al(AlSi)O_7]$ e akermanite. $[Ca_2MgSi_2O_7]$.

Sempre più membri di questo gruppo di silicati sono studiati per applicazioni in campo biomedicale, a partire dall'akermanite ($Ca_2MgSi_2O_7$) e in particolare, per quanto concerne questo elaborato, l'hardystonite ($Ca_2ZnSi_2O_7$), oltre a varie soluzioni solide tra i membri.

È stato dimostrato che gli osteoblasti si legano bene alle pareti porose degli *scaffolds* realizzati con questi silicati, che sono in grado quindi di incentivarne la proliferazione. Vista la proprietà della struttura cristallina melilitica di essere relativamente facile da modificare in diversi composti sintetici isostrutturali non stupisce che ad oggi essa sia ampiamente studiata e che vi siano diverse pubblicazioni a riguardo.

In precedenti ricerche effettuate presso i laboratori dell'università di Padova sono stati prodotti con successo tramite la tecnologia *Polymer Derived Ceramics* (PDCs) solidi cellulari a base di hardystonite e anche di una soluzione solida più avanzata tra hardystonite e okayamalite ($Ca_2B_2SiO_7$, unico borato naturale appartenente alla famiglia dei minerali melilitici.)

Il boro è stato aggiunto all'hardystonite soprattutto nell'ottica di modulare le proprietà di degradazione di questo biomateriale, oltre a volerne aumentare la capacità di mineralizzazione del *layer* di apatite. Inoltre, utilizzando un sale boratico (colemanite) come precursore di boro, si favorisce nel processo PDCs la produzione di fase liquida e tutto lo ZnO (filler attivo per lo Zn) si converte formando hardystonite a temperature di 250 °C minori rispetto alle sintesi a 1200 °C effettuate con lo stesso processo.

Tuttavia i campioni sintetizzati hanno presentato una certa percentuale di fase secondaria e seppur caratterizzati da buone proprietà meccaniche nessun test è stato condotto per stabilirne il grado di bioattività e la reale applicabilità in campo clinico.

Il boro infatti, se non inglobato in maniera corretta, si discioglie nell'organismo e inibisce la crescita e la proliferazione delle cellule staminali mesenchimali, come alcuni esperimenti in vitro hanno dimostrato.

Alla luce di questi risultati la prima fase sperimentale di questo elaborato è stata dedicata alla produzione di melilite complesse tramite processo PDCs introducendo nuovi elementi biocompatibili in modo da creare soluzioni solide più complesse e una struttura cristallina il più possibile monofasica.

Dopo due capitoli di introduzione teorica sui biomateriali e sul processo PDCs, nel Capitolo 3 è stato verificato tramite tecniche XRD l'ottenimento di una fase cristallina hardystonitica praticamente pura su pastiglie, prodotte a partire da soluzioni solide con sei elementi (Si, Ca, Zn, B, Sr, Mg), sulle quali in seguito sono stati condotti e discussi i test di citotossicità.

Visti i risultati non del tutto soddisfacenti di bioattività, nel capitolo 4 è stata prima di tutto sintetizzata una nuova melilite complessa priva di boro a partire da polimero preceramico e *fillers*, e successivamente è stata ampliata introducendo nella miscela di partenza una ridotta percentuale di vetro della medesima composizione chimica, come *filler* aggiuntivo in grado di dare fase liquida durante il trattamento termico. Le pastiglie ottenute, caratterizzate tramite XRD e test di citotossicità, hanno evidenziato la presenza di una fase cristallina hardystonitica pura e una bioattività sorprendente e nettamente superiore rispetto a quella della melilite complessa con boro.

Nella seconda fase sperimentale presente nel Capitolo 5 è stata verificata la formabilità delle varie soluzioni di polimero preceramico e *fillers* tramite la realizzazione di solidi cellulari quali schiume, attraverso processo di schiumatura, e *scaffolds* da stampa 3D diretta. L'obiettivo dunque è stato produrre strutture cellulari altamente porose e omogenee, per poi effettuare le prove meccaniche sui campioni al fine di ricavarne una stima della resistenza a compressione.

Gli *scaffolds* 3D sono stati prodotti secondo una tecnologia di Additive Manufacturing, ovvero *Robocasting/DIW (Direct Ink Writing)*. Essa consiste nell'estrusione attraverso un ugello di una pasta viscosa sotto forma di filamento; i filamenti intrecciandosi vanno a formare la geometria cubica con pori ortogonali. Questo processo di stampa 3D risolve i difetti di morfologia riscontrati nelle schiume, a vantaggio delle proprietà meccaniche.

Capitolo 1

Bioceramici e loro applicazioni

In questo capitolo si presenta un breve sommario sui bioceramici e le loro applicazioni in campo biomedico. Vengono definiti e classificati i biomateriali, le loro caratteristiche principali, le interazioni con l'ambiente biologico e le principali funzioni, prestando particolare attenzione ai bioceramici silicatici attualmente al vaglio della ricerca o già in essere come prodotti finiti.

Infine viene introdotto il gruppo dei minerali melilitici, soggetto di questa tesi, la cui struttura risulta molto interessante per applicazioni in campo biomedicale.

Lo stato dell'arte è un riassunto delle fonti bibliografiche [1 - 26] qualora non indicato nel testo.

1.1 Definizione e classificazione dei biomateriali

La definizione più accettata in ambito scientifico dei biomateriali è attualmente quella utilizzata dall'Istituto Nazionale di Salute americano che descrive il biomateriale come "qualsiasi sostanza o combinazione di sostanze, diverse da un farmaco, di origine sintetica o naturale, utilizzabile per qualsiasi periodo di tempo, che fa crescere o sostituisce parzialmente o totalmente qualsiasi tessuto, organo o funzione del corpo, al fine di mantenere o migliorare la qualità della vita dell'individuo".

Per rispondere a tali requisiti, i biomateriali devono essere necessariamente biocompatibili, ossia non devono essere citotossici, non devono interferire o interagire in modo dannoso con le attività fisiologiche dell'organismo e devono assolvere a precise funzioni a cui sono designati al fine di riparare o sostituire un tessuto vivente danneggiato o per ripristinare una funzionalità compromessa (*Figura 1.1*).

Esistono varie sottocategorie di materiali biocompatibili. Possono essere classificati sulla base degli effetti prodotti sul materiale stesso in seguito all'innesto, da cui la distinzione tra biostabili e biodegradabili.

- Vengono definiti **biostabili** i materiali che, una volta posizionati in situ, non subiscono sostanziali trasformazioni chimiche e/o fisiche nel tempo.
- Vengono definiti **biodegradabili** i materiali che, una volta impiantati, subiscono sostanziali trasformazioni chimiche e/o fisiche che li portano a scomparire nel tempo.

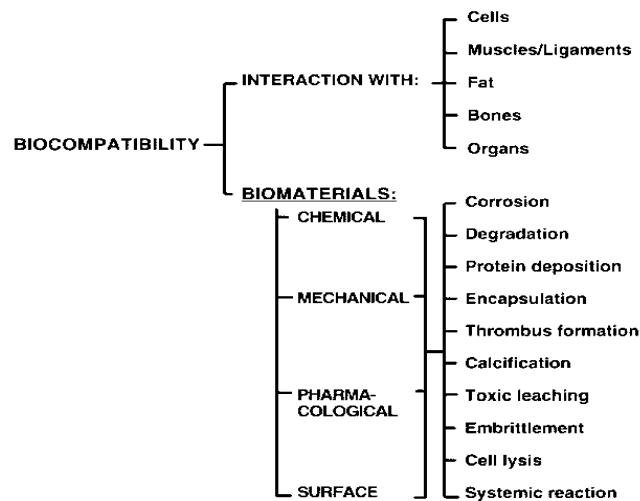


Figura 1.1. Illustrazione schematica della biocompatibilità (Copyright © 1998, Wiley).

Un altro tipo di classificazione invece considera l'interazione materiale-organismo, da cui derivano le distinzioni tra biotossici, bioinerti, biorisorbibili e bioattivi.

- I materiali **biotossici** provocano una reazione di rigetto da parte del tessuto biologico a causa di processi di tipo chimico e/o galvanico; possono essere quei materiali contenenti nichel, cadmio, vanadio, carburi, metilmetacrilati ed altri.
- I materiali **bioinerti** sono stabili dal punto di vista chimico-fisico e presentano interazioni minime con i tessuti circostanti. Questi materiali consentono una buona coesistenza tra organismo e impianto.
- I materiali **biorisorbibili** sono costituiti esclusivamente da sostanze che possono essere metabolizzate dall'organismo dissolvendosi in presenza dei fluidi corporei subendo una progressiva degradazione all'interno del sistema biologico, senza che questo provochi reazioni di rigetto o effetti tossici. Essi sono generalmente bioattivi e vengono gradualmente rimpiazzati dal tessuto biologico. Per queste loro caratteristiche risultano particolarmente utili nel caso in cui la protesi sostitutiva debba occupare uno spazio limitato. Vengono anche molto usati per il rilascio controllato di farmaci o radiazioni terapeutiche.
- I materiali **bioattivi** sollecitano una risposta biologica da parte dell'organismo, favorendo le interazioni dirette di tipo biochimico con il tessuto biologico, il quale può crescere sulla superficie del materiale stesso. Sono riassorbibili, ma al contempo permettono l'instaurarsi di legami forti coi tessuti viventi danneggiati e incentivare la produzione di nuovo tessuto. Tutto ciò permette l'instaurarsi di un solido legame dal punto di vista meccanico tra il tessuto naturale e l'impianto.

La bioattività viene valutata sulla base di un parametro denominato (I_B) che la mette in relazione al tempo ($t_{0,5}$) impiegato dal 50% della superficie del materiale per legarsi all'osso, (tessuto biologico di prevalente interesse per i bioceramici) secondo la seguente equazione:

$$I_b = 100/t_{0,5}$$

In tale categoria rientrano due diversi tipi di materiali denominati di classe A e di classe B:

- Materiali di classe A ($I_B > 8$): oltre ad essere osteoconduttivi sono anche osteoproduttivi, vale a dire che sono in grado di stimolare la ricrescita ossea in seguito a elevate velocità di dissoluzione e inoltre possono formare legami coi tessuti molli.
- Materiali di classe B ($0 < I_B < 8$): si legano all'osso e sono osteoconduttivi, cioè permettono la crescita ossea sulla superficie del biomateriale stesso. Tra questi si hanno l'idrossiapatite sintetica ed il tricalcio fosfato. Essi danno luogo a reazioni all'interfaccia non molto veloci e minimo rilascio di ioni.

Infine l'ultima distinzione dei materiali avviene sulla base della natura chimica: polimerici, metallici, ceramici, compositi, e biologici o naturali.

La lista in *Tabella 1.1* illustra parte dei vantaggi, svantaggi ed applicazioni correnti dei quattro gruppi sintetici di biomateriali. Biomateriali biologici o naturali ricostituiti come il collagene sono inoltre attualmente molto usati come sostituti o protesi per pareti arteriose, valvole cardiache, pelle etc.

Tabella 1.1. *Classi di biomateriali sintetici utilizzati, divisi a seconda della loro natura chimica (Copyright © 2007, Springer).*

Materials	Advantages	Disadvantages	Examples
Polymers (nylon, silicone rubber, polyester, polytetrafluoroethylene, etc)	Resilient Easy to fabricate	Not strong Deforms with time May degrade	Sutures, blood vessels other soft tissues, sutures, hip socket, ear, nose
Metals (Ti and its alloys, Co-Cr alloys, Au, Ag stainless steels, etc.)	Strong, tough ductile	May corrode Dense Difficult to make	Joint replacements, dental root implants, pacer and suture wires, bone plates and screws
Ceramics (alumina zirconia, calcium phosphates including hydroxyapatite, carbon)	Very bio-compatible	Brittle Not resilient Weak in tension	Dental and orthopedic implants
Composites (carbon-carbon, wire- or fiber- reinforced bone cement)	Strong, tailor-made	Difficult to make	Bone cement, Dental resin

Poiché i biomateriali artificiali sono limitati nelle funzioni che possono compiere, la ricerca biomedica è sempre più orientata verso la rigenerazione o ricrescita di tessuti biologici danneggiati o malati. L'ingegneria tissutale (*tissue engineering*) si riferisce quindi alla ricrescita di nuovo tessuto da parte di cellule viventi guidate dalla struttura di un substrato artificiale. Questo substrato viene chiamato *scaffold* e deve essere necessariamente compatibile, quindi possibilmente bioattivo e/o biorisorbibile, con le cellule con cui andrà in contatto guidando attivamente e coerentemente con l'organo danneggiato la loro ricrescita. Parte degli *scaffolds* sono oggi naturali o polimerici, ma per la ricrescita di tessuti duri quali ossa e denti sono necessari *scaffolds* ceramici scelti soprattutto per la loro elevata biocompatibilità.

1.2 Prestazioni dei biomateriali nell'ambiente biologico

Come visto la biocompatibilità è un requisito fondamentale, legato alla necessità di migliorare e/o ripristinare una determinata funzione biologica, senza interferire o interagire in modo dannoso con le attività fisiologiche dell'organismo.

Il grado di biocompatibilità dipende da varie caratteristiche:

- Proprietà del materiale: Proprietà chimiche, rugosità, stabilità chimica, ecc.;
- Dispositivi impiantati: Dimensioni, forma, rigidità, ecc.;
- Condizioni dell'organismo ospite: Tipo di tessuto, luogo di impianto, condizioni di salute, ecc.;
- Tecnica chirurgica.

Vi sono due caratteristiche principali per quanto concerne la valutazione della biocompatibilità di un materiale: il fatto che ogni materiale impiantato “provoca” una reazione nell'organismo e, allo stesso tempo, “subisce” l'attacco da parte dell'organismo. Per queste ragioni è essenziale comprendere a fondo le relazioni tra proprietà, funzioni e strutture dei materiali biologici e le interazioni tra questi ed i biomateriali impiantati all'interno del corpo.

Non esiste infatti alcun materiale che si possa definire completamente inerte in ambiente biologico. La biocompatibilità di un materiale non va intesa comunque solo in riferimento alla sua sicurezza biologica, ma è relativa anche alle caratteristiche chimico-fisiche ed alle proprietà meccaniche del materiale e deve pertanto essere controllata durante l'intero ciclo produttivo, dalla fase di progettazione a quella di sterilizzazione, dall'approvvigionamento delle materie prime al confezionamento finale del prodotto.

REQUIREMENTS OF IMPLANTS

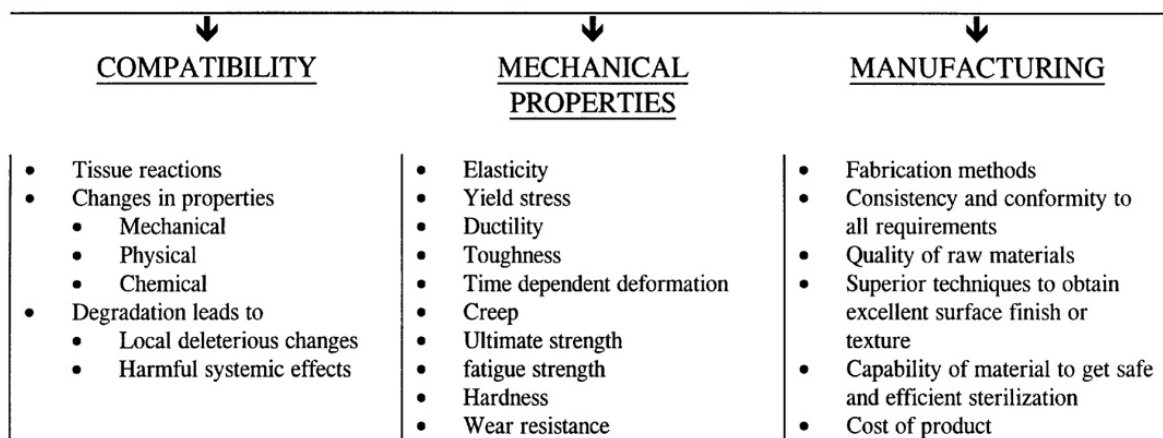


Figura 1.2. Illustrazione schematica dei requisiti di un impianto.

Risulta più semplice comprendere i requisiti di prestazioni di un impianto esaminando le caratteristiche che, ad esempio, una piastra ossea deve soddisfare per stabilizzare un femore fratturato a seguito di un incidente:

- Accettazione della piastra alla superficie del tessuto biologico;
- Accettabilità farmacologica, il materiale sintetico non deve essere tossico, allergenico, immunogenico, cancerogeno etc.;
- Chimicamente inerte e stabile, con degradazione che non dipenda dal tempo;
- Adeguata resistenza meccanica;
- Adeguata resistenza a fatica;
- Solido design ingegneristico;
- Peso e densità appropriati;
- Relativamente economica, riproducibile, facilmente fabbricabile e possibilmente compatibile con una produzione di larga scala.

L'ambiente biologico è attivo e aggressivo nei confronti dei corpi riconosciuti come estranei e per tale ragione, già nei primi istanti temporali successivi all'impianto, l'interfaccia tra il biomateriale e l'ambiente biologico è sede di un importante catena di eventi, indipendenti dal tipo di biomateriale innestato, che condizionano sempre il successo o il fallimento dei dispositivi protesici.

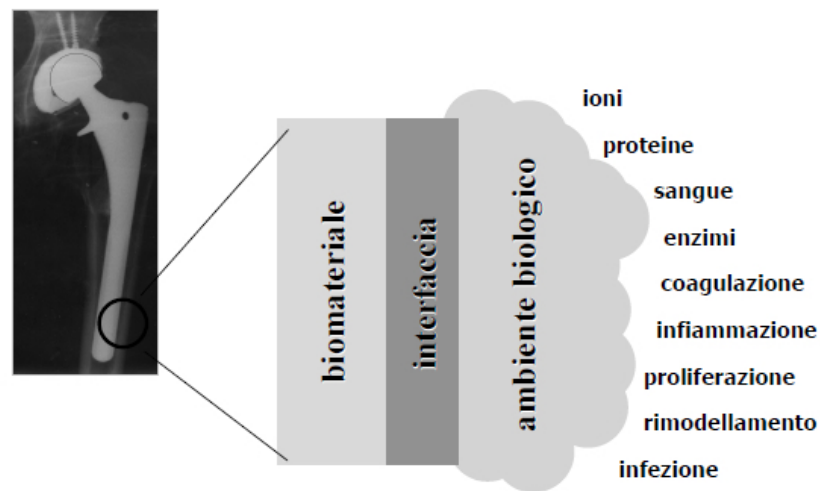


Figura 1.3. Schematizzazione del contatto biomateriale-ambiente biologico.

L'innesto di un impianto richiede sempre la produzione di una ferita in sede chirurgica, il più delle volte traumatiche e di notevole impatto sull'organismo, pertanto le interazioni fra tessuto ed impianto sono fortemente influenzate dal processo di guarigione della ferita che avviene attraverso le fasi di coagulazione, infiammazione, proliferazione cellulare, rimodellamento tissutale e nei casi più sfortunati anche di infezione.

In ordine temporale, il primo contatto a cui il biomateriale è destinato riguarda le molecole d'acqua, le quali si adsorbono alla superficie formando uno strato spesso pochi nanometri; successivamente si osserva la formazione di un layer proteico, in seguito a fenomeni di adsorbimento di proteine. Una volta creato lo strato proteico, la superficie viene raggiunta dalle cellule, che potranno colonizzarla occupando siti di opportune dimensioni, grazie alla mediazione del layer proteico formatosi in precedenza.

Di fondamentale importanza è la natura mutua dell'interazione biomateriale-ambiente biologico: da un lato il materiale provoca una reazione da parte dell'ambiente, dall'altro subisce l'attacco da parte dell'organismo.

La risposta immune dipende da diverse variabili:

- Caratteristiche dell'impianto: Materiale costituente, condizioni superficiali, forma e dimensione;
- Localizzazione all'interno del corpo;
- Condizioni del paziente; Età, sesso, salute e molte altre.

Le principali problematiche connesse all'uso di dispositivi ed impianti biomedici sono:

- La biocompatibilità, ossia la capacità di ripristinare una o più funzioni biologiche compromesse senza scatenare reazioni avverse;
- L'usura progressiva del materiale utilizzato, che può portare alla formazione di frammenti microscopici liberi e quindi ad infezioni e formazione di capsule fibrotiche;
- La durata che spesso è limitata e richiede un secondo intervento di revisione o sostituzione;
- La proliferazione di colonie batteriche sulla superficie del materiale, causa di infezioni croniche che obbligano alla rimozione dell'impianto;
- La mobilitazione asettica dell'impianto, derivata da fenomeni di stress shielding ma anche da usura.

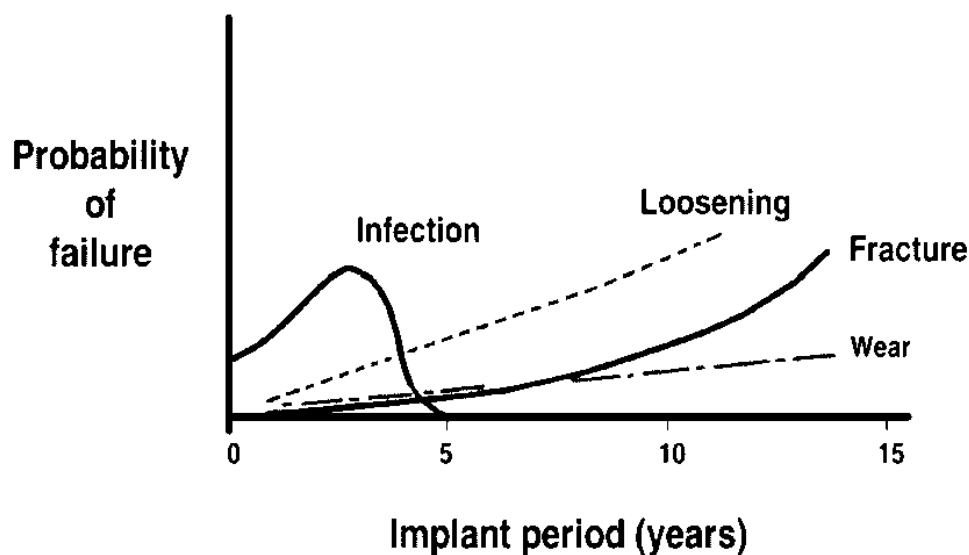


Figura 1.4. Illustrazione schematica della probabilità di fallimento versus tempo di impianto per una protesi dell'articolazione dell'anca (Copyright © 1977, Taylor & Francis).

I fattori da valutare sono dipendenti dal singolo materiale, caso clinico, applicazione ecc. ed un loro elenco generale ma non esaustivo è catalogato di seguito nella *Tabella 1.2*.

Tabella 1.2. Fattori principali che possono influenzare l'affidabilità del biomateriale.

Bulk material composition, micro- (or nano)-structure, morphology
Crystallinity and crystallography
Elastic constants
Water content, hydrophobic–hydrophilic balance
Macro-, micro-, nano-porosity
Surface chemical composition, chemical gradients, surface molecular mobility
Surface topography
Surface energy
Surface electrical/electronic properties
Corrosion parameters, ion release profile, metal ion toxicity (for metallic materials)
Degradation profile, degradation product form and toxicity (for polymeric materials)
Leachables, additives, catalysts, contaminants and their toxicity (for polymeric materials)
Dissolution/degradation profile, degradation product toxicity (for ceramic materials)
Wear debris release profile

Vista la vastità di problemi che può comportare l'uso di un materiale non adeguato in campo bio, i materiali destinati all'uso *in vivo* devono essere approvati dagli organi competenti (FDA, CE, EMA, standard EN ISO etc.) al fine di garantirne sicurezza ed efficacia e sono sottoposti a sperimentazioni organizzate a *step* successivi simili alle richieste legislative per il rilascio sul mercato di farmaci. Si passa dalla caratterizzazione chimico-fisica fino alla valutazione di proprietà elettriche, meccaniche, di trasporto, etc.; a cui segue una serie di test *in vitro* con cellule e tessuti prelevati da donatori mammiferi. Si passa poi ai test *in vivo* su modello animale, cercando per legge di limitare al massimo il numero di esemplari sacrificati e le loro sofferenze; quando possibile si scelgono metodi alternativi, come ad esempio i *trials in silico*, condotti con l'ausilio di modelli e simulatori informatici. Ultimo *step* è la sperimentazione clinica su pazienti, solo per quei biomateriali/dispositivi che siano stati promossi a tutti i test precedenti. Per gli scaffolds bioattivi è necessario essere in grado di controllare la velocità di dissoluzione del materiale di cui sono composti; è necessaria infatti una bassa solubilità se lo scaffold viene progettato per avere una vita molto lunga mentre è richiesta una solubilità controllata qualora venga progettato per coadiuvare la formazione ossea. Quindi è necessaria un'approfondita conoscenza dei fattori che influenzano la solubilità e la bioattività al fine di sviluppare nuovi materiali per la rigenerazione dei tessuti *in situ* e per la *tissue engineering*, obiettivo del presente lavoro di tesi.

1.1.1 Tessuto osseo naturale

Per comprendere a fondo l'azione dei bioceramici a contatto con l'osso è necessario conoscere in minima parte le proprietà e la struttura del tessuto osseo naturale.

Esso è in pratica un materiale composito, appartenente alla classe dei tessuti connettivi, con funzione di sostegno meccanico del corpo umano e, unitamente al sistema muscolare, di regolazione motoria; si contraddistingue per la durezza e per le caratteristiche di resistenza alla pressione, alla trazione e alla torsione.

Il tessuto osseo è formato da cellule caratteristiche, denominate osteociti e da una matrice extracellulare, divisa in organica ed inorganica, la prima è composta da fibre collagene e da una sostanza amorfa, nella cui costituzione entrano glicoproteine e proteoglicani.

Fra gli osteociti si riconoscono gli osteoblasti deputati alla sintesi della matrice intercellulare ed alla sua mineralizzazione, e gli osteoclasti che invece distruggono la sostanza fondamentale sostituendola con un leggero trabecolato osseo.

Dal punto di vista strutturale si possono distinguere due tipi di tessuto osseo:

- Osso compatto (*cortical bone*), che appare come una massa solida continua;
- Osso spugnoso (*cancellous bone*), che possiede un aspetto alveolare.

La caratteristica peculiare del tessuto osseo maturo è la sua struttura lamellare composta da lamelle spesse da 3 a 7 μm aggregate in strati paralleli e disposte in vario modo. Ciascuna lamella è costituita da cellule e da sostanza intercellulare.

Nell'osso spugnoso le lamelle si dispongono a formare trabecole irregolari, disposte disordinatamente, che delimitano un labirinto di spazi intercomunicanti occupati dal midollo osseo. Nell'osso compatto le lamelle si associano parallelamente formando strutture compatte e molto più regolari.

La matrice ossea è costituita per circa il 70% del suo peso da una fase inorganica formata da sali inorganici di un fosfato di calcio basico assimilabile all'idrossiapatite $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ sotto forma di cristalli aghiformi di lunghezza pari a 20÷40 nm e spessore di 1.5÷3 nm, che, all'interno della sua struttura cristallina, incorpora una serie di ioni estranei presenti in tracce, tra cui Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Sr^{2+} , Si^{4+} , CO_3^{2-} . Questi, oltre a contribuire alla durezza del tessuto, svolgono funzione metabolica come riserva di calcio e fosforo per l'intero organismo a cui può attingere in caso di necessità.

Il rimanente 30% in peso è la componente organica della matrice, che conferisce all'osso elasticità e resistenza a trazione, in essa si distinguono una parte fibrosa costituita per circa il 90 % da fibre di collagene di tipo I ed una parte interfibrillare amorfa formata da glicoproteine e proteoglicani.

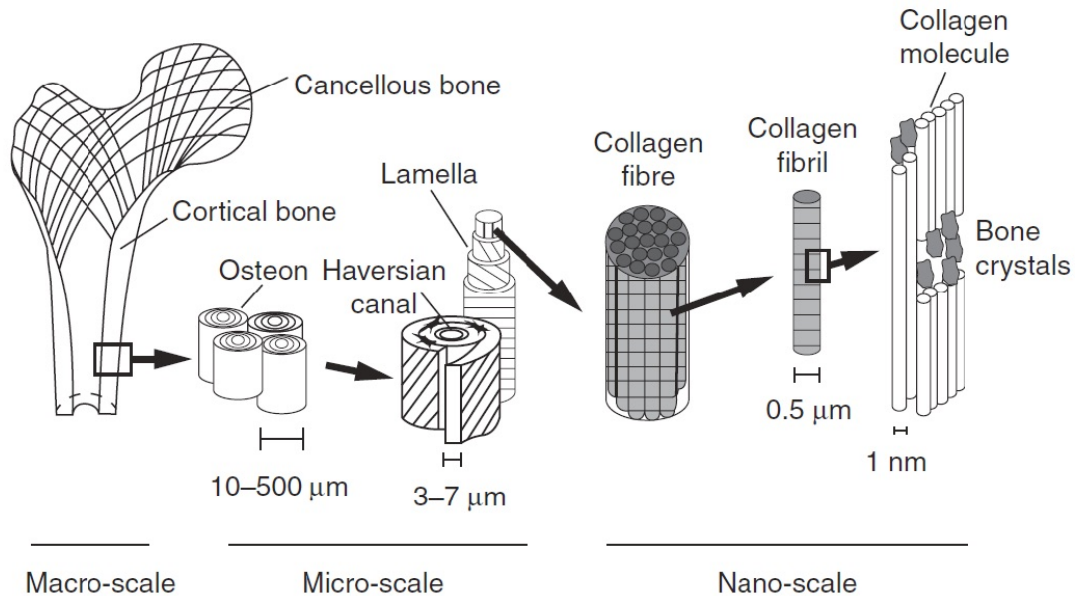


Figura 1.5. Struttura ossea a diverse scale di ingrandimento.

I costituenti inorganici dell'osso sono quindi i responsabili della sua durezza e rigidità mentre la resistenza alla trazione e alla pressione è legata alla matrice organica e principalmente alle fibre collagene. Le proprietà di resistenza dell'osso dipendono in larga misura dalla sua mirabile organizzazione lamellare e dalla disposizione ordinata, ma con orientamento diverso, delle fibre collagene nelle lamelle contigue. La combinazione delle due componenti della matrice e la superba architettura interna dell'osso assicurano la massima resistenza e durezza associate al minimo peso, rendendolo adatto ad adempiere alle sue imprescindibili funzioni meccaniche.

1.3 I bioceramici

I ceramici sono materiali non metallici e inorganici caratterizzati da legami interatomici (ionici o covalenti) che generalmente si formano ad elevate temperature e sono dotati di buona resistenza a compressione e inerzia biologica.

Per questo motivo ceramici e vetro-ceramici sono tuttora sottoposti ad un interesse crescente per applicazioni in campo bio, ed alcuni di loro hanno superato da tempo l'iter necessario per l'utilizzo clinico (Figura 1.5).

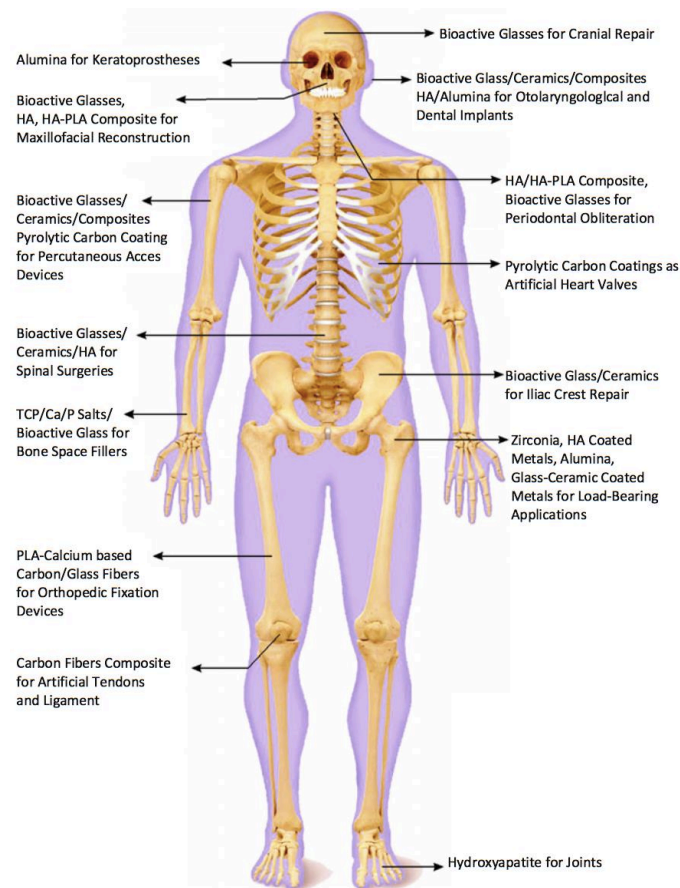


Figura 1.6. Diversi usi di materiali ceramici, vetri e compositi nel corpo umano
(Copyright© 2016, Springer International Publishing Switzerland).

Questa famiglia di materiali ha avuto negli ultimi quarant'anni un notevole sviluppo guidato da una ragione tanto semplice quanto valida che può essere riassunta con un semplice dato di fatto: “il corpo umano rigetta i materiali metallici e polimerici formando tessuto cicatriziale in quanto i tessuti stessi non sono costituiti da tali materiali, tantomeno sono in grado di sintetizzarli”. Un materiale ceramico invece ha la possibilità di replicare il tessuto che sarà chiamato a sostituire e quindi potrà non subire rigetto.

Il principale bioceramico conosciuto è l'allumina (Al_2O_3), importante per la bioinerzia, la durezza e le proprietà tribologiche; altri ceramici bioinerti sono il biossido di titanio (TiO_2), il biossido di zirconio (ZrO_2) e le porcellane dure.

I fosfati di calcio, distinti nelle forme di idrossiapatite (HA) e β -tricalcio sono noti per l'osteconduttività, i biovetri e le biovetroceramiche oltre ad essere bioattivi e osteoconduttivi hanno il pregio di essere osteoproduttivi.

I bioceramici riprendendo la suddivisione in classi dei biomateriali e possono quindi essere catalogati come:

- **Bioinerti:** Ne sono esempi l'allumina, la zirconia, il SiAlON ed il carbonio pirolitico.
- **Bioriassorbibili:** Appartengono a questa classe i fosfati di calcio come il fosfato tricalcico, l'idrossiapatite porosa e alcuni biovetri.
- **Bioattivi:** Idrossiapatite, biovetri e biovetro-ceramici.

Il successo di questi materiali dipende quindi nella loro abilità di indurre la rigenerazione e ricrescita ossea all'interfaccia tessuto-impianto sfavorendo lo sviluppo del tessuto fibroso cicatriziale. I materiali bioceramici per le loro caratteristiche di biocompatibilità, facilità di riassorbimento e/o bioattività, flessibilità nella composizione e buona resistenza alla compressione e corrosione, sono senza dubbio tra i biomateriali più interessanti. I principali problemi legati alla loro natura ceramica sono correlabili al basso carico di rottura, soprattutto in confronto ai metalli, duttilità praticamente nulla, alta densità e difficoltà di manipolazione in sede chirurgica

Per la realizzazione ed il successo di un impianto protesico gli aspetti cui bisogna tenere conto sono molteplici. È noto che il successo clinico richiede la realizzazione simultanea di una stabile interfaccia con il tessuto connettivo e una corrispondenza del comportamento meccanico dell'impianto con il tessuto da sostituire. Di certo la tossicità, la tollerabilità, il riassorbimento e il meccanismo di collegamento tra osso e biomateriale giocano un ruolo fondamentale nel campo della progettazione biomeccanica.

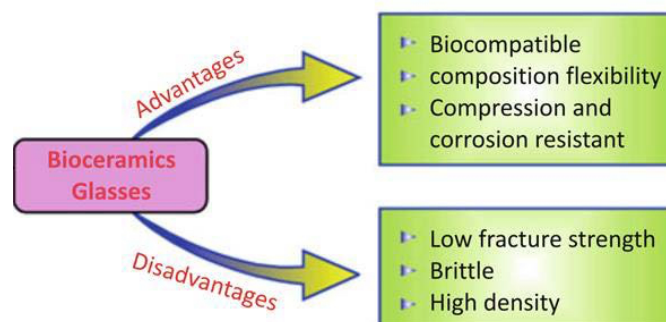


Figura 1.7. Schematizzazione di vantaggi e svantaggi dei bioceramici.
(Copyright © 2016, Springer International Publishing Switzerland.)

1.3.1 Ceramiche silicatiche bioattive

I bioceramics silicatici negli ultimi anni hanno attirato una significativa attenzione per le loro applicazioni di rigenerazione di tessuti ossei e per l'elevata osteostimolazione.

Il silicio è uno dei più importanti elementi nel corpo umano, è presente ad un livello di 100 ppm nel tessuto osseo e 200÷550 ppm legato ai composti della matrice extracellulare ed è riportato come elemento attivo nei processi di mineralizzazione del tessuto osseo, nella la sintesi del collagene, nel *cross-linking* del tessuto connettivo e nella lo sviluppo dell'apparato scheletrico e vascolare.

Confrontati con i convenzionali bioceramics a base di fosfati di calcio, i ceramiche silicati hanno una varietà di composizione maggiore che permette loro di aggiustare le proprietà fisico-chimiche come resistenza meccanica, bioattività e degradazione.

Ispirati dagli sviluppi nel campo dei vetri e delle vetroceramiche bioattive i bioceramics sono stati ampiamente studiati e sviluppati negli ultimi anni (*Tabella 1.3*). Tra i principali si trovano:

- Ceramiche silicatiche binari: CaO–SiO₂, MgO–SiO₂, SrO–SiO₂, ZnO–SiO₂;
- Ceramiche silicatiche ternari: MgO–CaO–SiO₂, ZnO–CaO–SiO₂, SrO–CaO–SiO₂, TiO₂–CaO–SiO₂, ZrO₂–CaO–SiO₂, P₂O₅–CaO–SiO₂, SrO–MgO–SiO₂, SrO–ZnO–SiO₂ e Na₂O–CaO–SiO₂;
- Ceramiche silicatiche quaternari: SrO–ZnO–CaO–SiO₂.

Tabella 1.3. Composizione e principali forme dei ceramiche silicatiche bioattive correntemente studiati.

System	Names	Compositions	Main forms
Binary oxides	Wollastonite	CaSiO ₃	Powders
	Dicalcium silicate	Ca ₂ SiO ₄	Ceramics
	Tricalcium silicate	Ca ₃ SiO ₅	Scaffolds Coatings
	Dimagnesium silicate	Mg ₂ SiO ₄	Powders
	Magnesium silicate	MgSiO ₃	Ceramics
	Zinc silicate	Zn ₂ SiO ₄	Ceramics
	Strontium silicate	SrSiO ₃	Powders
Ternary oxides	Akermanite	Ca ₂ MgSi ₂ O ₇	Powders
	Bredigite	Ca ₇ MgSi ₄ O ₁₆	Ceramics
	Diopside	CaMgSi ₂ O ₆	Spheres
	Monticellite	CaMgSiO ₄	Scaffolds
	Merwinite	Ca ₃ MgSi ₂ O ₈	
	Hardystonite	Ca ₂ ZnSi ₂ O ₇	Powders
		Zn _(x) CaSiO _(3+x)	Ceramics
		(Sr, Ca)SiO ₃	Ceramics
	Sphene	CaTiSiO ₅	Ceramics, coatings
	Baghdadite	Ca ₃ ZrSi ₂ O ₉	Ceramics, spheres
	Silicocarnotite Nagelschmidite	Ca ₅ P ₂ SiO ₁₂ Ca ₇ Si ₂ P ₂ O ₁₆	Powders, ceramics
	Strontium-hardystonite	Sr ₂ ZnSi ₂ O ₇	Ceramics
Quaternary oxides		CaNa ₂ SiO ₄ Ca ₂ Na ₂ Si ₃ O ₉	Ceramics
		(Sr,Ca) ₂ ZnSi ₂ O ₇	Scaffolds

La risposta di questa categoria di bioceramici nei fluidi corporei (naturali o simulati, SBF = *simulated body fluid*) viene schematizzata in *Figura 1.8*.

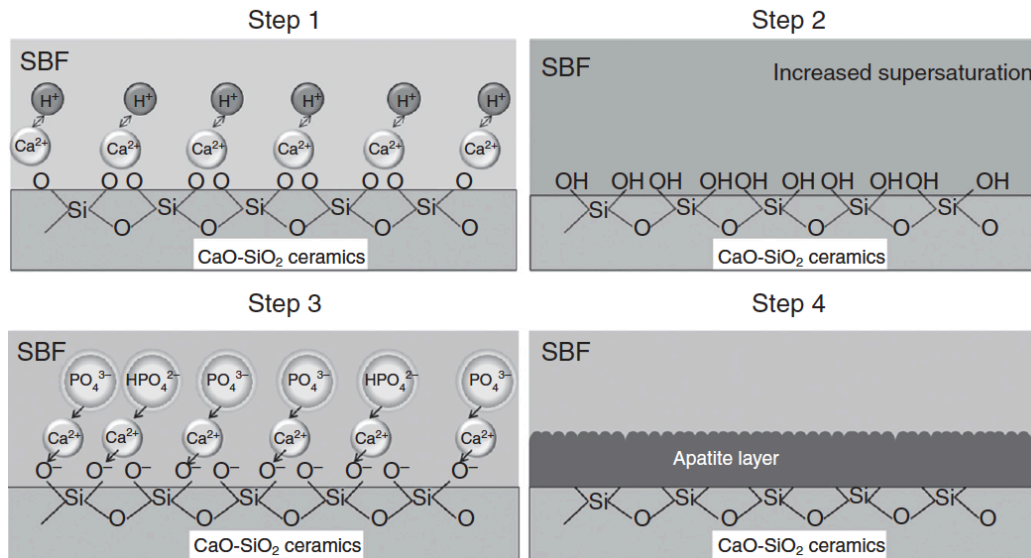


Figura 1.8. Illustrazione schematica del processo di formazione del layer di apatite nei ceramici silicatici in simulated body fluid (SBF).

L'apatite che si forma nei diversi bioceramici silicatici risulta significativamente differente come morfologia a seconda della composizione chimica del ceramico e generalmente maggiore è il contenuto di Ca maggiore sarà la capacità di mineralizzazione mentre l'incorporazione di altri ioni metallici quali possono essere Mg, Zn e Sr tende a diminuirle.

Tabella 1.4. Proprietà dei bioceramici silicatici a contatto con i SBF.

Names	Apatite mineralization	Dissolution
Wollastonite Dicalcium silicate Tricalcium silicate Bredigite Nagelschmidite	Excellent	Quick
Akermanite Merwinite Silicocarnotite Strontium silicate	Good	Common
Diopside Monticellite Baghdadite	Common	Slow
Dimagnesium silicate Magnesium silicate Zinc silicate Hardystonite Sphene Strontium-akermanite Strontium-hardystonite	Poor	Very slow

È dimostrato che la resistenza meccanica di certi bioceramici silicatici, specialmente la resistenza a frattura in condizioni di test a secco, è generalmente più elevata di quella dell'HA sintetica, una buona proprietà meccanica è essenziale per l'osteogenesi. Sempre in condizioni di test a secco gran parte dei monoliti silicatici possiedono una resistenza a flessione ed un modulo elastico comparabile con quella dell'osso compatto umano (50÷150 MPa e 7÷30 GPa rispettivamente); Nella *Tabella 1.5* vengono riassunti le proprietà meccaniche dei principali bioceramici silicatici sia in forma monolitica che di scaffold poroso.

Tabella 1.5. Proprietà meccaniche di monoliti e di scaffolds porosi di alcuni bioceramici silicatici.

Bioceramic	Bending strength (MPa)	Fracture toughness (MPam ^{1/2})	Young's modulus (GPa)
Cortical bone	50–150	2–12	7–30
Cancellous bone	10–20	-	0.2–0.5
Hydroxyapatite	115–200	0.6–1	80–120
	110	1.1	47
	107.3	0.86	67
	115–120	1.0	80–110
	107.3±4.3 80–89.07	0.86±0.12 0.75–1.0	67±3
CaSiO ₃	95	<1.0	-
Bredigite	156±6	1.57±0.12	43.00±4.53
Diopside	300	3.5	170
Akermanite	176.2±9.8	1.83±0.10	42.0±5.4
	141.8±2.3	1.53±0.10	56.2±5.4
Monticellite	163.9±3.6	1.65±0.12	45.5±4.1
	159.7	1.63	51
Merwinite	128.4±4.7	1.57±0.17	49.3±2.3
	151.2±5.7	1.72±0.11	31±2
Hardystonite	136.4	1.24	37
Strontium hardystonite	53	-	27

Bioceramic	Porosity (%)	Compressive strength (MPa)
Cancellous bone	70–90	0.2–4.0
Hydroxyapatite	69–86	0.03–0.29
	β-TCP	-
45S5 Bioglass	82–89	0.42–0.6
	84–89	0.42–0.6
CaSiO ₃	90	0.03±0.007
	81	0.33
	81	0.32±0.11
Bredigite	-	0.233±0.014
Bredigite with biomimetic apatite layer	90	0.101±0.008
Diopside	75–80	0.63–1.36
Porous akermanite	63.5–90.3	0.53–1.35
Hardystonite	87	0.06±0.008
	78	1.99±0.45
CaSiO ₃ hardystonite	89	0.12±0.02
Strontium hardystonite	78	2.16±0.52
Strontium-hardystonite-gahnite	85	0.8–4.1
	85	4.1±3

Ottenere monoliti *bulk* completamente sinterizzati di elevata densità è difficile con le tecniche convenzionali poiché la temperatura necessaria per gran parte delle polveri silicatiche è superiore ai 1000 °C. I principali metodi di produzione di questa categoria di bioceramici sono il metodo sol-gel, la precipitazione chimica, il processo idrotermale, reazioni allo stato solido e tecnica PDCs (*polymer-derived ceramics*). La preparazione di ossidi ternari e quaternari silicatici risulta più difficoltosa ed è necessario selezionare adeguate materie prime di partenza e metodi di sintesi, controllando altresì le condizioni di reazione. Il sol-gel risulta quindi essere il metodo più diffuso per i ternari e quaternari, anche per le inferiori temperature necessarie.

Per la preparazione di *scaffolds* porosi ci si può invece affidare al metodo *porogen*, al *templating* con schiuma poliuretana, al PDCs con *fillers* attivi o alla stampa 3D.

Di interesse per il presente lavoro di tesi è l'applicazione di bioceramici nell'ingegneria tissutale, le pareti porose degli *scaffolds* composti da questa famiglia di materiali permette un buon legame con gli osteoblasti. Tuttavia, poiché la superficie specifica di una struttura porosa è notevolmente superiore, i bioceramici silicatici si degradano a una velocità molto elevata, ciò può causare il crollo della struttura prima della formazione di una sufficiente matrice ossea extracellulare.

Inoltre l'eccessiva dissoluzione comporta una grande deviazione nei valori di pH dal livello fisiologico che può avere effetti negativi sulle cellule circostanti. Pertanto, il tasso di dissoluzione va adeguatamente controllato o adeguato per migliorare i risultati biologici e per mantenere gli ioni liberati a concentrazioni terapeutiche.

La ricerca si sta inoltre concentrando sul miglioramento delle proprietà meccaniche dei bioceramici silicatici molto spesso non sufficientemente forti per la rigenerazione ossea in applicazioni portanti.

1.3.1.1 Approccio per incrementare le prestazioni

Sebbene i ceramici silicatici siano bioattivi e osteoconduttivi rispetto ai tradizionali bioceramici bioinerti quali ZrO_2 e Al_2O_3 , le loro proprietà meccaniche e di osteoconduzione rimangono non ottimali per la rigenerazione ossea.

In tal senso il miglioramento di queste proprietà rappresenta uno step fondamentale prima della loro possibile applicazione in ambito clinico.

L'osteoconduttività può essere migliorata cercando di incorporare nella struttura cristallina elementi bioattivi (Si, Zn, Mg, B e Sr) o biomolecole e fattori di crescita per formare un composto a più elementi; per esempio nel presente lavoro di ricerca è stato sintetizzato un composto monofasico con un massimo di sei diversi elementi

Questo approccio non solo è in grado di fornire ceramici a base di Ca-Si con una capacità di rilasciare ioni bioattivi essenziali per la crescita ossea, aumentando così la loro bioattività, ma anche di migliorare notevolmente le loro proprietà meccaniche.

Elementi in piccola quantità come zinco (Zn), stronzio (Sr) silicio (Si) e Boro (B) sono essenziali nel corpo umano con effetti significativi sulla formazione dell'osso e sulla guarigione della frattura.

Verranno ora riassunti i principali benefici degli elementi più comuni di un bioceramico.

- **Zinco:** Lo zinco è un elemento essenziale nel corpo umano e presenta effetti significativi sulla formazione dell'osso. A livello cellulare esso svolge un ruolo significativo nel miglioramento della proliferazione osteoblastica aumentando sia l'attività di fosfatasi alcalina (ALP) che il contenuto di DNA nei tessuti ossei. Inoltre è in grado di indurre l'inibizione selettiva delle funzioni osteoclastiche.
- **Silicio:** Il silicio è un altro elemento essenziale per i processi metabolici associati allo sviluppo di tessuti sia ossei che connettivi. Esso svolge un ruolo importante durante la fase iniziale della formazione dell'osso e durante il processo di calcificazione aumentando i principali geni osteoblastici dell'mRNA, come il collagene di tipo I.

- **Magnesio:** Il magnesio è uno degli elementi più importanti nella biologia mammifera. È presente in abbondanza nella cartilagine e nel tessuto osseo durante le fasi iniziali di osteogenesi mentre tende a scomparire nell'osso maturo. La sua mancanza pregiudica tutti gli stadi del metabolismo scheletrico, causando la cessazione della crescita ossea e la diminuzione dell'attività osteoblastica e osteoclastica.
- **Stronzio:** Lo stronzio è un altro elemento benefico per la formazione dell'osso ed è stato introdotto gradualmente nel trattamento per l'osteoporosi. Esso infatti migliora la riproduzione delle cellule osteoprogenitrici (o preosteoblasti) e la sintesi di collagene come si è stato verificato tramite la coltura di cellule osteoblastiche del ratto. Lo studio condotto in vivo ha dimostrato che lo stronzio può stimolare la formazione dell'osso e ridurre il riassorbimento pur conservando una buona mineralizzazione, ottenendo così una maggiore massa vertebrale ossea. Vetri bioattivi sostituiti da Sr [16] hanno mostrato effetti stimolanti sulla osteogenesi.
- **Boro:** Il boro è stato riconosciuto come un elemento importante nella riproduzione e l'embriogenesi, nel metabolismo osseo, nel miglioramento della guarigione delle ferite e nel modificare l'azione del calcio nell'organismo. È stato riferito che il boro ha un effetto positivo sulla crescita di piante e animali: per esempio, fornito come supplemento a ratti e pulcini ha dimostrato di aumentare la loro resistenza ossea. Biomateriali contenenti boro hanno anche un effetto benefico sulla formazione dell'osso, sulla sua composizione e sulle sue caratteristiche fisiche. La presenza dell'elemento boro nei vetri o vetro-ceramiche bioattive potrebbe promuovere invece la loro completa conversione a HA. Numerosi materiali contenenti B, come vetri borati, vetri boro silicatici e vetri con calcio sodio e boro, sono attualmente candidati promettenti per l'ingegneria tissutale ossea.

Quindi al fine di migliorare le proprietà meccaniche e modulare la velocità di degradazione dei bioceramici silicatici sono stati sviluppati e si stanno sviluppando tutt'ora nuovi tipi di ceramici basati su sistemi a tre, quattro o più elementi.

Interessanti da questo punto di vista sono le meliliti, ovvero un ampio gruppo di minerali che risultano molto promettenti per le applicazioni in campo biomedicale in particolare per le loro proprietà di struttura, meccaniche e di biocompatibilità.

1.3.2 Le meliliti e la loro struttura cristallina

Il gruppo dei minerali melilitici è costituito da soluzioni solide tra i termini puri (*end-members*) gehlenite $[\text{Ca}_2\text{Al}(\text{AlSi})\text{O}_7]$ e akermanite. $[\text{Ca}_2\text{MgSi}_2\text{O}_7]$.

Il nome deriva dalle parole greche meli (miele) e lithos (roccia), a causa del colore giallastro dei primi minerali rinvenuti, al giorno d'oggi molti composti a struttura cristallina melilitica vengono sintetizzati artificialmente.

Il gruppo appartiene alla sottoclasse dei silicati di nome sorosilicati. Questi composti sono formati da due tetraedri $[\text{SiO}_4]$ interconnessi da un ossigeno e questa coppia costituisce la struttura di base del gruppo anione $(\text{Si}_2\text{O}_7)^{6-}$.

La formula generale delle meliliti è quindi $\text{A}_2[\text{T}_1][\text{T}_2]_2\text{O}_7$: i siti A ottaedrici a più alto numero di coordinazione sono occupati in genere da elementi terrosi o alcalino-terrosi (A = Ca, Sr, Ba, Pb, Na, Y, Er, Tb, Eu, etc.)

I siti T_1 tetraedrici possono ospitare ioni bivalenti come Mg^{2+} e Zn^{2+} rispettivamente in akermanite e hardystonite, oppure ioni trivalenti come Al^{3+} e B^{3+} ; la neutralità di carica viene compensata dalla sostituzione di ioni Si^{4+} nei siti T_2 con ioni trivalenti.

Quindi l'Al o il B possono sostituire un atomo di Si quando T_1 è uno ione trivalente, ma la carica può anche essere bilanciata dalla sostituzione accoppiata Ca^{2+} con uno ione monovalente e T_1^{3+} con T_2^{2+} .

Tabella 1.6. Principali ioni e siti occupati nella struttura melilitica.

Sito		Ioni principali
A	Ottaedrico	Ca, Sr, Ba, Pb, Na, Y, Er, Tb, Eu,
T₁	Tetraedrico	Be, Mg, Mn^{2+} , Fe^{2+} , Co, Cu, Zn, Cd, Al, Fe^{3+} , Ga, Si, B
T₂	Tetraedrico	Si, Ge, Al, Fe^{3+} , Ga, Be, B

Tabella 1.7. Alcuni esempi di membri del gruppo delle meliliti.

Minéral	Formule	$\text{A}_2[\text{T}_1][\text{T}_2]_2\text{O}_7$		
		A	T ₁	T ₂
Gehlénite	$\text{Ca}_2\text{Al}_2\text{SiO}_7$	Ca	Al	Al, Si
Akermanite	$\text{Ca}_2\text{MgSi}_2\text{O}_7$	Ca	Mg	Si
Gugiaite	$\text{Ca}_2\text{BeSi}_2\text{O}_7$	Ca	Be	Si
Hardystonite	$\text{Ca}_2\text{ZnSi}_2\text{O}_7$	Ca	Zn	Si
Sodamelilite	$\text{CaNaAlSi}_2\text{O}_7$	Ca, Na	Al	Si

La struttura cristallina della melilite, descritta per la prima volta nel 1930 da B. E. Warren, è tetragonale, di tipo $P\bar{4}2_1m$, ed è formata lungo l'asse c da una successione di fogli composti da tetraedri $[(T_1)O_4]$ e $[(T_2)O_4]$. Questi fogli sono interconnessi dai cationi A con numero di coordinazione 8 formando un poliedro irregolare (cubi di Thomson deformati). I tetraedri T_2 condividono uno dei loro atomi di ossigeno creando coppie $[T_2O_7]$ (gruppo anione) collegate a quattro tetraedri T_1 . Nel piano (001) la struttura dei fogli può anche essere descritta come un insieme di anelli formati da cinque tetraedri che creano dei canali dove si collocano i cationi A (Figura 1.9). A causa di questo arrangiamento atomico, le meliliti possono mostrare un clivaggio nelle direzioni cristallografiche $\{001\}$ e, perpendicolarmente a queste, un clivaggio più debole nelle direzioni $\{110\}$.

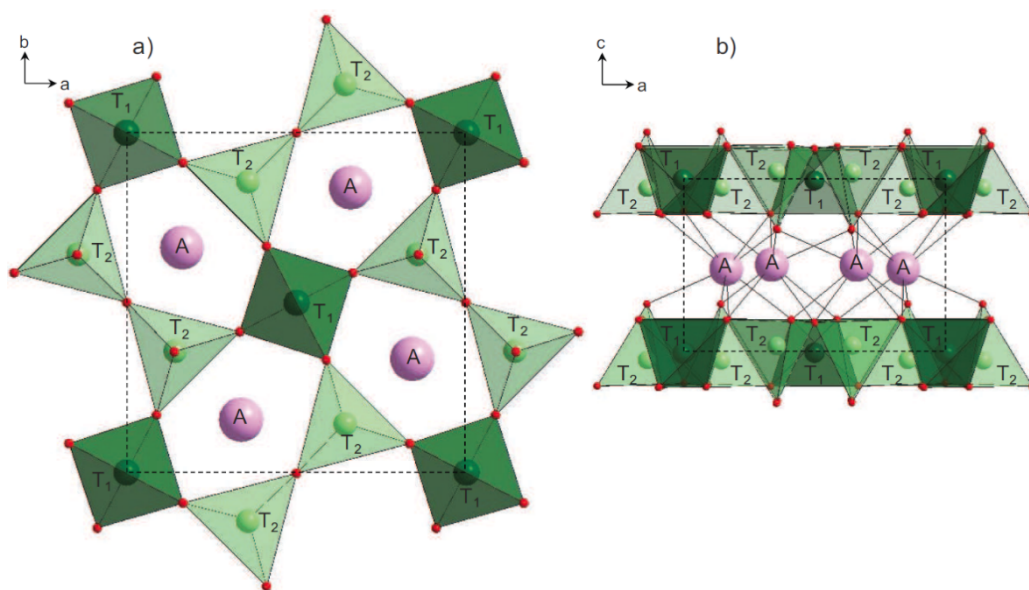


Figura 1.9. Proiezioni della struttura cristallina delle meliliti nei piani a) (001) e b) (010).

Secondo M. Kimata vi sono, nella struttura di un composto, tre tipi di controllo cristallografico: l'elettronegatività, il raggio ionico e il legame chimico. Alla luce di questi vincoli, la sostituzione cationica di una fase può portare ad ottenere un composto isostrutturale od una struttura completamente diversa in determinate condizioni di pressione e temperatura.

Secondo le norme introdotte da V.M. Goldschmidt è difficile sostituire due ioni con elettronegatività e carica molto diverse o con raggi ionici che differiscono di oltre il 30 %.

Da quanto esposto, e vista la capacità della struttura cristallina melilitica di essere relativamente facile da modificare in diversi composti sintetici isostrutturali non stupisce che ad oggi essa sia ampiamente studiata e che vi siano diverse pubblicazioni su questi silicati sintetici:

$Y_2SiBe_2O_7$; $Ca_2BeSi_2O_7$; $Sr_2MgSi_2O_7$; $Ca_2CoSi_2O_7$; $Sr_2Al_2SiO_7$; $Sr_2MnSi_2O_7$; $Ba_2MgSi_2O_7$; $BaCu_2Si_2O_7$; $Ca_2VO_2Si_2O_7$; $Ca_2Zn(Ge,Si)_2O_7$; $Ca_2B_2SiO_7$; $Ca_2ZnSi_2O_7$ e svariate loro soluzioni solide come ad esempio $Ca_2Al_2SiO_7 - Ca_2B_2SiO_7$ e altre sviluppate all'interno dei laboratori dell'università di Padova come ad esempio $Ca_2ZnSi_2O_7 - Ca_2B_2SiO_7$.

Sempre più membri di questo gruppo di silicati sono studiati per applicazioni in campo biomedicale, a partire dall'åkermanite ($Ca_2MgSi_2O_7$) e in particolare, per quanto concerne questo elaborato, l'hardystonite $Ca_2ZnSi_2O_7$ e soluzioni solidi tra questi.

L'attenzione è riposta nella possibilità di aggiustare le proprietà fisico-chimiche come resistenza meccanica, bioattività e degradazione modificando la struttura cristallina melilitica ed i suoi cationi, nell'ottica di ottenere biomateriali silicatici più efficaci per applicazioni cliniche.

L'åkermanite ad esempio possiede proprietà meccaniche migliori rispetto all'idrossiapatite e la sua resistenza alla flessione e modulo di Young sono vicine a quella dell'osso compatto umano (*Tabella 1.5*). Ciò è una diretta conseguenza della maggiore complessità della struttura cristallina melilitica in cui i nuovi legami Mg-O risultano più forti dei legami Ca-O.

Anche l'incorporazione di ioni Mg^{2+} è stata sperimentata con successo; La diopside (DIOP: $CaMgSi_2O_6$), è risultata avere diverse proprietà interessanti, tra le quali una grande resistenza meccanica, una buona capacità di indurre in vitro la formazione di apatite e un'eccellente citocompatibilità.

L'okayamalite [$Ca_2B_2SiO_7$] è ad oggi l'unico borato naturale appartenente alla famiglia dei minerali melilitici, la sua struttura melilitica con presenza di calcio, silicio e in particolare boro rende questo materiale un possibile candidato come bioceramico.

Le soluzioni SBF hanno presentato, come atteso, ioni B e Si disciolti mentre la concentrazione di ioni P è diminuita per formare il *layer* di HA.

L'incorporazione di ioni Zn^{2+} nella struttura melilitica genera il bioceramico chiamato hardystonite, essa ha mostrato una migliore stabilità chimica e migliori proprietà meccaniche rispetto alla wollastonite [$CaSiO_3$].

Si è scoperto dai test *in vitro*, successivi ai test con SBF, che gran parte dei bioceramici silicatici come l'åkermanite, hardystonite, diopside ecc., supportano l'attacco degli osteoblasti, delle cellule stromali del midollo osseo (BMSCs) e delle cellule staminali del legamento parodontale (PDLCS). Essi inoltre sono caratterizzati da una velocità di degradazione moderata (*Tabella 1.8*) che porta benefici all'attacco di cellule staminali in confronto a silicati veloci nel degradarsi, quali wollastonite, e *tricalcium silicate*; ciò è una diretta conseguenza della diversa composizione chimica e rapporto tra Ca e altri ioni metallici.

Diminuire la velocità di degradazione è un passo essenziale nella realizzazione di biomateriali, soprattutto se porosi, poiché se troppo veloce può portare ad un ambiente con elevato pH con effetti negativi nella crescita cellulare.

Tabella 1.8. Gli effetti dei prodotti ionici da parte di certi bioceramici silicatici nella proliferazione e differenziazione osteogenica delle cellule.

Silicate bioceramics	Cell proliferation	Cell osteogenic differentiation
Wollastonite	OB	
Dicalcium silicate	L929	
Tricalcium silicate	L929, DPC	DPC
Magnesium silicate	L929	
Strontium silicate	BMSCs	
Akermanite	L929, OB, ADC, BMSCs, PDLCs	BMSCs, OB, ADC, PDLCs
Bredigite	L929, OB	
Diopside	OB	
Hardystonite	BMSCs	BMSCs
(Sr, Ca)SiO ₃	OB	
Sphene	OB	
Baghdadite	OB	
Nagelschmidite	PDLCs	PDLCs

OB: osteoblasts; DPC: dental pulp cells; BMSCs: bone marrow stromal cells;
ADC: adipose-derived stem cells; L929: L929 fibroblast; PDLC: periodontal ligament cells.

1.3.2.1 Hardystonite

L'hardystonite ($\text{Ca}_2\text{ZnSi}_2\text{O}_7$) è una melilite contenente calcio nel sito A, zinco nel sito T_1 , silicio nel sito T_2 e ovviamente ossigeno. È un raro silicato di zinco descritto per la prima volta nel 1899 da J. E. Wolff nei depositi di zinco Franklin, New Jersey, US, e fu chiamato così da Hardyston Township che prima del 1913 incorporava le miniere Franklin. Questo minerale nella sua forma naturale contiene spesso piombo, dannoso per il processo di fusione dello zinco, e quindi non è utile come materia prima.

La struttura melilitica dell'hardystonite può essere riassunta come composta da fogli di $[\text{ZnSi}_2\text{O}_7]^{4-}$ in cui il legame covalente è dominante, ed i fogli adiacenti sono tenuti assieme da ioni Ca^{2+} intercalati con legame prevalentemente ionico. La struttura prevede parametri di cella $a = 7.829 \text{ \AA}$ e $c = 5.014 \text{ \AA}$, con una densità di 3.4 g/cm^3 , un coefficiente di espansione termica del secondo ordine, una $T_F = 1425 \text{ }^\circ\text{C}$ e si colloca tra 3 e 4 della scala Mohs per la durezza.

Al contrario dell'akermanite, l'hardystonite è molto stabile se sintetizzata da precursori nelle corrette proporzioni molari e non si decompone in altri silicati di calcio.

A livello di laboratorio l'hardystonite può essere prodotta con la tecnica Czochralski o con la tecnica *floating zone*, o sinterizzata a partire da polveri di ossidi o attraverso processo sol-gel o PDCs. Non sono riportate in letteratura sintesi di questo composto a temperature inferiori di $1150 \text{ }^\circ\text{C}$.

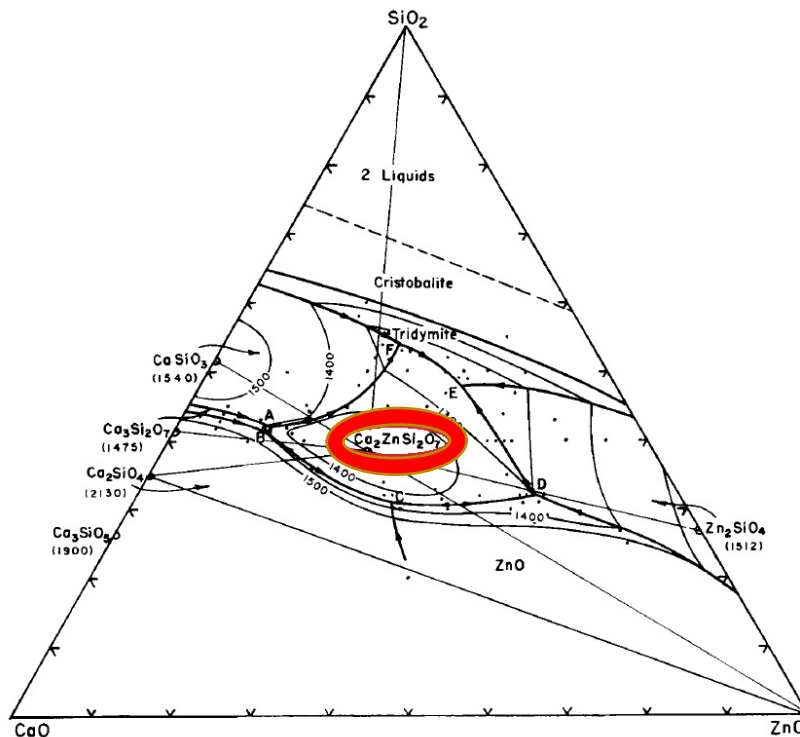


Figura 1.10. Il sistema ternario CaO-ZnO-SiO₂.

I vantaggi principali dell'hardystonite risiedono nel fatto che contiene Zn nel suo reticolo cristallino, il suo rilascio ha infatti effetti positivi sulla formazione dell'osso (§1.3.1.1) e contribuisce a ridurre quello di ioni di Ca e Si.

Questi materiali hanno dimostrato di poter aumentare il tasso di proliferazione delle cellule staminali mesenchimali del midollo osseo (BMSCs) e di indurre il differenziamento osteogenico delle BMSCs.

La dissoluzione di hardystonite non provoca un microambiente alcalino e evita così i potenziali pericoli sulle cellule, inoltre, le sue proprietà meccaniche risultano migliori rispetto alla wollastonite ed è stata dimostrata la sua capacità di sostenere l'adesione cellulare e di aumentare la proliferazione e differenziazione cellulare di HOBs.

Tutto ciò si traduce in un materiale con buona biocompatibilità. Tuttavia, lo svantaggio principale dell'hardystonite è il suo basso tasso di degradazione che inibisce in parte gli effetti biologici degli ioni contenuti al suo interno.

Al fine di migliorare la bioattività dell'hardystonite si è recentemente sviluppato un bioceramico hardystonitico, sotto forma di scaffolds, che incorpora stronzio (Sr-HT). Questo materiale è risultato maggiormente degradabile ed in grado di rilasciare quattro ioni bioattivi (Zn, Ca, Sr, Si), risultando complessivamente migliore di tutti i precedenti materiali a base hardystonite nella formazione del tessuto osseo in vivo.

Quest'ultimo bioceramico è anche il solo, a quanto riporta la letteratura, che verrà a breve introdotto nel mercato come prodotto commerciale in una sua versione modificata strontium-hardystonite-gahnite (Sr-HT-gahnite), con una resistenza a compressione competitiva di ~4.1 MPa, associata all'85 % di porosità totale, adatta anche a scaffolds sotto carico.

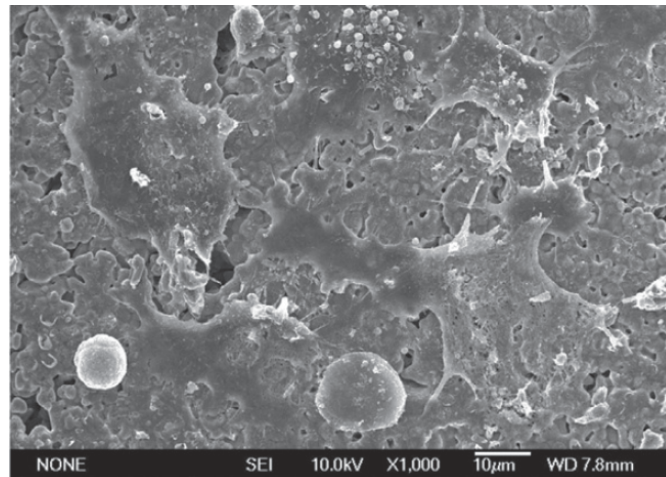


Figura 1.11. Attacco degli osteoblasti su superficie in hardystonite; la mineralizzazione dell'apatite è invece generalmente povera o nulla.

Le ceramiche hardystonite, riassumendo, sembrano possedere una migliore biocompatibilità, resistenza alla flessione e alla frattura rispetto ad HA e CaSiO_3 (Tabella 1.5).

L'inclusione dello zinco ha effetti diretti sull'ambiente biologico e ha fatto sì che i bioceramici hardystonitici siano quindi considerati materiali promettenti per l'ingegneria tissutale applicata specialmente al tessuto osseo.

Infine c'è da dire che la capacità di incorporare per sostituzione un certo numero di elementi e la stabilità chimica anche ad elevate temperature pongono tutti i minerali melilitici come candidati sia per la realizzazione di biomateriali molto interessanti sia per altre molteplici applicazioni: dai filtri di inceneritori a speciali pigmenti (es. $\text{Ca}_2(\text{Zn},\text{Co})\text{Si}_2\text{O}_7$) come nuovo pigmento blu per smalti fino a fibre ottiche, fosfori e diodi laser [14, 15].

Nel rispetto degli standard internazionali per l'approvazione legislativa di nuovi farmaci o dispositivi biomedicali, alcuni bioceramici silicatici sono già arrivati allo *step* dei *trials in vivo*. *Scaffolds* porosi in wollastonite e åkermanite hanno dimostrato su tessuto osseo animale una, attesa, maggiore velocità di degradazione e una maggiore formazione di nuovo tessuto in confronto a *scaffolds* di riferimento β -TCP.

Per concludere, la ricerca di base ha già confermato come åkermanite, hardystonite ed okayamalite siano promettenti ceramici silicatici bioattivi, ma fino ad oggi pochi studi sono stati presentati sulla fattibilità nell'ottenere soluzioni solide tra questi *end-members* per sfruttare assieme gli effetti positivi degli ioni Mg, Zn e B e altri caratteristici di ogni struttura.

L'obiettivo del presente lavoro di tesi è proprio questo; a partire da soluzioni solide già sperimentate si andranno a incorporare nuovi ioni per dare soluzioni con una maggiore complessità al fine di migliorare i due aspetti principali di un biomateriale: la resistenza meccanica e la biocompatibilità.

Per quanto esposto una continua ricerca su questi nuovi bioceramici silicatici è promettente e può portare nel breve termine a soluzioni più efficaci per applicazioni cliniche.

1.3.2.2 Approfondimento sulla soluzione solida

La variazione della composizione deriva dalla sostituzione, in una determinata struttura, di un ione o gruppo ionico con un altro ione o gruppo ionico. Questo processo, definito sostituzione ionica o soluzione solida, avviene fra minerali o composti che sono isostrutturali e avviene quando un sito atomico specifico viene occupato, in proporzioni variabili, da due o più elementi chimici differenti (o gruppi).

Secondo alcune regole empiriche introdotte da V. M. Goldschmidt, i fattori principali che determinano la quantità di soluzione solida che si può avere in una certa struttura cristallina sono le seguenti:

- Le dimensioni relative degli ioni, atomi, o gruppi ionici che si sostituiscono reciprocamente → Un ampio intervallo di sostituzione è generalmente possibile se le differenze fra i raggi dei due elementi minori di circa il 15 %. Quando differiscono per un valore compreso fra il 15 e il 30 % la sostituzione è limitata o rara, e se differiscono più del 30 % è probabile una scarsa sostituzione.
- Le cariche degli ioni coinvolti nella sostituzione → Se la carica degli ioni è la stessa, come nel caso di Mg^{2+} e Fe^{2+} , la struttura in cui avviene la sostituzione rimane elettricamente neutra. Se le cariche sono diverse, come nel caso di Al^{3+} che sostituisce Si^{4+} , per mantenere la neutralità elettrostatica deve avvenire una sostituzione ionica aggiuntiva in un'altra posizione della struttura.
- La temperatura a cui avviene la sostituzione → Esiste, in generale, una maggiore tolleranza verso la sostituzione atomica a temperature più elevate, quando le vibrazioni termiche sono maggiori e le dimensioni dei siti atomici disponibili sono più ampie. In una data struttura, perciò, ci si attende una maggiore variabilità composizionale alle alte temperature rispetto alle basse.

I vari tipi di soluzioni solide possono essere descritte come sostituzionali, interstiziali e omissionali.

Capitolo 2

Il processo PDCs

La tecnica utilizzata durante questa attività per ottenere materiali bioceramici è la tecnologia denominata PDCs – *polymer-derived ceramics*, anche se per quanto riguarda il presente lavoro di Tesi trova una più corretta denominazione in PDSs – *polymer-derived silicates*.

Si basa sulla produzione ceramici silicatici attraverso la pirolisi di polimeri preceramici; la composizione e la morfologia dei ceramici ottenuti dipendono essenzialmente dalla struttura molecolare del precursore polimerico.

I vantaggi di questa tecnica sono unici, soprattutto in termini di formabilità, essa consente infatti di utilizzare sui ceramici le tecnologie classiche di formatura plastica come stampaggio a iniezione, estrusione, RTM (*resin-transfer-molding*) ecc. Ciò si traduce in prodotti ceramici dai costi di produzione più bassi, anche grazie alle basse temperature di lavorazione in genere al di sotto dei 1200 °C.

Questa tecnica possiede quindi determinati vantaggi e svantaggi nella realizzazione dei solidi cellulari oggetto di questa tesi ovvero *scaffolds* e schiume. Si presenta un quadro generale della tecnologia, riportando le fasi del processo di lavorazione e di formatura sia di *scaffolds* 3D che di schiume cellulari. Lo stato dell'arte, qualora non indicato direttamente nel testo, è un riassunto delle fonti bibliografiche [27 - 38].

2.1 La tecnologia PDCs

PDCs, *polymer-derived ceramics* o ceramici derivati da polimeri è una tecnica che ha acquisito notevole interesse negli ultimi decenni a causa di una serie di vantaggi connessi con l'uso di polimeri preceramici, come ad esempio la grande varietà e disponibilità di precursori, il loro basso costo e la loro facile manipolazione, oltre alle temperature relativamente basse di sintesi e la possibilità di applicare le tecniche di formatura convenzionali dei polimeri. Tutti questi aspetti favorevoli rendono la tecnica PDCs un metodo estremamente promettente per la realizzazione di una classe unica di materiali con caratteristiche straordinarie.

I polimeri preceramici sono polimeri organici-inorganici la cui struttura contiene solitamente atomi di Silicio; si trasformano in ceramico attraverso un trattamento termico che elimina la frazione organica in seguito alla rottura dei legami C-H nel range di temperature tra 600 e 800°C e al conseguente rilascio di H₂, CH₄ ed altri composti volatili.

Questi polimeri vengono impiegati con successo per fabbricare componenti avanzati con peculiari vantaggi rispetto alle procedure convenzionali di sintesi delle polveri, in quanto è possibile produrre materiali ceramici con composizioni non ottenibili sfruttando altri procedimenti.

Le principali applicazioni per i ceramici da polimeri sono le seguenti:

- Fibre: Costituiscono uno dei campi di applicazione di maggior successo (fibre di SiC);
- Compositi a matrice ceramica: L'utilizzo di polimeri preceramici permette vantaggi per quanto riguarda la semplicità, i costi, le temperature di processo, i tempi di ciclo e la facoltà di produrre componenti grandi e complessi;
- Componenti ad elevata porosità: Si possono ottenere strutture con dimensione dei pori nel range compreso dai nanometri ad alcuni millimetri. Tale applicazione riguarda i biomateriali trattati in questa tesi;
- Rivestimenti: I polimeri possono essere depositati su substrati di diversa natura usando varie tecniche basate su fase liquida o su fase vapore. Questo metodo costituisce un'alternativa ai processi PVD e CVD e permette di ottenere rivestimenti in SiCN e SiCO;
- Microcomponenti: È possibile realizzare componenti aventi dimensioni inferiori ad 1 μm . Inoltre l'eccellente resistenza termo meccanica, all'ossidazione e alla corrosione permette l'applicazione nei componenti MEMS (Micro-Electro Mechanical Systems);
- Resistori ceramici: Sono caratterizzati da elevata resistenza alle alte temperature ed agli shock termici.

2.1.1 I polimeri preceramici

I precursori ceramici attualmente più utilizzati e che hanno avuto maggiore sviluppo sono quelli a base siliconica. Essi sono costituiti da una catena polimerica Si-X a cui sono legati lateralmente dei gruppi funzionali, come schematizzato in *Figura 2.1*.

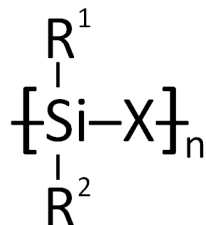


Figura 2.1. Formula generale semplificata per un polimero preceramico a base di Si.

Il gruppo X è il parametro più importante per modificare il composto preceramico e determinare la classe del polimero, a seconda di questo si possono ottenere diversi polimeri preceramici riportati in *Tabella 2.1*.

Tabella 2.1. Classi principali di polimeri preceramici Si-based, in base alla natura del gruppo X nella catena polimerica.

Gruppo X	Classe di polimero
Si	Polysilanes
O	Polysiloxanes, Polysilsesquixanes
CH₂	Polycarbosilanes
NH	Polysilazanes, polysilsesquiazanes
B	Polyborosilanes
N=C=N	Polycarboxyilediimmide

I gruppi R₁ e R₂, invece, possono essere modificati per modulare la stabilità termica e chimica, così come la solubilità del polimero, le proprietà elettroniche, ottiche e reologiche. Questi gruppi funzionali laterali sono generalmente a base carbonio come ad esempio gruppi H, aromatici o alifatici. In particolare la solubilità, la stabilità termica e la viscosità in funzione della temperatura sono caratteristiche importanti per la lavorazione dei polimeri.

Una descrizione più completa e la rappresentazione grafica dei polimeri preceramici silicatici sono riportate in *Figura 2.2*, anche se non tutte queste classi sono diffuse o prodotte industrialmente. Ciò è dovuto principalmente al fatto che, oltre alle proprietà e prestazioni dei ceramici finali, vi è una serie di altri fattori che influenzano la scelta di un polimero preceramico. Il parametro più importante da considerare, soprattutto dal punto di vista industriale, è il costo dei precursori, ma anche il trattamento specifico che ogni precursore richiede è rilevante ed è influenzato dalla sua durata chimica, stabilità termica, tossicità e reattività nei confronti dell'atmosfera utilizzata o di altre sostanze.

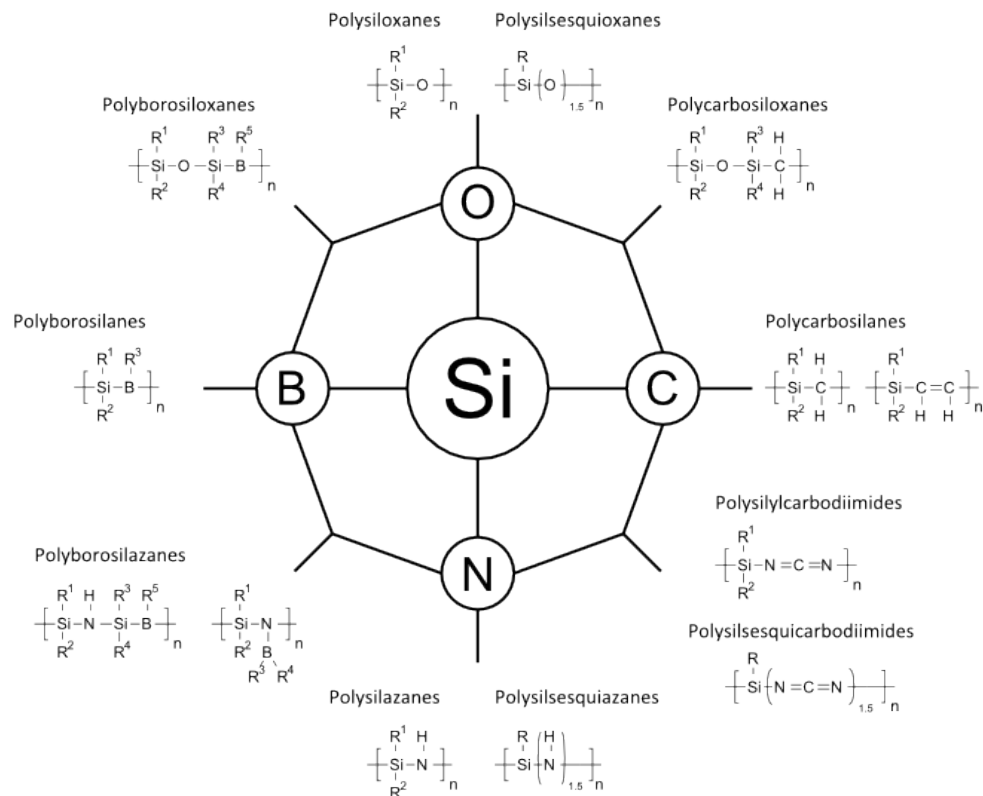


Figura 2.2. Principali classi di polimeri preceramici Si-based nel sistema Si-O-C-N-B.

2.1.1.1 Polisilossani

Tra tutte le classi di polimeri preceramici la più studiata è la classe dei polisilossani, chiamati anche siliconi, poiché uniscono alle proprietà di stabilità chimica e termica costi decisamente contenuti; sono caratterizzati essenzialmente da:

- Peso molecolare sufficientemente alto, per evitare la volatilizzazione dei componenti a basso peso molecolare;
- Proprietà reologiche adeguate e buona solubilità per consentire i processi di formatura;
- Presenza di gruppi funzionali che garantiscono la reattività in fase di reticolazione.

La semplicità di sintesi e la stabilità termo-meccanica rende i siliconi versatili e processabili in condizioni normali, senza particolari precauzioni. Sono generalmente privi di odore, non tossici, resistenti all'acqua, resistenti chimicamente all'ossidazione, stabili ad alte temperature e isolanti elettricamente. Inoltre presentano proprietà tecnologiche come bassa tensione superficiale, bassa temperatura di transizione vetrosa e bassa idrofobicità; possono presentarsi in forma sia liquida che solida; da solidi possono essere facilmente sciolti in diversi solventi organici o possono essere fusi a temperature inferiori a 150 °C.

Milioni di prodotti moderni si affidano in qualche modo ai siliconi per prestazioni e affidabilità e vengono utilizzati anche in diverse industrie come lubrificanti, adesivi, sigillanti, guarnizioni, liquidi refrigeranti etc. Inoltre, grazie alla loro estremamente bassa reattività e atossicità, hanno applicazioni biomediche, come nelle protesi mammarie, oppure possono essere utilizzati nel settore dei prodotti per la cura della persona o come additivi alimentari.

Essi sono ampiamente utilizzati anche in settori *hi-tech*, come nell'industria aerospaziale per aumentare la durata di componenti vitali, nell'industria dei semiconduttori come materiali di protezione, nel settore ferroviario come isolamento duraturo del motore e lubrificanti per cuscinetti, o nell'industria elettronica e delle telecomunicazioni per la lavorazione di prodotti come fibre ottiche di vetro, wafer di silicio e chip.

Il metodo di sintesi più comune per la preparazione di polisilossani comprende la reazione dei cloro (organo)silani con acqua, ma sono state anche proposte altre vie di sintesi, come la reazione di policondensazione di silani lineari funzionalizzati e la polimerizzazione ad apertura di anello di *silathethers* ciclici.

Una importante sottoclasse è rappresentata dai polisilsesquiossani, caratterizzati dalla formula generale $-[RSi-O_{1.5}]_n-$ e da una struttura molecolare altamente ramificata che può portare a differenti configurazioni spaziali (*Figura 2.3*).

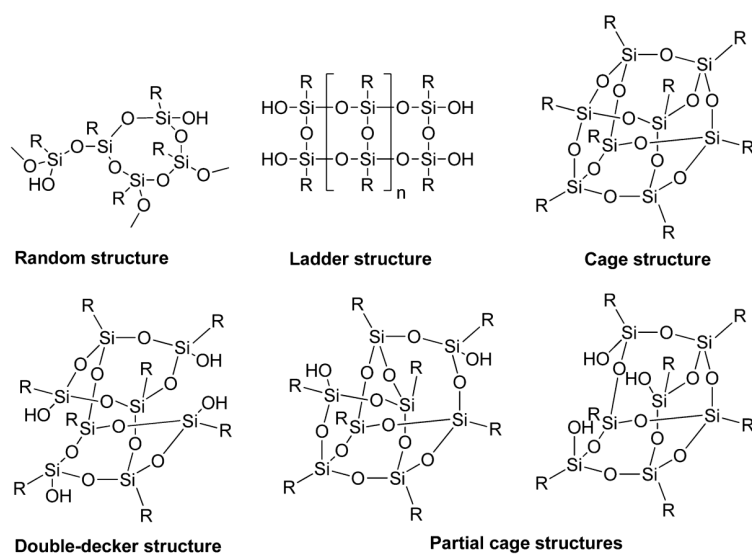


Figura 2.3. Tipologie generali di polisilsesquiossani.

Grazie alla loro elevata ramificazione questa classe di polimeri è spesso utilizzata come resine siliciche, generalmente sono solidi a temperatura ambiente e hanno rese ceramiche molto elevate. In un'atmosfera non ossidante, la pirolisi di polisilossani forma un residuo amorfo di ossicarburo di silicio, costituito da legami Si-O e Si-C, impossibile da ottenere con tecniche di lavorazione più tradizionali.

La presenza di entrambi i legami covalenti è alla base di tutte le proprietà distintive dei polimeri preceramici, come la maggiore stabilità termica e la resistenza al creep, all'ossidazione e alla corrosione. Essi risultano neri a causa del residuo "libero" di C presente all'interno del materiale. Se invece la pirolisi è condotta in atmosfera ossidante, cioè in aria, il C sarà ossidato a CO₂; il residuo derivante sarà di colore tipicamente bianco, diversamente dal caso precedente. I polimeri preceramici protagonisti in questo lavoro di Tesi sono i seguenti:

- **Silres[®] H62C**, prodotto dalla Wacker-Chemie GmbH a Monaco, in Germania. Si tratta di un metil-fenil-vinil-idrogeno polisilossano liquido con una densità a 25 °C di 1.12 g/cm³ quando non reticolato, e di 1.16 g/cm³ dopo reticolazione. La sua viscosità va dai 1000 mPa·s a 25 °C fino ai 95 mPa·s a 80 °C. È caratterizzato da una bassa volatilità, che lo rende adatto, ad esempio, per impregnazioni sotto vuoto. La reticolazione avviene per trattamento a temperature comprese tra 180 °C e 220 °C senza l'aggiunta di catalizzatori, e può essere lavorato fino a circa 80 °C per diminuirne la viscosità. La resa ceramica del polimero H62C è del 56 % in peso, in quanto le sue catene sono meno ramificate di altri polisilossani: la maggior linearità permette la volatilizzazione dei frammenti a minor peso molecolare. Questo silicone è solubile in vari solventi aromatici, chetoni, esteri e idrocarburi clorurati.
- **Silres[®] MK**, prodotto dalla Wacker-Chemie GmbH a Monaco, in Germania. Si tratta di un metil-polisilsesquiossano in forma di polvere ad alto grado di reticolazione: dal foglio tecnico fornito si apprende che la T_g va da 35 °C a 55 °C e la densità di bulk vale 0.5 g/cm³. Presenta ottima resistenza termica fino ai 300 °C unitamente ad un'alta reattività, qualità che lo rende adatto a giuntare laminati o a produrre pre-impregnati di eccellente stabilità. Possiede il più alto tenore in SiO₂ tra tutte le resine siliconiche Wacker ed ha anche un'alta resa ceramica, che si attesta sull'84 % in peso. Altre proprietà del silicone MK sono la forza di legame, la ridotta evoluzione in fumi durante la pirolisi e la solubilità in solventi aromatici, chetoni, esteri, paraffine e idrocarburi clorurati che lo rendono molto adatto alla miscelazione con *fillers* di vario genere. Sopra i 350 °C questo silicone va incontro ad una degradazione ossidativa che porta alla formazione di SiO₂, CO₂ e H₂O senza formazione di ceneri.

2.2 Aggiunta di fillers reattivi

La conversione da polimero a ceramico è una fase cruciale di tutta la lavorazione dei polimeri preceramici, effettuata molto spesso sopra ai 400 °C in atmosfera selezionata inerte o reattiva, ossidante o non ossidante. Un inconveniente caratteristico della tecnologia PDCs è lo scarso controllo sul ritiro e sull'integrità strutturale dei prodotti della trasformazione. L'eliminazione delle frazioni organiche tipiche di un polimero avviene con significativo rilascio di gas in forma di metano, benzene ed idrogeno con conseguente ritiro geometrico: la densità può variare da un valore di $\sim 0,8-1,2 \text{ g/cm}^3$ tipico per un polimero a $\sim 2,2 \text{ g/cm}^3$ per un ceramico amorfo a base di silicio. Il rilascio di gas porta alla formazione di micro e macro porosità non controllabili e una fessurazione consistente di pezzi monolitici; questi difetti influenzano le proprietà meccaniche del componente e consentono la sintesi solo di oggetti con parete sottile, tipicamente con uno spessore inferiore a poche centinaia di micrometri come fibre, schiume a celle aperte, rivestimenti o componenti altamente porosi, in cui il gas deve compiere un percorso di diffusione molto breve. Durante la pirolisi, tutte le tensioni legate al ritiro, al rilascio dei prodotti gassosi e ai riarrangiamenti strutturali non possono essere alleggeriti dal flusso viscoso o da altri meccanismi.

Negli ultimi anni si è cercato con grande sforzo di sviluppare metodi per eliminare, o almeno limitare, il ritiro del materiale e la generazione di crepe. Inizialmente come soluzione è stata proposta la pressatura a caldo di materiali prepirolizzati e di recente, la tecnica spark plasma sintering (SPS) è stata utilizzata con successo per produrre componenti nanostrutturati densi. Sebbene abbia avuto successo, lo stampaggio a caldo deve essere impiegato su polveri di polimero preceramico che siano almeno già parzialmente pirolizzate, in quanto la generazione di gas di decomposizione durante la pressatura creerebbe problemi all'apparecchiatura.

Gli studi condotti da Greil hanno fornito una soluzione fondamentale per l'ottenimento di monoliti, praticamente densi con una porosità in genere inferiore al 15% in volume, senza cricche, con un singolo processo di ceramizzazione, tramite una più o meno marcata modifica chimica del processo PDCs. Egli ha dimostrato, in particolare, l'impatto che hanno due tipi di additivi solidi, o cariche, quelli passivi o inerti, e quelli attivi.

Tali *fillers* possono essere di varia natura (polimerica, metallica, ceramica), forma (particelle equiassiche, grani allungati, whiskers, piastrine, nanotubi, fibre tritate/lunghe/nanometriche) e dimensione (da nanoparticelle a fibre di diversi centimetri).

La pirolisi in aria a temperature superiori a 400 °C provoca l'ossidazione delle frazioni organiche e la creazione di silice altamente reattiva che può facilmente formare silicati con le polveri di riempimento. Rispetto ai metodi sol-gel, non è necessario né un controllo rigoroso della sintesi né di solventi o precursori infiammabili e possono essere impiegate tecniche di formatura plastica.

2.2.1 Fillers passivi

Fillers passivi o inerti sono polveri ceramiche che non reagiscono con il residuo ceramico proveniente dal polimero preceramico, con i gas di decomposizione o con l'atmosfera. Tali riempitivi, come si può notare nella *Figura 2.4*, diluiscono semplicemente il polimero preceramico, andando quindi a diminuire la quantità di gas generato e il ritiro volumetrico associato, riducendo la probabilità di formare cricche macroscopiche durante la lavorazione. Il ceramico finale ha una chimica modificata, nel senso che la matrice polimerica che ne deriva è accompagnata da fasi secondarie. Tipici esempi di cariche passive sono polveri di SiC o Si₃N₄, ma sono stati utilizzate anche polveri di Al₂O₃, B₄C e BN.

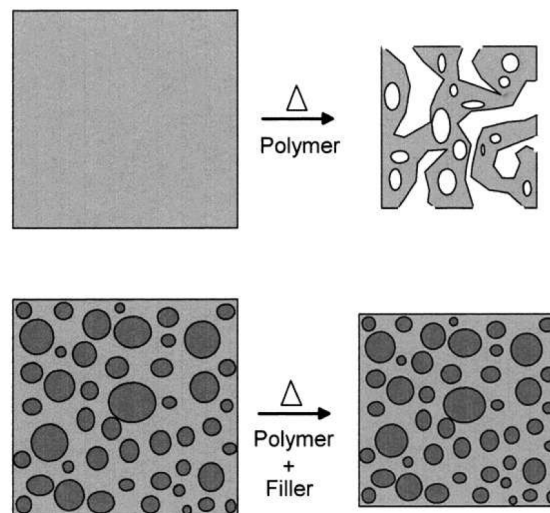


Figura 2.4. Riduzione del ritiro di un componente bulk prodotto tramite tecnica PDCs con l'aggiunta di un filler passivo.

Come ultima osservazione, l'introduzione di *fillers* passivi può anche rappresentare un modo per abbassare il costo globale del prodotto ceramico finale.

2.2.2 Fillers attivi

Peter Greil e al. denominarono "attivi" riempitivi specifici, soprattutto, ma non solo, metalli e composti intermetallici, poiché reagiscono sia con la matrice ceramica, sia con i prodotti gassosi di termolisi e con il gas di riscaldamento durante la conversione del polimero preceramico, generando carburi, nitruri, ossidi o siliciuri. Molto lavoro è stata dedicato all'ottimizzazione di questo metodo per fabbricare componenti *near-net-shape* dalla conversione dei polimeri con limitato o assente ritiro globale.

Questo è ottenibile grazie all'incorporazione di cariche metalliche che formano composti tramite reazione delle cariche con le specie gassose derivanti dalla decomposizione del polimero o, in alternativa, con l'atmosfera del forno. La formazione di questi composti porta ad una conseguente espansione in volume fino al 50 % che va a compensare così il ritiro del polimero. La *Figura 2.5* mostra un esempio di azione dei *fillers* attivi.

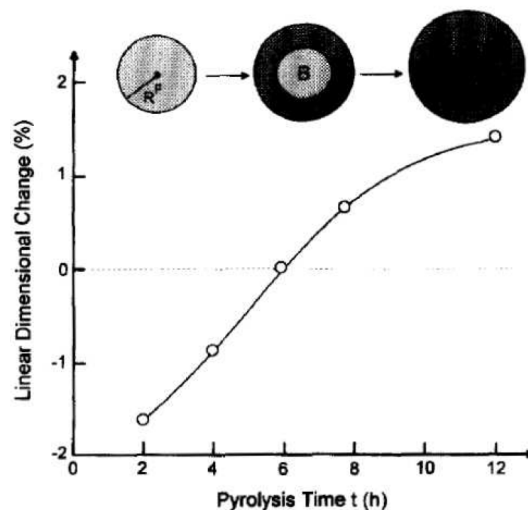


Figura 2.5. Variazione lineare delle dimensioni di una miscela polisilossano/40 vol% boro pirolizzata a 1480 °C in N₂, in funzione del tempo di reazione del filler.

Specialmente quando si lavora con cariche attive, la scelta dei polimeri e la combinazione polimero/riempitivo non può essere arbitraria, ma deve basarsi su criteri termodinamici di stabilità, caratteristiche di espansione dei *fillers* e studio delle reazioni cinetiche.

Il materiale risultante viene così generato dalla combinazione del polimero preceramico, del *filler* attivo introdotto, dei sottoprodotti gassosi derivanti dalla decomposizione del polimero e dall'atmosfera di trattamento. Ossidi utilizzati come *fillers* possono essere attivi o inerti, a seconda della velocità di riscaldamento, della temperatura e della loro dimensione.

Va inoltre tenuto presente che, poiché molti riempitivi attivi reagiscono con i sottoprodotti gassosi derivanti dalla decomposizione della fase polimerica, la resa ceramica finale del polimero preceramico risulta superiore rispetto a quando i riempitivi attivi non sono presenti. La *Tabella 2.2* riassume i vari tipi di ceramici silicatici e ossinitruri che sono stati finora prodotti nell'Università degli Studi di Padova a partire da polimeri preceramici contenenti cariche attive di dimensioni nanometriche. La produzione di ceramici silicatici implica generalmente formatura, essiccazione e trattamento termico in aria, un metodo relativamente semplice che sfrutta la silice amorfa proveniente dal polimero preceramico. Questo è il metodo d'interesse per la parte sperimentale di questa Tesi.

Tabella 2.2. Riassunto dei ceramici silicatici e ossinitruri, da polimeri preceramici e cariche attive di dimensioni nanometriche, preparati presso l'Università degli studi di Padova fino al 2014.

Ceramic phase	Polymer	Nano-sized filler	Secondary components	Remarks
Mullite (3Al ₂ O ₃ ·2SiO ₂)	MK	γ-Al ₂ O ₃ (15 nm, E)	-	Monoliths grain size <300 nm
	MK + H62C		-	Denser samples
	H62C		Borax	Acicular mullite crystals
ZTM (Zirconia Toughened Mullite)	MK	γ-Al ₂ O ₃ (15 nm, E)	ZrO ₂ (13 nm, E) TiO ₂ (13 nm, E)	Reinforced monoliths (K _C ~ 6.5 MPa·m ^{0.5})
Wollastonite (CaO·SiO ₂)	MK	CaO (<170 nm, D)	Ca-acetate	Monoliths and foams
	MK + H62C	CaCO ₃ (90 nm, P)	n-HAp, m-HAp	3D scaffolds
		CaCO ₃ (90 nm, P)	TEOS	
Yttrium mono-silicate (Y ₂ O ₃ ·SiO ₂)	MK	Y ₂ O ₃ (30–50 nm, I)	Eu ₂ O ₃ (45-60 nm, C)	Phosphor powders
Yttrium di-silicate (Y ₂ O ₃ ·2SiO ₂)		-	-	Environmental barrier coatings
Zircon (ZrO ₂ ·SiO ₂)	MK, H62C	ZrO ₂ (13 nm, E)	TiO ₂ (13 nm, E) Zircon seeds	Monoliths, environmental barrier coatings
Forsterite (2MgO·SiO ₂)	MK, H62C	MgO (30 nm, I)	TiO ₂ (13 nm, E) m-TiO ₂	Monoliths for dielectric components
Willemite (2ZnO·SiO ₂)	MK	ZnO (30–50 nm, I)	Mn-acetate	Phosphor powders
Cordierite (2MgO·2Al ₂ O ₃ ·5SiO ₂)	MK, H62C	γ-Al ₂ O ₃ (15 nm, E) MgO (30 nm, I)	-	Monoliths and foams
Gehlenite (2CaO·Al ₂ O ₃ ·SiO ₂)	MK	γ-Al ₂ O ₃ (15 nm, E)	Eu ₂ O ₃ (45-60 nm, C)	Phosphors for treatment in air or in N ₂ ; Ce-doping effective in N ₂
		CaCO ₃ (90 nm, P)	CeO ₂ (20 nm, M)	
Akermanite (2CaO·MgO·2SiO ₂)	MK, H62C	CaCO ₃ (90 nm, P) MgO (30 nm, I)	m-HAp Borax	Monoliths and foams
Hardystonite (2CaO·ZnO·2SiO ₂)	MK	γ-Al ₂ O ₃ (15 nm, E) ZnO (30–50 nm, I)	Eu ₂ O ₃ (45-60 nm, C)	Phosphor powders
β'-SiAlON	MK, H44	γ-Al ₂ O ₃ (15 nm, E)	Si ₃ N ₄ , AlN, SiC	Monoliths, foams, ceramic joints
	PSZ20, NN120-20		Si ₃ N ₄ (20 nm, G)	Monoliths,
			Eu ₂ O ₃ (45-60 nm, C)	phosphor powders
Ca-α'-SiAlON	PSZ20	γ-Al ₂ O ₃ (15 nm, E) CaCO ₃ (90 nm, P)	Eu ₂ O ₃ (45-60 nm, C)	Phosphor powders
Y-Si-O-Ns	MK	Y ₂ O ₃ (30–50 nm, I)	Eu ₂ O ₃ (45-60 nm, C) CeO ₂ (20 nm, M)	Phosphor powders

Sebbene l'uso della pirolisi controllata di polimeri preceramici con *fillers* attivi abbia dimostrato di essere estremamente efficace nel ridurre la quantità totale di porosità nei ceramici finali, con un conseguente miglioramento delle proprietà meccaniche, va detto che questa tecnica richiede un controllo estremamente preciso di tutte le condizioni di trattamento termico, così come delle caratteristiche delle materie prime. Modelli teorici sono stati creati per una scelta a priori delle condizioni di lavorazione e delle caratteristiche dei riempitivi, ma piccole variazioni dell'ambiente di trattamento delle particelle, della distribuzione delle particelle e delle proprietà fisiche delle stesse possono portare a significative variazioni nella cinetica di reazione. Per questi motivi, una procedura sperimentale per tentativi è ancora generalmente necessaria per ottimizzare le proprietà finali dei materiali prodotti secondo processo PDCs.

2.3 Fasi del processo PDCs

Le fasi che caratterizzano la tecnologia *polymer-derived ceramics* e portano alla formazione del ceramico finale sono sostanzialmente quattro: formatura del polimero preceramico, reticolazione, pirolisi ed eventuale cristallizzazione.

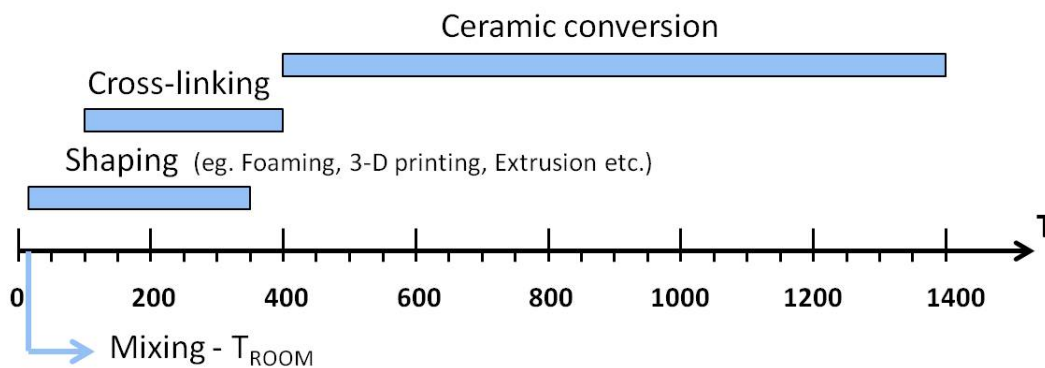


Figura 2.6. Fasi e temperature standard operative del processo PDCs che portano alla formazione del ceramico finale

Nei paragrafi successivi vengono descritti singolarmente gli step che portano alla realizzazione del ceramico, sia dal punto di vista tecnologico, sia considerando l'evoluzione che il composto subisce durante il passaggio da una fase all'altra. Si sottolinea inoltre che la fase di formatura è preceduta, in genere, dall'aggiunta di *fillers* di varia natura (§2.2) al polimero preceramico e di conseguenza va preventivata una fase di miscelazione e omogeneizzazione del composto: questo stadio è piuttosto critico e va condotto con accuratezza per garantire l'ottenimento di un prodotto finale perfettamente omogeneo.

2.3.1 Formatura

Come accennato anche nel §2.1 la natura polimerica dei costituenti preceramici, porta ad una serie di vantaggi soprattutto in questa prima fase del processo produttivo. Infatti i polimeri possono essere lavorati e formati con numerose tecniche semplici ed economiche. Nel dettaglio vediamo che le tecniche di formatura di materie plastiche utilizzabili sono la pressatura a caldo, l'estrusione, lo stampaggio ad iniezione, il rivestimento di substrati a spruzzo, il rivestimento per immersione, lo spin coating, la chemical vapour deposition (CVD), ecc. L'unione del processo PDCs con tecnologie di formatura speciali dà la possibilità di realizzare componenti unici, generalmente non facili, se non impossibili, da ottenere con tecnologia delle polveri. Alcuni esempi rappresentativi includono la produzione di fibre, l'infiltrazione di *scaffolds* preformati per compositi a matrice ceramica (CMC), adesione/unione di componenti ceramici,

produzione di micro-componenti mediante polimerizzazione selettiva di substrati con tecniche litografiche e realizzazione di schiume cellulari o *scaffolds* altamente porosi mediante schiumatura diretta, Robocasting, etc.

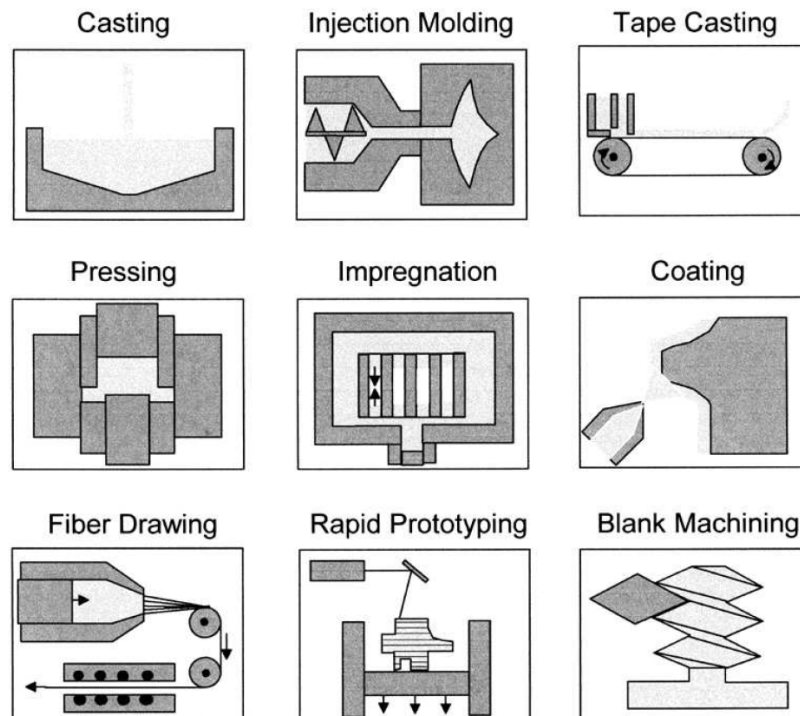


Figura 2.7. Tecnologie di formatura per PDCs.

Partire da un composto polimerico permette una facile fabbricazione di compatti verdi senza necessità di leganti addizionali che presentano una sufficiente resistenza meccanica sia per ulteriori manipolazioni sia, se necessario, per lavorazioni dopo reticolazione. La possibilità di lavorazione prima della ceramizzazione è un notevole vantaggio rispetto alla tecnologia delle polveri, in quanto permette un controllo preciso della forma ed evita i problemi connessi all'usura e fragilità dei materiali ceramici.

Infine va sottolineato che questo approccio ha importanti vantaggi tecnologici rispetto ad esempio al processo sol-gel che derivano per lo più dall'uso di polimeri preceramici, infatti questi:

1. Non hanno alcun problema di essiccazione che ostacoli la possibilità di fabbricare componenti *bulk* e non necessitano di tempi di lavorazione lunghi per gelificare ed essiccare;
2. Non richiedono solventi infiammabili, possono essere trattati allo stato fuso e le loro soluzioni sono stabili nel tempo;
3. Non richiedono alcuna procedura speciale per la loro manipolazione, almeno per i polisilossani disponibili in commercio.

2.3.1.1 Formatura tramite Robocasting/Direct Ink Writing (DIW)

Additive Manufacturing o Manifattura Additiva (AM), conosciuta anche come stampa 3D, descrive una classe di tecnologie utilizzate per creare un oggetto tridimensionale tramite sovrapposizione di strati di materiale sotto il controllo del computer.

Essa è definita dalla ASTM F2792-12a (Standard Terminology for Additive Manufacturing Technologies) come “the process of joining materials to make objects from 3D model data, usually layer upon layer, as opposed to subtractive manufacturing methodologies, such as traditional machining”.

Le varie tecnologie di additive manufacturing presenti possono essere classificate in due grandi categorie:

1. Le tecniche di “stampa diretta”, nelle quali il materiale viene direttamente depositato nel punto di interesse a formare la geometria desiderata:
 - *Direct Inkjet Printing* (DIP)
→ deposizione di singole gocce di miscela ceramica.
 - *Fused Deposition Modeling* (FDM) e *Direct Ink Writing* (DIW) o *Robocasting*
→ estrusione di filamento polimerico/ceramico.

2. Le tecniche di “stampa indiretta”, nelle quali il primo strato depositato funge da basamento, mentre i successivi *layers* vengono realizzati a partire da uno strato ben calibrato di polvere del materiale tramite passaggio di laser o leganti (solventi). Il residuo in eccesso agisce da supporto nei confronti dei *layers* successivi e viene rimosso al termine della stampa:
 - *Powder Based 3D Printing* (P-3DP)
→ compattazione locale di polvere tramite collanti.
 - *Selective Laser Sintering* (SLS)
→ incisione avviene tramite tecniche laser.
 - *Stereolitografia* (SL)
→ fotopolimerizzazione localizzata.

La deposizione diretta di impasti ceramici o preceramici è senza dubbio la tecnologia di *Additive Manufacturing* (AM) più utilizzata per generare strutture porose. Essa consiste nell'estrusione attraverso un ugello di una pasta viscosa sotto forma di filamento.

Il controllo delle proprietà reologiche del filamento è essenziale per evitare la deformazione del pezzo dopo estrusione e/o cedimenti dei filamenti stessi.

La tecnica è stata originariamente brevettata e sviluppata da Cesarano al Sandia National Laboratories negli Stati Uniti sotto il nome di "Robocasting".

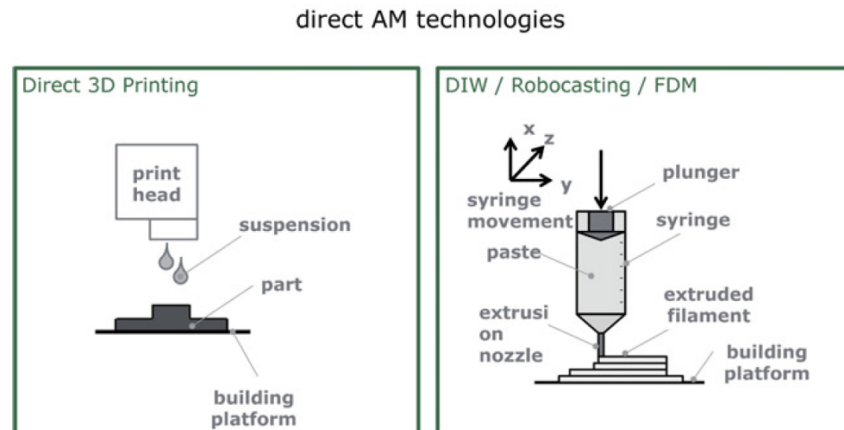


Figura 2.8. Schema delle tecnologie AM dirette.

Nella stampa 3D, la sospensione ceramica subisce una trasformazione passando da un comportamento pseudoplastico a un comportamento dilatante quando viene estrusa in aria, fenomeno che viene innescato da un leggero essiccamento dell'inchiostro per effetto dell'evaporazione del solvente con la quale viene preparata. Per evitare che questi problemi si manifestino, gli inchiostri devono essere appositamente sviluppati.

L'essiccazione in aria presenta un limite importante in quanto limita il diametro minimo dell'ugello per la stampa ad un valore di circa 500 micron.

L'uso di un polimero preceramico massimizza tutti i vantaggi precedenti poiché:

1. Si può modificare il polimero di partenza per adattare la reologia dell'inchiostro;
2. I *fillers* carichi possono modificare la reologia dell'inchiostro solamente in base alla dimensione e le proprietà delle particelle;
3. Molti polimeri preceramici si sciolgono in solventi e quindi possono essere resi meno viscosi a seconda di quanto solvente viene aggiunto alla miscela di partenza.

In *Tabella 2.3* la tecnica *DIW/Robocasting* è messa a confronto con le altre tecnologie di *Additive Manufacturing*. Le caratteristiche più comuni della miscela di partenza sono: viscosità = $10 \div 100 \text{ Pas @ } 100 \text{ s}^{-1}$, $G' \text{ (eq)} = 10^5 \div 10^6 \text{ Pa}$, $\text{yield stress} = 10^2 \div 10^3 \text{ Pa}$. I filamenti sono prodotti sotto queste condizioni da ugelli mediante nel *range* di $100 \div 1000 \text{ }\mu\text{m}$ e possono raggiungere densità molto elevate con microporosità quasi assente.

Tabella 2.3. Principali caratteristiche a confronto di tecnologie AM utilizzate per materiali ceramici.

Technology [†]	Feedstock (liquid or solid)	Dense struts (dense ceramic, but limited volume)	Monolithic	Part dimension [‡] (size that can be produced economically)	Surface (quality of parts, not of single struts)	Precision	Cost of feedstock preparation	Cost of process	Direct versus indirect
P-3DP	Solid	No	No	M-XL	Medium	100 µm	Low	Medium	Indirect
P-SLS	Solid	No	No	M-L	Medium	100 µm	Low	High	Indirect
P-SLM	Solid	No	No	M-L	Medium	100 µm	Low	High	Indirect
S-3DP	Liquid	Yes	Yes	M-XL	High	100 µm	Low	Medium	Indirect
S-SLS	Liquid	Yes	Yes	M-L	High	100 µm	Low	High	Indirect
SL	Liquid	Yes	No	XS-M	High	<1 µm	Medium-High	Medium	Indirect
LOM	Solid	Yes	Yes	M-L	Medium	100 µm	Medium	Medium	Indirect
DIW/ Robocasting	Liquid	Yes	No	S-XL	Low	10 µm	Low-Medium	Low	Direct
FDM	Liquid	Yes	No	S-M	Low	100 µm	Medium	Low	Direct
DIP	Liquid	Yes	Yes	S-M	Medium	10 µm	High	Medium	Direct
Direct Dep	Liquid				Low				Direct

[†]XS = 100 µm; S = 1 mm; M = 10 mm; L = 0.1 m; XL = 1 m.

La tecnica di formatura DIW/Robocasting verrà utilizzata per produrre *scaffolds* da polimeri preceramici più *fillers* (Capitolo 5) e risulta perfettamente adeguata nel soddisfare le richieste di idealità di forma, alla luce anche dei vari successi riportati in letteratura (Capitolo 1).

2.3.2 Reticolazione

Un requisito specifico per la trasformazione di componenti che utilizzano polimeri preceramici è che, dopo la formatura, la parte polimerica termoindurente deve essere reticolata per conservare la forma durante la ceramizzazione. La metodologia più comune per ottenere l'indurimento della fase polimerica è la cura termica a temperature inferiori di 200 °C, che può essere facilmente ottenuta incorporando gruppi funzionali idonei come gruppi H, OH, o vinilici nella struttura del polimero, permettendo così la reticolazione mediante reazioni di addizione o condensazione. Le temperature di indurimento termico potrebbero anche essere abbassate usando catalizzatori o iniziatori radicalici, con l'ulteriore vantaggio di un aumento della resa ceramica dovuto all'abbassamento della perdita di oligomeri per evaporazione.

L'indurimento può essere raggiunto utilizzando strategie diverse, come radiazioni UV su gruppi fotosensibili corretti, raggi γ , raggi elettronici o uso di sostanze reattive, in forma di gas o plasma. Può essere applicata anche la reticolazione laser, soprattutto quando è richiesto un elevato grado di complessità morfologica.

Durante la fase di cura in genere può avvenire un rilascio di sottoprodotti gassosi come esempio acqua o etanolo a seconda del meccanismo di reticolazione e dei *fillers* attivi presenti in miscela.

La conseguenza di questo rilascio di gas è la generazione di bolle che possono rimanere intrappolate all'interno del mezzo polimerico; questo fenomeno può essere sfruttato per la produzione di prodotti porosi come schiume cellulari da processi auto-espandenti o può essere dannoso se il prodotto voluto è un ceramico denso privo di pori.

Va osservato che il grado di reticolazione influenza il comportamento reologico di un polimero preceramico, deve quindi essere controllato attentamente soprattutto quando si utilizzano tecnologie di formatura derivate dai materiali plastici. Inoltre, è da notare che, quando un polimero preceramico è riempito con una maggiore quantità di *fillers*, la fase di reticolazione potrebbe non essere necessaria poiché gli additivi solidi possono offrire sostegno sufficiente alla matrice polimerica per mantenere la forma in seguito al riscaldamento. Infatti, l'incorporazione di riempitivi solidi influisce fortemente sul comportamento reologico dei polimeri preceramici e dei polimeri in generale. La fase di reticolazione infine è di fondamentale importanza per l'ottenimento di elevate rese ceramiche tramite pirolisi: più efficaci sono le reazioni di *cross-linking* più i composti polimerici saranno altamente ramificati con peso molecolare superiore e quindi con un minor contenuto di oligomeri e catene a basso peso molecolare che potrebbero volatilizzare a temperature più elevate.

2.3.3 Conversione da polimero a ceramico

Questa fase è probabilmente la più importante dell'intero processo di trasformazione dei polimeri preceramici ed è il risultato della decomposizione termica che avviene al di sopra di circa 400 °C. Ciò che resta è un residuo totalmente inorganico e non volatile.

Il meccanismo che sta alla base della pirolisi è abbastanza complesso e comprende una serie di eventi che coinvolgono un riarrangiamento strutturale e delle reazioni radicaliche, che portano alla scissione dei legami chimici (ad esempio Si-H, Si-C, C-H), al distaccamento di alcuni gruppi funzionali organici come CH₄, C₆H₆, CH₃NH₂ e alla formazione di un *network* inorganico. L'intero processo può essere semplificato in una sequenza di fenomeni, ognuno dei quali ha luogo in un *range* di temperature ben definito. Ad esempio, nel caso delle resine polisilossaniche, è stato osservato che tra i 600 °C e gli 800 °C il metano è la specie più facilmente rilasciata, mentre nel *range* tra i 600 °C e i 1100 °C è l'idrogeno. Inoltre a temperature superiori a 400 °C si forma una rete di canali porosi aperti, che, dopo ulteriore riscaldamento a 800÷1000 °C, può diminuire.

L'analisi quantitativa e lo studio dettagliato del comportamento del polimero nel corso del processo di decomposizione possono essere condotti attraverso un'analisi termo-gravimetrica (TGA), di cui si fornisce un tipico andamento in *Figura 2.9*.

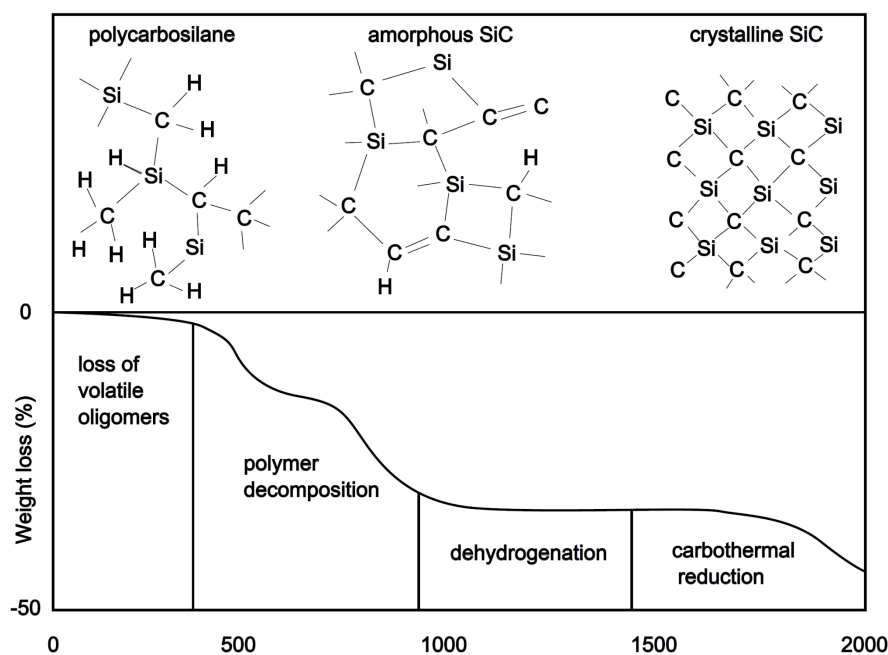


Figura 2.9. Tipiche fasi di trasformazione strutturale e analisi TG durante la decomposizione termica di un polycarbosilano in atmosfera inerte (Ar).

Nella *Figura 2.9* si può anche osservare la suddivisione nelle diverse fasi riconoscibili durante l'intero processo.

La resa ceramica o *ceramic yield*, è un parametro basilare da considerare nell'ambito della conversione dei polimeri preceramici. Essa viene definita come il rapporto tra la massa iniziale di polimero e la massa del residuo finale, dopo la pirolisi. Il processo di conversione da materiale organico a inorganico può considerarsi terminato tra gli 800 °C e 1000 °C ed è normalmente associato a una perdita in peso variabile tra il 10 % e il 30 %, quindi tipiche rese ceramiche si aggirano tra il 70 % e il 90 %. Naturalmente la natura del precursore polimerico e la sua chimica sono essenziali nel determinare la resa ceramica finale: polimeri a basso peso molecolare o presenza di oligomeri possono ridurla drammaticamente, a causa di fenomeni di volatilizzazione e reazioni di depolimerizzazione. Per questo motivo, la reticolazione rappresenta uno *step* imprescindibile prima di condurre la pirolisi. Anche la presenza di gruppi laterali ha una certa influenza nel determinare le possibilità di *cross-linking* e quindi la resa ceramica finale. Durante la decomposizione termica si verifica il rilascio di sottoprodotti gassosi, il fenomeno è inevitabilmente accompagnato dalla formazione di cricche e porosità all'interno del materiale, oltre che da una contrazione volumetrica più o meno pronunciata. Si osserva un incremento della densità di un fattore 2 o 3.

Se i cambiamenti strutturali nel materiale non sono accompagnati da flusso viscoso o processi diffusivi, la combinazione di tensioni interne, pori e cricche formatesi può portare alla distruzione del componente, soprattutto in presenza di vincoli esterni come possono essere per esempio rivestimenti.

Questo è il motivo per cui, come già riportato, si riescono a produrre coi polimeri preceramici non caricati solo spessori di poche centinaia di μm , come fibre, film sottili e schiume. Al termine della conversione i ceramici ottenuti mostrano una struttura amorfa, tipica del processo PDCs, e costituita da un miscuglio di legami covalenti (soprattutto Si-C, Si-O, Si-N e C-C). Salendo con la temperatura (1000-1800°C) si verificano ulteriori riarrangiamenti, che generano una separazione di fase e la cristallizzazione di fasi diverse. Anche questo fenomeno dipende dalla natura dei precursori di partenza causando a volte la formazione di nanocristalli e di zone ricche di C soggette a grafitizzazione. Nel caso di elevate temperature o lunghi tempi di mantenimento si può raggiungere un equilibrio tra le fasi cristalline. Solitamente la devettrificazione è indesiderata, poiché è spesso accompagnata da una degradazione delle proprietà dei PDCs. Infine altro aspetto fondamentale nel corso della conversione da polimero a ceramico è il tipo di atmosfera scelta, in particolare la composizione dipende chiaramente dal sistema utilizzato. In atmosfera inerte, per esempio, i polycarbosilani conferiscono una struttura amorfa di SiC, polisilossani e polisilsesquiossani una struttura amorfa di SiCO. In generale, un'atmosfera ossidante porta alla formazione di una matrice di silice amorfa completamente priva di carbonio, il quale si consuma in reazioni di ossidazione.

2.4 Evoluzione del processo PDCs

La tecnologia PDCs utilizzata per produrre silicati da polimeri preceramici negli anni è stata sviluppata e migliorata anche grazie ai lavori svolti presso i laboratori dell'università di Padova. Negli studi effettuati da Colombo, Bernardo e colleghi nel 2012, venne discusso approfonditamente come *fillers* di dimensioni nanometriche portassero ad ottenere ottimi risultati nella realizzazione di ceramici silicatici avanzati con elevato grado di cristallizzazione a partire da polimeri preceramici.

Tuttavia, studi successivi, hanno ridimensionato l'importanza della dimensione dei *fillers*, infatti, mescolando accuratamente il silicone con cariche anche micrometriche è possibile ottenere comunque il silicato desiderato.

Con il processo PDCs è stata sintetizzata con successo akermanite ($\text{Ca}_2\text{MgSi}_2\text{O}_7$) partendo da una miscela di polimero preceramico siliconico e precursori reattivi ossidi quali MgO e CaO, sia in forma di polvere nanometrica che micrometrica. Con particelle di dimensione micrometrica si verificò l'ottenimento di akermanite, non come fase pura, ma con la presenza di diverse impurezze soprattutto di wollastonite e magnesio, il quale, non miscelandosi con il resto delle materie prime, restava presente come fase cristallina a sé stante.

La svolta è stata l'aggiunta di un additivo secondario che durante il trattamento termico fornisce una fase liquida, come ad esempio il borato di sodio.

In questo modo è stato dimostrato che il *filler* reattivo non è più solo fornitore di ossido, ma anche di una fase liquida che da poi, dando fase vetrosa, permette di ottenere un prodotto paragonabile ad una vetroceramica.

Inoltre utilizzando sali boratici idrati si ha un *filler* con dei gruppi –OH che possono condensare rilasciando acqua sotto forma di vapore durante il trattamento; questo è stato sfruttato per creare facilmente solidi cellulari porosi come schiume ceramiche.

Questi risultati hanno permesso successivi sviluppi della tecnica PDCs con la produzione sia di schiume che di *scaffolds* di hardystonite con l'utilizzo di opportuni riempitivi organici, ottenendo una morfologia ottimizzata e delle buone proprietà.

Per quanto riguarda le schiume, esse sono state ottenute da diversi polimeri preceramici disponibili in commercio e CaCO_3 e ZnO come *fillers*. L'hardystonite è stata prodotta dopo il riscaldamento a $1200\text{ }^\circ\text{C}$ in aria, risultando quasi pura con tracce minori di willemite. La schiumatura è stata ottenuta mediante l'aggiunta di un derivato dell'idrazina ($\text{C}_2\text{H}_6\text{N}_4\text{O}_2$ al 98 %) come agente schiumogeno; questa si decompone in un *range* di temperature nel quale il polimero preceramico fuso può intrappolare il gas rilasciato e reticolando mantiene la struttura porosa e può successivamente essere ceramizzato. L'idrazina, anche se non compromette la bioattività e biocompatibilità delle schiume, è un agente esterno e non fornisce nessun ione o ossido necessario alla conversione ceramica.

Gli *scaffolds* di hardystonite ottenuti da stampa 3D, dopo il trattamento termico a $1200\text{ }^\circ\text{C}$, erano caratterizzati da molte crepe, probabilmente a causa del rilascio di gas e delle variazioni di volume associate alla conversione da polimero a ceramico e alla conseguente cristallizzazione e presentavano quindi proprietà meccaniche ancora troppo basse.

Il passo successivo è stato implementare nella sintesi un nuovo *filler* reattivo più efficace in analogia con le esperienze citate in precedenza con il sodio borato. Al fine di creare biomateriali più prestanti è stata sperimentata con successo la soluzione solida tra hardystonite e okayamalite, in particolare si è indagato l'effetto del boro nella cristallizzazione dell'hardystonite, partendo da un nuovo composto idrato a base boro, la colemanite, $\text{Ca}_2\text{B}_6\text{O}_{11}\cdot 5\text{H}_2\text{O}$. Essa fornisce sia il B necessario sia un supporto diretto alla schiumatura dei campioni eliminando la necessità di usare idrazina o CO_2 supercritica. Il boro viene aggiunto nell'ottica di modulare le proprietà di degradazione di questo biomateriale, oltre a volerne aumentare la capacità di mineralizzazione del *layer* di apatite.

In particolare, il CaO non è più fornito solo dal carbonato di calcio ma in parte anche dalla colemanite utilizzata sia come sale idrato, ($\text{Ca}_2\text{B}_6\text{O}_{11}\cdot 5\text{H}_2\text{O}$) sia trattata per ottenere la forma anidra ($\text{Ca}_2\text{B}_6\text{O}_{11}$). In forma idratata rilascia vapore acqueo nello stesso range di temperatura dell'idrazina provocando ugualmente una consistente schiumatura delle miscele con silicone, mentre nella sua forma anidra è in grado di fornire fase liquida durante il riscaldamento con effetti benefici sull'evoluzione di fase.

L'utilizzo di colemanite come nuovo *filler* è stato quindi specificamente concepito per favorire anche la formazione di una a soluzione solida a bassa temperatura (950°C) a base di hardystonite, mediante incorporazione di boro nella struttura cristallina melilitica; questa è la soluzione alla base del presente la voro di tesi.

La presenza di boro ha favorito la formazione di una fase liquida durante la conversione in ceramico creando benefici sia in termini di purezza delle fasi sia di proprietà meccaniche delle schiume; la fase liquida agisce diminuendo gli stress dovuti alla rapida conversione del polimero preceramico e del *filler* CaCO₃ fungendo da legante tra i grani cristallini e inoltre ha facilita la migrazione degli ioni nel loro impaccamento durante la cristallizzazione.

La sintesi di hardystonite partendo da miscele contenenti boro favorisce, nel processo PDCs, enormemente la produzione di fasi pure e tutto lo ZnO (*filler* attivo per lo Zn) si converte formando HT a temperature di 250 °C minori rispetto alle precedenti sintesi effettuate con lo stesso processo.

Il vantaggio più evidente, dopo ceramizzazione a 950 °C, è la vistosa diminuzione della microcricatura rispetto a *scaffolds* 3D 100 mol% HT prodotti con lo stesso processo. Questo nuovo bioceramico silicatico è risultato molto promettente e può portare a soluzioni più efficaci per applicazioni cliniche.

I test di bioattività di questi bioceramici, non ancora testati, sono stati eseguiti in questo lavoro di tesi e saranno analizzati nel presente elaborato. Le proprietà meccaniche risultanti non sono ancora sufficientemente elevate ed il processo PDCs va ottimizzato per riuscire a produrre bioceramici a base hardystonite più resistenti e privi di micro-cricature.

Va sottolineato come le crepe possano essere eliminate quasi completamente aggiungendo polveri di hardystonite preceramizzata come riempitivi inerti nella composizione dell'inchiostro; così facendo però verrebbe compromessa l'idea di una sintesi diretta.

In alternativa, si potrebbe eseguire il trattamento termico in atmosfera di azoto, anche se ciò comprometterebbe la purezza di fase; si andrebbe a formare infatti wollastonite (CaSiO₃) invece di hardystonite, come effetto di reazione carbotermica tra ZnO e residui carboniosi dal polimero preceramico, con evaporazione di Zn metallo.

Partendo da questi risultati e scartando a priori queste ultime due soluzioni, nel presente lavoro di tesi si è cercato di complicare la soluzione solida melilitica tramite l'incorporazione di ioni diversi in grado di dare benefici sia in termini di biocompatibilità sia di proprietà meccaniche.

Capitolo 3

Sintesi di meliliti complesse con boro

In questo capitolo sperimentale vengono descritte le prove effettuate nei laboratori dell'università di Padova che hanno portato alla realizzazione di pastiglie in materiale bioceramico con metodo alternativo alla sinterizzazione di polveri e alla tecnica sol-gel quale è il processo PDCs.

In particolare si è indagata la fattibilità di sintesi tramite tecnologia PDCs di un bioceramico con struttura cristallina melilitica monofasica a base hardystonite a sei elementi; ovvero Si, Ca, Zn, B, Sr, Mg per sfruttare i vantaggi derivanti dalla loro incorporazione già citata nel paragrafo §1.3.1.1.

Innanzitutto verranno riportate e analizzate le modalità con cui sono state realizzate pastiglie di varie composizioni chimiche al fine di studiare, dopo trattamento termico, le fasi prodotte tramite tecniche XRD e quindi la composizione ottimale per avere una soluzione solida monofasica. Verranno infine presentati i risultati del test di citotossicità effettuati sui campioni prodotti per quantificare l'eventuale miglioramento delle nuove soluzioni sulla proliferazione cellulare. Lo stato dell'arte, qualora non indicato direttamente nel testo, è un riassunto delle fonti bibliografiche [39 - 49].

3.1 Formulazione della composizione

Come già accennato nel precedente capitolo la base di partenza per lo sviluppo sperimentale di questo elaborato è la soluzione solida melilitica tra hardystonite e okayamalite sviluppata presso i laboratori dell'università di Padova: $x \cdot \text{Ca}_2\text{ZnSi}_2\text{O}_7 + (1-x) \cdot \text{Ca}_2\text{SiB}_2\text{O}_7$

Questi sotto forma di *scaffolds* realizzati da stampa 3D presentavano proprietà meccaniche promettenti per applicazioni di rigenerazione ossea ma ancora nessun test di bioattività era stato eseguito. I campioni realizzati tuttavia non presentavano una struttura cristallina monofasica ma hardystonite mista a wollastonite con una probabile fase calcio-boratica amorfa.

L'incorporazione di boro, come già visto (§1.3.1.1), ha effetti positivi sulla formazione di tessuto osseo, tuttavia se contenuto nella fase vetrosa e più prono a disciogliersi e concentrazioni sopra 0.65 mmol in vitro hanno dimostrato di inibire la crescita e la proliferazione delle cellule staminali mesenchimali; per ultimare la caratterizzazione di questi materiali sono stati svolti i test di citotossicità, che servono inoltre da confronto per le nuove soluzioni adottate nel presente lavoro di tesi.

Alla luce di questi risultati si è cercato di introdurre nuovi elementi biocompatibili in modo da creare soluzioni solide più complesse al fine di ottenere una struttura il più possibile caratterizzata da monofase cristallina.

Il punto di partenza è stata l'idea, ripresa dagli ultimi esperimenti effettuati presso l'università di Padova, di continuare lo studio sulla soluzione solida akermanite (AK) – hardystonite (HT) – Okayamalite (OK).

Lo scopo è quello di sfruttare assieme gli effetti positivi degli ioni Mg, Zn e B (oltre a Ca e Si) caratteristici di ogni struttura e valutare l'evoluzione alla luce dei sorprendenti effetti positivi sulla densificazione dovuti alla presenza di fase boratica liquida.

Inoltre come elemento in grado di creare una struttura modificata più complessa e monofasica è stata studiata l'incorporazione di stronzio (Sr) soprattutto alla luce delle numerose sperimentazioni positive sulla sua incorporazione nei bioceramici silicatici.

Già diversi silicati contenenti stronzio, quali Sr-CaSiO₃, silicato di stronzio (SrSiO₃) e biovetri con Sr hanno mostrato ottime proprietà bioattive con spiccati effetti stimolanti sull'osteogenesi. Inoltre è stato dimostrato che hardystonite drogata con stronzio Sr-HT presenta una migliore dissoluzione ed è in grado di rilasciare quattro ioni bioattivi (Zn, Ca, Si e Sr) con un conseguente miglioramento in vivo sulla formazione dell'osso.

Il fine è quindi ottenere una composizione chimica tra questi sei elementi, ovvero Si, Ca, Zn, B, Sr, Mg per migliorare la bioattività di hardystonite, creare una soluzione solida monofasica densa senza crepe e dalle buone proprietà meccaniche e molto bioattiva grazie al rilascio controllato di sei ioni storicamente riconosciuti come positivi per applicazioni in campo biomedicale.

Il tutto sfruttando i vantaggi offerti dalla tecnica PDCs in confronto alle più tradizionali quale ad esempio il metodo sol-gel; Il processo produttivo viene riassunto in *Figura 3.1*.

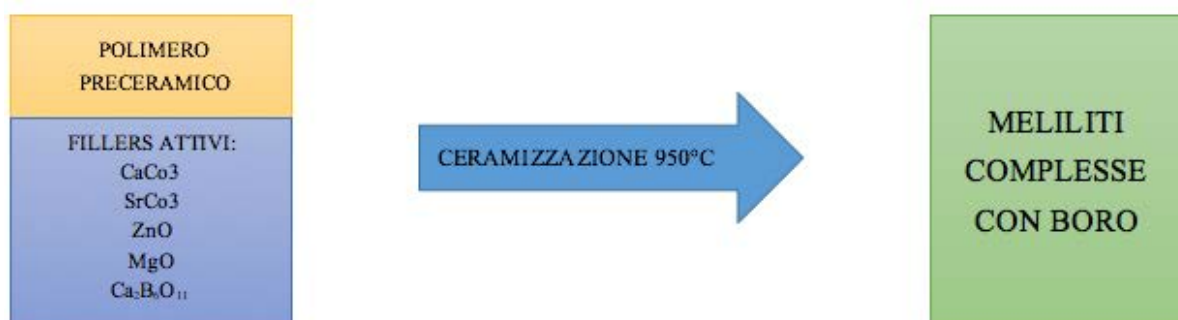


Figura 3.1. Processo PDCs schematico per ottenere pastiglie partendo da polimero preceramico e fillers attivi.

Bisogna affermare che le regole empiriche introdotte da V. M. Goldschmidt sulla soluzione solida, già citate nel §1.4.2.2 vengono teoricamente rispettate con queste nuove formulazioni (Tabella 3.1). Sia il rapporto tra i raggi di Sr e Ca sia tra Mg e Zn differisce sempre meno del 30 % e le cariche degli ioni sono le medesime.

Tabella 3.1. Carica, numero di coordinazione, raggio ionico e elettronegatività (scala di Pauling) degli elementi chiave di questo studio.

Elemento	Carica	Numero di coordinazione	Ri [Å]	Electronegatività
Calcio	2+	VIII	1.12	1
Stronzio	2+	VIII	1.4	0.95
Zinco	2+	IV	0.74	1.65
Magnesio	2+	IV	0.71	1.31
Boro	3+	IV	0.25	2.04
Silicio	4+	IV	0.40	1.90

3.2 Preparazione delle pastiglie

Inizialmente come soluzione base più promettente è stata scelta quella costituita da 75mol% hardystonite e 25 mol% okayamalite.

È stata valutata la variazione della struttura in seguito all'incorporazione dei Mg e Sr sia presi singolarmente sia contemporaneamente presenti.

Lo stronzio è stato considerato come elemento sostituzionale del calcio nel sito A ottaedrico della struttura melilitica, mentre il magnesio come sostituzionale dello zinco nel sito T₁ tetraedrico.

3.2.1 Miscelazione e ceramizzazione delle polveri

Visto che il metodo di sintesi su cui si basa la presente ricerca è il PDCs, prima di tutto va scelta la fonte di silice del processo, ovvero, il polimero preceramico polisilossanico disponibile in commercio denominato MK in forma di polvere (Wacker-Chemie GmbH, Monaco di Baviera, Germania), che presenta una resa ceramica del 84 % in peso.

La scelta di MK è finalizzata alla principale applicazione prevista per questo lavoro di test ovvero la stampa Robocasting.

L'MK, infatti, oltre ad essere più reattivo rispetto ad H62C (resa ceramica del 58 %), presenta una ridotta evoluzione in fumi durante la pirolisi riducendo quindi il ritiro volumetrico, la perdita di peso e la formazione di micro e macro porosità.

In secondo luogo vanno accuratamente selezionati i *fillers* reattivi in gioco, questi sono:

- CaCO_3 (< 10 μm , Industrie Bitossi, Vinci, Italia);
- ZnO (< 1.48 μm , Sigma Aldrich, Germania);
- Colemanite $\text{Ca}_2\text{B}_6\text{O}_{11} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (< 1 μm , fornita da CIRCE, Università degli Studi di Padova, Padova);
- MgO (polvere nanometrica);
- SrCO_3 (polvere micrometrica).

Poiché l'effetto schiumante della colemanite derivato dal rilascio dei gruppi H_2O durante la reticolazione del polimero preceramico inficerebbe la produzione del campione massivo dopo trattamento termico, essa è stata prima calcinata a 420 °C per 4 ore per rimuovere l'acqua cristallina e ottenere la forma anidra: $\text{Ca}_2\text{B}_6\text{O}_{11}$.

Per poter realizzare la miscela tra le polveri di polimero preceramico e dei *fillers* viene utilizzato alcool isopropilico $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}$. I solventi con carattere apolare sono poco adatti per disciogliere siliconi, dato che non essendovi gruppi polari questi tendono ad aggregarsi precipitando all'interno della soluzione. I solventi fortemente polari, invece, generano un'iniziale buona dispersione, ma la presenza di gruppi idrossilici può determinare reazioni di sostituzione dei gruppi laterali nei siliconi con successiva reticolazione o reazioni di riduzione da parte del solvente (es. etanolo). I candidati migliori sono quindi i solventi a leggero carattere polare come l'acetone, utilizzato principalmente per la pulizia delle strumentazioni utilizzate, o, appunto, l'alcool isopropilico.

3.2.1.1 Miscelazione e formatura pastiglie

Gli step relativi alla miscelazione e all'ottenimento delle pastiglie sono i seguenti:

- Dissolvere il polimero preceramico MK in alcool isopropilico in parti uguali all'interno di un becher di vetro. Per assicurarsi l'omogeneità della miscela il tutto viene mantenuto in agitazione tramite stirring magnetico per 15 minuti e successivamente viene posto nella macchina ultrasonica per altri 15 minuti, con l'obiettivo di eliminare l'eventuale presenza di gas disciolti all'interno e disgregare aggregati che si sono formati durante il processo di miscelazione.

La soluzione che si ottiene deve essere limpida, indice dell'ottima solubilità del silicone nel solvente scelto; una volta raggiunta questa condizione si può procedere con gli steps successivi.

- Mantenendo la soluzione in stirring, aggiungere lentamente alla miscela le polveri di tutti i *fillers* lasciando loro il tempo di omogeneizzarsi con il resto della miscela grazie alla presenza dell'agitatore magnetico. Tra l'aggiunta di un *filler* e il successivo in genere è necessario attendere qualche minuto per l'omogeneizzazione.
- Terminata l'aggiunta dei *fillers*, sonicare per 15 minuti la miscela, quindi rimettere il becher sotto stirring magnetico per 10 minuti e infine versare il tutto in un cristallizzatore di teflon di circa 10 cm di diametro. L'uso del cristallizzatore permette alla soluzione di disporsi nella maggior area superficiale possibile evitando la formazione di strati a diversa altezza che potrebbero indurre a segregazioni o aggregazioni preferenziali. La scelta del teflon è necessaria per permettere il distacco della mescola dopo essiccazione.
- Lasciare il cristallizzatore ad essiccare durante la notte a 60-70 °C in modo da trasformare la miscela basata su MK in materiale compatto, facendo evaporare l'alcool isopropilico. Se si trattano termicamente i campioni senza aver estratto il solvente, durante il trattamento si potrebbero verificare processi di esplosione dovuta alla presenza del solvente stesso e fenomeni di segregazione a bassa temperatura.
- Dopo l'essiccazione, rimuovere la miscela a base di silicone e cariche dal cristallizzatore e macinare tramite mulino a sfere (*Pulverisette 7 planetary ball mill, Fritsch, Idar-Oberstein, Germania*) a 350 rpm fino ad ottenere una polvere fine da setacciare fino a dimensioni < 90 µm.
- Una volta ottenute le polveri, versarne 1 grammo in uno stampo cilindrico in acciaio inossidabile, composto da camera e punzone, per realizzare pastiglie da 16,5 mm di diametro, e uno spessore di circa 3 mm; applicare tramite pressa idraulica una pressione di 140 MPa per almeno 1 minuto e rimuovere la pastiglia dallo stampo.
- Terminata la formatura delle pastiglie con la pressa manuale, si effettua il processo di ceramizzazione per realizzare il silicato desiderato. In analogia con il lavoro svolto in precedenza presso i laboratori dell'università di Padova le pastiglie sono state tutte trattate termicamente e convertite in ceramico in aria a 950 °C, con una rampa di salita di 2 °C/min, mantenimento di 1 ora e raffreddamento di 4 °C/min.

3.2.1.2 Prime formulazioni adottate e reagenti

Nella formulazione delle composizioni ci sono diversi aspetti da tenere in considerazione:

1. Ciascun *fillers* va introdotto nella giusta proporzione tenendo conto della loro resa in ossido dopo trattamento e se sono precursori di uno o più ossidi.

Tabella 3.2. *Principali fillers utilizzati con rispettiva resa in ossido*

Precursore	MK	CaCO ₃	SrCO ₃	ZnO	MgO	Ca ₂ B ₆ O ₁₁	
Ione fornito	Si	Ca	Sr	Zn	Mg	Ca	B
Resa peso [%]	84	56	70	100	100	35	65

2. Effettuando una sostituzione di ossidi nella composizione va tenuto conto del rapporto molare affinché il bilancio stechiometrico sia corretto; partendo dalla soluzione 75%mol HT e 25%mol OK di formula Ca₂Zn_{0,75}B_{0,5}Si_{1,75}O₇, andando a sostituire Sr al Ca e Mg allo Zn, la formula chimica risulta quindi: Ca_{2-x}Sr_xZn_(0,75-y)Mg_yB_{0,25}Si_{1,75}O₇.

Si è voluto prima di tutto indagare singolarmente l'effetto dell'incorporazione di Sr e Mg in due rapporti diversi che per entrambi sono 15% e 30% molare; per cui sono state inizialmente realizzate 4 pastiglie di composizione differente:

Tabella 3.3. *Formulazioni adottate con relativa quantità di ioni sostituiti e formula chimica.*

Formulazione	Rapporto molare	Valore	Formula chimica
15 mol% Sr	$Sr / Ca + Sr$	0,15	Ca _{1,7} Sr _{0,3} Zn _{0,75} B _{0,5} Si _{1,75} O ₇
30 mol% Sr		0,30	Ca _{1,4} Sr _{0,6} Zn _{0,75} B _{0,5} Si _{1,75} O ₇
15 mol% Mg	$Mg / Zn + Mg$	0,15	Ca ₂ Zn _{0,64} Mg _{0,11} B _{0,5} Si _{1,75} O ₇
30 mol% Mg		0,30	Ca ₂ Zn _{0,53} Mg _{0,22} B _{0,5} Si _{1,75} O ₇

In *Tabella 3.4* vengono riportate le quantità in peso di polimero preceramico e cariche delle diverse formulazioni per ottenere 100 g di resa ceramica dopo il trattamento termico.

Tabella 3.4. Le composizioni d'interesse delle diverse formulazioni per ottenere 100 g di resa ceramica dopo il trattamento termico.

Formulazione	MK	CaCO ₃ [g]	ZnO [g]	Colemanite* [g]	SrCO ₃ [g]	MgO [g]
15 mol% Sr	42,3	51,93	20,6	9,1	14,99	0
30 mol% Sr	42,3	41,76	20,6	9,1	29,99	0
15 mol% Mg	42,3	62,1	17,51	9,1	0	1,53
30 mol% Mg	42,3	62,1	14,42	9,1	0	3,06

* colemanite anidra (Ca₂B₆O₁₁), MW = 321.01 g/mol

3.2.2 Analisi XRD e Discussione dei risultati

L'identificazione delle fasi cristalline è stata effettuata tramite diffrazione ai raggi X (XRD; Bruker AXS D8 Advance, Bruker, Germania), con il supporto del database di *patterns* cristallografici PDF-2 (ICDD-International Centre for Diffraction Data, Newtown Square, PA) e del programma Match! (Crystal Impact GbR, Bonn, Germania) e successivamente ricontrollati con il database COD (Crystallography Open Database, www.crystallography.net). Per effettuare l'analisi è necessario macinare a mano la pastiglia trattata fino ad ottenere polvere abbastanza fine. Dopo la macinazione, circa un grammo viene disposto nel piatto secondo la modalità illustrata nella *Figura 3.2*.

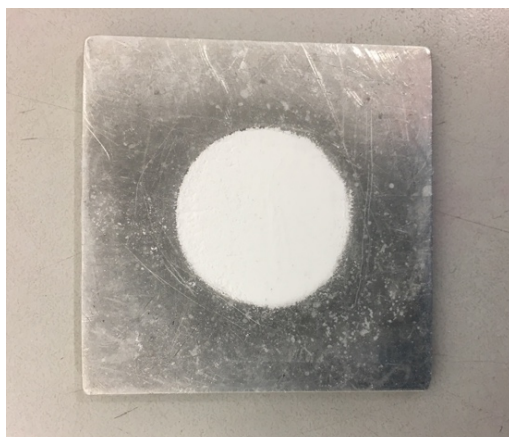


Figura 3.2 Piatto utilizzato per predisporre la polvere per l'analisi ai raggi X.

È importante che la polvere sia ben distribuita per permettere alla macchina di lavorare in maniera corretta.

3.2.2.1 Effetto dell'incorporazione di stronzio

Si è innanzitutto indagato l'effetto dell'incorporazione dello stronzio, la *Figura 3.3* mette in comparazione gli spettri XRD delle due soluzioni contenenti le diverse quantità di Sr con la soluzione base 75%mol HT – 25%mol OK e il pattern di riferimento dell'hardystonite e permette di trarre risultati molto interessanti.

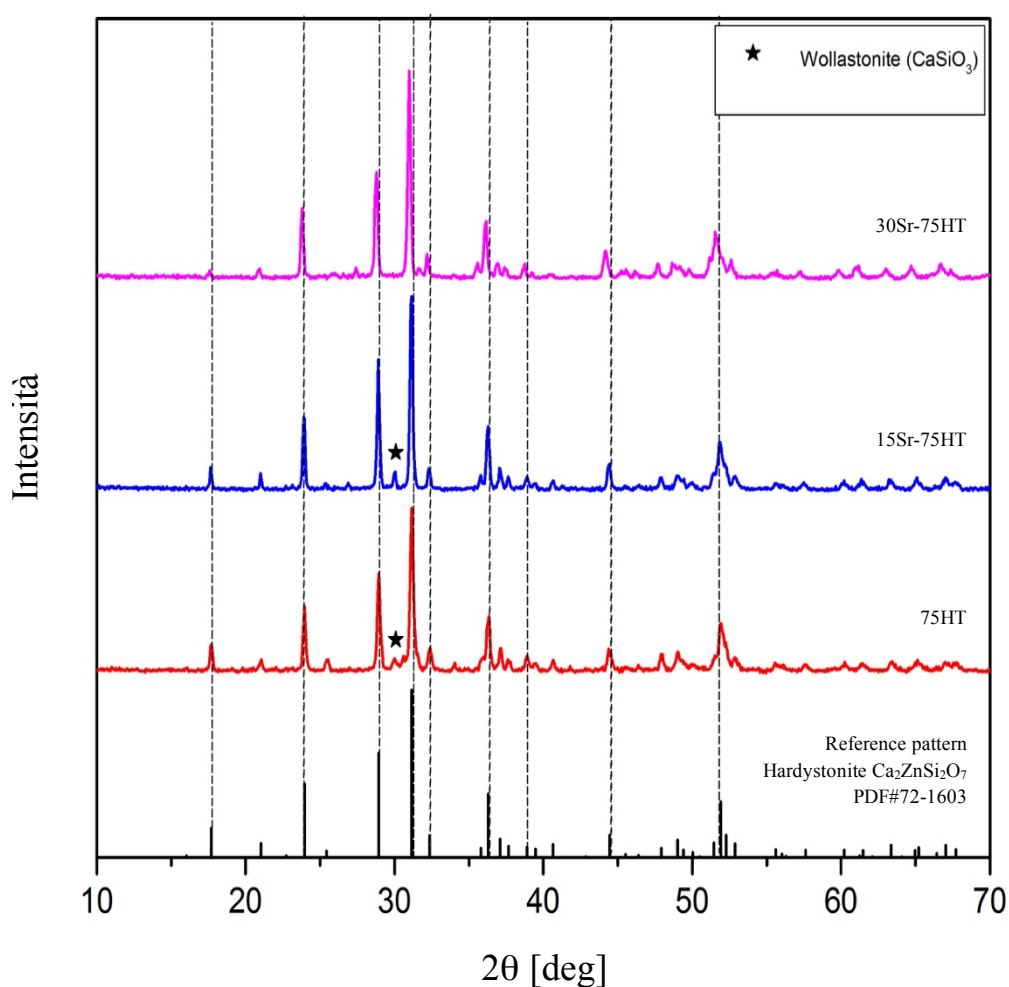


Figura 3.3. Analisi XRD delle due diverse soluzioni Sr75HT confrontate con la soluzione base 75HT e il pattern dell'hardystonite (PDF#72-1603) in evidenza.

La soluzione solida HT - OK sussiste in tutti i casi e i picchi sono coerenti con la presenza di struttura cristallina melilitica di hardystonite.

Nella pastiglia 15%mol Sr però è presente un picco a 30° che dimostra la presenza di una seconda fase di wollastonite, riscontrata anche nel materiale base già dalle analisi condotte in passato e confermata anche ora.

Al contrario la pastiglia 30%mol Sr è totalmente priva di fasi diverse da quella di hardystonite, ciò dimostra che la sua incorporazione ha permesso una modifica del reticolo cristallino sufficiente ad incorporare correttamente tutti gli ioni creando una soluzione solida monofasica. Viene rilevato un leggero spostamento dei picchi coerente con l'evoluzione delle fasi. In particolare aumentando il tasso di sostituzione avviene un lieve *shift* dei picchi verso sinistra che è indice di una dilatazione della cella unitaria della struttura melilitica.

La presenza di un atomo di dimensioni maggiori nel sito A ottaedrico come Sr, raggio atomico di 219 pm, al posto del Ca, raggio atomico di 194 pm distorce il reticolo e altera le direzioni dei fasci diffratti; questo cambiamento nel reticolo può essere determinato dalle misurazioni delle distanze d dei diversi piani. Lo *shift* risulta più evidente in *Figura 3.4*.

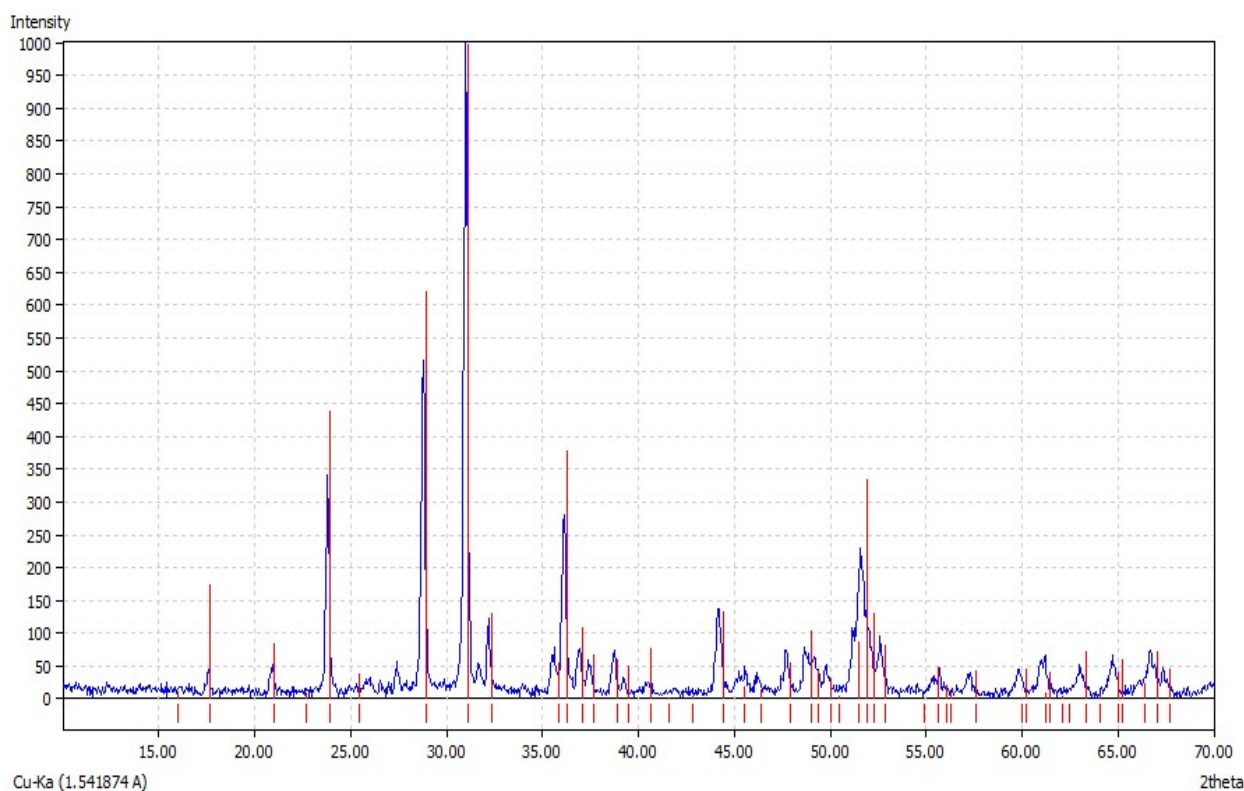


Figura 3.4. Analisi XRD della composizione con 30%mol Sr con il pattern dell'*hardystonite* (PDF#72-1603) in evidenza.

L'assenza di pance nei *pattern* di diffrazione ci conferma che la presenza di fase amorfa in frazione in percentuale è molto bassa rispetto alla frazione cristallina.

3.2.2.2 Effetto dell'incorporazione di magnesio

Si è quindi passati allo studio dell'incorporazione del magnesio come atomo sostituzionale dello Zinco; la *Figura 3.5* mette in comparazione gli spettri XRD delle due soluzioni contenenti le diverse quantità di Mg con la soluzione base 75%mol HT – 25%mol OK e il pattern di riferimento dell'hardystonite e permette di trarre alcuni risultati.

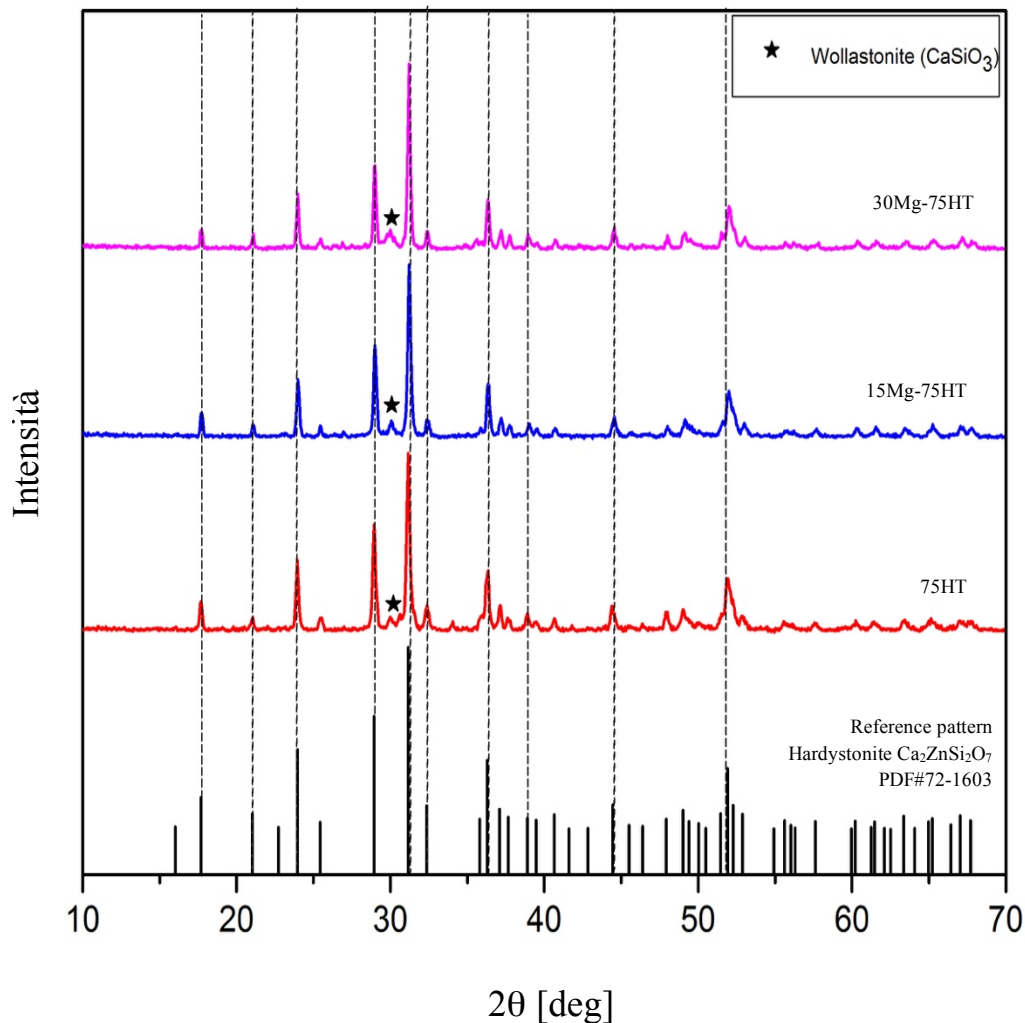


Figura 3.5. Analisi XRD delle due diverse soluzioni Mg75HT confrontate con la soluzione base 75HT e il pattern dell'hardystonite (PDF#72-1603) in evidenza.

La soluzione solida HT - OK sussiste in tutti i campioni e i picchi sono coerenti con la presenza di struttura cristallina melilitica di hardystonite. Questa volta la differenza tra i tre spettri è praticamente impercettibile, rimane infatti presente il picco a 30° che conferma la presenza di una seconda fase di wollastonite anche sui campioni con il magnesio sostituito; il picco subisce un leggero incremento nella pastiglia 30%mol Sr.

In questo caso viene incorporato un atomo di Mg nel sito sito T₁ tetraedrico, raggio atomico di 145 pm, al posto dello Zn, raggio atomico di 142 pm; la differenza tra i raggi è minima e non permette una distorsione del reticolo tale da ottenere struttura monofasica.

Tuttavia sono stati incorporati con successo ioni Mg, positivi per la bioattività (§1.3.1.1), senza avere sulle fasi presenti nella struttura cristallina.

Anche in questo caso l'assenza di pance nei *pattern* di diffrazione ci conferma che la presenza di fase amorfa in frazione in percentuale è molto bassa rispetto alla frazione cristallina.

3.2.2.3 Effetto dell'incorporazione di stronzio e magnesio

È stato infine indagato l'effetto dell'incorporazione simultanea di stronzio e magnesio; in particolare sono state realizzate due composizioni differenti entrambe con il 30% molare di Sr sostituito ma rispettivamente con 15% molare e 30% molare di Mg.

Il processo di realizzazione delle pastiglie è identico a quello descritto nel §3.2.1.1.

Tabella 3.5. Formulazioni adottate con relativa quantità di ioni sostituiti e formula chimica.

Formulazione	Rapporto molare	Valore	Formula chimica
SrMg75HT 30-15	$Sr/Ca + Sr$	0,30	$Ca_{1,4} Sr_{0,6} Zn_{0,64} Mg_{0,11} B_{0,5} Si_{1,75} O_7$
	$Mg/Zn + Mg$	0,15	
SrMg75HT 30-30	$Sr/Ca + Sr$	0,30	$Ca_{1,4} Sr_{0,6} Zn_{0,53} Mg_{0,22} B_{0,5} Si_{1,75} O_7$
	$Mg/Zn + Mg$	0,30	

In *Tabella 3.6* vengono riportate le quantità in peso di polimero preceramico e cariche delle due diverse formulazioni per ottenere 100 g di resa ceramica dopo il trattamento termico.

Tabella 3.6. Le composizioni d'interesse delle diverse formulazioni per ottenere 100 g di resa ceramica dopo il trattamento termico.

Formulazione	MK [g]	CaCO ₃ [g]	ZnO [g]	Colemanite* [g]	SrCO ₃ [g]	MgO [g]
SrMg75HT 30-15	42,3	41,76	17,52	9,1	29,99	1,53
SrMg75HT 30-30	42,3	41,76	14,42	9,1	29,99	3,06

* colemanite anidra (Ca₂B₆O₁₁), MW = 321.01 g/mol

La *Figura 3.6* mette in comparazione gli spettri XRD delle due soluzioni contenenti le diverse quantità di Sr e Mg con la soluzione base 75%mol HT – 25%mol OK e il pattern di riferimento dell'hardystonite e permette di trarre alcuni risultati.

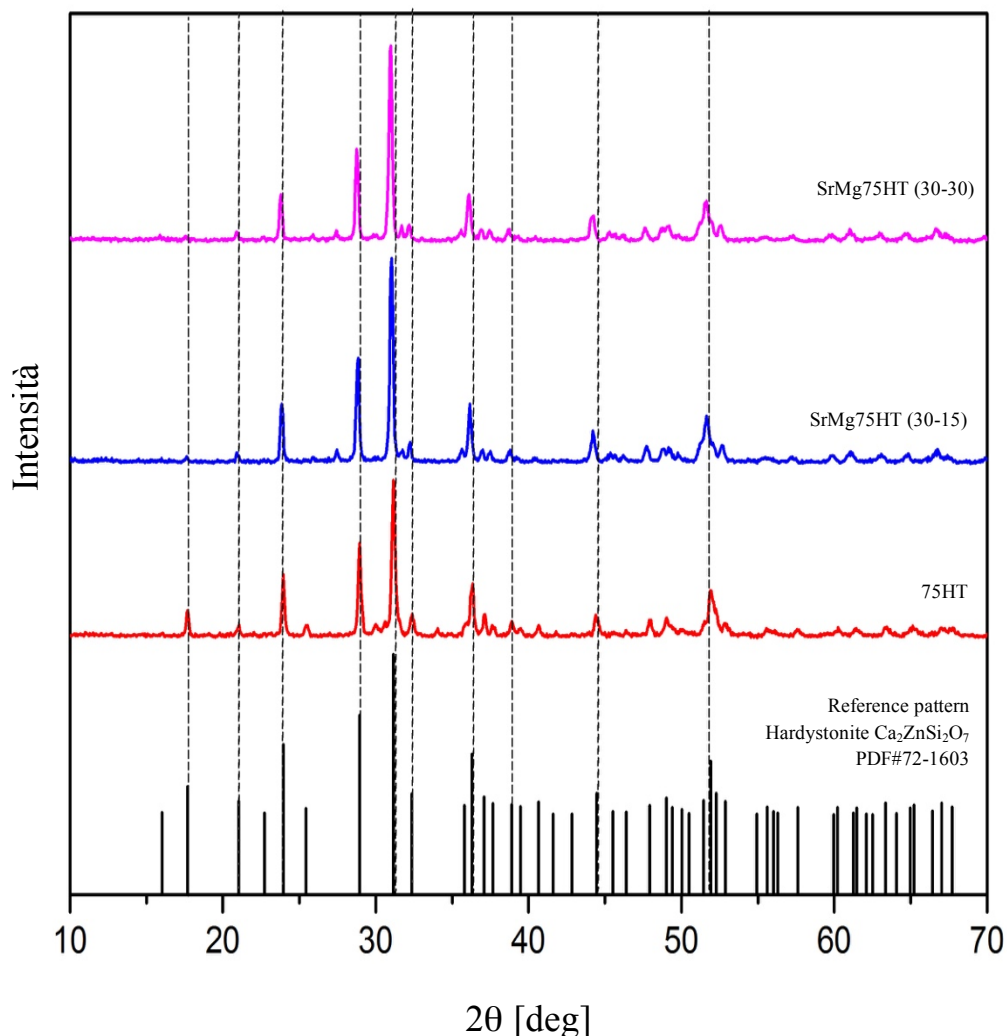


Figura 3.6. Analisi XRD delle due diverse soluzioni SrMg75HT confrontate con la soluzione base 75HT e il pattern dell'hardystonite (PDF#72-1603) in evidenza.

La soluzione solida tra i sei elementi è stata ottenuta con successo e in entrambi i casi risulta presente una fase cristallina melilitica hardystonitica praticamente pura.

Il picco a 30° presente nel campione di soluzione base non è praticamente più presente nella soluzione con minor contenuto di magnesio e solo appena distinguibile nella seconda.

La fase secondaria di wollastonite è sostanzialmente sparita e teoricamente tutti gli ioni introdotti sono finiti all'interno della struttura cristallina, ottenendo così un campione cristallino monofasico.

Viene rilevato un lieve *shift* dei picchi verso sinistra della stessa entità per entrambe le soluzioni. Come già discusso precedentemente anche in questo caso è dovuto all'incorporazione dello Sr. L'assenza di pance nei *pattern* di diffrazione ci conferma che la presenza di fase amorfa in frazione in percentuale è molto bassa rispetto alla frazione cristallina.

La soluzione contenente il 30%mol di Sr e 15%mol di Mg è sembrata la più interessante e promettente per il proseguo degli studi. L'incorporazione di più magnesio non dà benefici tali da giustificare la differenza di prezzo nella quantità di *fillers* da utilizzare.

3.2.2.4 Soluzione 67% HT – 33% OK

Alla luce dei buoni risultati riscontrati con l'incorporazione di Sr e Mg si è voluto sperimentare il medesimo grado di sostituzione anche con la soluzione solida con maggior contenuto di boro: 67%HT - 33%OK. Questa soluzione permette di avere più fase liquida durante il trattamento termico e dovrebbe portare quindi ad un grado di densificazione superiore e di conseguenza a migliori proprietà meccaniche, soprattutto in riferimento a *scaffolds* prodotti da stampa 3D. Il processo di realizzazione delle pastiglie è identico a quello descritto nel §3.2.1.1.

Tabella 3.7. Formulazioni adottate con relativa quantità di ioni sostituiti e formula chimica.

Formulazione	Rapporto molare	Valore	Formula chimica
SrMg67HT 30-15	$Sr / Ca + Sr$	0,30	$Ca_{1,4} Sr_{0,6} Zn_{0,57} Mg_{0,1} B_{0,66} Si_{1,67} O_7$
	$Mg / Zn + Mg$	0,15	

In *Tabella 3.8* vengono riportate le quantità in peso di polimero preceramico e cariche delle due diverse formulazioni per ottenere 100 g di resa ceramica dopo il trattamento termico.

Tabella 3.8. Le composizioni d'interesse delle diverse formulazioni per ottenere 100 g di resa ceramica dopo il trattamento termico.

Formulazione	MK [g]	CaCO ₃ [g]	ZnO [g]	Colemanite* [g]	SrCO ₃ [g]	MgO [g]
SrMg67HT 30-15	37,99	37,56	14,75	11,23	28,17	1,28

* colemanite anidra (Ca₂B₆O₁₁), MW = 321.01 g/mol

L'analisi XRD ha confermato i risultati attesi (Figura 3.7); la soluzione solida tra i sei elementi anche in questo caso è stata ottenuta con successo e risulta presente una fase cristallina melilitica hardystonitica accompagnata da una fase di silicato di calcio in piccole dosi (picco a $2\theta \approx 28^\circ$). Anche in questo spettro viene rilevato un lieve *shift* dei picchi verso sinistra, come già discusso precedentemente.

L'assenza di pance nei *pattern* di diffrazione ci conferma che la presenza di fase amorfa in frazione in percentuale è molto bassa rispetto alla frazione cristallina.

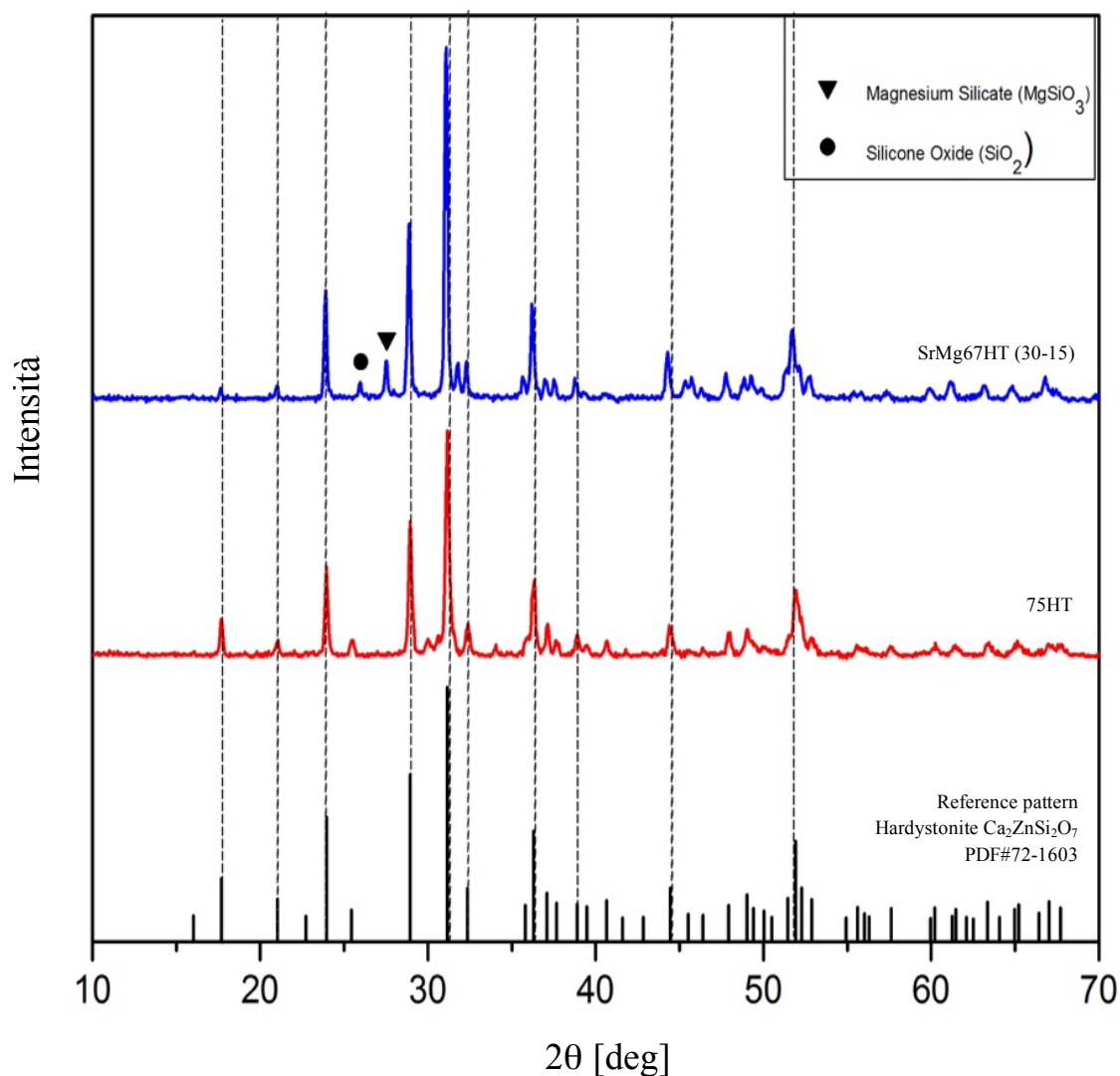


Figura 3.7. Analisi XRD della soluzione SrMg67HT confrontate con la soluzione base 75HT e il pattern dell'hardystonite (PDF#72-1603) in evidenza.

3.3 Confronto con altri precursori di silice

Per verificare la validità della tecnica PDCs utilizzata per ottenere questo particolare silicato è stato eseguito un confronto con altri precursori di silice quali:

- Il polimero preceramico H62C per stabilire se il processo sia riproducibile con diversi polimeri preceramico o solamente con l'MK.
- Precursori di silice non polimerici quali la silice colloidale la sabbia silicea.

Sia la silice colloidale che la sabbia sono costituite da unità di silice SiO_2 unite fra loro. Per questo motivo è necessario ricalcolare il quantitativo di precursore da utilizzare considerando in questo caso non più la resa ceramica del polimero preceramico MK pari all'84% ma una del 100%. Per il polimero H62C invece la resa è inferiori e pari al 56%.

I diversi precursori sono stati utilizzati sulla stessa formulazione, ovvero la soluzione SrMg75HT (Tabella 3.5)

Il processo di realizzazione delle pastiglie è identico a quello descritto nel §3.2.1.1.

In Tabella 3.9 vengono riportate le quantità in peso di polimero preceramico e cariche delle due diverse formulazioni per ottenere 100 g di resa ceramica dopo il trattamento termico.

Tabella 3.9 Le composizioni di interesse delle formulazioni con H62C, Silice colloidale e sabbia, per ottenere 100 g di resa ceramica dopo il trattamento termico.

Formulazione	Precursore Silice [g]	CaCO_3 [g]	ZnO [g]	Colemanite* [g]	SrCO_3 [g]	MgO [g]
H62C	63,4	41,76	17,52	9,1	29,99	1,53
Silice colloidale	35,5	41,76	17,52	9,1	29,99	1,53
Sabbia silicea	35,5	41,76	17,52	9,1	29,99	1,53

Si vogliono indagare le fasi presenti su queste miscele utilizzando il medesimo trattamento termico utilizzato per le pastiglie con il polimero preceramico MK; il fine è stabilire se è il polimero preceramico che rende possibile la sintesi della struttura melilitica monofasica e in caso se è possibile con diversi polimeri.

3.3.1 Analisi XRD e discussione dei risultati

L'identificazione delle fasi cristalline è stata effettuata tramite diffrazione ai raggi X (XRD; Bruker AXS D8 Advance, Bruker, Germania), con il supporto del database di *patterns* cristallografici PDF-2 (ICDD-International Centre for Diffraction Data, Newtown Square, PA) e del programma Match! (Crystal Impact GbR, Bonn, Germania) e successivamente ricontrollati con il database COD (Crystallography Open Database, www.crystallography.net). Per effettuare l'analisi è necessario macinare a mano la pastiglia trattata fino ad ottenere polvere abbastanza fine. Dopo la macinazione, circa un grammo viene disposto nel piatto secondo la modalità illustrata nella *Figura 3.2*. È importante che la polvere sia ben distribuita per permettere alla macchina di lavorare in maniera corretta.

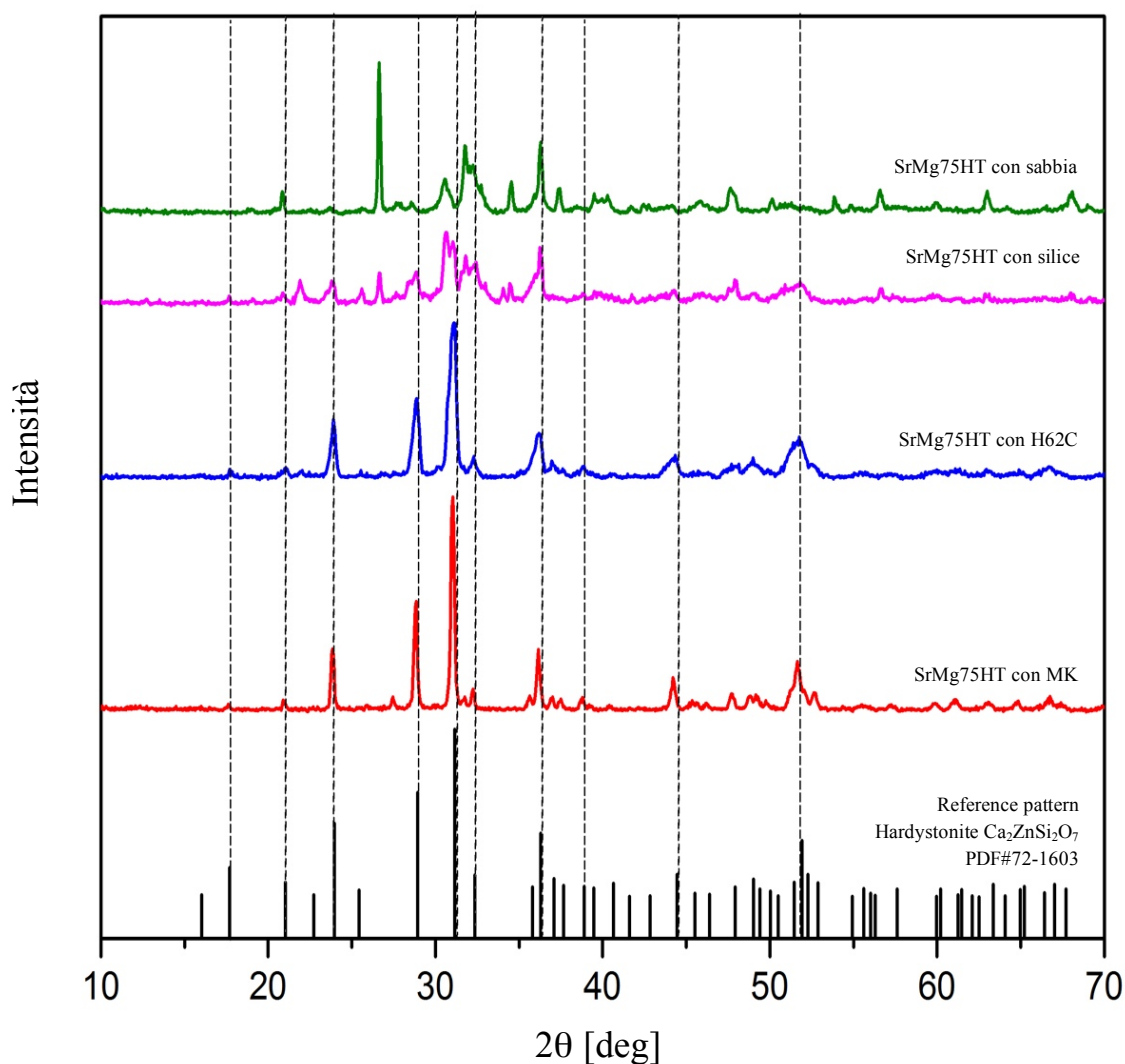


Figura 3.8. Analisi XRD delle soluzioni SrMg75HT ottenute da diversi precursori di silice e il pattern dell'hardystonite (PDF#72-1603) in evidenza.

La *Figura 3.8* mette in comparazione tra di loro gli spettri XRD delle soluzioni di SrMg75HT ottenute a partire da diversi precursori di silice e con il pattern di riferimento dell'hardystonite e permette di trarre risultati molto interessanti:

- Gli spettri di diffrazione ottenuti da polimeri preceramici sono identici e risulta presente una fase cristallina melilitica hardystonitica anche con il polimero H62C. Questo dimostra che è possibile ottenere lo stesso risultato con polimeri precursori diversi utilizzando il processo PDCs
- Gli spettri di diffrazione ottenuti da precursori non polimerici sono totalmente differenti sia tra di loro sia rispetto a quelli ottenuti dai polimeri preceramici; i due diversi precursori utilizzati hanno entrambi portato ad un sistema cristallino con molteplici fasi presenti. Questo dimostra che Il processo PDCs congiunto all'uso di polimeri preceramici è in grado di dare una reazione unica e particolare tra i reagenti per formare la melilite complessa, ad una temperatura impensabile per altri processi.

In conclusione il ruolo svolto dal polimero preceramico è essenziale nella sintesi tramite PDCs per ottenere una soluzione solida tra tutti gli elementi; per questo motivo altri precursori non verranno presi in considerazione per la realizzazione della pasta per l'Additive Manufacturing, in quanto non garantiscono le stesse funzionalità derivate dal polimero preceramico silicone MK, che risulta svolgere bene il ruolo di legante.

3.4 Misura delle proprietà fisiche: ritiro geometrico

Effettuando le misure del diametro delle pastiglie dopo trattamento termico è possibile ottenere informazione sulla densificazione calcolando il ritiro geometrico. La formatura delle pastiglie infatti avviene in maniera ripetitiva e standard nello stesso stampo cilindrico in acciaio inossidabile con un diametro di circa 16,5 mm.

I valori in percentuale del ritiro sono riportati in *Tabella 3.10* assieme ai valori medi dei diametri dopo ceramizzazione per entrambe le soluzioni a sei elementi sintetizzate.

Tabella 3.10 Percentuale di ritiro geometrico delle pastiglie.

<i>Campione</i>	<i>Diametro iniziale</i>	<i>Diametro finale</i>	<i>Ritiro</i>
<i>SrMg75HT</i>	<i>16,43 mm</i>	<i>14,23 mm</i>	<i>13,39 %</i>
<i>SrMg67HT</i>	<i>16,43 mm</i>	<i>13,17 mm</i>	<i>19,79 %</i>

Come da previsione la soluzione con un maggior contenuto di boro è risultata maggiormente densificata è già al tatto appare più solida e meccanicamente performante; la maggior quantità di fase liquida prodotta durante riscaldamento dal sale boratico aggiunto ha prodotto un campione più compatto caratterizzato da una quantità di cricche superficiali minore.

Questa seconda soluzione sembra più promettente per quanto riguarda le applicazioni nella realizzazione di solidi cellulari, anche se potenzialmente il maggior contenuto di boro potrebbe dare problemi di citotossicità.

3.5 Ottimizzazione del trattamento termico

Per evitare il più possibile di ottenere microcricche residue negli *scaffolds* 3D da stampare è stata effettuata l'analisi termica DTA-TGA delle due composizioni di interesse al fine di elaborare un trattamento termico ottimale che permetta ai prodotti di ceramizzare senza criccarsi per gli stress generati.

In *Figura 3.10* sono riportati gli andamenti delle curve ricavate da analisi TGA e DTA sui campioni SrMg75HT e SrMg67HT; entrambe le soluzioni danno risultati praticamente identici, ciò significa che l'evoluzione di fase durante il trattamento termico sarà la stessa e si potranno quindi utilizzare rampe di riscaldamento e mantenimenti uguali.

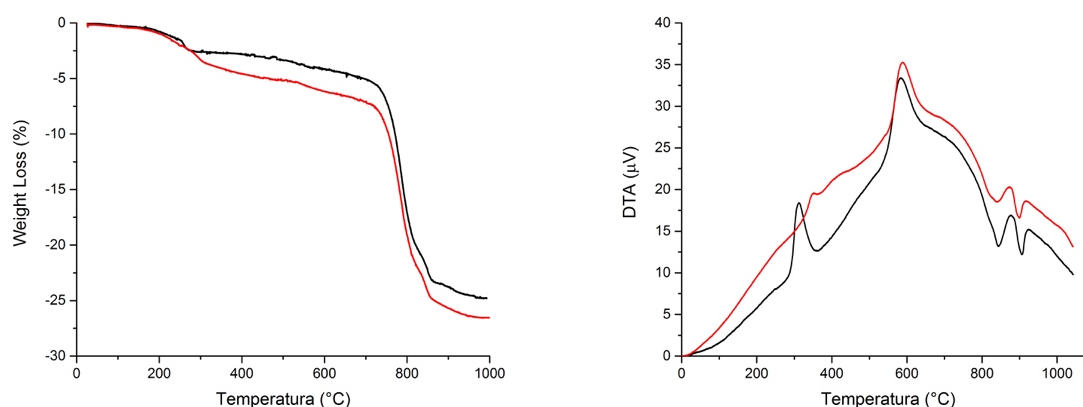


Figura 3.10. Curve termogravimetrica TGA e curve DTA delle soluzioni SrMg75HT e SrMg67HT.

Si può distinguere una consistente perdita di massa partendo da ~ 240 °C dovuta alle reazioni di reticolazione del polimero preceramico che prosegue fino a temperature superiori a 350 °C a causa della conversione per poi concludersi a ~ 850 °C.

CaCO_3 inizia a decomporsi endotermicamente a $\sim 700\div 900$ °C, formando CaO che reagendo con il residuo di silice del silicone preceramico e sviluppa le fasi cristalline silicatiche desiderate.

A fronte di questi risultati DTA-TGA è stato selezionato il trattamento termico di conversione ceramica ottimizzati da utilizzare per la ceramizzazione degli *scaffolds* e delle schiume.

Verrà infatti utilizzata una velocità di riscaldamento sufficientemente bassa pari a $0,3$ °C/min con opportuni *steps* di mantenimento per promuovere la completa conversione del polimero preceramico evitando cricche durante le trasformazioni di fase.

Per permettere il rilassamento della struttura prima della decomposizione di CaCO_3 verrà effettuato un mantenimento di 3 h a 590 °C (picco esotermico della conversione di MK nella curva DTA. Inoltre per favorire la completa conversione di CaCO_3 prima della stasi a 950 °C, verrà effettuato un mantenimento di 2 h a 880 °C (picco endotermico di decomposizione di CaCO_3 , da curva DTA). Il trattamento termico completo ideato è in *Figura 3.11*.

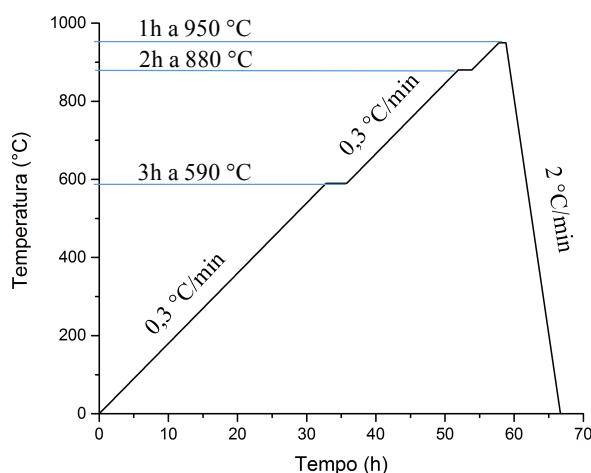


Figura 3.11. Diagramma del trattamento termico di conversione ceramica ottimale per le soluzioni SrMg75HT e SrMg67HT.

Per quanto esposto queste nuove soluzioni per ottenere bioceramici silicatici sono promettenti e possono portare a soluzioni più efficaci per applicazioni cliniche.

L'ottenimento di una struttura monofasica densa senza crepe è essenziale per avere buone proprietà meccaniche e per mitigare la dissoluzione dell'hardystonite con un conseguente miglioramento in vivo sulla formazione dell'osso.

Lo studio è proseguito con i test di citotossicità sulle soluzioni SrMg75HT e SrMg67HT, sulla soluzione base 75%mol – 25%molOK e su hardystonite pura in modo da verificare l'effettivo contributo degli ioni inseriti e della monofasicità ottenuta sulla bioattività.

3.6 Test di citotossicità

L'effetto citotossico viene determinato sia attraverso una analisi morfologica fine al microscopio elettronico (TEM e SEM) sia attraverso saggi in grado di misurare la vitalità cellulare; è una procedura essenziale per tutti i prodotti in campo clinico *ex vivo*.

Questa analisi viene condotta determinando il contenuto di ATP cellulare (*ATP cell viability assay*) o l'attività delle deidrogenasi mitocondriali (*MTT cell viability assay*)

3.6.1 Saggio MTT (*MTT cell viability assay*)

Il saggio di vitalità più usato in tutto il mondo è il saggio con MTT che è un test colorimetrico quantitativo. Il saggio si basa sulla capacità degli enzimi succinato deidrogenasi mitocondriale, presenti nelle cellule vitali, di trasformare il sale MTT *tetrazolium 3-(4,5-dimethylthiazolo-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide*, di color giallo, in cristalli di formazano, mediante rottura dell'anello tetrazolico. I cristalli hanno una colorazione porpora e sono insolubili in soluzioni acquose. I cristalli ridisciolti in isopropanolo acidificato formano una soluzione purpurea misurata con spettrofotometria a 520 nm. I valori di assorbanza sono proporzionali alla quantità di formazano prodotta e, quindi all'attività metabolica e alla vitalità cellulare. Questo test fornisce un'indicazione relativa della popolazione vitale e permette di valutare la tossicità di una sostanza, attraverso il confronto tra gli indici di vitalità cellulare ottenuti dalle cellule trattate rispetto al campione di controllo. I valori di assorbanza superiori al controllo indicano una buona proliferazione cellulare, mentre i valori più bassi suggeriscono la morte cellulare o l'inibizione della proliferazione. Il test è stato condotto presso i laboratori di biologia dell'università di Padova secondo questi steps:

- I campioni sono stati sterilizzati in autoclave per 20 minuti a 121 °C;
- Sono stati seminati 20 mila fibroblasti umani su ogni campione; le cellule seminate su tcp (*tissue culture polystyrene* o polistirene per colture tessutali) rappresentano la condizione di controllo;
- Le cellule sono state coltivate con cDMEM basale medio fino a 14 giorni;
- Il test MTT è stato eseguito al giorno 1, 3, 7 e 14.

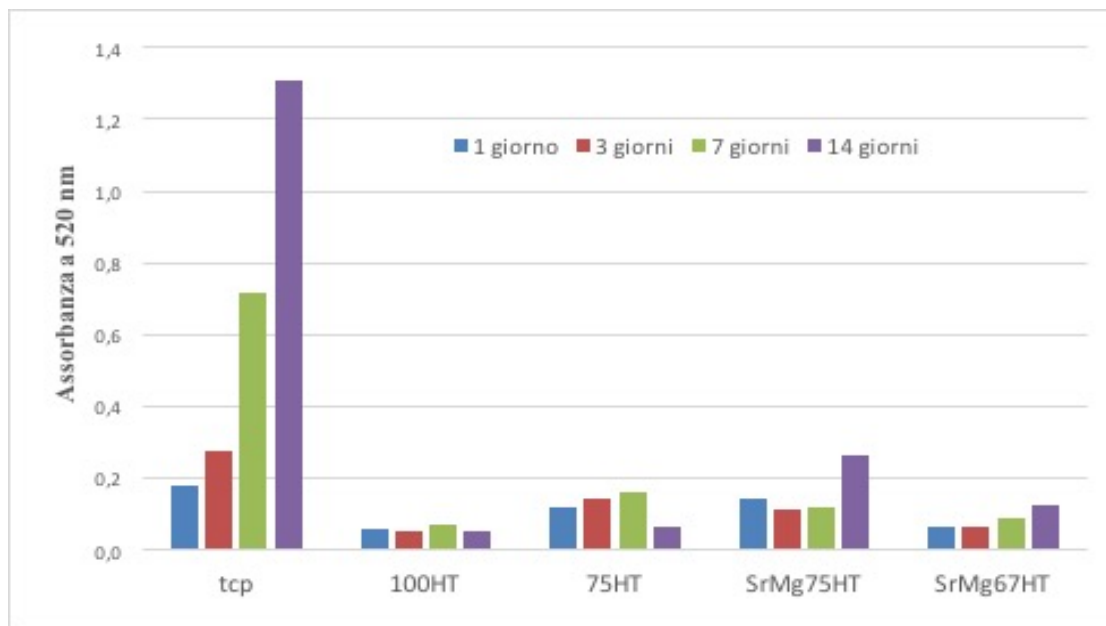


Figura 3.12. Grafico dei risultati del test MTT condotto sui diversi campioni a 1, 3, 7 e 14 giorni.

Il risultato del test ci permette di fare alcune considerazioni:

1. La soluzione di hardystonite pura 100HT, come si trova in letteratura, si conferma citotossica a causa sua troppo rapida dissoluzione.
2. La soluzione 75HT risulta non favorevole alla vitalità cellulare; presenta infatti una diminuzione dell'assorbanza a 14 giorni corrispondente ad una diminuzione di concentrazione di cellule vive. Questo probabilmente a causa della presenza di boro in fasi secondarie o amorfe fuori dalla soluzione solida primaria.
3. Le soluzioni ottenute tramite incorporazione di Sr e Mg sono sicuramente più promettenti per applicazioni biomediche e rappresentano di per sé un progresso rispetto alla soluzione base 75HT.

L'andamento del rapporto di assorbanza è promettente e probabilmente effettuando il test a tempi più lunghi si potrebbero ottenere risultati interessanti. Tuttavia la capacità di proliferazione cellulare è molto inferiore rispetto a quella mostrata dal campione di controllo e ciò rende difficile al momento la collocazione di prodotti realizzati con queste soluzioni in campo clinico. L'incorporazione di boro è molto delicata ed è indispensabile che sia totalmente contenuto in soluzione solida, se si discioglie troppo in fretta e la sua concentrazione sale sopra 0,65 mmol inibisce la crescita e la proliferazione delle cellule staminali mesenchimali, come alcuni esperimento in vitro hanno dimostrato. Si nota infatti come l'assorbanza del campione con maggior quantità di boro presenti un andamento nel tempo che cresce molto più lentamente rispetto al campione con meno boro.

Sono state inoltre effettuate analisi morfologiche al microscopio elettronico (TEM e SEM), le immagini sono state scattate sui campioni trattati dopo 7 e 14 giorni di test. Si riportano in *Figura 3.13* e *Figura 3.14* le immagini a 14 giorni dei campioni SrMg75HT e SrMg67HT; in entrambi i casi sono presenti pochissime cellule, al più qualche aggregato di carbonato di calcio.

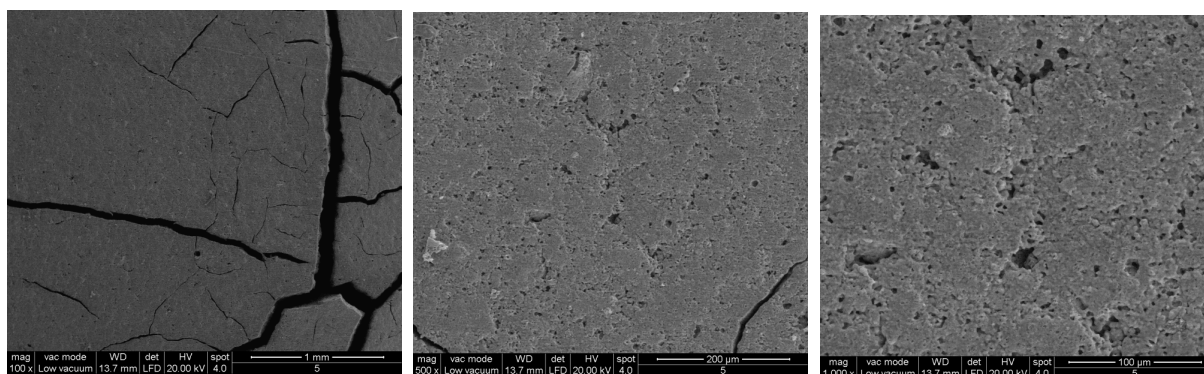


Figura 3.13. Immagini SEM del campione SrMg75HT dopo 14 giorni di test MTT.

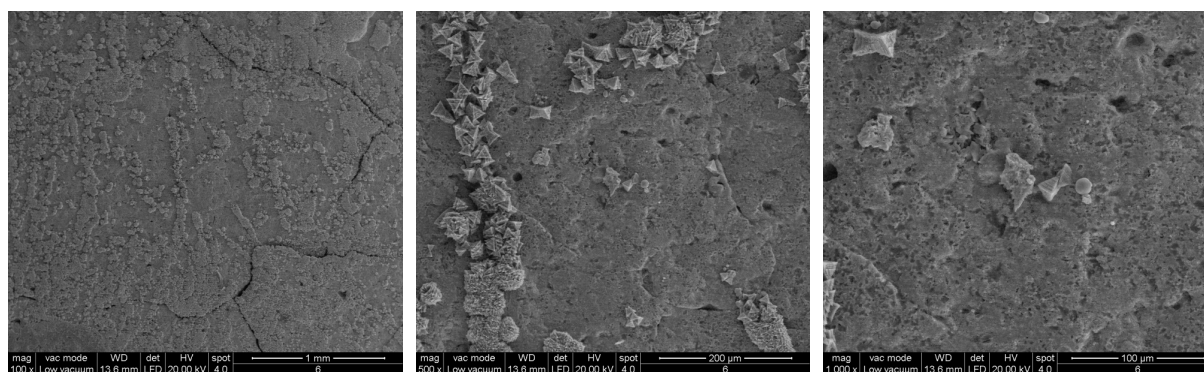


Figura 3.14. Immagini SEM del campione SrMg67HT dopo 14 giorni di test MTT.

Alla luce dei risultati di citotossicità non entusiasmanti, si è voluto quindi studiare una soluzione nuova, priva di boro, con potenziali miglioramenti sulla proliferazione cellulare che verrà trattata nel capitolo seguente.

Capitolo 4

Sintesi di meliliti complesse senza boro

In questo capitolo sperimentale vengono descritte le prove effettuate nei laboratori del Dipartimento di Ingegneria Industriale che hanno portato alla realizzazione di pastiglie in materiale bioceramico con metodo alternativo alla sinterizzazione di polveri e alla tecnica sol-gel quale è il processo PDCs.

In particolare si è indagata la fattibilità di sintesi tramite tecnologia PDCs di un bioceramico con struttura cristallina melilitica monofasica a base hardystonitica a cinque elementi; ovvero Si, Ca, Zn, Sr, Mg per sfruttare i vantaggi derivanti dalla loro incorporazione già citata nel §1.3.1.1.

Verranno riportate e analizzate le modalità con cui sono state realizzate le pastiglie di varie composizioni chimiche al fine di studiare, dopo trattamento termico, le fasi prodotte tramite tecniche XRD e quindi la composizione ottimale per avere una soluzione solida monofasica.

Verranno infine presentati i risultati del test di citotossicità effettuati sui campioni prodotti per quantificare l'eventuale miglioramento delle nuove soluzioni sulla proliferazione cellulare.

Lo stato dell'arte, qualora non indicato direttamente nel testo, è un riassunto delle fonti bibliografiche [50 - 53].

4.1 Formulazione della composizione

Le analisi condotte nel precedente capitolo hanno portato ad alcuni risultati importanti:

1. L'incorporazione di più elementi all'interno della soluzione solida ha permesso di modificare la cella unitaria del reticolo in modo da ottenere una struttura cristallina all'incirca monofasica. Ciò ha portato a benefici soprattutto sulla degradazione del materiale, punto debole dell'hardystonite pura, evidenziato dai test di citotossicità.
2. L'incorporazione di boro nella struttura hardystonitica ha portato sicuramente ad un miglioramento di densificazione e quindi di proprietà meccaniche ma la sua dissoluzione nell'organismo è un veleno per la proliferazione cellulare; anche se l'incorporazione di Sr e Mg nella soluzione 75HT ha incrementato la bioattività i risultati non sono ancora soddisfacenti per l'applicazione in campo clinico.

Alla luce di questi risultati quindi si è deciso di studiare una nuova soluzione totalmente priva di boro sfruttando gli aspetti positivi riscontrati con l'incorporazione di ioni Sr e Mg nella struttura melilitica hardystonitica.

Il fine è quindi ottenere una composizione chimica tra questi cinque elementi, ovvero Si, Ca, Zn, Sr, Mg per creare una soluzione solida monofasica il più possibile densa senza crepe e dalle buone proprietà meccaniche. Lo scopo è migliorare la bioattività dell'hardystonite pura e delle precedenti soluzioni contenenti boro, grazie al rilascio controllato di cinque ioni storicamente riconosciuti come positivi per applicazioni in campo biomedicale.

Il tutto sempre sfruttando i vantaggi offerti dalla tecnica PDCs in confronto alle più tradizionali quale ad esempio il metodo sol-gel; Il processo produttivo viene riassunto in *Figura 4.1*.



Figura 4.1. Processo PDCs schematico per ottenere pastiglie partendo da polimero preceramico e fillers attivi.

Bisogna affermare che le regole empiriche introdotte da V. M. Goldschmidt sulla soluzione solida, già citate nel §1.4.2.2 vengono teoricamente rispettate con queste nuove formulazioni (*Tabella 4.1*). Sia il rapporto tra i raggi di Sr e Ca sia tra Mg e Zn differisce sempre meno del 30 % e le cariche degli ioni sono le medesime.

Tabella 4.1. Carica, numero di coordinazione, raggio ionico e elettronegatività (scala di Pauling) degli elementi chiave di questo studio.

Elemento	Carica	Numero di coordinazione	Ri [Å]	Electronegatività
Calcio	2+	VIII	1.12	1
Stronzio	2+	VIII	1.4	0.95
Zinco	2+	IV	0.74	1.65
Magnesio	2+	IV	0.71	1.31
Silicio	4+	IV	0.40	1.90

4.2 Preparazione delle pastiglie

La base di partenza per questo studio è la sintesi di hardystonite tramite PDCs, già sperimentate presso i laboratori dell'università di Padova, a cui si vuole aggiungere l'incorporazione nella struttura di Sr e Mg alla luce dei risultati ottenuti nel precedente capitolo.

Lo stronzio è stato studiato come elemento sostituzionale del calcio nel sito A ottaedrico della struttura melilitica, mentre il magnesio come sostituzionale dello zinco nel sito T₁ tetraedrico.

4.2.1 Miscelazione e ceramizzazione delle polveri

Visto che il metodo di sintesi su cui si basa la presente ricerca è il PDCs, prima di tutto va scelta la fonte di silice del processo, ovvero, il polimero preceramico polisilossanico disponibile in commercio denominato MK in forma di polvere (Wacker-Chemie GmbH, Monaco di Baviera, Germania), che presenta una resa ceramica del 84 % in peso.

La scelta di MK è finalizzata alla principale applicazione prevista per questo lavoro di testi ovvero la stampa Robocasting. L'MK, infatti, oltre ad essere più reattivo rispetto ad H62C (resa ceramica del 58 %), presenta una ridotta evoluzione in fumi durante la pirolisi riducendo quindi il ritiro volumetrico, la perdita di peso e la formazione di micro e macro porosità.

In secondo luogo vanno accuratamente selezionati i *fillers* reattivi in gioco, questi sono:

- CaCO₃ (< 10 µm, Industrie Bitossi, Vinci, Italia);
- ZnO (< 1.48 µm, Sigma Aldrich, Germania);
- MgO (polvere nanometrica);
- SrCO₃ (polvere micrometrica).

Per poter realizzare la miscela tra le polveri di polimero preceramico e dei *fillers* viene utilizzato alcool isopropilico C₃H₈O. I solventi con carattere apolare sono poco adatti per disciogliere siliconi, dato che non essendovi gruppi polari questi tendono ad aggregarsi precipitando all'interno della soluzione. I solventi fortemente polari, invece, generano un'iniziale buona dispersione, ma la presenza di gruppi idrossilici può determinare reazioni di sostituzione dei gruppi laterali nei siliconi con successiva reticolazione o reazioni di riduzione da parte del solvente (es. etanolo). I candidati migliori sono quindi i solventi a leggero carattere polare come l'acetone, utilizzato principalmente per la pulizia delle strumentazioni utilizzate, o, appunto, l'alcool isopropilico.

4.2.1.1 Miscelazione e formatura pastiglie

Gli step relativi alla miscelazione e all'ottenimento delle pastiglie sono i seguenti:

- Dissolvere il polimero preceramico MK in alcool isopropilico in parti uguali all'interno di un becher di vetro. Per assicurarsi l'omogeneità della miscela il tutto viene mantenuto in agitazione tramite stirring magnetico per 15 minuti e successivamente viene posto nella macchina ultrasonica per altri 15 minuti, con l'obiettivo di eliminare l'eventuale presenza di gas disciolti all'interno e disgregare aggregati che si sono formati durante il processo di miscelazione. La soluzione che si ottiene deve essere limpida, indice dell'ottima solubilità del silicone nel solvente scelto; una volta raggiunta questa condizione si può procedere con gli steps successivi.
- Mantenendo la soluzione in stirring, aggiungere lentamente alla miscela le polveri di tutti i *fillers* lasciando loro il tempo di omogeneizzarsi con il resto della miscela grazie alla presenza dell'agitatore magnetico. Tra l'aggiunta di un *filler* e il successivo in genere è necessario attendere qualche minuto per l'omogeneizzazione.
- Terminata l'aggiunta dei *fillers*, sonicare per 15 minuti la miscela, quindi rimettere il becher sotto stirring magnetico per 10 minuti e poi infine versare il tutto in un cristallizzatore di teflon di circa 10 cm di diametro. L'uso del cristallizzatore permette alla soluzione di disporsi nella maggior area superficiale possibile evitando la formazione di strati a diversa altezza che potrebbero indurre a segregazioni o aggregazioni preferenziali. La scelta del teflon è necessaria per permettere il distacco della mescola dopo essiccazione.
- Lasciare il cristallizzatore ad essiccare durante la notte a 60-70 °C in modo da trasformare la miscela basata su MK in materiale compatto, facendo evaporare l'alcool isopropilico. Se si trattano termicamente i campioni senza aver estratto il solvente, durante il trattamento si potrebbero verificare processi di esplosione dovuta alla presenza del solvente stesso e fenomeni di segregazione a bassa temperatura.
- Dopo l'essiccazione, rimuovere la miscela a base di silicone e cariche dal cristallizzatore e macinare tramite mulino a sfere (*Pulverisette 7 planetary ball mill, Fritsch, Idar-Oberstein, Germania*) a 350 rpm fino ad ottenere una polvere fine da setacciare fino a dimensioni < 90 µm.

- Una volta ottenute le polveri, versarne 1 grammo in uno stampo cilindrico in acciaio inossidabile, composto da camera e punzone, per realizzare pastiglie da 16,5 mm di diametro, e uno spessore di circa 3 mm; applicare tramite pressa idraulica una pressione di 140 MPa per almeno 1 minuto e rimuovere la pastiglia dallo stampo.
- Terminata la formatura delle pastiglie con la pressa manuale, si effettua il processo di ceramizzazione per realizzare il silicato desiderato. In analogia con il lavoro svolto in precedenza presso i laboratori dell'università di Padova per sintetizzare hardystonite tramite PDCs, le pastiglie sono state trattate termicamente e convertite in ceramico in aria a 1100 °C e 1200 °C, con una rampa di salita di 2 °C/min, mantenimento di 1 ora e raffreddamento di 4 °C/min. Non essendoci *filler* in grado di fluidificare o liquefare durante il trattamento, diversamente dalla sintesi di meliliti con boro, in questo caso non è possibile scendere sotto i 1000 °C.

Da processo PDCs è stata ottenuta hardystonite già a 1100°C ma con la presenza di fasi secondarie che spariscono quasi totalmente col trattamento a 1200°C. Si è voluto indagare quindi se l'effetto positivo dell'incorporazione di ioni sull'evoluzione di fase abbia conseguenze anche sulla temperatura di trattamento e consenta l'ottenimento di una fase pura anche ad una temperatura di trattamento inferiore.

4.2.1.2 Formulazioni adottate e reagenti

Nella formulazione delle composizioni ci sono diversi aspetti da tenere in considerazione:

1. Ciascun *fillers* va introdotto nella giusta proporzione tenendo conto della loro resa in ossido dopo trattamento e se sono precursori di uno o più ossidi.

Tabella 4.2. *Principali fillers utilizzati con rispettiva resa in ossido*

Precursore	MK	CaCO ₃	SrCO ₃	ZnO	MgO
Ione fornito	Si	Ca	Sr	Zn	Mg
Resa peso [%]	84	56	70	100	100

2. Effettuando una sostituzione di ossidi nella composizione va tenuto conto del rapporto molare affinché il bilancio stechiometrico sia corretto; partendo dalla soluzione 100%HT di formula Ca₂ZnSi₂O₇, andando a sostituire Sr al Ca e Mg allo Zn, la formula chimica risulta quindi: Ca_{2-x}Sr_xZn_(1-y)Mg_ySi₂O₇.

Riprendendo lo studio effettuato in precedenza si è considerato una sostituzione del 30% mol di Sr e del 15% mol di Mg.

Tabella 4.3. Formulazioni adottate con relativa quantità di ioni sostituiti e formula chimica.

Formulazione	Rapporto molare	Valore	Formula chimica
SrMg100HT	$Sr/Ca + Sr$	0,30	$Ca_{1,4} Sr_{0,6} Zn_{0,85} Mg_{0,15} Si_2 O_7$
	$Mg/Zn + Mg$	0,15	

In *Tabella 4.4* vengono riportate le quantità in peso di polimero preceramico e cariche per ottenere 100 g di resa ceramica dopo il trattamento termico.

Tabella 4.4. Le composizioni d'interesse delle diverse formulazioni per ottenere 100 g di resa ceramica dopo il trattamento termico.

Formulazione	MK	CaCO ₃ [g]	ZnO [g]	SrCO ₃ [g]	MgO [g]
SrMg100HT	42,57	41,7	20,6	26,36	1,8

4.2.2 Analisi XRD e Discussione dei risultati

L'identificazione delle fasi cristalline è stata effettuata tramite diffrazione ai raggi X (XRD; Bruker AXS D8 Advance, Bruker, Germania), con il supporto del database di *patterns* cristallografici PDF-2 (ICDD-International Centre for Diffraction Data, Newtown Square, PA) e del programma Match! (Crystal Impact GbR, Bonn, Germania) e successivamente ricontrollati con il database COD (Crystallography Open Database, www.crystallography.net). Per effettuare l'analisi è necessario macinare a mano la pastiglia trattata fino ad ottenere polvere abbastanza fine. Dopo la macinazione, circa un grammo viene disposto nel piatto secondo la modalità illustrata nella *Figura 4.2*. È importante che la polvere sia ben distribuita per permettere alla macchina di lavorare in maniera corretta.

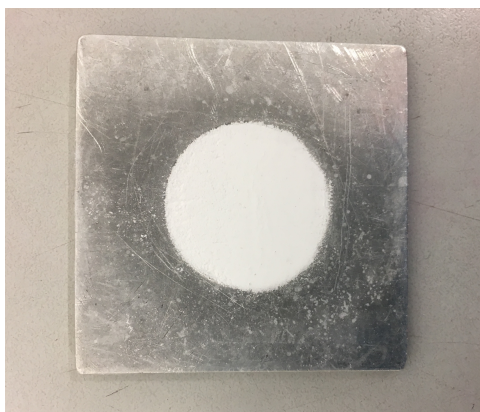


Figura 4.2. Piatto utilizzato per predisporre la polvere per l'analisi ai raggi X.

La *Figura 4.3* mette in comparazione gli spettri XRD della stessa soluzione sintetizzata a 1100 °C e 1200 °C con il pattern di riferimento dell'hardystonite e permette di trarre risultati molto interessanti.

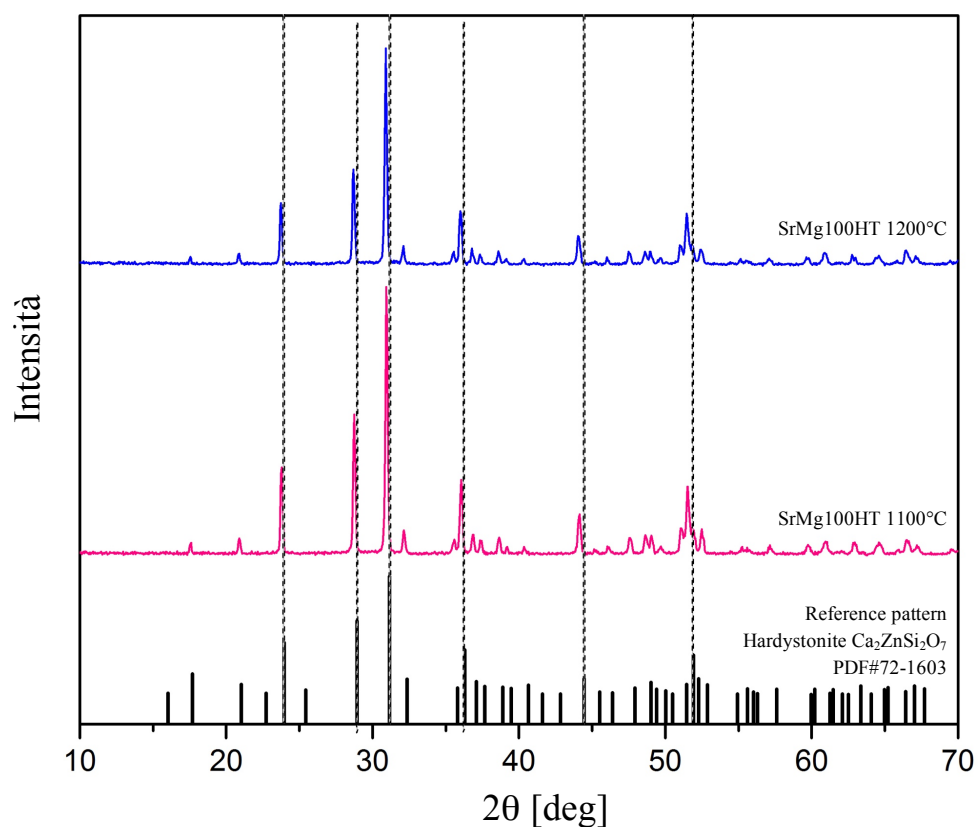


Figura 4.3. Analisi XRD della composizione SrMg100HT trattata a 1100°C e 1200°C con il pattern dell'hardystonite (PDF#72-1603) in evidenza.

I picchi di diffrazione mostrano per entrambe le temperature di trattamento una perfetta corrispondenza con il pattern dell'hardystonite, a dimostrazione del fatto che l'incorporazione di nuovi elementi ha permesso una modifica del reticolo cristallino e un conseguente miglioramento della mobilità ionica tale da creare una soluzione solida monofasica anche a temperature minori di 1200°C, risultato non possibile con la sintesi di hardystonite pura non drogata.

Viene rilevato un leggero spostamento dei picchi coerente con l'evoluzione delle fasi. In particolare il lieve *shift* dei picchi verso sinistra è indice di una dilatazione della cella unitaria della struttura melilitica. La presenza di un atomo di dimensioni maggiori nel sito A ottaedrico come Sr, raggio atomico di 219 pm, al posto del Ca, raggio atomico di 194 pm distorce il reticolo e altera le direzioni dei fasci diffratti; questo cambiamento nel reticolo può essere determinato dalle misurazioni delle distanze d dei diversi piani.

L'assenza di pance nei *pattern* di diffrazione ci conferma che la presenza di fase amorfa in frazione in percentuale è molto bassa rispetto alla frazione cristallina.

La rimozione di boro ha comportato, rispetto ai campioni studiati nel precedente capitolo, la scomparsa della fase liquida durante il processo di ceramizzazione; le pastiglie sintetizzate col processo PDCs hanno infatti mostrato una notevole friabilità con molte cricche superficiali, dovute ad un mancato rilassamento delle tensioni indotte dalle variazioni di volume durante la trasformazione polimero-ceramico e la conseguente cristallizzazione.

Le crepe potrebbero essere eliminate quasi completamente aggiungendo polveri di hardystonite pre-ceramizzate come *filler* inerti nella composizione, compromettendo però l'idea di una sintesi diretta.

Tenendo conto di questo, è stato quindi proposto un secondo percorso di sintesi che prevede sempre la promozione di una fase liquida durante il trattamento termico in grado di promuovere la densificazione e la scomparsa delle microcricche. Ciò è stato possibile grazie all'incorporazione di polveri di vetro della stessa composizione usate come *fillers* secondario, in analogia con altri esperimenti realizzati presso i laboratori dell'università di Padova in passato.

4.3 Vetro come *filler* attivo

Operando con una metodologia definita "*low-glass approach*" [51], una ridotta percentuale di vetro è stata utilizzata come *filler* aggiuntivo. La particolarità di questo vetro è l'assoluta identità in composizione chimica con il materiale ceramico sviluppato da silicone e restanti *fillers*.

L'aggiunta è finalizzata alla determinazione di fase liquida, dal rammollimento del vetro, durante il trattamento termico, in assenza di *fillers* boratici.

4.3.1 Sintesi di vetro di SrMg100HT

Il vetro della stessa composizione delle pastiglie di SrMg100HT è stato realizzato presso i laboratori dell'università di Padova.

Prima di tutto sono stati accuratamente selezionati i *fillers* reattivi in gioco, questi sono:

- SiO₂ (polvere micrometrica)
- CaCO₃ (< 10 µm, Industrie Bitossi, Vinci, Italia);
- ZnO (< 1.48 µm, Sigma Aldrich, Germania);
- CaCO₃·MgCO₃ (Dolomite)
- SrCO₃ (polvere micrometrica).

Come fonte di silice viene usata della sabbia in quanto materia prima economica; la dolomite viene usata al posto dell'ossido di magnesio a vantaggio dell'omogeneità ottenibile, in quanto precursore sia di magnesio che di calcio.

Ciascun *fillers* va introdotto nella giusta proporzione tenendo conto della loro resa in ossido dopo fusione e se sono precursori di uno o più ossidi.

Tabella 4.5. Principali *fillers* utilizzati con rispettiva resa in ossido.

Precursore	SiO ₂	CaCO ₃	SrCO ₃	ZnO	CaCO ₃ ·MgCO ₃	
Ione fornito	Si	Ca	Sr	Zn	Ca	Mg
Resa peso [%]	100	56	70	100	30,4	22

In *Tabella 4.6* vengono riportate le quantità in peso di *filler* per ottenere 100 g di vetro dopo il trattamento termico.

Tabella 4.6. Le composizioni d'interesse delle diverse formulazioni per ottenere 100 g di resa ceramica dopo il trattamento termico.

Formulazione	SiO ₂	CaCO ₃ [g]	ZnO [g]	SrCO ₃ [g]	CaCO ₃ ·MgCO ₃ [g]
SrMg100HT	35,75	37,23	20,6	26,36	8,23

Gli step relativi alla miscelazione e all'ottenimento del vetro sono i seguenti:

- Versare le polveri di tutti i *fillers* nelle giuste dosi all'interno di una giara per il mulino a sfere (*Pulverisette 7 planetary ball mill, Fritsch, Idar-Oberstein, Germania*) e lasciare mescolare per 1 h a 300 rpm.
- Rimuovere la miscela dalla giara e setacciare fino a dimensioni $< 150 \mu\text{m}$; in questo modo abbiamo omogeneizzato la composizione e preparata per la trasformazione in vetro.
- Riempire dei crogioli in materiale refrattario con circa 100g di polvere ciascuno.
- Inserire i crogioli nel forno per la fusione e aumentare la temperatura fino a completa fusione del composto. È stato controllato lo stato della soluzione dopo i 1200°C circa ogni 50° ; in questo caso è stato necessario raggiungere i 1400°C prima di ottenere la fusione del composto.
- Estrarre i crogioli e colare su un opportuno supporto che permetta il rapido raffreddamento e la formazione del vetro (*Figura 4.4*)



Figura 4.4. Fasi di realizzazione del vetro, dalla colata su stampo al prodotto finale solidificato.

- Inserire il vetro all'interno di una giara e macinare tramite mulino a sfere a 450 rpm fino ad ottenere una polvere fine da setacciare fino a dimensioni $< 39 \mu\text{m}$.

4.3.2 Pastiglie Low Glass Approach

A questo punto è stato ottenuto il *filler* di polvere di vetro della medesima composizione dei campioni SrMg100HT e si può procedere con la sintesi di pastiglie *low glass approach*.

Il processo di realizzazione delle pastiglie è identico a quello descritto nel §4.2.1.1, con trattamento termico a 1100 °C.

4.3.2.1 Formulazioni adottate e reagenti

Ciascun *fillers* va introdotto nella giusta proporzione tenendo conto della loro resa in ossido dopo trattamento e se sono precursori di uno o più ossidi.

Tabella 4.7. Principali *fillers* utilizzati con rispettiva resa in ossido.

Precursore	MK	CaCO ₃	SrCO ₃	ZnO	MgO
Ione fornito	Si	Ca	Sr	Zn	Mg
Resa peso [%]	84	56	70	100	100

In *Tabella 4.8* vengono riportate le quantità in peso di polimero preceramico e cariche per ottenere 100 g di resa ceramica dopo il trattamento termico, avendo stabilito una introduzione del 20% di *filler* di vetro.

Tabella 4.8. Le composizioni d'interesse delle diverse formulazioni per ottenere 100 g di resa ceramica dopo il trattamento termico.

Formulazione	MK	CaCO ₃ [g]	ZnO [g]	SrCO ₃ [g]	MgO [g]	Vetro
SrMg100HT 20% glass	34,05	33,36	16,47	21,09	1,44	20g

4.3.3 Analisi XRD e Discussione dei risultati

L'identificazione delle fasi cristalline è stata effettuata tramite diffrazione ai raggi X (XRD; Bruker AXS D8 Advance, Bruker, Germania), con il supporto del database di *patterns* cristallografici PDF-2 (ICDD-International Centre for Diffraction Data, Newtown Square, PA) e del programma Match! (Crystal Impact GbR, Bonn, Germania) e successivamente ricontrollati con il database COD (Crystallography Open Database, www.crystallography.net).

Per effettuare l'analisi è necessario macinare a mano la pastiglia trattata fino ad ottenere polvere abbastanza fine. Dopo la macinazione, circa un grammo viene disposto nel piatto secondo la modalità illustrata nella *Figura 4.2*. È importante che la polvere sia ben distribuita per permettere alla macchina di lavorare in maniera corretta.

La *Figura 4.5* mette in comparazione gli spettri XRD della soluzione sintetizzata a 1100 °C con diverse percentuali di *filler* di vetro in relazione con il pattern dell'hardystonite pura.

picchi di diffrazione mostrano una quasi perfetta corrispondenza con il pattern dell'hardystonite anche in seguito all'incorporazione della polvere di vetro.

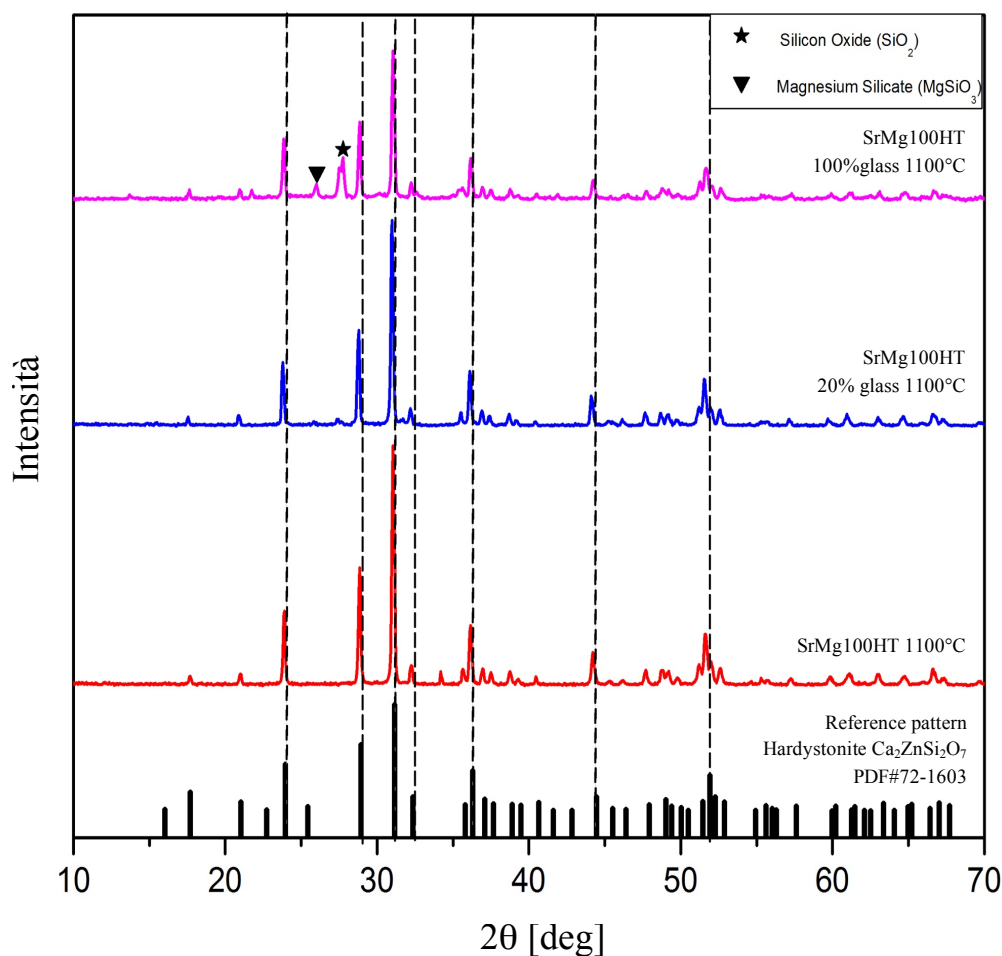


Figura 4.5. Analisi XRD della composizione SrMg100HT trattata a 1100°C con diverse % di filler di vetro e il pattern dell'hardystonite (PDF#72-1603) in evidenza.

Il risultato è molto promettente e ci permette di affermare che il vetro aggiunto cristallizza contribuendo a formare la struttura melilitica monofasica e in più, rammollendo durante il trattamento termico, consente una migliore densificazione del prodotto.

Viene rilevato un leggero spostamento dei picchi coerente con l'evoluzione delle fasi. In particolare il lieve *shift* dei picchi verso sinistra è indice di una dilatazione della cella unitaria della struttura melilitica già discusso nel §4.2.2.

L'assenza di pance nei *pattern* di diffrazione ci conferma che la presenza di fase amorfa in frazione in percentuale è molto bassa rispetto alla frazione cristallina.

Il campione con il 100% di vetro presenta alcune fasi secondarie e una conseguente diminuzione dell'intensità dei picchi caratteristici della fase hardystonite.

4.4 Misura delle proprietà fisiche: ritiro geometrico

Effettuando le misure del diametro delle pastiglie dopo trattamento termico è possibile ottenere informazione sulla densificazione calcolando il ritiro geometrico. La formatura delle pastiglie infatti avviene in maniera ripetitiva e standard nello stesso stampo cilindrico in acciaio inossidabile con un diametro di circa 16,5 mm.

I valori in percentuale del ritiro sono riportati in *Tabella 4.9* assieme ai valori medi dei diametri dopo ceramizzazione per le soluzioni SrMg100HT senza vetro ottenute a diversa temperatura e per quella col 20% di *filler* di vetro ottenuta solamente a 1100 °C.

Tabella 4.9 Percentuale di ritiro geometrico delle pastiglie.

<i>Campione</i>	<i>Diametro iniziale</i>	<i>Diametro finale</i>	<i>Ritiro</i>
<i>SrMg100HT 1100 °C</i>	<i>16,43 mm</i>	<i>14,46 mm</i>	<i>12 %</i>
<i>SrMg100HT 1200 °C</i>	<i>16,43 mm</i>	<i>14,11 mm</i>	<i>14,1 %</i>
<i>SrMg100HT 20% Vetro 1100 °C</i>	<i>16,43 mm</i>	<i>13,85 mm</i>	<i>15,7 %</i>

Come da previsione la soluzione con polvere di vetro è risultata maggiormente densificata è già al tatto appare più solida e meccanicamente performante; il *filler* vetroso rammollendo durante il riscaldamento ha prodotto un campione più compatto caratterizzato da una quantità di cricche superficiali minore mantenendo inalterata la struttura cristallina monofasica; per eliminare il più possibili la presenza di cricche, per la sintesi di solidi cellulari si ricorrerà ad una maggiore quantità di polvere di vetro pari al 30%.

La temperatura di trattamento maggiore permette si una maggiore mobilità ionica e una maggiore densificazione ma non presenta alcun vantaggio dal punto di vista morfologico, quindi i solidi cellulari di queste soluzioni saranno ceramizzati non oltre i 110 °C.

4.5 Ottimizzazione del Trattamento termico

Per evitare il più possibile di ottenere microcricche residue negli *scaffolds* 3D da stampare è stata effettuata l'analisi termica DTA-TGA della composizione di interesse al fine di elaborare un trattamento termico ottimale che permetta ai prodotti di ceramizzare senza criccarsi per gli stress generati. È stata quindi messa in confronto con la soluzione contenente boro per studiare le eventuali differenze di comportamento.

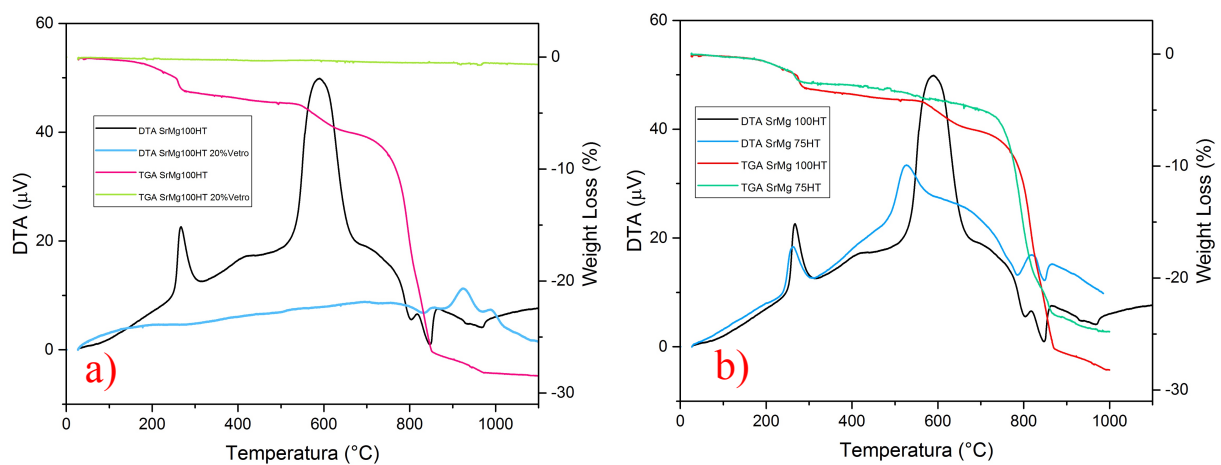


Figura 4.6. Curve termogravimetrica TGA e curve DTA della soluzione SrMg100HT in confronto con: a) SrMg100HT 100% Vetrol e b) SrMg75HT.

Il vetro avendo già subito un riscaldamento fino a 1400 °C presenta delle curve sostanzialmente piatte con solamente un picco riconducibile alla cristallizzazione.

Nella *Figura 4.6b* le soluzioni confrontate presentano un andamento di DTA-TGA molto simile, ciò significa che l'evoluzione di fase durante il trattamento termico sarà la stessa e si potranno quindi utilizzare rampe di riscaldamento e mantenimenti uguali.

Si può distinguere una consistente perdita di massa partendo da ~240 °C dovuta alle reazioni di reticolazione del polimero preceramico; la perdita di massa continua fino a temperature superiori a 350 °C a causa della conversione ceramica e si conclude a ~850 °C. CaCO₃ inizia a decomporsi endotermicamente a ~700÷900 °C, formando CaO che reagisce con il residuo di silice del silicene preceramico e sviluppa le fasi cristalline silicatiche desiderate.

A fronte di questi risultati DTA-TGA è stato selezionato il trattamento termico di conversione ceramica efficace per la formazione degli *scaffolds* e delle schiume cellulari.

Verrà infatti utilizzata una velocità di riscaldamento sufficientemente bassa pari a $0,3\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ con opportuni *steps* di mantenimento per promuovere la completa conversione del polimero preceramico evitando cricche durante le trasformazioni di fase.

Per permettere il rilassamento della struttura prima della decomposizione di CaCO_3 verrà effettuato un mantenimento di 3 h a $590\text{ }^{\circ}\text{C}$ (picco esotermico della conversione di MK nella curva DTA. Inoltre per favorire la completa conversione di CaCO_3 prima della stasi a $1100\text{ }^{\circ}\text{C}$, verrà effettuato un mantenimento di 2 h a $880\text{ }^{\circ}\text{C}$ (picco endotermico di decomposizione di CaCO_3 , da curva DTA). Il trattamento termico completo ideato è in *Figura 4.7*.

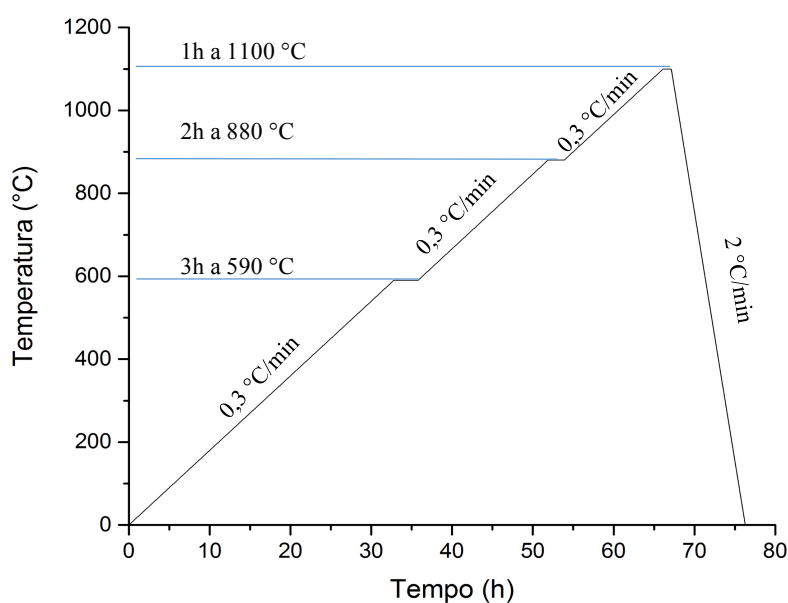


Figura 4.7. Diagramma del trattamento termico di conversione ceramica ottimale per le soluzioni SrMg100HT.

Per quanto esposto questa nuova soluzione, priva di boro, per ottenere bioceramici silicatici sembra promettente per applicazioni cliniche.

L'ottenimento di una struttura monofasica, grazie al *filler* di vetro anche con ridotta quantità di crepe, è essenziale per avere buone proprietà meccaniche e per mitigare la dissoluzione dell'hardystonite con un conseguente probabile miglioramento in vivo sulla formazione dell'osso.

Lo studio è quindi proseguito con i test di citotossicità sulle soluzioni SrMg100HT, con un successivo confronto con le soluzioni testate ne precedente capitolo in modo da verificare l'effettivo beneficio della rimozione di boro e della monofasicità ottenuta sulla bioattività.

4.6 Test di citotossicità

L'effetto citotossico viene determinato sia attraverso una analisi morfologica fine al microscopio elettronico (TEM e SEM) sia attraverso saggi in grado di misurare la vitalità cellulare; è una procedura essenziale per tutti i prodotti in campo clinico *ex vivo*.

Questa analisi viene condotta determinando il contenuto di ATP cellulare (*ATP cell viability assay*) o l'attività delle deidrogenasi mitocondriali (*MTT cell viability assay*)

4.6.1 Saggio MTT (*MTT cell viability assay*)

Il saggio di vitalità più usato in tutto il mondo è il saggio con MTT che è un test colorimetrico quantitativo. Il saggio si basa sulla capacità degli enzimi succinato deidrogenasi mitocondriale, presenti nelle cellule vitali, di trasformare il sale MTT *tetrazolium 3-(4,5-dimethylthiazolo-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide*, di color giallo, in cristalli di formazano, mediante rottura dell'anello tetrazolico. I cristalli hanno una colorazione porpora e sono insolubili in soluzioni acquose. I cristalli ridisciolti in isopropanolo acidificato formano una soluzione purpurea misurata con spettrofotometria a 520 nm. I valori di assorbanza sono proporzionali alla quantità di formazano prodotta e, quindi all'attività metabolica e alla vitalità cellulare. Questo test fornisce un'indicazione relativa della popolazione vitale e permette di valutare la tossicità di una sostanza, attraverso il confronto tra gli indici di vitalità cellulare ottenuti dalle cellule trattate rispetto al campione di controllo. I valori di assorbanza superiori al controllo indicano una buona proliferazione cellulare, mentre i valori più bassi suggeriscono la morte cellulare o l'inibizione della proliferazione. Il test è stato condotto presso i laboratori di biologia dell'università di Padova secondo questi steps:

- I campioni sono stati sterilizzati in autoclave per 20 minuti a 121 °C;
- Sono stati seminati 20 mila fibroblasti umani su ogni campione; le cellule seminate su tcp (*tissue culture polystyrene* o polistirene per colture tessutali) rappresentano la condizione di controllo;
- Le cellule sono state coltivate con cDMEM basale medio fino a 14 giorni;
- Il test MTT è stato eseguito al giorno 1, 3, 7 e 14.

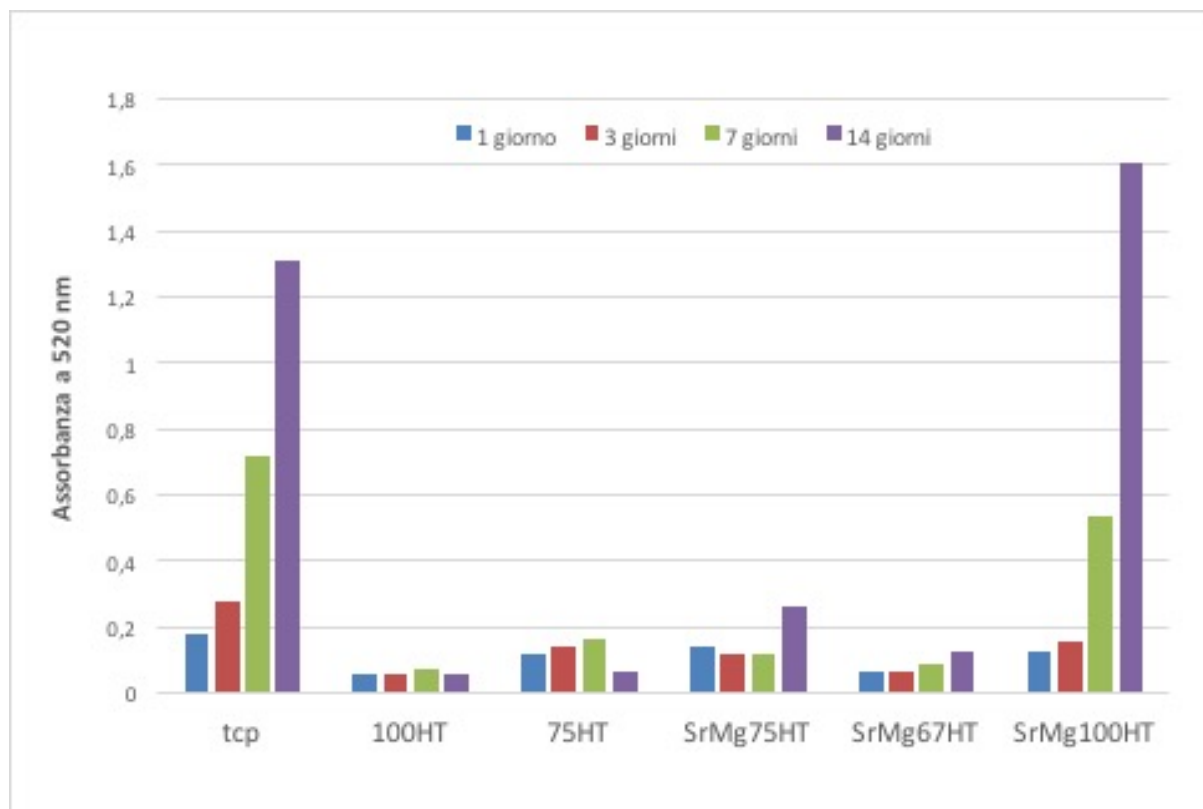


Figura 4.8. Grafico dei risultati del test MTT condotto sui diversi campioni a 1, 3, 7 e 14 giorni.

In *Figura 4.8* è riportato il risultato del saggio MTT comprensivo di tutte le soluzioni sperimentate in questo lavoro di Tesi. La soluzione con il *filler* di vetro non è stata analizzata in quanto inevitabilmente presenterebbe contaminazioni di alluminio derivante dai crogioli in cui è stato ottenuto il vetro che influenzerebbe negativamente il test di citotossicità.

Il test su questo campione è rimandato a studi futuri, da effettuare una volta realizzato la carica vetrosa tramite un processo differente che non contami il prodotto.

Il risultato del test ci permette di fare alcune considerazioni:

1. La melilite complessa priva di boro mostra una capacità di proliferazione cellulare superiore a quella del campione di confronto e nettamente migliore delle soluzioni con il boro e decisamente promettente per applicazioni biomediche.

È stato raggiunto quindi l'obiettivo di realizzare una soluzione solida monofasica dalle buone caratteristiche di bioattività tramite l'eliminazione del boro dalla sintesi; a conferma del fatto che la sua incorporazione è molto delicata, se si discioglie troppo in fretta infatti inibisce la crescita e la proliferazione delle cellule staminali mesenchimali, come alcuni esperimento in vitro hanno dimostrato.

2. Tuttavia il risultato positivo di quest'ultimo test non è dovuto solamente all'eliminazione di boro. L'hardystonite pura infatti, pur non contenendo boro, si dimostra del tutto sfavorevole alla riproduzione cellulare; Il salto prestazionale dunque è stato favorito dall'introduzione degli ioni stronzio e magnesio, che hanno promosso la formazione di una struttura monofasica migliorando i problemi di dissoluzione tipici dell'hardystonite pura. Questa nuova soluzione è in grado di rilasciare cinque ioni bioattivi (Zn, Ca, Si Sr e Mg) con un evidente incremento di bioattività.

Sono state inoltre effettuate analisi morfologiche al microscopio elettronico (TEM e SEM), le immagini più interessanti sono state scattate a 14 giorni dove sul campione SrMg100HT si può osservare uno strato regolare di cellule specialmente nelle zone fratturate.

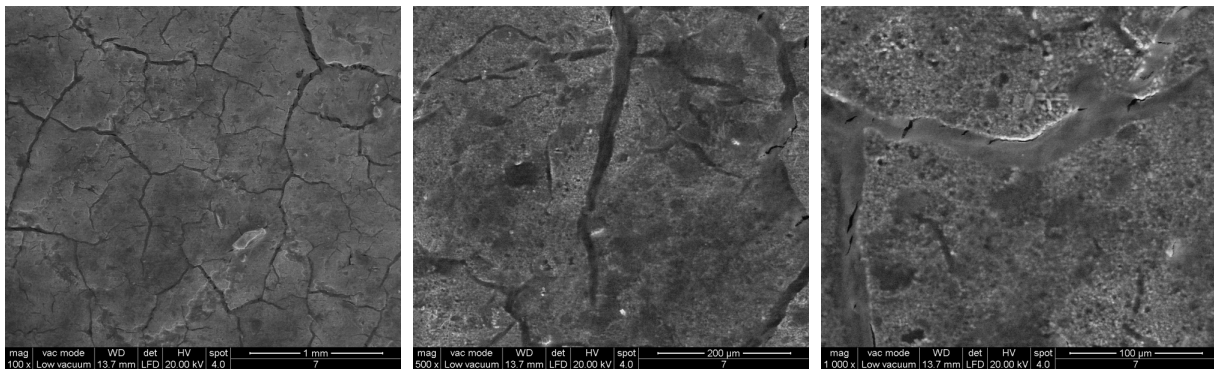


Figura 4.9. Immagini SEM del campione SrMg100HT dopo 14 giorno di test MTT.

Capitolo 5

Sviluppo di solidi cellulari a base di meliliti complesse

Il fulcro di questa Tesi sperimentale prevede la verifica della formabilità delle varie soluzioni di polimero preceramico e *fillers* tramite la realizzazione di solidi cellulari quali schiume attraverso processo di schiumatura e *scaffolds* da stampa 3D diretta.

Gli scopi sono ottenere strutture cellulari altamente porose ed omogenee e dimostrare come il processo PDCs sia applicabile ad una varietà di metodi di formatura mutuati dalle tecniche di formatura delle materie plastiche.

Verranno descritte le fasi per ottenere schiume cellulari e *scaffolds* e la loro caratterizzazione tramite microscopio ottico e tecniche SEM.

Infine verranno effettuate sui campioni realizzate delle prove di compressione per ricavare una stima delle proprietà meccaniche.

Lo stato dell'arte, qualora non indicato direttamente nel testo, è un riassunto delle fonti bibliografiche [55 - 63].

5.1 *Gli scaffolds*

La rigenerazione dei tessuti è una delle principali sfide di cui si sta occupando la *tissue engineering* servendosi solitamente di costrutti tridimensionali bioattivi e biorisorbibili, che prendono il nome di *scaffolds*.

Sia nel caso di *scaffolds* formati da tecnica DIW/Robocasting, sia nel caso di schiume cellulari formate a seguito di reazioni dei *fillers* attivi contenuti nella miscela dopo trattamento termico, questi costrutti ingegnerizzati usati dall'ingegneria tissutale ed impiegati per la rigenerazione dei tessuti danneggiati devono rispondere a precisi requisiti al fine di riprodurre efficacemente la matrice extracellulare e dare un sostegno tridimensionale su cui le cellule possano aderire, migrare, moltiplicarsi e dare il via alle loro funzioni.

5.1.1 Criteri di idealità di uno scaffold

Si possono così riassumere le caratteristiche ideali a cui lo *scaffold* ideale dovrebbe rispondere:

- Fornire l'impalcatura (da cui il nome stesso "*scaffold*") per il tessuto neo-formato, permettendo la ripopolazione cellulare e la rivascularizzazione;
- Essere costituito da materiali biocompatibili, biorassorbibili e bioattivi quindi:
 - Non deve essere citotossico;
 - I prodotti rilasciati devono essere facilmente assorbiti o espulsi dall'organismo,
 - Deve degradarsi con la stessa velocità di riparazione del tessuto danneggiato;
 - Deve promuovere l'adesione cellulare e/o l'osteogenesi;
- Permettere la formazione di un legame forte e stabile con gli altri tessuti (tessuto osseo e tessuto molle), senza formare capsule fibrotiche;
- Possedere proprietà meccaniche simili a quelle del tessuto da riparare, evitando fenomeni come lo *stress shielding*;
- Essere prodotto facilmente, anche in forma irregolare, potendo così imitare la geometria del difetto che deve riparare;
- Essere industrialmente riproducibile, ovvero fornire garanzie dal punto di vista del processo produttivo e che sia realizzabile su larga scala, oltre che sterilizzabile.

Il primo criterio è adeguatamente soddisfatto se lo *scaffold* possiede una struttura a porosità aperta possibilmente elevata (> 80 %). È necessario, per garantire la funzionalità dell'impianto, che la dimensione dei pori sia di almeno 100 μm ; tale dimensione garantisce infatti la possibilità alle cellule di formare nuovo tessuto all'interno dello *scaffold* e contemporaneamente permette la vascolarizzazione, necessaria al trasporto delle sostanze nutritive per mantenere in vita il nuovo tessuto.

Da tali criteri emergono quindi le caratteristiche che si è cercato di riprodurre nei campioni realizzati. Sia per quanto riguarda la sintesi delle schiume che la stampa 3D, si è tentato di riprodurre geometrie con elevata porosità aperta, anche superiore all'80%, di dimensioni maggiori o uguali ai 100 μm , per garantire una buona proliferazione cellulare e la vascolarizzazione. Con la stampa 3D in particolare si è cercato di ottenere una geometria controllata tale da garantire una resistenza meccanica a compressione maggiore rispetto a quella ottenibile con tecniche diverse come lo schiumaggio; una σ_{comp} tra i 2 e 12 MPa è necessaria per permettere al costrutto di sostenere i carichi fisiologici dell'organismo umano.

5.2 Schiume ceramiche a base di meliliti complesse

L'applicazione delle soluzioni sperimentate studiate nei precedenti capitoli è proseguita con l'obiettivo di produrre solidi cellulari inizialmente sotto forma di schiume tramite processo PDCs per applicazioni di ricrescita ossea dove la porosità è un requisito essenziale.

In particolare, come già sperimentato in precedenti lavori di tesi, è possibile realizzare schiume ceramiche altamente porose con l'utilizzo del processo PDCs e opportuni *fillers* attivi in grado di rilasciare molecole d'acqua nella matrice polimerica prima della conversione in ceramico e dare così un effetto schiumante.

5.2.1 Formulazioni con boro

Il ruolo di *filler* attivo ruolo viene svolto egregiamente dalla colemanite utilizzata così come fornita ovvero in forma idrata; essa quindi si rivela essere "multifunzionale", poiché oltre a fornire il boro necessario e favorire lo sviluppo di fase, è in grado di dare schiumatura grazie al rilascio dei gruppi H₂O durante la reticolazione del polimero.

Prima di tutto va scelta la fonte di silice del processo che, diversamente rispetto alla sintesi delle pastiglie è il polimero preceramico polisilossanico disponibile in commercio denominato H62C in forma liquida (Wacker-Chemie GmbH, Monaco di Baviera, Germania), che presenta una resa ceramica del 56 % in peso.

Il polimero H62C verrà utilizzato solamente per la realizzazione di schiume cellulari in quanto, rispetto al polimero MK, usato in precedenza per le pastiglie e in seguito per gli *scaffolds*, presenta una maggior evoluzione in fumi durante la pirolisi aumentando la perdita di peso e la formazione di micro e macro porosità.

Per essere in grado di generare dalla decomposizione di un agente schiumogeno una schiuma con una struttura cellulare ben sviluppata, è necessario che la viscosità della soluzione sia sufficientemente elevata da bloccare il gas generato. MK non può essere utilizzato in questo caso in quanto solido a temperatura ambiente. Come accennato in precedenza, dal momento che il polimero preceramico H62C subisce reticolazione durante la schiumatura, consente la stabilizzazione della struttura formata evitando tutti quei meccanismi di destabilizzazione che si verificherebbero in una schiuma troppo liquida. Esso quindi risulta essere il polimero preceramico ideale per realizzare schiume; è in grado di reticolare durante il processo di schiumatura ad un range di temperatura che va dai 300 °C ai 420 °C e di conferire stabilità alla struttura cellulare.

In secondo luogo vanno accuratamente selezionati i *fillers* reattivi in gioco, questi sono:

- CaCO_3 ($< 10 \mu\text{m}$, Industrie Bitossi, Vinci, Italia);
- ZnO ($< 1.48 \mu\text{m}$, Sigma Aldrich, Germania);
- Colemanite $\text{Ca}_2\text{B}_6\text{O}_{11} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ($< 1 \mu\text{m}$, fornita da CIRCe, Università degli Studi di Padova, Padova);
- MgO (polvere nanometrica);
- SrCO_3 (polvere micrometrica).

In questo caso la colemanite viene utilizzata così come fornita ovvero in forma idrata in quanto, oltre a fornire il boro necessario, è in grado di dare schiumatura grazie al rilascio dei gruppi H_2O durante la reticolazione del polimero.

Per poter realizzare la miscela tra le polveri di polimero preceramico e dei fillers viene utilizzato come per le pastiglie l'alcool isopropilico $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}$.

Il processo produttivo che sfrutta la tecnica PDCs per produrre schiume cellulari viene riassunto in *Figura 5.1*.

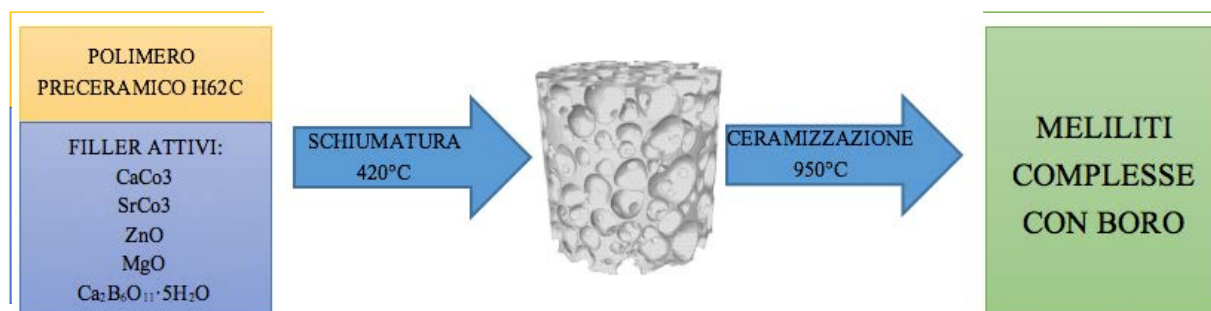


Figura 5.1. Processo PDCs schematico per ottenere schiume cellulari partendo da polimero preceramico e fillers attivi.

5.2.1.1 Preparazione della miscela, schiumaggio e ceramizzazione

Gli *steps* necessari per la realizzazione delle schiume cellulari sono sostanzialmente tre: preparazione della miscela di polimero preceramico e *fillers*, schiumaggio diretto della miscela preceramica e ceramizzazione della schiuma ottenuta.

La procedura dettagliata per l'ottenimento delle schiume cellulari è la seguente:

- Dissolvere il polimero preceramico H62C in alcool isopropilico in parti uguali all'interno di un becher di vetro.

- Per assicurarsi l'omogeneità della miscela il tutto viene mantenuto in agitazione tramite stirring magnetico per 15 minuti e successivamente viene posto nella macchina ultrasonica per altri 15 minuti, con l'obiettivo di eliminare l'eventuale presenza di gas disciolti all'interno e disgregare eventuali aggregati che si sono formati durante il processo di miscelazione. La soluzione che si ottiene deve essere limpida, indice dell'ottima solubilità del silicone nel solvente scelto; una volta raggiunta questa condizione si può procedere con gli *steps* successivi.
- Mantenendo la soluzione in stirring, aggiungere lentamente alla miscela le polveri di tutti i filler lasciando loro il tempo di omogeneizzarsi con il resto della miscela grazie alla presenza dell'agitatore magnetico. Tra l'aggiunta di un filler e il successivo in genere è necessario attendere qualche minuto per l'omogeneizzazione.
- Terminata l'aggiunta dei *fillers*, sonicare per 15 minuti la miscela, quindi rimettere il becher sotto stirring magnetico per 10 minuti e poi infine versare il tutto in un cristallizzatore di teflon di circa 10 cm di diametro. L'uso del cristallizzatore permette alla soluzione di disporsi nella maggior area superficiale possibile evitando la formazione di strati a diversa altezza che potrebbero indurre a segregazioni o aggregazioni preferenziali. La scelta del teflon è necessaria per permettere il distacco della miscela dopo essiccazione.
- Lasciare il cristallizzatore ad essiccare durante la notte a 60-70 °C, in modo da trasformare la miscela basata su H62C in una pasta viscosa facendo evaporare l'alcool isopropilico. Se si trattano termicamente i campioni senza aver estratto il solvente, durante il trattamento si potrebbero verificare processi di esplosione dovuta alla presenza del solvente stesso e fenomeni di segregazione a bassa temperatura.
- Versare manualmente circa 3 g di pasta densa in uno stampo cilindrico d'alluminio fatto a mano con un diametro di ~16 mm.
- Inserire gli stampi in un forno impostato a 420 °C in aria e attendere 10 minuti per la schiumatura e la reticolazione. Aprire il forno per far raffreddare gradualmente le schiume formate ed evitare lo shock termico. Al termine di questa procedura i campioni sono sufficientemente resistenti per essere manipolati.
- Dopo aver rimosso i campioni dallo stampo in alluminio, cercare di togliere lo strato superficiale con della carta vetrata a grana grossa, al fine di raggiungere tutte le zone a porosità aperta. Questa fase conferisce al campione la forma finale, che poi manterrà anche dopo ceramizzazione; risulta più difficile lavorare le superfici con precisione se il materiale è già del tutto ceramico.
- Infine effettuare il processo di ceramizzazione, sperimentato in precedenza, in aria a 950 °C, con una rampa di salita di 0,3 °C/min, una sosta di 3 ore a 590 °C, una di 2h a 580°C, mantenimento di 1 ora a 950 °C e raffreddamento di 2 °C/min.

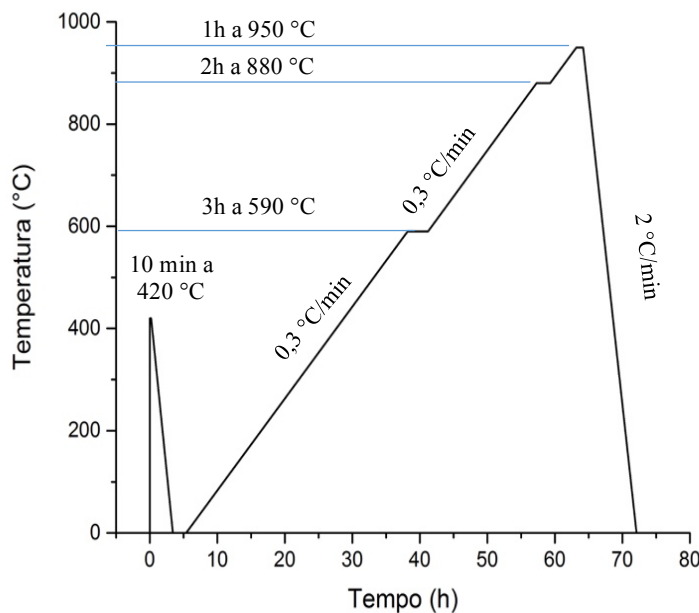


Figura 5.2. Diagramma del trattamento termico di conversione ceramica ottimale per le soluzioni SrMg75HT e SrMg67HT.

L'andamento del trattamento termico complessivo per la realizzazione della schiuma ceramica descritto in *Figura 5.2* riprende gli *steps* di mantenimento descritti in precedenza (§3.5) ma prevede due fasi, dettate da logiche pratiche di liberazione della schiuma dallo stampo di alluminio realizzato a mano; tuttavia sarebbe comunque possibile svolgere l'intero processo con un unico trattamento aggiungendo una sosta per 10 minuti a 420 °C.

La temperatura scelta non è casuale, deriva dalle sperimentazioni fatte in passato nei laboratori di Padova sull'uso della colemanite come *filler* attivo per lo schiumaggio.

Il trattamento eseguito a 420 °C massimizza la decomposizione della colemanite ottenendo il massimo rilascio di molecole d'acqua (ultima molecola d'acqua rilasciata a ~412 °C). Lo scopo è stabilizzare le bolle causate dal rilascio di acqua durante il trattamento e raggiungere la completa reticolazione del precursore preceramico.

Sono state realizzate schiume di due diverse composizioni caratterizzate dallo stesso rapporto molare di ioni sostituiti, ovvero 30%mol Sr e 15%mol Mg ma partendo rispettivamente dalla soluzione solida 75%HT-25%OK e 67%HT-33%OK, che per semplicità chiamiamo SrMg75HT e SrMg67HT.

In *Tabella 5.1* vengono riportate le quantità in peso di polimero preceramico e cariche delle due diverse formulazioni per ottenere 100 g di resa ceramica dopo il trattamento termico, tenendo conto delle rese in ossidi dei diversi *fillers*.

Tabella 5.1. Le composizioni d'interesse delle diverse formulazioni per ottenere 100 g di resa ceramica dopo trattamento termico.

Formulazione	H62C [g]	CaCO ₃ [g]	ZnO [g]	Colemanite* [g]	SrCO ₃ [g]	MgO [g]
SrMg75HT	58,72	38,6	16,29	10,7	27,7	1,39
SrMg67HT	56,99	37,56	14,75	14,38	28,173	1,28

* colemanite idrata (Ca₂B₆O₁₁), MW = 411,08 g/mol

5.2.2 Formulazioni senza boro

Nel caso delle meliliti sintetizzate senza boro il ruolo di filler attivo non può più essere svolto dal sale boratico (colemanite).

In analogia con le precedenti sintesi di schiume cellulari di meliliti tramite PDCs come agenti schiumogeni sono stati utilizzati insieme due filler attivi:

- 1) Un derivato dell'idrazina; N'-Dicarbamoylhydrazine o biurea; C₂H₆N₄O₂ al 98%, Alfa Aesar, UK), che si decompone a circa 260 °C; essa è un agente esterno e non fornisce nessun ione o ossido necessario alla conversione ceramica e non compromette la bioattività e biocompatibilità delle schiume. Viene usata con una concentrazione pari all'1% in peso di prodotto finale
- 2) Idrossido di magnesio Mg(OH)₂ che si decompone a circa 330 °C; esso in questo caso oltre a dare schiumatura grazie al rilascio dei gruppi H₂O durante la reticolazione del polimero fa da fonte di magnesio per la soluzione da sintetizzare. Viene usato con una quantità tale da fornire gli ioni magnesio necessari.

La temperatura di schiumatura va quindi opportunamente adattata ai nuovi *fillers* utilizzati in modo che il polimero preceramico fuso possa intrappolare il gas rilasciato e, grazie alla simultanea reticolazione, mantenere la struttura porosa per poi essere successivamente ceramizzato. In analogia con studi precedenti è stata scelta una temperatura di 350 °C che risulta ideale per massimizzare la decomposizione delle cariche e per conferire stabilità alla struttura cellulare grazie alla reticolazione del polimero H62C che avviene in un range di temperatura compresa tra i 300 e i 420 °C.

La fonte di Silice, come per le meliliti con boro, è il polimero preceramico polisilossanico disponibile in commercio denominato H62C in forma liquida (Wacker-Chemie GmbH, Monaco di Baviera, Germania), che presenta una resa ceramica del 56 % in peso; i motivi di tale scelta sono i medesimi riportati nel paragrafo §5.2.1.

In secondo luogo vanno accuratamente selezionati i *fillers* reattivi in gioco, questi sono:

- CaCO_3 ($< 10 \mu\text{m}$, Industrie Bitossi, Vinci, Italia);
- ZnO ($< 1,48 \mu\text{m}$, Sigma Aldrich, Germania);
- $\text{Mg}(\text{OH})_2$ ($< 10 \mu\text{m}$, Industrie Bitossi, Vinci, Italia);
- SrCO_3 (polvere micrometrica).

Per poter realizzare la miscela tra le polveri di polimero preceramico e dei fillers viene utilizzato come per le pastiglie l'alcool isopropilico $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}$.

Il processo produttivo che sfrutta la tecnica PDCs per produrre schiume cellulari viene riassunto in *Figura 5.3*.

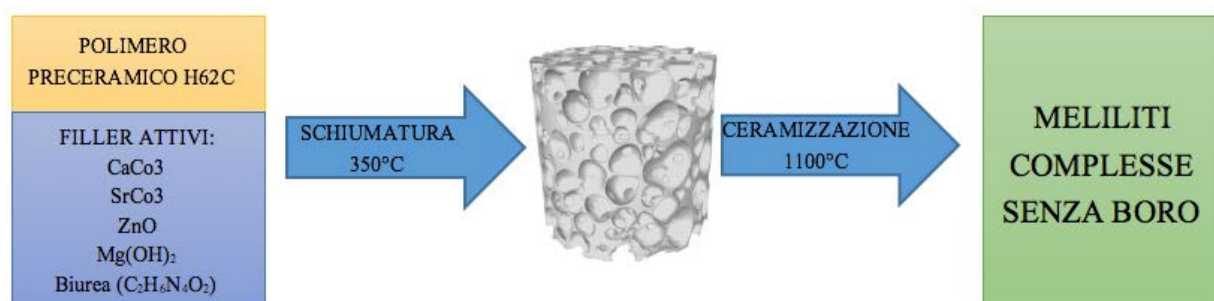


Figura 5.3. Processo PDCs schematico per ottenere schiume cellulari partendo da polimero preceramico e fillers attivi.

5.2.2.1 Preparazione della miscela, schiumaggio e ceramizzazione

Gli *steps* necessari per la realizzazione delle schiume cellulari sono sostanzialmente tre: preparazione della miscela di polimero preceramico e *fillers*, schiumaggio diretto della miscela preceramica e ceramizzazione della schiuma ottenuta.

La procedura dettagliata per l'ottenimento delle schiume cellulari è la seguente:

- Dissolvere il polimero preceramico H62C in alcool isopropilico in parti uguali all'interno di un becher d vetro. Per assicurarsi l'omogeneità della miscela il tutto viene mantenuto in agitazione tramite stirring magnetico per 15 minuti e successivamente viene posto nella macchina ultrasonica per altri 15 minuti, con l'obiettivo di eliminare l'eventuale presenza di gas disciolti all'interno e disgregare eventuali aggregati che si sono formati durante il processo di miscelazione. La soluzione che si ottiene deve essere limpida, indice dell'ottima solubilità del silicone nel solvente scelto; una volta raggiunta questa condizione si può procedere con gli steps successivi.

- Mantenendo la soluzione in stirring, aggiungere lentamente alla miscela le polveri di tutti i *fillers* lasciando loro il tempo di omogeneizzarsi con il resto della miscela grazie alla presenza dell'agitatore magnetico. Tra l'aggiunta di un *filler* e il successivo in genere è necessario attendere qualche minuto per l'omogeneizzazione.
- Terminata l'aggiunta dei *fillers*, sonicare per 15 minuti la miscela, quindi rimettere il becher sotto stirring magnetico per 10 minuti e poi infine versare il tutto in un cristallizzatore di teflon di circa 10 cm di diametro. L'uso del cristallizzatore permette alla soluzione di disporsi nella maggior area superficiale possibile evitando la formazione di strati a diversa altezza che potrebbero indurre a segregazioni o aggregazioni preferenziali. La scelta del teflon è necessaria per permettere il distacco della mescola dopo essiccazione.
- Lasciare il cristallizzatore ad essiccare durante la notte a 60-70 °C, in modo da trasformare la miscela basata su H62C in una pasta viscosa facendo evaporare l'alcool isopropilico. Se si trattano termicamente i campioni senza aver estratto il solvente, durante il trattamento si potrebbero verificare processi di esplosione dovuta alla presenza del solvente stesso e fenomeni di segregazione a bassa temperatura.
- Versare manualmente circa 3 g di pasta densa in uno stampo cilindrico d'alluminio fatto a mano con un diametro di ~16 mm.
- Inserire gli stampi in un forno impostato a 350 °C in aria e attendere 30 minuti per la schiumatura e la reticolazione. Aprire il forno per far raffreddare gradualmente le schiume formate ed evitare lo shock termico. Al termine di questa procedura i campioni sono sufficientemente resistenti per essere manipolati.
- Dopo aver rimosso i campioni dallo stampo in alluminio, cercare di togliere lo strato superficiale con della carta vetrata a grana grossa, al fine di raggiungere tutte le zone a porosità aperta. Questa fase conferisce al campione la forma finale, che poi manterrà anche dopo ceramizzazione; risulta più difficile lavorare le superfici con precisione se il materiale è già del tutto ceramico.
- Infine effettuare il processo di ceramizzazione, sperimentato in precedenza, in aria a 1100 °C, con una rampa di salita di 0,3 °C/min, una sosta di 3 ore a 590 °C, una di 2h a 580°C, mantenimento di 1 ora a 1100 °C e raffreddamento di 2 °C/min.

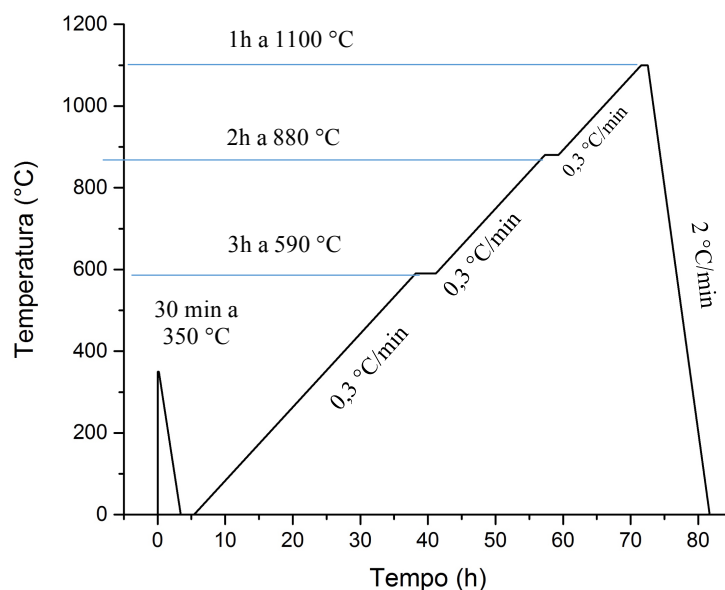


Figura 5.4. Diagramma del trattamento termico di conversione ceramica ottimale per le soluzioni SrMg100HT.

L'andamento del trattamento termico complessivo per la realizzazione della schiuma ceramica descritto in *Figura 5.4* riprende gli *steps* di mantenimento descritti in precedenza (§4.5), ma prevede due fasi, dettate da logiche pratiche di liberazione della schiuma dallo stampo di alluminio realizzato a mano; tuttavia sarebbe comunque possibile svolgere l'intero processo con un unico trattamento aggiungendo una sosta per 30 minuti a 350 °C.

Il trattamento eseguito a 350 °C massimizza la decomposizione dei *fillers* per lo schiumaggio e il rilascio di molecole d'acqua.

Sono state realizzate schiume della stessa composizione denominata SrMg100HT sia senza polvere di vetro che tramite *low glass approach* con il 30% di *filler* aggiunto.

Tale percentuale è da considerarsi il caso limite per quanto riguarda la produzione di schiume, un'ulteriore aggiunta diminuirebbe troppo la concentrazione di cariche schiumanti e impedirebbe alla schiuma di formarsi correttamente.

È stata sperimentata una percentuale di vetro superiore rispetto alle pastiglie (§4.3) per massimizzare la densificazione e minimizzare le cricche.

In *Tabella 5.2* vengono riportate le quantità in peso di polimero preceramico e cariche delle due diverse formulazioni per ottenere 100 g di resa ceramica dopo il trattamento termico, tenendo conto delle rese in ossido dei diversi *fillers*.

Tabella 5.2. Le composizioni d'interesse delle diverse formulazioni per ottenere 100 g di resa ceramica dopo trattamento termico.

Formulazione	H ₆ C [g]	CaCO ₃ [g]	ZnO [g]	SrCO ₃ [g]	Mg(OH) ₂ [g]	(C ₂ H ₆ N ₄ O ₂) [g]	Vetro [g]
SrMg100HT	63,85	41,7	20,58	26,35	2,6	1	0
SrMg100HT 30% glass	44,69	29,19	14,41	18,45	1,82	1	30

Questa formulazione ha portato tuttavia allo sviluppo di schiume cellulari troppo porose e fragili (*Figura 5.5*); risultava impossibile rimuovere lo stampo di alluminio senza frantumare le schiume.

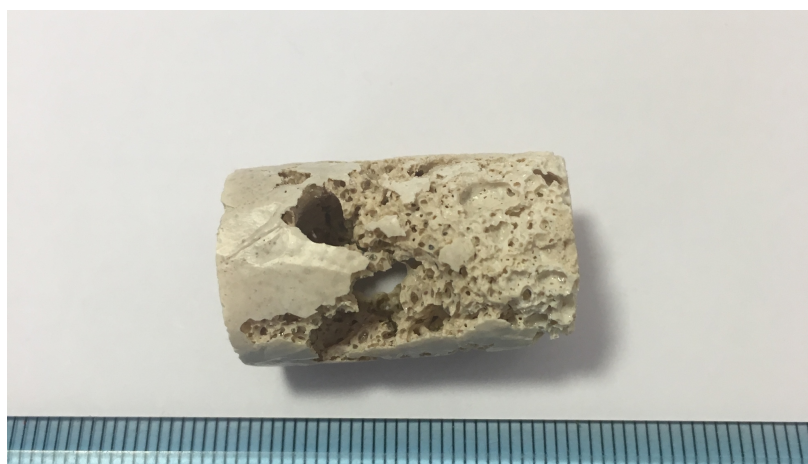


Figura 5.5 Schiuma SrMg100HT ottenuta con l'1% in peso di C₂H₆N₄O₂.

L'uso dell'1% in peso di C₂H₆N₄O₂ deriva dagli studi effettuati nei laboratori dell'università di Padova sulla sintesi di Hardystonite pura tramite PDCs; tuttavia in quella sintesi era presente come unico agente schiumante all'interno della soluzione.

Nel caso in esame invece è presente anche un secondo agente, ovvero l'idrossido di magnesio, la cui quantità non può essere diminuita in quanto necessaria per fornire il magnesio.

Si è optato quindi per nuove soluzioni che prevedessero l'uso solamente dello 0,5% di C₂H₆N₄O₂, quantità che è risultata decisamente più efficace.

5.3 *Discussione dei risultati ottenuti*

Mettendo in confronto le schiume prima del trattamento termico, quindi ancora in stato polimerico, con quelle ceramizzate, si possono notare subito alcune le differenze, grazie anche all'aiuto delle immagini in *Figura 5.6*, In particolare:

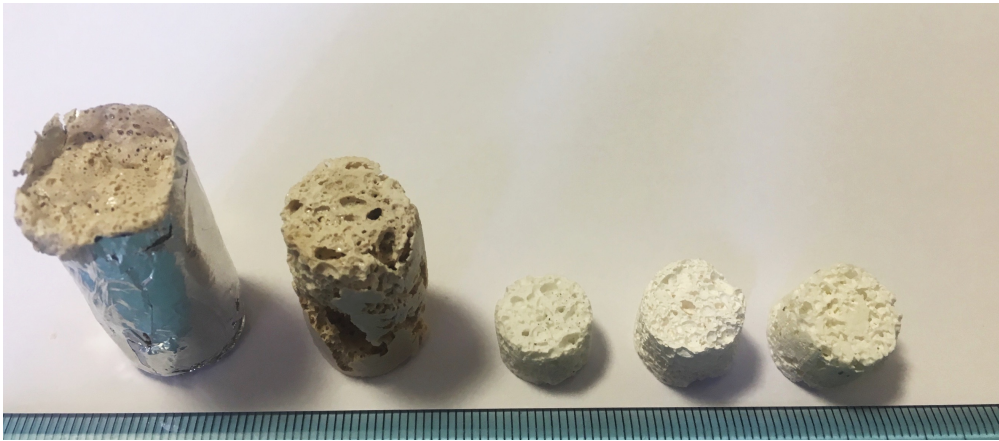


Figura 5.6 Confronto schiume prima e dopo della ceramizzazione.

- Differenza di colore: Dopo trattamento termico, le schiume cambiano colorazione passano da un leggero tenore di grigio ad un bianco, la pirolisi è stata condotta in aria, una atmosfera ossidante, dunque il Carbonio viene interamente ossidato a CO_2 .
- Differenza delle dimensioni: Come è stato riscontrato per le pastiglie, anche per le schiume si è verificato un ritiro geometrico ma non molto evidente.
- La porosità viene perfettamente mantenuta anche dopo trattamento termico, gli stress generati non alterano in alcun modo la forma delle schiume.
- Differenza della consistenza al tatto e all'udito: la schiuma non ancora ceramizzata è caratterizzata da una certa tendenza a disgregarsi se non si presta attenzione nel maneggiarla, è molto friabile per via della grande percentuale di porosità raggiunta e può rompersi facilmente col minimo sforzo. Al contrario una volta trattata già al tatto presenta una buona resistenza testimoniata anche dal suono emesso se sbattuta, indice di un materiale abbastanza rigido e ben cristallizzato.

5.4 Analisi Ottiche e SEM

Le immagini al microscopio ottico permettono di verificare quanto accennato in precedenza. Si può osservare che la forma si è perfettamente conservata, in particolare per quanto riguarda il rapporto materiale denso/porosità (*Figura 5.7*).

La simultanea reticolazione del polimero preceramico, durante il processo di *foaming* dei *fillers* attivi, ha mantenuto la struttura cellulare anche dopo trattamento termico di ceramizzazione.

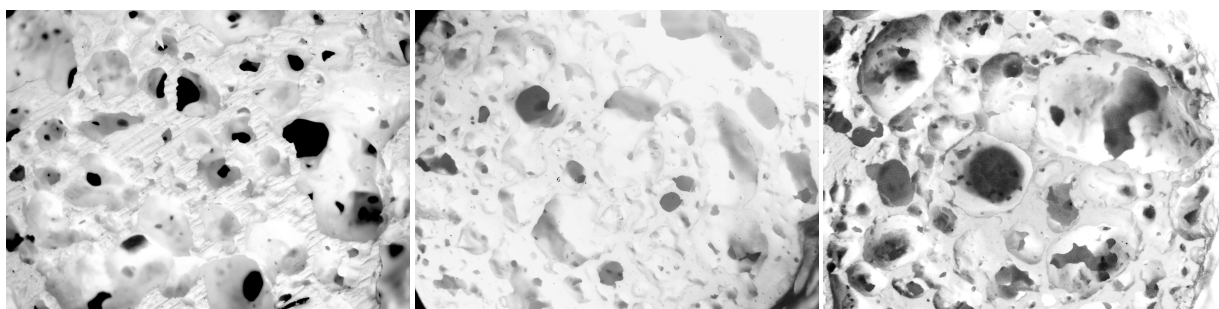


Figura 5.7. Dettagli macrostrutturali allo stereomicroscopio delle schiume dopo ceramizzazione, rispettivamente da sinistra: SrMg75HT, SrMg67HT, SrMg100HT.

L'analisi al Microscopio a Scansione Elettronica (*FEI Quanta 200 ESEM, Eindhoven, Paesi Bassi*) permette di visualizzare la struttura a livello micrometrico, per verificare in particolare la presenza di microporosità strutturali, la cristallinità, eventuali comportamenti anomali della composizione specifica e se vi è la presenza di micro-cricche in superficie e tra una porosità e l'altra dopo che è stato effettuato il trattamento termico.

Le *Figure 5.8, 5.9, 5.10, 5.11*, confrontano i risultati ottenuti con le diverse formulazione sintetizzate.

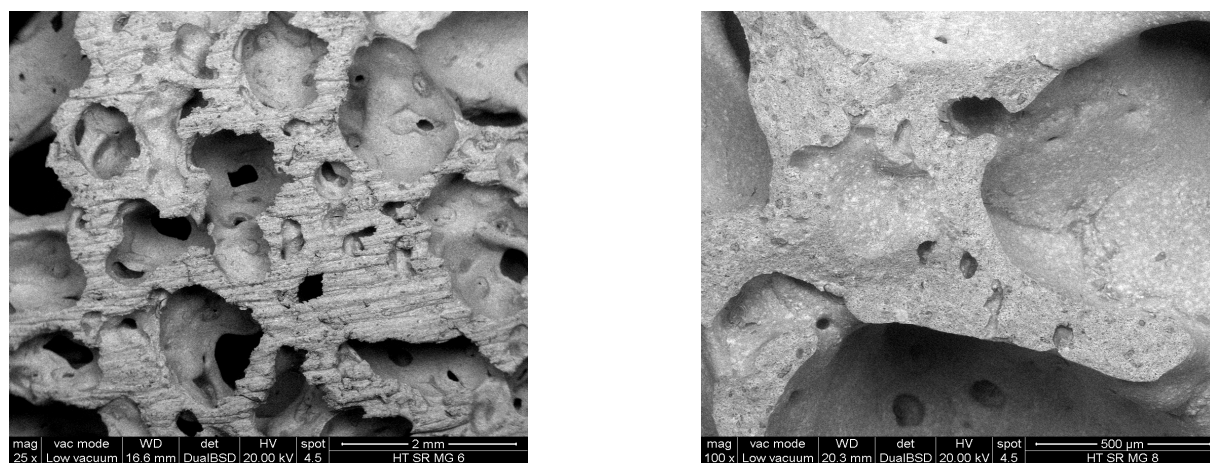


Figura 5.8. Immagini SEM della schiuma cellulare SrMg75HT.

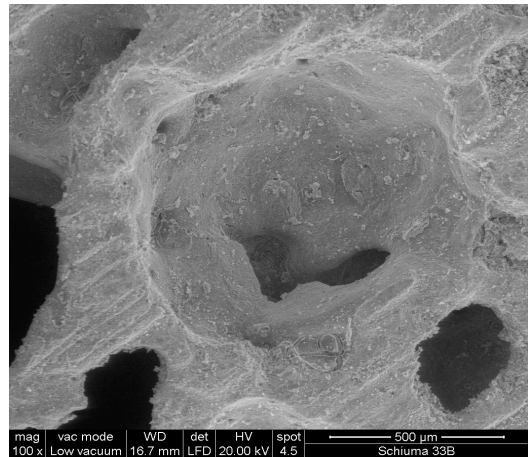
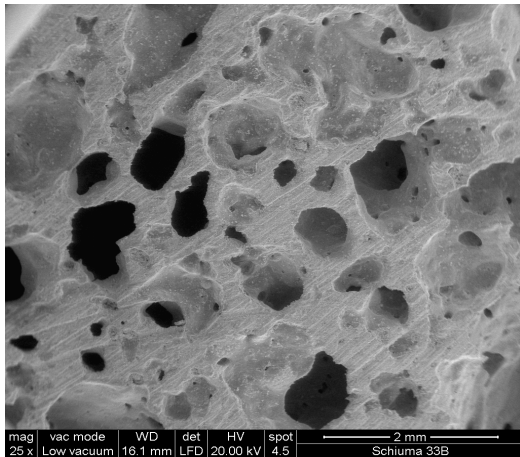


Figura 5.9. Immagini SEM della schiuma cellulare SrMg67HT.

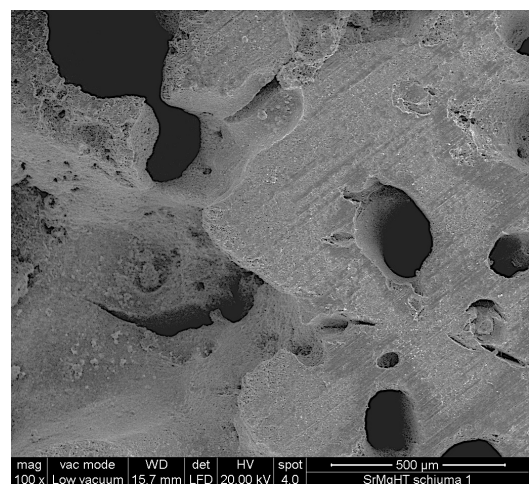
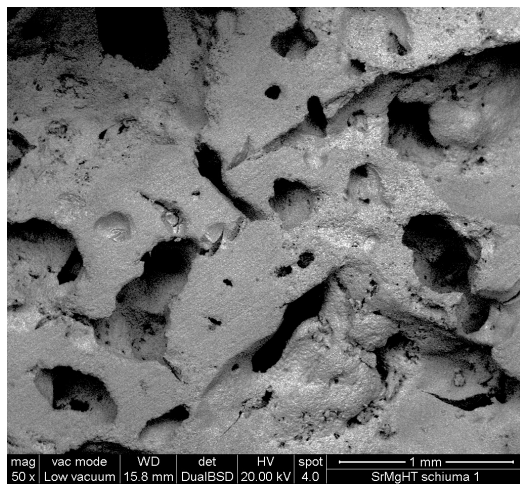


Figura 5.10. Immagini SEM della schiuma cellulare SrMg100HT.

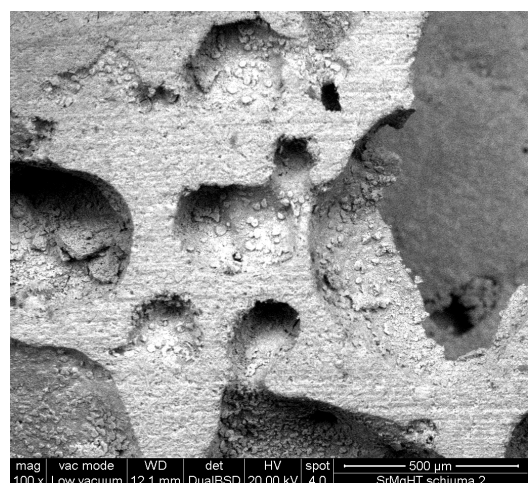
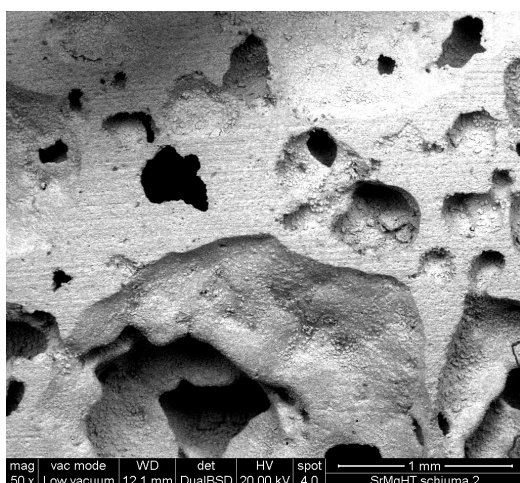


Figura 5.11. Immagini SEM della schiuma cellulare SrMg100HT 30% vetro.

Le schiume risultano visivamente molto simili, possono dunque essere tratte le stesse considerazioni per tutte e quattro le formulazioni adottate. Non è presente una significativa struttura microporosa (pori di diametro < 2 nm) e/o mesoporosa (2 nm $<$ diametro pori < 50 nm). La porosità è aperta ed interconnessa, con dimensione dei pori principali ~ 100 μ m e la morfologia dei campioni prodotti rispecchia le richieste di idealità di uno *scaffold* per applicazioni di biorigenerazione.

Si nota una notevole disomogeneità nelle dimensioni della porosità; il rilascio esplosivo d'acqua infatti non permette una facile gestione dei *filler* attivi per lo schiumaggio.

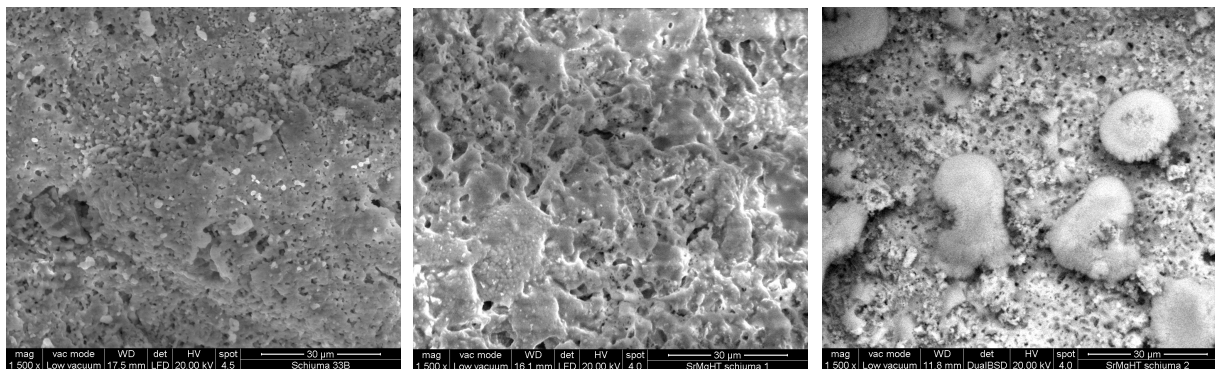


Figura 5.12. Immagini SEM ad elevato ingrandimento delle schiume per evidenziare la porosità $0.1 \mu\text{m} < d < 10 \mu\text{m}$, rispettivamente da sinistra: SrMg67HT, SrMg100HT, SrMg100HT 30% vetro.

È presente una parziale porosità dell'ordine del micron ($0.1 \mu\text{m} < d < 10 \mu\text{m}$; Figura 5.12) dovuta non solo allo schiumaggio dei *fillers* preposti ma anche all'evoluzione dei gas nelle trasformazioni del polimero preceramico e di CaCO_3 ; essa viene mantenuta grazie alla contemporanea reticolazione durante il trattamento termico di pirolisi.

Va sottolineato che tale porosità, pur abbassando la resistenza meccanica, risulta essere fondamentale nel campo dei materiali bioattivi; infatti pori di dimensione micrometrica favoriscono l'adesione cellulare, l'assorbimento di metaboliti e velocità più controllate per il rilascio dei prodotti di dissoluzione ionica.

5.5 Misura delle proprietà fisiche e meccaniche

5.5.1 Densità e porosità

La densità *bulk* è stata determinata misurando il volume occupato dalla schiuma con un calibro digitale e la sua massa tramite una bilancia analitica. Le misure per la densità apparente sono state effettuate su varie schiume con l'ausilio di un picnometro a elio (*AccuPyc 1330*, *Micromeritics*, *Norcross, GA*);

- La densità di bulk (ρ_{Bulk}) è la densità calcolata sul volume totale occupato dalla schiuma.
- La densità apparente (ρ_{App}) è calcolata considerando il volume occupato dal materiale di cui è costituito la schiuma, escludendo la porosità aperta.

Da questi dati è possibile verificare anche il valore della porosità aperta (P_A) secondo la formula: $P_A = \frac{(\rho_{\text{App}} - \rho_{\text{Bulk}})}{\rho_{\text{App}}} \cdot 100$

Tutti questi valori misurati e calcolati sono riportati a seguire, dove ciascun dato rappresenta il valore medio tra tutti i campioni analizzati (*Tabella 5.3*).

Tabella 5.3. Le proprietà fisiche delle formulazioni dopo schiumatura e trattamento termico.

Formulazione schiuma	Densità Bulk [g/cm ³]	Densità apparente [g/cm ³]	Porosità aperta [%]
SrMg75HT	0,60 ± 0,02	3,42 ± 0,06	82,35 ± 0,9
SrMg67HT	0,65 ± 0,12	3,40 ± 0,08	83,06 ± 1,9
SrMg100HT	0,59 ± 0,05	3,45 ± 0,03	83,05 ± 1,72
SrMg100HT 30% vetro	0,86 ± 0,06	3,07 ± 0,05	71,91 ± 1,30

Si possono trarre alcune considerazioni:

- Per tutte le soluzioni i valori di densità apparente sono più alti di quelli di bulk in quanto il volume su cui è calcolata è minore poiché esclude lo spazio occupato dalla porosità.
- Osservando invece la porosità in percentuale, si nota come per quasi tutte le soluzioni si raggiunge la porosità suggerita dell'80 % per *scaffolds* applicabili alla biorigenerazione dei tessuti ossei; i campioni con il *filler* di vetro presenta invece densità bulk più elevata e una porosità minore rispetto alle altre tre soluzioni che hanno invece valori pressoché identici. Questo è sicuramente dovuto al fatto che l'introduzione di un *filler* denso come lo è la polvere di vetro comporti una pasta di partenza già di per sé più densa; questo potrebbe bastare a spiegare la maggior densità di bulk. Inoltre essendoci una minore quantità di agente schiumante rispetto alla soluzione senza vetro è ragionevole che la porosità raggiunta sia minore, il 30% di *filler* vetroso in questo caso ha compromesso la corretta formazione della schiuma e andrebbero quindi eseguiti ulteriori test con una minore quantità.

- La densità apparente è stranamente in linea con i 3.4 g/cm³ della Hardystonite pura probabilmente per la presenza dello ione Sr più pesante nel sito A ottaedrico al posto del Ca.

5.5.2 Resistenza Meccanica

Per la valutazione delle caratteristiche meccaniche dei campioni realizzati, essi sono stati parificati fino ad ottenere un'altezza di 7÷8 mm (*Figura 5.6*); si è utilizzato una macchina modello *Instron 1121 UTM (Instron, Danvers, MA)* per prove di compressione/trazione. Si tratta di una macchina dotata di una cella di carico da 10000 N, e nella configurazione per la prova di compressione la macchina si equipaggia con due piatti di acciaio, uno semovibile e l'altro fisso dove si dispone il campione.

Misurata l'area della superficie su cui è applicato il carico (A), si coprono le facce dei campioni con un parafilm per evitare a schegge pericolose di uscire durante la prova e si poggiano sul piatto della macchina, infine si effettua la prova ad una velocità di discesa di 0.5 mm/min.

La macchina fornisce i valori di forza (F) e corsa, con le quali è possibile risalire allo sforzo di compressione (σ_{comp}) a cui vengono sottoposti i provini: $\sigma_{comp} = F/A$ [N/mm²].

Le schiume sono materiali con porosità quasi totalmente aperta o in parte anche chiusa a bassa densità, tuttavia la loro resistenza meccanica è influenzata e limitata dalla loro struttura e distribuzione dei pori difficilmente controllabile e riproducibile. In genere con questi solidi si registrano proprietà meccaniche significativamente inferiori rispetto ai corrispondenti materiali compatti. Si verificano infatti spesso instabilità strutturali, inomogeneità e locali concentrazioni di sforzi; le proprietà delle schiume quindi non possono essere considerate solo in relazione al materiale di cui sono fatte ma soprattutto in relazione alla struttura.

Quindi le schiume sono solidi a porosità prevalentemente aperta e generalmente si considerano solidi *bending dominated* che per deformarsi flettono le pareti di cella; Gibson e Ashby hanno mostrato che le proprietà meccaniche, più precisamente la resistenza a compressione, dei solidi di questo tipo dipendono dalla densità relativa secondo:

$$\frac{\sigma_{Schiuma}}{\sigma_{Flexural}} = 0,2 \cdot \left(\frac{\rho_{Bulk}}{\rho_{App}} \right)^{3/2}$$

Il rapporto delle densità nella formula non è altro che la densità relativa misurabile anche come:
 $\rho_{rel} = 1 - porosità$.

In questo modo è possibile stabilire un indice di resistenza a flessione del campione pesato sulla quantità di porosità presenta che permetta di confrontare schiume con diverse morfologie dando maggior importanza al materiale di cui sono costituite. Non è facile confrontare direttamente strutture altamente porose con diverse geometrie e diversa porosità in %. La morfologia della porosità, la dimensione media dei pori, la presenza di microcricche etc. influenzano i risultati della prova a compressione.

Vengono riportati in *Tabella 5.4* i valori medi ottenuti dalla prova a compressione per ciascuna composizione, insieme alla stima dei valori calcolati di resistenza a flessione.

Tabella 5.4. Le proprietà fisiche e meccaniche delle formulazioni dopo schiumatura e trattamento termico.

Formulazione	Porosità Aperta media	Densità Relativa	Resistenza a Compressione σ_{comp}, [MPa]	Resistenza Flessione σ_{comp}, [MPa]
SrMg75HT	82,35	0,18	1,48 ± 0,20	94,90 ± 7,19
SrMg67HT	83,06	0,17	1,18 ± 0,64	66,19 ± 11,26
SrMg100HT	83,05	0,17	0,95 ± 0,28	54,94 ± 36,01
SrMg100HT 30% vetro	71,91	0,28	1,07 ± 0,32	35,66 ± 9,06
100HT	77,5	0,23	~ 1,99	~ 90,2
Sr100HT	78,0	0,22	~ 2,16	~ 104,2
75HT []	67,2	0,32	4,0 ± 0,6	~ 110,5
Sr-HT-Gahnite	85	0,15	~4,1	~ 352,8

La resistenza a compressione varia moltissimo da campione a campione anche della stessa soluzione; la deviazione standard dai valori medi infatti è decisamente elevata, occorre quindi ottimizzare la riproducibilità e il processo ed effettuare in futuro ulteriori prove. La morfologia delle bolle, la loro dimensione media, la presenza di microcricche etc. influenzano i risultati della prova a compressione. La natura stessa di questi materiali ceramici, governati dalla teoria della frattura in campo elastico, fa sì che la presenza di cavità non uniformi sia luogo di concentrazioni delle tensioni durante la prova abbassando la resistenza dei campioni.

Dalla *Tabella 5.4* si possono comunque trarre alcune conclusioni:

- Le soluzioni senza vetro presentano all'incirca la stessa percentuale di porosità, tuttavia la resistenza alla compressione è tendenzialmente maggiore per le soluzioni contenenti boro, la colemanite in questo caso si rivela essere un *filler* schiumante più performante dal punto di vista meccanico.
- I valori ottenuti, specialmente corretti in base alla densità relativa, sono in linea con gli altri bioceramici silicatici ma ancora non del tutto soddisfacenti. Tuttavia un confronto diretto con le altre schiume hardystonitiche riportate in letteratura non è significativo vista la differenza sostanziale di morfologia e porosità totale anche tra schiume della stessa composizione. Sr-HT-gahnite è in elenco in quanto unico bioceramico hardystonitico pronto per essere introdotto nel mercato come prodotto commerciale.

Sono state quindi prodotte schiume cellulari con una grande quantità di porosità interconnessa ma con resistenza meccanica non del tutto compatibile con l'applicazione come schiume cellulari per la rigenerazione ossea; esso possono quindi resistere a sforzi sotto carico lievi.

5.6 Stampa Robocasting di scaffolds 3D

Proseguendo nella realizzazione di solidi cellulari, la seconda parte di questo capitolo sperimentale prevede la realizzazione dell'obiettivo principale dello studio ovvero la verifica della formabilità delle varie soluzioni di polimero preceramico e *fillers* tramite stampa 3D diretta.

A fronte dei risultati ottenuti con le schiume ceramiche prodotte viene applicata alle stesse formulazioni la tecnologia di *Additive Manufacturing Robocasting/DIW* per stampare *scaffolds* 3D. Gli scopi sono ottenere strutture cellulari altamente porose ed omogenee, risolvendo i difetti di morfologia riscontrati nelle schiume, e dimostrare come il processo PDCs sia applicabile ad una varietà di metodi di formatura mutuati dalle tecniche di formatura delle materie plastiche. La tecnologia PDCs per ottenere silicati da polimeri preceramici e *fillers* offre una valida alternativa anche nell'ambito dell'*Additive Manufacturing*. Il notevole vantaggio del PDCs, come già spiegato al §2.3.1, nasce soprattutto dalla relativamente semplice trasformazione dei precursori polimerici, che permette ai componenti di essere fabbricati utilizzando tecnologie adatte per i polimeri e per la produzione di materie plastiche.

La stampa 3D di materiali ceramici è ottenuta tramite diverse tecnologie che stanno ottenendo crescente interesse nella ricerca scientifica, in quanto sono in pieno sviluppo e continuo miglioramento. Nonostante le tecniche siano differenti l'una dall'altra, il principio di base per ottenere il prodotto finale è identico per tutte le tecniche di *Additive Manufacturing*.

A partire da un modello virtuale 3D e dal materiale in forma di polveri (powder) oppure paste (ink), si ottiene il campione desiderato per formatura diretta tramite l'aggiunta di materiale per strati sovrapposti e successivi, seguendo la geometria proposta dal modello 3D.

Questo concetto è esattamente l'opposto rispetto alla tecnologia sottrattiva, come ad esempio la tornitura.

La manifattura di ceramici è stata adoperata per fabbricare strutture porose con buona parte di queste tecniche di stampa 3D, presentate al §4.2.1, applicate con successo in diversi campi, come per esempio scaffolds per applicazioni biomediche, filtri o strutture leggere reticolari. Principalmente il successo della stampa in questa produzione è dovuto alla sua potenzialità di ottenere buone proprietà meccaniche grazie anche alla minimizzazione della porosità strutturale; garantire comunque di realizzare geometrie tridimensionali che abbiano porosità (tra un layer e l'altro), oppure programmare la presenza di una certa quantità di porosità residua nella parte solida ceramica dello *scaffold*, proprio per soddisfare i requisiti biomedicali.

Per tutte queste categorie la dimensione del filamento prevista è di 800 μm (0,8 mm), in quanto per la tipologia di inchiostro realizzato in questo studio, risulta difficile realizzare stampe con diametro minore, sia per la dimensione delle polveri di partenza sia per la facile formazione di agglomerati durante la formatura dell'inchiostro.

Una volta disegnata la geometria tramite i programmi di modellazione e convertito il disegno in un linguaggio comprensibile alla stampante 3D, essa calcola il percorso più efficiente da fare per ottenere il risultato migliore in particolare: il percorso che l'ugello dovrà effettuare, l'altezza di ogni *layers*. La velocità e il flusso di materiale vanno invece modificati manualmente in base alla reologia dell'inchiostro.

Per quanto riguarda il susseguirsi del presente lavoro di tesi verrà presa in considerazione la geometria già ottimizzata per la realizzazione di *scaffolds* con filamento e porosità da 800 μm .

5.6.1 Preparazione dell'inchiostro di stampa

Nel §2.3.1.1 si è visto come la miscela di partenza per la stampa Robocasting, chiamata "inchiostro" o "ink", deve sottostare a specifiche condizioni reologiche e deve essere ottimizzata in termini di composizione e omogeneità, per poter essere estrusa con successo e per assicurare la completa reazione dei precursori dopo conversione ceramica.

Per produrre *scaffolds* con filamenti sospesi e appoggiati gli uni sugli altri dunque, le proprietà reologiche devono essere controllate e i quantitativi delle materie prime devono essere tali da fornire una corretta viscosità all'impasto: né troppo bassa da non poter garantire il mantenimento della forma durante l'estrusione e la deposizione del filamento; né eccessivamente alta da non permettere alla pressione esercitata dall'aria di spingere il materiale verso l'ugello, nemmeno con l'aiuto dell'estrusore a vite.

Per la realizzazione dell'inchiostro è stato utilizzato il polimero preceramico polisilossanico MK, disponibile in commercio in forma di polvere, (*Wacker-Chemie GmbH, Monaco di Baviera, Germania*), è stato considerato come fonte di silice e legante reattivo della miscela con una resa ceramica del 84 % in peso.

Come già detto in precedenza per le pastiglie al §3.2.1, MK è più reattivo rispetto al silicone in forma liquida H62C (resa ceramica del 58 %) e presenta una ridotta evoluzione in fumi durante la pirolisi riducendo quindi il ritiro volumetrico, la perdita di peso e la formazione di micro e macro porosità. Inoltre l'MK si presenta in forma di polvere potendo variare la viscosità dell'inchiostro in un vasto *range* solamente dissolvendo il preceramico nella quantità desiderata del solvente opportuno.

In secondo luogo vanno accuratamente selezionati i *fillers* reattivi in gioco, qui vengono elencati tutti quelli utilizzati per le diverse composizioni:

- CaCO_3 (< 10 μm , Industrie Bitossi, Vinci, Italia);
- ZnO (< 1.48 μm , Sigma Aldrich, Germania);
- Colemanite calcinata anidra $\text{Ca}_2\text{B}_6\text{O}_{11}$ (< 1 μm , fornita da CIRCe, Università degli Studi di Padova, Padova) come fonte di Boro, (vedi paragrafo);
- MgO (polvere nanometrica);
- SrCO_3 (polvere micrometrica).
- Vetro (polvere micrometrica) come *filler* densificante per la soluzione SrMg100HT (§4.3.1).
- Silica fume, SiO_2 (*Aerosil R106, Evonik, Germania*; 3.55 wt% della resa ceramica totale), utilizzata allo scopo di modificare il comportamento reologico dell'inchiostro, svolge dunque il ruolo di addensante e di agente tixotropico in solventi a basso peso molecolare.

È stata tentato anche un primo approccio che non prevedesse l'introduzione di silica fume ma con scarsi risultati, l'inchiostro non presentava in nessun modo una viscosità tale da poter essere stampato e tale opzione è stata velocemente scartata. Tutte le materie prime utilizzate sono in forma di polvere, e questo richiede l'intervento di un solvente a leggero carattere polare come può essere l'isopropanolo $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}$. Quindi le variabili su cui poter effettuare delle modifiche per modulare le proprietà reologiche dell'inchiostro sono: la quantità di isopropanolo e la quantità di Silica fume. Si può partire dagli studi effettuati da A. Zocca e al. come spunto sulle quantità ottimali per la realizzazione dell'inchiostro dalla viscosità più adatta alla stampa *Robocasting*. La quantità di Silica fume appropriata per il raggiungimento di una reologia adeguata è il 10 % in peso, calcolata come quantità di (Silica fume)/(silice totale); dove la silice totale è quella fornita dal polimero preceramico con una resa ceramica 84% più la Silica fume con una resa in silice del 100%.

L'isopropanolo ottimale in miscela dovrebbe essere pari al 27 vol%; dove il volume totale è calcolato considerando il quantitativo in grammi e la densità di tutte le polveri in gioco (polimero preceramico e *fillers*).

La procedura dettagliata per l'ottenimento dell'inchiostro è la seguente:

- Disciogliere l'MK nella giusta quantità di isopropanolo all'interno di una giara (primo tentativo 27 %vol) e miscelarlo con la polvere di silice fume mediante un mulino a sfere (*Pulverisette 7 planetary ball mill, Fritsch, Idar-Oberstein, Germania*) per 60 min a 100 rpm. La soluzione che si ottiene deve essere limpida, senza la presenza di agglomerati e grumi, indice dell'ottima solubilità del silicone nel solvente scelto; una volta raggiunta questa condizione si può procedere con gli steps successivi.
- Aggiungere le polveri dei *fillers* opportuni dentro la giara uno alla volta inglobando con l'ausilio di una spatola per una migliore interazione con la miscela. Mescolare utilizzando il mulino a sfere per 6 ore a 350 rpm con opportune pause, per rompere gli aggregati di polvere ed ottenere una migliore omogeneità dell'inchiostro con lo scopo di avere un flusso continuo attraverso l'ugello durante la stampa 3D.
- Rimuovere la pasta dalla giara ed inserirla nella siringa utilizzata per la stampa (§5.5.2).

L'ottenimento della miscela è stato inizialmente testato per la soluzione SrMg75HT con queste quantità indicative:

- Alcool isopropilico → 27 vol. %
- Silice fume → 10% in peso.
- MK → 90% in peso rispetto al quantitativo utilizzato per le pastiglie.

Tuttavia l'inchiostro non è risultato della giusta consistenza, dopo l'aggiunta dei *fillers* e la successiva miscelazione, si presentava poco omogeneo con troppi agglomerati e non fluido a sufficienza da poter essere filato durante la stampa 3D. La quantità di cariche aggiunte e la dimensione delle particelle produce delle variazioni nel comportamento reologico e sulla viscosità tanto da dare problemi durante il processo di miscelazione e omogeneizzazione di polimero e *fillers*; La polvere di colemanite in particolare ha dimensione media < 1 µm e sembra essere la responsabile della modifica della reologia dell'inchiostro.

Si è optato quindi per un quantitativo maggiore di isopropanolo, in particolare con la seguente nuova formulazione è stato ottenuto un inchiostro adeguato per la stampa:

- Alcool isopropilico → 28 vol. %
- Silice fume → 10% in peso.
- MK → 90% in peso rispetto al quantitativo utilizzato per le pastiglie.



Figura 5.13. Inchiostro miscelato all'interno della giara pronto per essere stampato.

Tale formulazione è risultata idonea per tutte e tre le diverse formulazioni adottate; inoltre sono confermate le considerazioni tratte da A. Zocca e al. su come una minima variazione di quantità del solvente, al massimo 0,3 g comporti notevoli variazioni nella qualità dell'inchiostro per la stampa.

Sono stati realizzati *scaffolds* di tre composizioni differenti partendo da 50g di inchiostro ciascuno seguendo i modelli CAD 3D elaborati presso i laboratori dell'università di Padova; gli *scaffolds* prodotti sono caratterizzati da un filamento di circa 0,8 mm e da geometria cubica con pori ortogonali di due differenti dimensioni: 0,8 mm e 1,6 mm. Le composizioni finali vengono tabellate nella *Tabella 5.5*.

Tabella 5.5. Le composizioni d'interesse degli inchiostri utilizzati nella stampa Robocasting, per ottenere 50 g di resa ceramica dopo il trattamento termico.

Formulazioni	SrMg75HT	SrMg67HT	SrMg100HT 30%vetro
Isopropanolo [g]	8,8	8,8	7,8
Mk [g]	17,8	17,1	11,17
Silica fume [g]	1,66	1,6	0,57
Colemanite* [g]	19,55	5,61	-
CaCO ₃ [g]	14,03	18,78	4,98
SrCO ₃ [g]	4,23	14,09	2,47
ZnO [g]	8,19	7,38	1,29
MgO [g]	0,72	0,64	0,18
Vetro** [g]	-	-	15

* colemanite anidra (Ca₂B₆O₁₁), MW = 321,01 g/mol; ** Vetro di composizione SrMg100HT (§4.3.1)

5.6.2 Stampa Robocasting e ceramizzazione

Una volta realizzato l'inchiostro della giusta viscosità, verificata dal mantenimento della forma del filamento con una stampa a mano, è possibile proseguire con la stampa tramite deposizione del filamento secondo la geometria realizzata e opportunamente convertita in un codice interpretabile dalla stampante. Prima di tutto va attrezzata la macchina da utilizzare, ovvero la Delta 20×40 (*Wasp, Massa Lombarda, Italia*), una stampante 3D adatta alle lavorazioni di materiali polimerici, ma anche di materiali ceramici come l'argilla e la porcellana. Pur non essendo una stampante propriamente adatta all'*Additive Manufacturing* di biomateriali realizzati da preceramici e *fillers*, la caratteristica del materiale e la sua capacità a prestarsi a questo tipo di formabilità ne permettono comunque l'utilizzo.

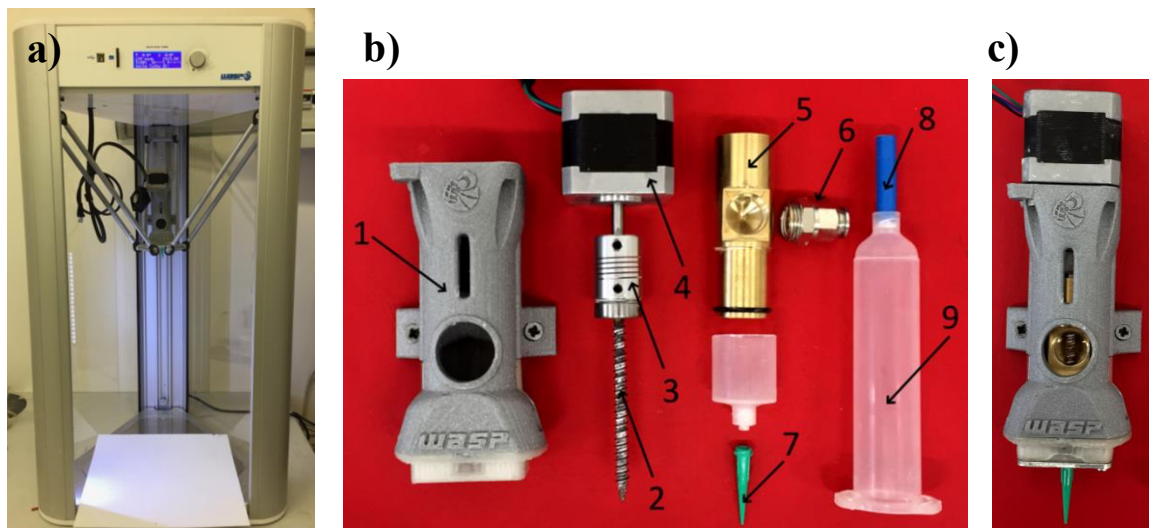


Figura 5.14. a) Delta 20x40 (*Wasp, Massa Lombarda, Italia*); b) componenti della stampante e c) componenti assemblati.

In *Figura 5.14b*, sono presenti tutti i componenti necessari per il corretto funzionamento della stampante (*Figura 5.14a*), e il loro assemblaggio (*Figura 5.14c*) e inserimento all'interno della copertura in ABS dell'estrusore (1).

Viene presentato un breve elenco delle componenti:

- Sistema motore (4) – accoppiatore (3) – vite (2): Permettono un flusso ottimale di inchiostro da estrarre in prossimità dell'ugello; tale flusso viene deciso e impostato dall'operatore tramite l'apposito display (*Figura 5.14a*) con cui è possibile controllare tutti i parametri della macchina e ottimizzare il processo in base alle caratteristiche del filamento.

- Componente in ottone (5): permette alla vite di lavorare correttamente a contatto con il materiale e tramite il raccordo (6) e il tubo da 0,8 mm (8) viene collegato con una siringa che funge da serbatoio per l'inchiostro; è sufficiente per contenerne circa 60 g, ovvero il contenuto di una giara. La siringa, collegata all'aria compressa, permette al materiale di fluire verso l'estrusore.
- Ugello conico (EFD, Westlake, Ohio) (7), dal diametro di 0,8 mm, per poter estrarre un filamento dal diametro finale compreso tra $800 \div 900 \mu\text{m}$.

Per prima cosa va impostata la corretta altezza di stampa affinché l'ugello raggiunga la giusta posizione per depositare correttamente il primo *layer* e di conseguenza tutti gli altri; quindi dopo aver selezionato il modello da riprodurre è possibile eseguire la stampa degli *scaffolds*, come si può osservare dalla sequenza di immagini della *Figura 5.15*.

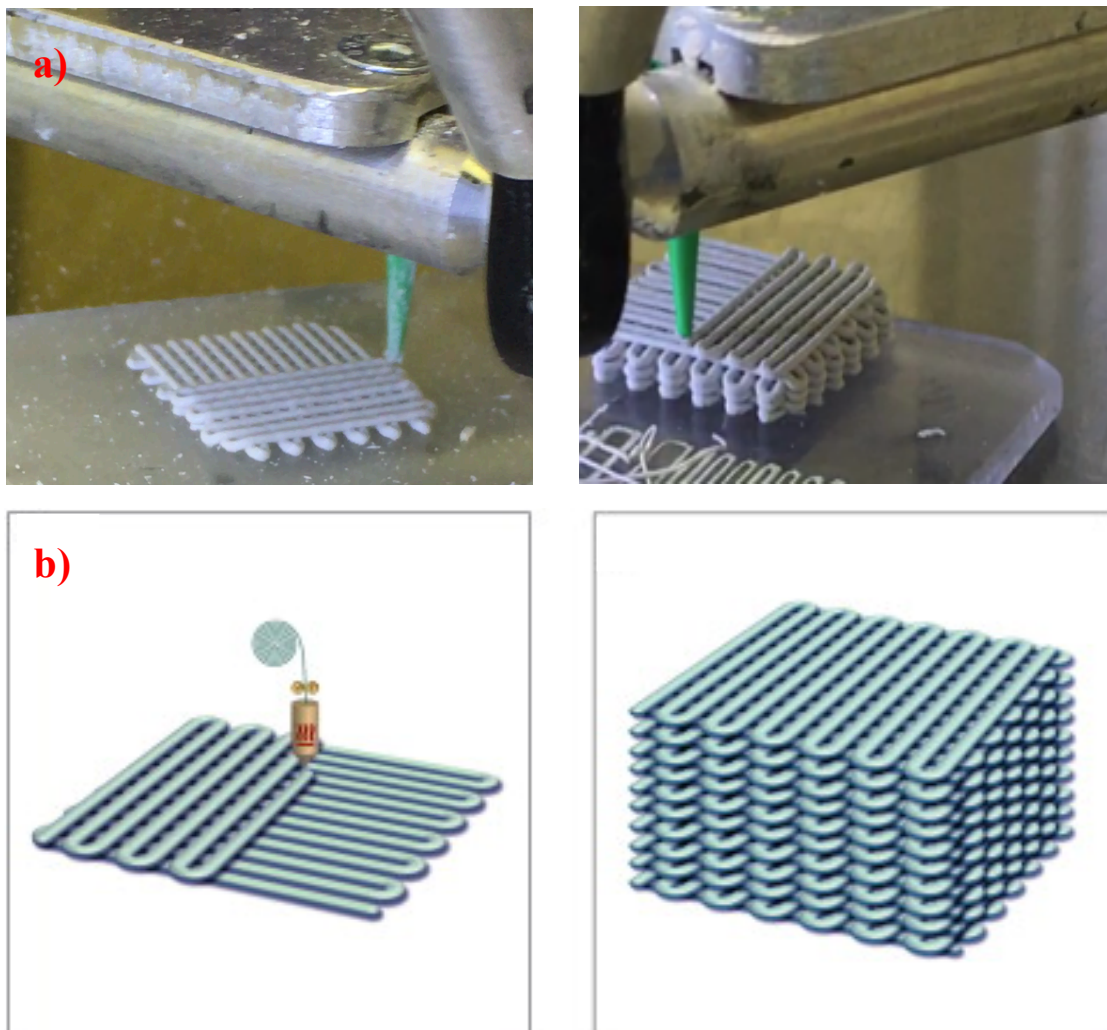


Figura 5.15. Sequenza di realizzazione della stampa degli *scaffolds*: a) $\phi = 800 \mu\text{m}$; porosità 0,8 mm; b) Schematizzazione processo.

Una volta terminata la stampa *Robocasting* degli *scaffolds* con un quantitativo di inchiostro di circa 50 g è necessario lasciarli all'aria per far evaporare l'alcool isopropilico ancora presente. Terminato questo periodo, di qualche giorno si può effettuare il trattamento termico per la conversione da polimero preceramico e *fillers* a ceramico silicatico.

Quest'ultimo step necessario per la ceramizzazione è avvenuto secondo il trattamento termico studiato nei precedenti capitoli (§3.5 e §4.5) appositamente per il trattamento degli *scaffolds*, che si può sintetizzare in questi passaggi:

- Rampa di riscaldamento a 0,3 °C/min fino a 590 °C;
- 3 h di mantenimento a 500 °C;
- Rampa di riscaldamento a 0,3 °C/min fino a 880 °C;
- 2 h di mantenimento a 880 °C;
- Rampa di riscaldamento a 0,3 °C/min fino a 950/1100 °C;
- 1 h di mantenimento a 950 (soluzioni con boro) o 1100 °C (soluzioni senza boro);
- Rampa di raffreddamento a 2 °C/min fino a temperatura ambiente.

La temperatura di ceramizzazione per i composti con boro è di 950 °C mentre per la soluzione senza boro è di 1100°C con gli stessi *steps* di mantenimento come già discusso nel §4.5; i relativi trattamenti schematizzati sono mostrati in *Figura 5.16*.

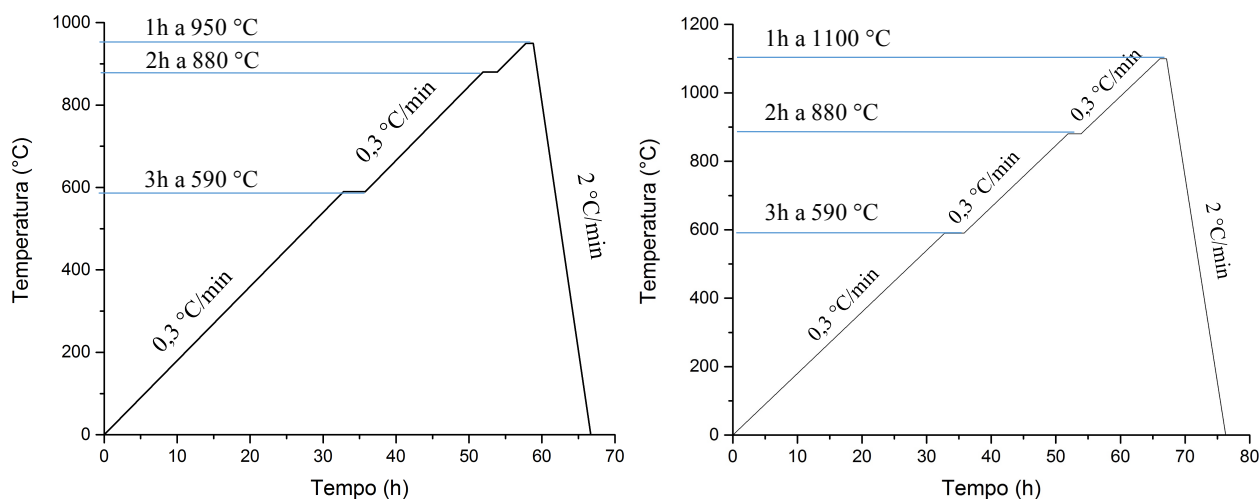


Figura 5.16. Diagramma del trattamento termico di conversione ceramica ottimale per gli *scaffolds* con boro (sinistra) e senza boro (destra).

Né cricche né difetti apprezzabili sono stati osservati nei campioni appena stampati, e l'adesione tra i filamenti come anche la morfologia generale risultavano ottimali confermando che le proprietà reologiche dell'inchiostro erano adatte per la stampa di tali geometrie.

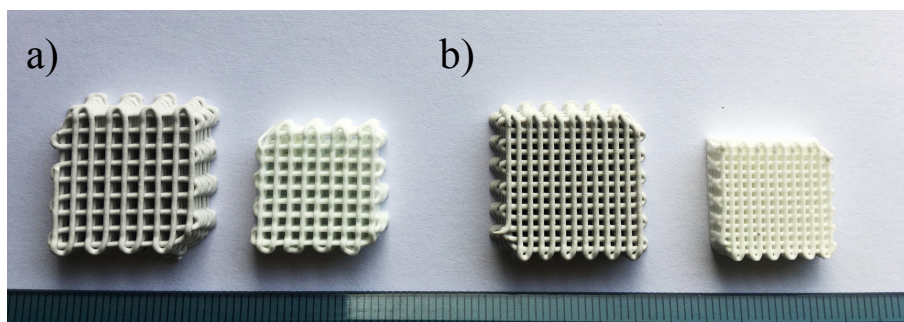


Figura 5.17. Confronto tra scaffolds prima e dopo ceramizzazione; con porosità da a) 1,6 mm e b) 0,8 mm.

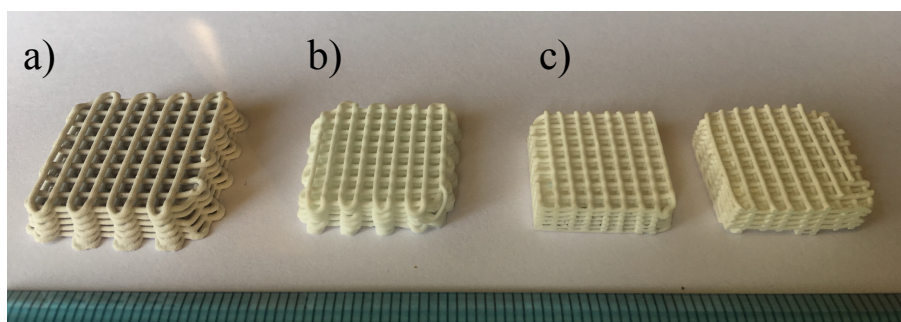


Figura 5.18. Scaffolds con porosità da 1,6 mm: a) Dopo la stampa, b) dopo ceramizzazione c) coi bordi curvi levigati per la caratterizzazione.

5.7 Discussione dei risultati ottenuti

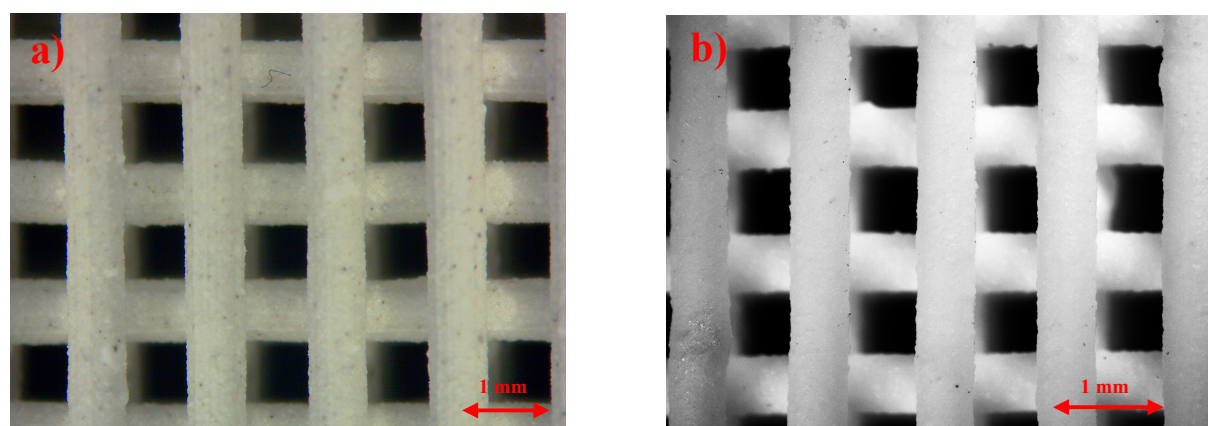


Figura 5.19. Morfologia al microscopio ottico degli scaffolds dopo la stampa (a) e dopo trattamento termico (b).

Mettendo in confronto gli *scaffolds* prima del trattamento termico, quindi ancora in stato polimerico, con quelli ceramizzati, si possono notare subito alcune differenze, grazie anche all'aiuto delle immagini in *Figura 5.19*. In particolare:

- Differenza di colore: Dopo trattamento termico, gli *scaffolds* cambiano colorazione passando da un leggero tenore di grigio ad un bianco, la pirolisi è stata condotta in aria, una atmosfera ossidante, dunque il Carbonio viene interamente ossidato a CO_2 .
- Differenza delle dimensioni: Come è stato riscontrato per le pastiglie, anche per gli *scaffolds* si è verificato un ritiro geometrico piuttosto evidente.
- Differenza della consistenza al tatto e all'udito: lo *scaffold* non ancora ceramizzato è caratterizzato da una scarsa coesione tra i *layers*, e può rompersi facilmente col minimo sforzo. Al contrario una volta trattato già al tatto presenta una buona resistenza e compattezza tra i diversi *layers*, testimoniati anche dal suono emesso se sbattuti, indice di materiali rigidi ben cristallizzati.

5.8 Analisi Ottiche e SEM

Le immagini al microscopio ottico permettono di verificare quanto accennato in precedenza. In particolare nella *Figura 5.20*, si nota grazie alla presenza della scala millimetrica, che dopo ceramizzazione il diametro dei filamenti è diminuito ed è compreso nel range $600 \div 700 \mu\text{m}$. Si può osservare inoltre che la forma si è perfettamente conservata, in particolare per quanto riguarda il rapporto materiale denso/porosità, sia dopo la stampa che dopo trattamento termico.

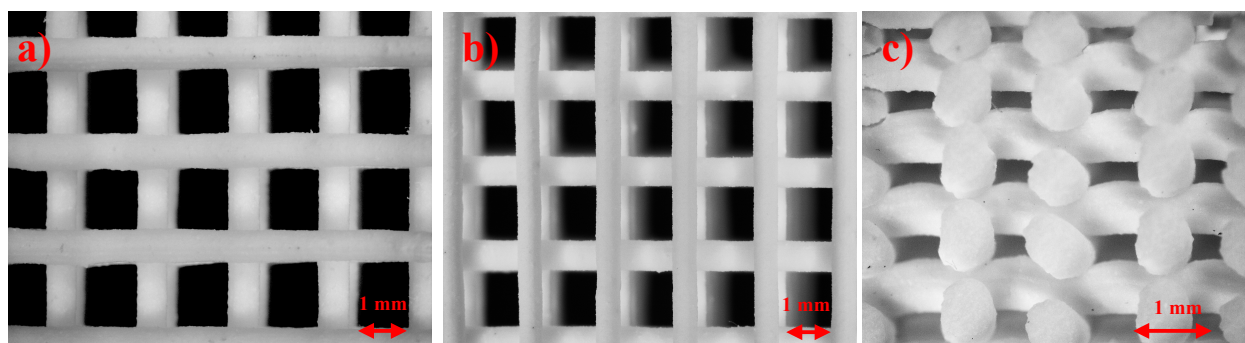


Figura 5.20. Immagini al microscopio ottico della faccia superiore (a, b) e della sezione laterale coi bordi opportunamente levigati (c).

Il mantenimento della forma viene meglio rappresentato anche dalle immagini della *Figura 5.20*, dove si possono notare sia per i *layers* paralleli al foglio, sia per quelli in direzione ortogonale, che non vi è stato alcun cedimento strutturale da portare a un'otturazione delle porosità.

Gli *scaffolds* stampati hanno una geometria porosa che rispecchia perfettamente il modello 3D con deflessioni molto limitate. Si può osservare che la superficie sinterizzata è uniforme e la struttura possiede una regolare dimensione e distribuzione dei pori. I filamenti si sono saldati perfettamente tra loro, non deformandosi né durante la stampa né durante la sinterizzazione. L'assenza di collassi approva la buona stampabilità di queste formulazioni di inchiostro. L'analisi al Microscopio a Scansione Elettronica (*FEI Quanta 200 ESEM, Eindhoven, Paesi Bassi*) permette di visualizzare la struttura a livello micrometrico, per verificare in particolare la presenza di microporosità strutturali, la cristallinità, eventuali agglomerazioni o comportamenti anomali della composizione specifica. Le immagini sono state effettuate per la facciata superiore e per la sezione trasversale dello *scaffold*.

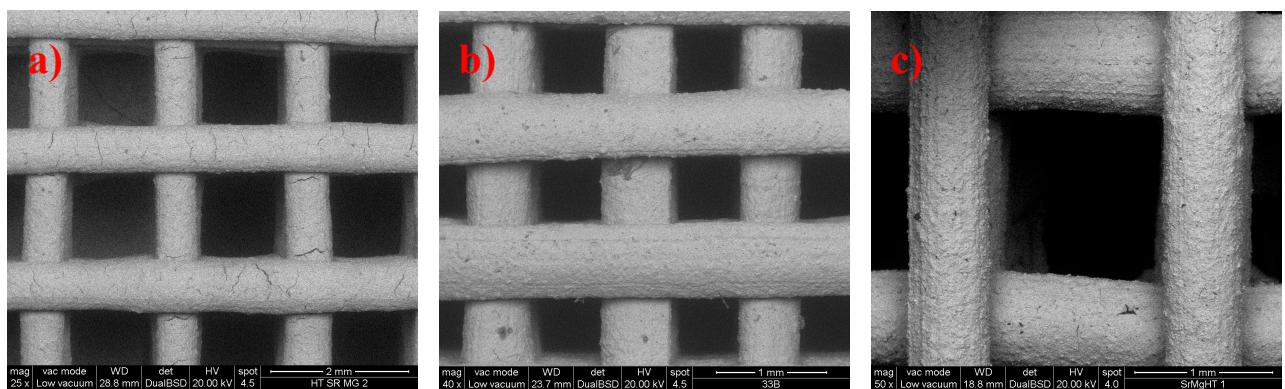


Figura 5.21. Immagini SEM della faccia superiore degli *scaffolds* 3D: a) SrMg75HT, b) SrMg67HT e c) SrMg100HT.

Dalla *Figura 5.21* è possibile trarre alcune considerazioni:

1. È stata mantenuta una forma geometria regolare sia del filamento che della porosità specifica dello *scaffold*; si può apprezzare in tutti e tre i casi la forma quasi perfettamente quadrata mantenuta dalla porosità anche dopo trattamento termico. Questa macroporosità, che in base alla geometria di stampa scelta è quadrata con lato di 0,8 mm o 1,6 mm, nonostante sia di dimensione particolarmente elevata è desiderata. Infatti, come visto nel §5.1.1, in strutture porose per applicazioni in campo biomedicale è necessario che i pori siano di diametro maggiore di 100 - 150 μm per fornire un apporto di sangue al tessuto connettivo cresciuto internamente.
2. La microcricatura è osservabile solamente nei campioni SrMg75HT (*Figura 5.21a*); nelle altre due formulazioni invece non è così evidente; la microcricatura si forma a causa del rilascio di gas e del grande ritiro coinvolto con le trasformazioni di fase che si verificano durante il trattamento termico. Differenti specie gassose sono infatti rilasciate sia durante la trasformazione del polimero preceramico MK, sia dalla decomposizione di CaCO_3 .

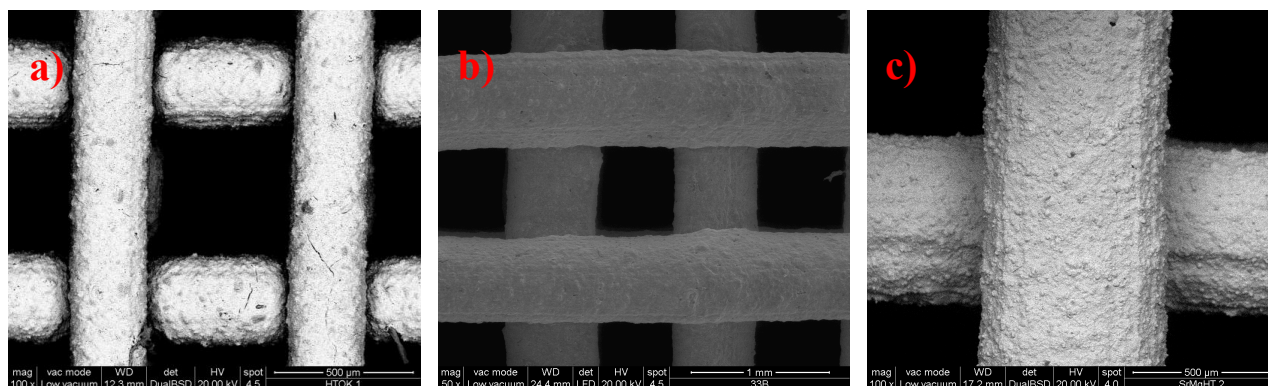


Figura 5.22. Immagini SEM del dettaglio dei filamenti degli scaffolds 3D: a) 75HT [35], b) SrMg67HT e c) SrMg100HT.

La Figura 5.22 mostra le immagini ottenute tramite SEM del filamento di tre diversi scaffolds. Possiamo fare un confronto tra gli scaffolds SrMg67HT e SrMg100HT 30% vetro prodotti in questo lavoro di tesi con lo scaffold 75 mol% HT - 25 mol% OK prodotto presso i laboratori dell'università di Padova in precedenza nonché punto di partenza della presente sperimentazione.

Si nota subito la vistosa diminuzione della microcricatura, segno che le soluzioni adottate hanno portato ad un miglioramento di densificazione e di compattezza dello scaffolds, da quantificare con le prove di compressione.

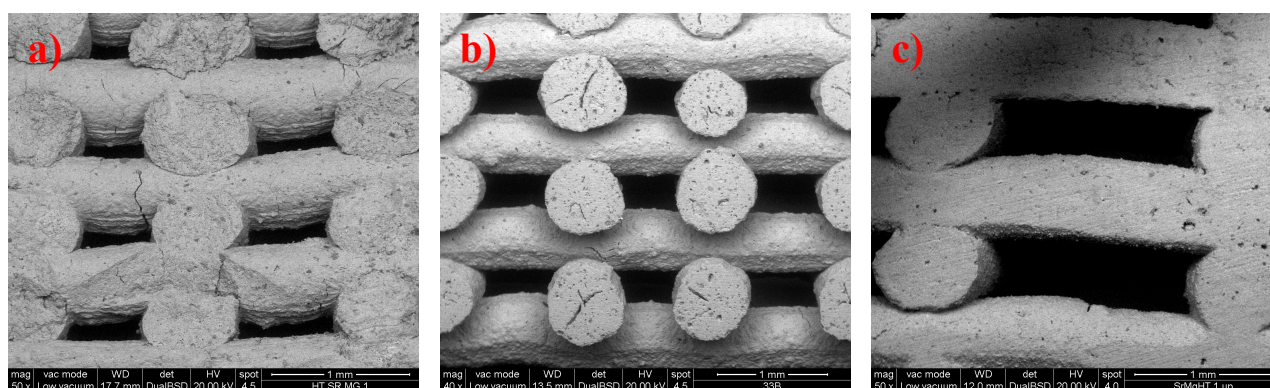


Figura 5.23 Immagini SEM della sezione ortogonale degli scaffolds: a) SrMg75, b) SrMg67HT e c) SrMg100HT.

Una seconda analisi è stata svolta sulla sezione di filamento degli scaffolds opportunamente lavorati in modo da eliminare i bordi curvi e poter vedere la sezione (Figura 5.23).

Come si può notare le microporosità sono poche ma ben distribuite sulla superficie di tutti e tre i campioni.

Tramite il processo PDCs il precursore polimerico MK sviluppa la porosità autonomamente che viene mantenuta grazie alla contemporanea reticolazione durante il trattamento termico di pirolisi. Va notato che tale porosità, pur abbassando la resistenza meccanica dello *scaffold*, risulta essere fondamentale nel campo dei materiali bioattivi; infatti pori di dimensione micrometrica favoriscono l'adesione cellulare, l'assorbimento di metaboliti e velocità più controllate per il rilascio dei prodotti di dissoluzione ionica.

Il campione con il *filler* di vetro sembra essere il più compatto, con minore microporosità; la maggior quantità di fase liquida durante la conversione ceramica occlude parte dei pori più piccoli e lega assieme la matrice cristallina;

Si può inoltre verificare l'interazione nei punti di contatto tra i diversi strati di filamento depositato, caratteristica molto importante per quanto riguarda il miglioramento delle proprietà meccaniche dello *scaffold*.

Infine si può osservare ad un ingrandimento maggiore la presenza dei cristalli (*Figura 5.24*)

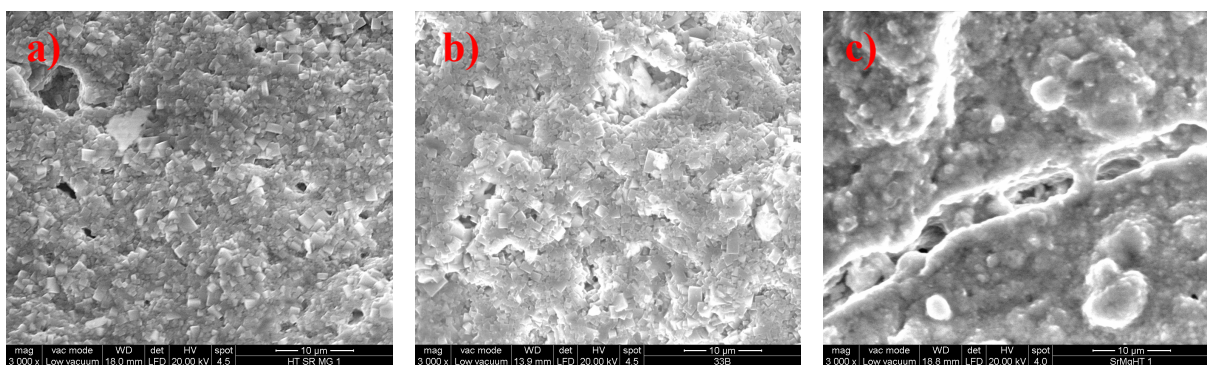


Figura 5.24 Immagini SEM a alti ingrandimenti della microstruttura degli scaffolds:

a) SrMg75, b) SrMg67HT e c) SrMg100HT

Il miglioramento avuto sulla microcricatura dei filamenti è correlato alla presenza della fase liquida/rammollita durante il trattamento; quest'ultima infatti ha portato un incremento di flusso viscoso con effetti positivi sul rilassamento delle sollecitazioni, legate soprattutto alla conversione del polimero preceramico, e sul miglioramento della migrazione degli ioni e del loro impaccamento durante la cristallizzazione.

Gli *Scaffolds* 3D che sono stati prodotti presentano una morfologia compatibile con applicazioni per la rigenerazione ossea. La stampa *Robocasting* è una metodologia precisa e affidabile, e conferma come il processo PDCs sia applicabile ad una varietà di metodi di formatura derivati delle materie plastiche.

5.9 Misura delle proprietà fisiche e meccaniche

5.9.1 Ritiro geometrico

Effettuando le misure di altezza, larghezza e lunghezza con un calibro digitale degli scaffolds prima e dopo trattamento termico è possibile calcolare il ritiro geometrico avvenuto nella conversione da polimero a ceramico. Molti *scaffolds* tuttavia presentavano altezze falsate dovute a problemi di schiacciamento in fase di stampa sulla realizzazione dei primi *layers* o sul danneggiamento degli ultimi sia durante la stampa che in seguito a ceramizzazione; per questo motivo è stato considerato maggiormente significativo confrontare il ritiro senza considerare l'altezza ma solamente sull'area superficiale, calcolata sugli *scaffolds* opportunamente lavorati in modo da eliminare i bordi curvi; come in *Figura 5.18*.

Con buona approssimazione è stata stimata un'area superficiale dello scaffold verde pari a 352 mm² per entrambe le geometrie con porosità di 0,8 mm e di 1,6 mm, con larghezza e lunghezza identiche e pari a 18,76 mm.

Tutti questi valori misurati e calcolati sono riportati a seguire, dove ciascun dato rappresenta il valore medio di tutti i campioni analizzati (*Tabella 5.6*).

Tabella 5.6 Percentuale di ritiro geometrico medio degli scaffolds delle varie composizioni.

<i>Campione</i>	<i>Superficie iniziale</i>	<i>Superficie finale</i>	<i>Ritiro</i>
<i>SrMg75HT</i>	352 mm ²	278 mm ²	21,1 %
<i>SrMg67HT</i>	352 mm ²	262 mm ²	25,4 %
<i>SrMg100HT 30% Vetro</i>	352 mm ²	297 mm ²	15,5 %

I risultati ottenuti rispecchiano quanto visto con le pastiglie:

- Per quanto riguarda gli *scaffolds* con boro è evidente l'effetto dell'aggiunta di questo elemento sulla densificazione, aumentando il suo contenuto aumenta la fase liquida durante sinterizzazione e aumenta quindi la densificazione e il ritiro geometrico conseguente.
- Gli *scaffolds* con polvere di vetro SrMg100HT hanno subito un ritiro minore, probabilmente poiché le caratteristiche dei *fillers* aggiunti portavano ad un inchiostro già maggiormente densificato, come si può ricavare confrontando il volume totale occupato dalle polveri e solvente inseriti nell'inchiostro (*Tabella 5.7*):

Tabella 5.7 Volume di 50 g di inchiostro delle varie composizioni.

Formulazione	SrMg75HT	SrMg67HT	SrMg100HT 30% Vetro
Volume totale inchiostro [g/cm ³]	39,88	40,16	35,34

Il volume riportato si riferisce a quello di 50 grammi di inchiostro ed è calcolato come somma del volume di tutti i componenti introdotti in ciascuna soluzione, secondo le quantità in *Tabella 5.5*. La differenza sostanziale tra le soluzioni è il *filler* incaricato di dare fase fluida durante sinterizzazione; in particolare nei due inchiostri con bore è presente colemanite anidra mentre in quello senza è presente la polvere di vetro; queste due *fillers* hanno rispettivamente densità di 2,42 g/cm³ e di 3,15 g/cm³.

Possiamo notare quindi che l'introduzione di una carica densa come la polvere di vetro comporta un inchiostro di partenza già di per sé più denso; questo potrebbe bastare a spiegare il minor ritiro degli *scaffolds* prodotti dall'inchiostro con tale *filler*.

5.9.2 Densità e porosità

La densità *bulk* è stata determinata misurando il volume occupato dallo *scaffold* con un calibro digitale e la sua massa tramite una bilancia analitica. Le misure di densità apparente e di densità reale del materiale di cui è costituito lo *scaffold*, sono state effettuate con l'ausilio di un picnometro a elio (*AccuPyc 1330, Micromeritics, Norcross, GA*); per misurare la prima lo *scaffold* è stato lavorato opportunamente, come si nota in *Figura 5.18*, per eliminare i bordi curvi e successivamente inserito all'interno del picnometro; per calcolare la densità reale invece, dopo le prove meccaniche, il campione è stato macinato ed è stata inserita nel picnometro la polvere prodotta.

Sono state effettuate misure di densità su vari *scaffolds* stampati:

- La densità di bulk (ρ_{Bulk}) è la densità calcolata sul volume totale occupato dallo *scaffold*.
- La densità apparente (ρ_{App}) è calcolata considerando il volume occupato dal materiale di cui è costituito lo *scaffold*, escludendo la porosità aperta.
- La densità reale (ρ_{Picn}) è calcolata considerando solo il volume effettivamente occupato dal materiale, senza alcun tipo di porosità.

Da questi dati è possibile verificare anche il valore della porosità aperta (P_A), porosità totale (P_{Tot}) e quindi porosità chiusa (P_C) secondo le seguenti formule:

$$P_A = \frac{(\rho_{App} - \rho_{Bulk})}{\rho_{App}} \cdot 100 \rightarrow P_{TOT} = \frac{(\rho_{Picn} - \rho_{Bulk})}{\rho_{Picn}} \cdot 100 \rightarrow P_C = P_{TOT} - P_A$$

Tutti questi valori misurati e calcolati sono riportati a seguire, dove ciascun dato rappresenta il valore medio tra tutti i campioni analizzati (*Tabella 5.8*).

Tabella 5.8. Le proprietà fisiche, con deviazione standard, degli scaffolds delle tre diverse formulazioni, dopo trattamento termico; le stesse proprietà sono confrontate con altri dati di letteratura.

Porosità Scaffolds	Formulazione	Densità Bulk [g/cm ³]	Densità Apparente [g/cm ³]	Densità Reale [g/cm ³]	Porosità Aperta [%]	Porosità Totale [%]
1,6 mm	SrMg75HT	0,90 ± 0,05	3,0671 ± 0,0006	3,1353 ± 0,0006	70,6 ± 1,56	71,2 ± 0,4
0,8 mm		1,38 ± 0,01			55,1 ± 0,4	56,1 ± 1,53
1,6 mm	SrMg67HT	0,96 ± 0,02	3,0318 ± 0,0006	3,1397 ± 0,0006	68,2 ± 1,62	69,3 ± 1,56
0,8 mm		1,37 ± 0,05			54,7 ± 1,88	56,3 ± 1,8
1,6 mm	SrMg100HT 30% vetro	0,85 ± 0,07	3,0625 ± 0,0006	3,0960 ± 0,0006	72,2 ± 2,37	72,5 ± 2,3
0,8 mm		1,67 ± 0,05			47,7 ± 4,91	48,2 ± 4,8
	75HT [35]	1.05 ± 0.04	3.26 ± 0.01	3.27 ± 0.01	67.7 ± 1.4	67.9 ± 1.4

Si possono trarre alcune considerazioni:

- Per tutte le soluzioni i valori di densità apparente sono più alti di quelli di bulk in quanto il volume su cui è calcolata è minore poiché esclude lo spazio occupato dalla porosità. La densità reale ha valori leggermente più alti rispetto alla apparente questo poiché è calcolata su un volume ancora inferiore, che esclude anche il volume occupato dalla porosità chiusa.
- Osservando invece la porosità totale in percentuale, si nota come il valore sia attorno al 70% per tutti gli *scaffolds* con porosità da 1,6 mm e in un range tra il 50÷55 % circa per quelli con porosità da 0,8 mm; i campioni con il *filler* di vetro presentano una deviazione standard elevata in quanto durante la stampa alcuni problemi con la vite della macchina hanno impedito una buona riproducibilità tra uno *scaffold* e il successivo.
- La porosità chiusa è quasi del tutto assente al massimo dell'1%, quindi possiamo considerare la porosità presente quasi solo aperta.

- La densità reale è minore dei $3,4 \text{ g/cm}^3$ della Hardystonite pura probabilmente per la presenza dello ione Sr nel sito A ottaedrico al posto del Ca, che distorce la cella unitaria aumentandone il volume; Inoltre non è da escludere la presenza di fase amorfa da stabilire con test futuri.

Non si raggiunge la porosità suggerita dell'80 % per *scaffolds* applicabili alla biorigenerazione dei tessuti ossei.

5.9.3 Resistenza Meccanica

Per la valutazione delle caratteristiche meccaniche dei campioni realizzati, si è utilizzato una macchina modello Instron 1121 UTM (*Instron, Danvers, MA*) per prove di compressione/trazione. Si tratta di una macchina dotata di una cella di carico da 10000 N, e nella configurazione per la prova di compressione la macchina si equipaggia con due piatti di acciaio, uno semovibile e l'altro fisso dove si dispone il campione.

Misurata l'area della superficie su cui è applicato il carico (A), si coprono le facce dei campioni con un parafilm per evitare a schegge pericolose di uscire durante la prova e si poggiano sul piatto della macchina, infine si può effettuare la prova ad una velocità di discesa di 0.5 mm/min. La macchina fornisce i valori di forza (F) e corsa, con le quali è possibile risalire allo sforzo di compressione (σ_{comp}) a cui vengono sottoposti i provini: $\sigma_{comp} = F/A \text{ [N/mm}^2\text{]}$

Come da considerazione fatte in precedenza, gli *scaffolds* sono a porosità prevalentemente aperta e, come visto per le schiume, generalmente si considerano solidi *bending dominated* che per deformarsi flettono le pareti di cella; Gibson e Ashby hanno mostrato che le proprietà meccaniche, più precisamente la resistenza a compressione, dei solidi di questo tipo dipendono dalla densità relativa secondo:

$$\frac{\sigma_{scaffold}}{\sigma_{Flexural}} = 0,2 \cdot \left(\frac{\rho_{Bulk}}{\rho_{App}} \right)^{3/2}$$

Il rapporto delle densità nella formula non è altro che la densità relativa misurabile anche come: $\rho_{rel} = 1 - \text{porosità}$.

In questo modo è possibile stabilire un indice di resistenza a flessione del campione pesato sulla quantità di porosità presenta che permetta di confrontare schiume con diverse morfologie dando maggior importanza al materiale di cui sono costituite.

Non è facile confrontare direttamente strutture altamente porose con diverse geometrie e diversa porosità in %. La morfologia della porosità, la dimensione media dei pori, la presenza di microcricche etc. influenzano i risultati della prova a compressione.

Vengono riportati in *Tabella 5.9* i valori medi ottenuti dalla prova a compressione per ciascuna composizione, insieme ai valori calcolati di resistenza bulk.

Tabella 5.9. Le proprietà fisiche e meccaniche, con deviazione standard, degli scaffolds delle tre diverse formulazioni, dopo trattamento termico; le stesse proprietà sono confrontate con altri dati di letteratura.

Porosità Scaffolds	Formulazione	Porosità Aperta media	Densità Relativa	Resistenza a Compressione σ_{comp} , [MPa]	Resistenza A Flessione σ_{comp} , [MPa]
1,6 mm	SrMg75HT	70,6	0,29	1,56 ± 0,22	48,09 ± 7,44
0,8 mm		55,1	0,45	4,55 ± 0,53	75,18 ± 9,76
1,6 mm	SrMg67HT	68,2	0,32	1,97 ± 0,34	56,93 ± 10,34
0,8 mm		54,7	0,45	6,72 ± 0,72	111,30 ± 18,24
1,6 mm	SrMg100HT 30% vetro	72,2	0,28	2,26 ± 1,23	69,51 ± 30,18
0,8 mm		47,7	0,52	11,64 ± 3,17	142,67 ± 31,89
	75HT [35]	67,7	0,32	5,2 ± 1.1	141,6
	Sr-HT-Gahnite [39]	85	0,15	4,1 ± 0,3	352,8

Da questa Tabella si possono trarre alcune conclusioni interessanti:

- Per tutte le soluzioni adottate la resistenza a compressione è chiaramente migliore per gli *scaffolds* con minor porosità aperta, quindi quelli caratterizzati da pori quadrati di lato 0,8 mm; si ha un miglioramento della resistenza rispetto alle schiume cellulate, dovuto sicuramente in parte alla morfologia regolare ottenuta con stampa *Robocasting*. I valori ottenuti sono molto soddisfacenti, anche se andrebbero analizzati un maggior numero di campioni per avere dei risultati più precisi; in particolare la soluzione più interessante è sicuramente la SrMG100HT 30% vetro, che presenta una resistenza decisamente maggiore rispetto alle altre soluzioni. Tuttavia i dati medi presenti sono fortemente influenzati dai pochi campioni analizzati e dai problemi avuti durante la stampa che non hanno consentito una buona riproducibilità dei prodotti di questa soluzione.

La deviazione standard dai valori medi infatti, in particolare per gli *scaffolds* di questa soluzione, è decisamente elevata, occorre quindi ottimizzare la riproducibilità e il processo di stampa ed effettuare in futuro ulteriori prove.

Si riporta in *Figura 5.25* per confronto il risultato del test a compressione del miglior *scaffold* di SrMG100HT 30% vetro e a seguire in *Tabella 5.10* le relative proprietà fisiche e meccaniche.

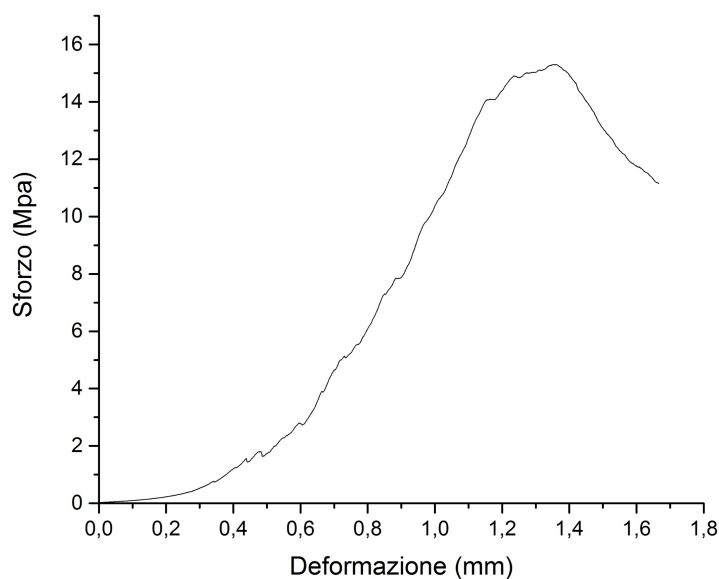


Figura 5.25 Grafico Sforzo (MPa) – Deformazione (mm) della prova di compressione effettuata su uno scaffold SrMg100HT 30% vetro.

Tabella 5.10. Le proprietà fisiche e meccaniche, con deviazione standard, di uno scaffold SrMg100HT 30% vetro dopo trattamento termico.

Porosità Scaffolds	Formulazione	Porosità Aperta media	Densità Relativa	Resistenza a Compressione σ_{comp} , [MPa]	Resistenza A Flessione σ_{comp} , [MPa]
0,8 mm	SrMg100HT 30% vetro	43,4	0,57	15,3	179,5

- Gli *scaffolds* ingegnerizzati in questa Tesi hanno i requisiti fisici per essere utilizzati nella rigenerazione dell'osso spugnoso, e possono entrare in diretta competizione con il *leader* attuale dei bioceramici silicatici (Sr-HT-gahnite) unico bioceramico hardystonitico pronto per essere introdotto nel mercato come prodotto commerciale. Se consideriamo la migliore soluzione adottata ovvero la SrMg100HT 30% vetro essa presenta una resistenza meccanica migliore o comunque confrontabile con altri ceramici hardystonitici:
 - *Scaffolds* 100 mol% HT → ~0,6 MPa;
 - *Scaffolds* 75 mol% HT – 25%mol OK → 5,2 MPa;
 - *Scaffolds* Sr-HT-Gahnite → 4,1 Mpa.

Il valore della σ_{comp} di gran parte dei campioni ottenuti è compatibile con i $2\div 12$ MPa suggeriti dalla letteratura per *scaffolds* applicabili alla rigenerazione dell'osso spugnoso, e possono quindi resistere a sforzi sotto carico lievi.

Dalle analisi effettuati emerge come nettamente vincente la soluzione senza boro, sia per le caratteristiche meccaniche in linea con altri prodotti per la rigenerazione di tessuto osseo ma soprattutto per le ottime proprietà bioattive di proliferazione cellulare, punto dolente di quasi tutti i ceramici a base Hardystonite come dimostrato dal test MTT effettuato.

5.9.4 Sviluppi futuri

Per quanto riguarda gli sviluppi futuri riguardo alla stampa *Robocasting* di questo silicato ottenuto da polimero preceramico e *fillers* senza boro, è opportuno operare in alcuni ambiti differenti:

1. Realizzare *scaffolds* della stessa composizione di quelli ottenuti con il *low-glass approach* ma senza *filler* di vetro: questa soluzione non è stata testata per mancanza di tempo, tuttavia è possibile che gli ioni Sr e Mg introdotti siano in grado di dare una struttura Hardystonitica con buone proprietà meccaniche lì dove la pura hardystonite si dimostra friabile e poco performante.
2. Confrontare *scaffolds* realizzati con diversa geometria in modo da ottimizzare le proprietà fisiche e meccaniche raggiungibili. Sarebbe importante ottenere strutture con almeno l'80% di porosità aperta, valore consigliato per applicazione di rigenerazione ossea.
3. Cercare di ottenere un inchiostro tale da poter stampare un filamento con diametro almeno da 400 μm , lavorando sulla dimensione delle polveri e sull'omogeneità della pasta.

Infine per comprendere adeguatamente cosa si intenda con utilizzo commerciale, in *Figura 5.26* sono commentati esempi di *scaffolds* 3D impiegati nel passato recente sia nella medicina umana (*Figura 5.26a*, *Figura 5.26c*) sia nella medicina veterinaria (*Figura 5.26b*). questi nuovi promettenti bioceramici silicatici potrebbero nel futuro prossimo diventare soluzioni più efficaci per applicazioni cliniche e sostituire parte degli *scaffolds* 3D attuali.

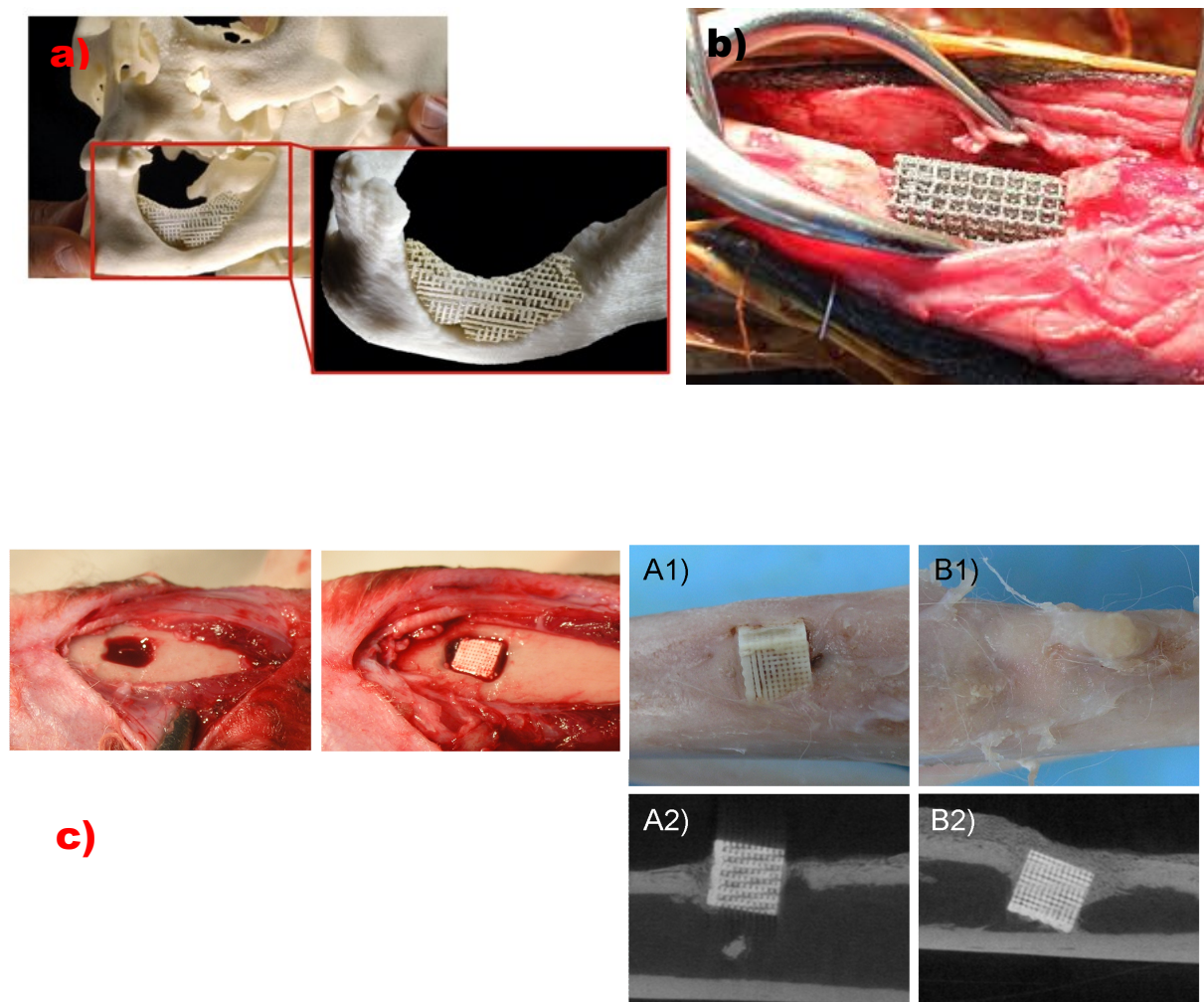


Figura 5.26. a) Esempio di scaffold con cellule progenitrici del midollo per rimodellare una mandibola danneggiata b) esempio di una sostituzione parziale dell'osso con scaffold 3D, [27], c) Applicazione chirurgica di scaffold per la rigenerazione ossea, [55].

Conclusioni

Gli obiettivi del presente lavoro di Tesi sono stati la realizzazione e lo studio di bioceramici cellulari a base di meliliti complesse, in particolare hardystonite ($\text{Ca}_2\text{ZnSi}_2\text{O}_7$, HT) e soluzioni solide tra membri di questo particolare gruppo di minerali al fine di dimostrarne la possibilità di utilizzo per l'ingegneria tissutale.

L'attenzione è stata riposta nella possibilità di aggiustare le proprietà fisico-chimiche come resistenza meccanica, bioattività e degradazione modificando la struttura cristallina melilitica ed i suoi cationi, nell'ottica di ottenere biomateriali silicatici più efficaci per applicazioni cliniche. La tecnica scelta per realizzare i campioni è la tecnologia denominata PDCs – *polymer-derived ceramics* ed è basata sull'utilizzo di una miscela di partenza caratterizzata da polimeri preceramici e *fillers*; la realizzazione dei ceramici silicatici avviene attraverso la pirolisi dei polimeri preceramici e la composizione e morfologia ottenibili dipendono essenzialmente dalla struttura molecolare del precursore polimerico. È una tecnica innovativa in quanto consente la formatura dei campioni secondo molteplici tecnologie classiche delle materie plastiche ed è efficace perché permette una sintesi semplice delle miscele di partenza. L'ispirazione del presente lavoro deriva dallo studio effettuato presso i laboratori dell'università di Padova sugli effetti dell'aggiunta di boro nella produzione dei bioceramici silicatici a base hardystonite e da altri studi, trovati in letteratura, sull'aggiunta di ulteriori elementi bioattivi, in particolare stronzio e magnesio, nella medesima struttura.

Innanzitutto è stata indagata la fattibilità di sintesi tramite tecnologia PDCs di pastiglie di un bioceramico con struttura cristallina melilitica monofasica a base hardystonite a sei elementi; ovvero Si, Ca, Zn, B, Sr, Mg per sfruttare i vantaggi derivanti dalla loro incorporazione sul grado di purezza di fase e sulla bioattività. Quindi, partendo dalla soluzione solida già sperimentata tra HT e Okayamalite ($\text{Ca}_2\text{SiB}_2\text{O}_7$, OK), Sr è stato considerato come elemento sostituzionale di Ca nel sito A ottaedrico della struttura melilitica, mentre Mg come sostituzionale di Zn nel sito T_1 tetraedrico. Il trattamento termico a 950°C utilizzato è stato il medesimo già sperimentato per la soluzione HT - OK di partenza, ben 250°C in meno rispetto alla sintesi di HT pura con lo stesso processo.

Le analisi XRD hanno confermato l'assenza di fasi diverse da quella di hardystonite, ciò dimostra che la sostituzione ha permesso una modifica del reticolo cristallino sufficiente ad incorporare correttamente tutti gli ioni creando una soluzione solida monofasica, non presente nelle soluzioni HT – OK; è stato rilevato un leggero spostamento dei picchi dello spettro coerente con l'evoluzione delle fasi dovuto all'incorporazione di ioni di raggio differente.

Utilizzando la stessa sintesi con altri precursori di silice polimerici e non, è stato inoltre dimostrato che il processo PDCs congiunto all'uso di polimeri preceramici è in grado di dare una reazione unica e particolare tra i reagenti per formare la melilite complessa, non ottenibile con altri precursori e ad una temperatura impensabile per altri processi. Le soluzioni ottenute sono state successivamente analizzate tramite saggio MTT per verificarne la biocompatibilità; i risultati hanno confermato un progresso rispetto alla HT pura e alla soluzione HT-OK, citotossiche a causa della troppo rapida dissoluzione. Tuttavia la capacità di proliferazione cellulare, seppur promettente, è risultata ancora insufficiente per applicazioni in campo clinico. L'incorporazione di boro è delicata e se si discioglie troppo in fretta inibisce la crescita e la proliferazione delle cellule, come alcuni esperimenti in vitro hanno dimostrato.

È stata considerata quindi l'incorporazione di Sr e Mg sulla struttura melilitica di hardystonite senza boro. In questo caso il processo è stato ripreso dagli studi precedenti effettuati sulla sintesi di HT da tecnica PDCs; in assenza di composti boratici il trattamento termico è stato eseguito a 1200 °C e in seguito anche a 1100°C con risultati pressoché identici.

Le analisi XRD hanno mostrato, per entrambe le temperature di trattamento, una perfetta corrispondenza con il pattern dell'hardystonite, a dimostrazione del fatto che l'incorporazione degli ioni ha permesso una modifica del reticolo cristallino sufficiente ad incorporare correttamente tutti gli ioni, anche a temperature minori di 1200°C, risultato non possibile con la sintesi di Hardystonite pura non drogata. Le pastiglie ottenute, così come già riscontrato per HT pura, si presentavano friabili e vistosamente criccate; quindi operando con una metodologia definita "*low-glass approach*", una ridotta percentuale di vetro, di identica composizione chimica rispetto al ceramico, è stata utilizzata come *filler* aggiuntivo. L'aggiunta è finalizzata alla determinazione di fase liquida, dal rammollimento del vetro, durante il trattamento termico, in assenza di *fillers* boratici. Il vetro è stato prodotto dopo fusione dei *fillers* a 1400°C ed è stato inglobato, una volta macinato a polvere micrometrica, nella miscela col polimero preceramico; le analisi XRD confermano che il vetro aggiunto cristallizza contribuendo a formare la struttura melilitica monofasica e in più, rammollendo durante il trattamento termico, consente una migliore densificazione del prodotto.

Il test di citotossicità, eseguiti solo sulla soluzione senza vetro, è risultato nettamente migliore rispetto alle soluzioni contenenti boro e decisamente promettente per applicazioni in campo biomedicale. È stato raggiunto quindi l'obiettivo di realizzare una soluzione solida con struttura monofasica e con buone caratteristiche di bioattività.

La sperimentazione è quindi proseguita con lo sviluppo di solidi cellulari, inizialmente come schiume ceramiche tramite fillers idonei a dare schiumatura durante il processo PDCs con polimero H62C in forma liquida. A tale scopo per le soluzioni con boro è stata utilizzata colemanite idrata ($\text{Ca}_2\text{B}_6\text{O}_{11}\cdot 5\text{H}_2\text{O}$), mentre per le altre idrossido di magnesio ($\text{Mg}(\text{OH})_2$) insieme allo 0,5% di un derivato dell'idrazina.

I campioni sono stati sottoposti ad un trattamento di reticolazione e schiumatura diverso in base al *filler* schiumante; ovvero 420 °C e 350 °C per massimizzare rispettivamente la temperatura di decomposizione di colemanite e idrossido di magnesio.

Le schiume sono state quindi caratterizzate dal punto di vista fisico e meccanico, dopo aver ottenuto immagini tramite SEM e microscopio ottico; tutte presentano porosità aperta ed interconnessa con dimensione dei pori principali >100 µm ma molto disomogenea. Per quasi tutte le soluzioni si raggiunge la porosità suggerita dell'80 % per *scaffolds* applicabili alla biorigenerazione dei tessuti ossei mentre la resistenza meccanica, seppur paragonabile con quella di altre schiume ceramiche, non del è tutto compatibile con tale applicazione. La morfologia della porosità molto disomogenea, la dimensione variabile dei pori e la presenza di microcricche influenzano i risultati della prova a compressione a causa di instabilità strutturali, inomogeneità e locali concentrazioni di sforzi.

I limiti nello sviluppo di una morfologia cellulare omogenea hanno portato nella seconda fase sperimentale di questa Tesi ad applicare la tecnologia di fabbricazione additiva Robocasting/DIW per realizzare *scaffolds* 3D. Gli inchiostri per la stampante sono stati prodotti miscelando insieme, tramite mulino a sfere, il polimero preceramico MK, in forma solida, i *fillers* attivi, silica fume e isopropanolo; la variazione della quantità di questi ultimi due componenti permette di ottimizzare le proprietà reologiche dell'inchiostro stesso, che deve necessariamente soddisfare requisiti specifici per poter essere stampato. L'inchiostro ottimale è stato ottenuto tramite l'introduzione del 27% di volume di isopropanolo e il 10% in peso di silica fume. Sono stati realizzati *Scaffolds* a geometria cubica con pori ortogonali di lato 1,6 mm e 0,8 mm. Una volta trattati e ceramizzati, né macrocricche né difetti sono stati evidenziati nei campioni, e l'adesione tra i filamenti come anche la morfologia generale sono risultati ottimali confermando le buone proprietà reologiche dell'inchiostro per la stampa di tali geometrie. Il vantaggio più evidente, dopo ceramizzazione, è stato la diminuzione della microcricatura rispetto a *scaffolds* 3D di HT-OK e di 100% HT prodotti con lo stesso processo. Gli effetti positivi della formazione di una fase liquida, sia da filler boratico che da polvere di vetro hanno permesso un adeguato rilassamento delle sollecitazioni legate alla conversione del polimero preceramico e del *filler* CaCO₃ e hanno facilitato la migrazione degli ioni nel loro impaccamento durante la cristallizzazione. Per tutte le soluzioni la resistenza alla compressione è risultata compatibile con i 2÷12 MPa suggeriti dalla letteratura per *scaffolds* applicabili alla rigenerazione dell'osso spugnoso; tuttavia emerge come superiore per le proprietà mostrate, soprattutto di biocompatibilità, la soluzione senza boro, con una resistenza a compressione degli *scaffolds* prodotti con filler di vetro pari a $11,64 \pm 3,17$ MPa associata a circa il 50% di porosità. Sviluppi futuri interessanti riguardano la fattibilità di ottenere *scaffolds* dalle medesime proprietà senza l'utilizzo di filler vetroso. Inoltre andrebbero studiate diverse geometrie di stampa e realizzati inchiostri tali da poter stampare filamenti con diametri di almeno 400 µm in modo da ottimizzare le proprietà fisiche e meccaniche raggiungibili.

Appendice

Metodi di caratterizzazione

Si vuole fornire una brevissima panoramica delle tecniche di misura utilizzate e degli strumenti che hanno permesso l'ottenimento dei dati quantitativi, delle immagini e dei grafici. Quanto esposto è ripreso in parte da [58,59].

A.1 Difrattometria a raggi X – Analisi XRD

La diffrazione ai raggi X è attualmente una delle tecniche più efficaci per lo studio dei materiali cristallini. Essa sfrutta le interazioni tra radiazioni elettromagnetiche ad alta energia (raggi X) ed il reticolo atomico del materiale in esame.

Quando il fascio di raggi X incontra il reticolo cristallino, le onde diffratte o secondarie possiedono un'intensità che è variabile a seconda dell'interferenza che avviene lungo la direzione percorsa dal fascio.

La diffrazione è quindi l'interferenza che subisce la radiazione elettromagnetica che diffonde da un oggetto posto sul cammino della radiazione. Il fenomeno nasce dalla somma coerente delle onde elettromagnetiche diffuse dagli atomi appartenenti alla stessa famiglia di piani reticolari, come schematizzato in *Figura 6.1*.

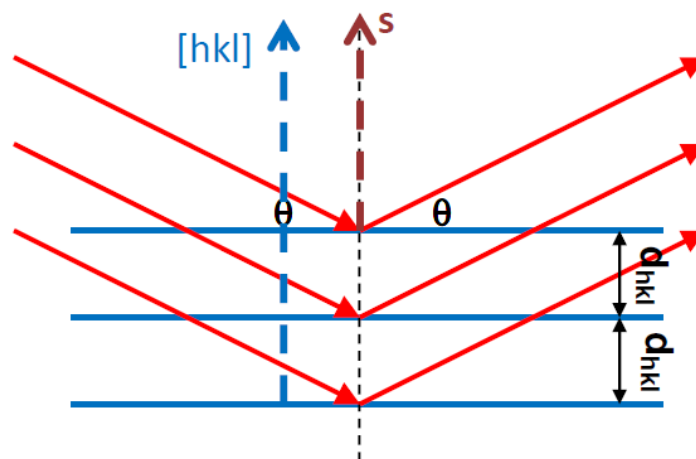


Figura 6.1. Riflessione alla Bragg dei raggi incidenti un reticolo cristallino.

Si ha un rafforzamento dell'intensità dei raggi riflessi in una direzione, e quindi interferenza costruttiva, quando la differenza di cammino tra i raggi ($2d \cdot \sin\theta$) soddisfa la legge di Bragg, cioè deve essere un multiplo intero della lunghezza d'onda della radiazione monocromatica incidente, ovvero: $n \cdot \lambda = 2 d \cdot \sin\theta$

dove:

- n = numero intero;
- λ = lunghezza d'onda della radiazione monocromatica incidente;
- d = spaziatura dei piani cristallografici;
- θ = angolo di incidenza.

Per la caratterizzazione dei campioni in laboratorio, nel corso dell'attività sperimentale, si è utilizzato un diffrattometro Bruker AXS D8 Advance (Bruker, Germania). La geometria del dispositivo non è quella classica di Bragg-Brentano, detta configurazione $\theta/2\theta$, nel quale ad ogni spostamento del porta campioni di uno *step* angolare $\Delta\theta$ corrisponde uno *step* angolare del contatore di $2\Delta\theta$. Viene utilizzata un'apparecchiatura con configurazione Bragg-Brentano θ/θ , nella quale il porta campioni con la polvere del materiale da indagare rimane fisso al centro, mentre il tubo radiogeno e il rivelatore si muovono contemporaneamente e con lo stesso incremento angolare $\Delta\theta$ rispetto all'orizzontale.

La sorgente utilizzata dallo strumento è caratterizzata da un anodo in rame: la radiazione utilizzata è la $\text{CuK}\alpha$, ovvero quella relativa alla transizione $\text{K}\alpha$ del rame ($\lambda = 1.541874 \text{ \AA}$). La tensione viene impostata ad un valore di 40 kV, con un'intensità di corrente elettrica di 40 mA. Per effettuare le analisi, le polveri ceramizzate e finemente macinate vengono distribuite su di un porta campioni in alluminio, cercando di rendere omogenea e priva di rilievi la superficie che verrà indagata; se così non fosse si potrebbe incorrere nei tipici errori metodologici dell'analisi XRD chiamati *sample displacement error*, *flat specimen error*, inomogeneità delle particelle e/o orientazione preferenziale delle particelle.

Nelle analisi sperimentali si sono effettuate misurazioni nell'intervallo 2θ compreso fra 10° e 70° con un incremento di 0.05° ogni 2 secondi. Il diffrattogramma che si ottiene è dato dall'intensità dei raggi riflessi graficata rispetto all'angolo di diffrazione 2θ e si presenta sotto forma di una serie di picchi: in generale, dalla posizione è possibile risalire alle fasi presenti, e con un'analisi più approfondita di intensità e forma dei picchi si ottiene la composizione quantitativa, la dimensione dei cristalliti etc. L'identificazione delle fasi cristalline è stata effettuata con il supporto del programma Match! (Crystal Impact GbR, Bonn, Germania).

A.2 Analisi DTA e TG

Le analisi termiche comprendono un gruppo di tecniche in cui una proprietà fisica di una sostanza viene misurata come una funzione della temperatura, mentre il materiale da investigare viene sottoposto ad una rampa termica controllata. L'analisi termica differenziale DTA (acronimo di “*Differential Thermal Analysis*”) coinvolge un provino ed uno standard scaldati o raffreddati nelle stesse condizioni e registra qualunque tipo di variazione, riportandola in funzione della temperatura o del tempo. Prima di effettuare la misura su di un campione è necessario effettuare una baseline dello standard.

Un sistema per l'analisi termica differenziale è composto da:

- Un contenitore per il campione e per lo standard, normalmente in allumina, che poggiano sulle termocoppie, il cui compito è quello di rilevare differenze di temperatura durante il programma di trattamento;
- Gli elementi riscaldanti;
- Un sistema per il controllo della temperatura;
- Un sistema per la registrazione dei dati, che converte il segnale elettrico inviato dalle termocoppie in un database.

È di fondamentale importanza che gli elementi riscaldanti siano in grado di mantenere la temperatura omogenea in tutta la camera, in modo che i due crogioli siano effettivamente alla stessa temperatura; inoltre devono essere in grado di modificare repentinamente tale valore in risposta alle indicazioni fornite dal programma di controllo. Dall'altra parte il sistema di registrazione dei dati deve avere un livello di acquisizione molto elevato (nell'ordine dei KHz) per riprodurre variazioni rapide del *set-up*.

Le termocoppie non devono essere poste in contatto diretto con il campione per evitare possibili contaminazioni o degrado del sensore che determinano la compromissione dell'acquisizione del segnale. I dati ricavati da un'analisi DTA forniscono dei valori indicativi sulle temperature di trasformazione, indicati con picchi endo- o eso-termici, ma non devono essere presi come riferimenti assoluti. Infatti i trattamenti effettuati su polveri normalmente non sono rappresentativi per campioni massivi, in quanto l'ambiente esterno, la composizione e la superficie specifica delle polveri sono tutti parametri che influenzano la temperatura a cui avvengono le transizioni osservabili in una curva DTA. Anche la velocità di riscaldamento ha un peso importante nel risultato perché da questa dipendono le trasformazioni durante il riscaldamento del campione.

Normalmente una curva DTA è composta da una serie di picchi esotermici o endotermici a seconda che si osservino delle emissioni o degli assorbimenti di calore diversi rispetto allo standard utilizzato. Poiché la termocoppia non è posta in contatto con il provino, bisogna considerare un certo ritardo tra la temperatura a cui si osserva il picco ed il valore reale a cui la trasformazione avviene.

L'analisi termo-gravimetrica (TG) consiste invece nella misura continua della massa del campione durante il suo riscaldamento. Questa analisi permette di valutare la stabilità termica del campione analizzato e la temperatura alla quale avvengono eventuali decomposizioni: il limite della misura è ovviamente quello di poter analizzare solo trasformazioni che coinvolgono variazioni nella massa del campione.

Risulta sempre conveniente accoppiare nello stesso riscaldamento le analisi DTA e TG, in modo da rendere complementari i risultati delle due misure. Nello svolgimento di questa Tesi sono state condotte analisi in aria con uno strumento DTA/TGA STA409 (Netzsch GmbH, Selb, Germania).

A.2 Misure picnometriche

Il picnometro ad elio (Micromeritics AccuPyc 1330, Norcross, GA) utilizzato in questa Tesi consente di misurare il volume di un campione facendo espandere dell'elio in una cella contenente il campione stesso. La *Figura 6.2* riporta lo schema di tale apparato, costituito da due celle calibrate: in particolare una cella di riferimento, di volume V_1 , e una cella portacampione, di volume V_2 , collegate fra loro tramite una valvola. Inizialmente, la cella di riferimento contiene elio a pressione e volume noti (P_1 , V_1), mentre la cella portacampione è depressurizzata mediante una pompa a vuoto. Successivamente, si fa espandere l'elio contenuto nella cella di riferimento verso la cella di misura; in questo modo, il sistema delle due celle collegate raggiunge un nuovo equilibrio termodinamico, caratterizzato dalla pressione P_2 .

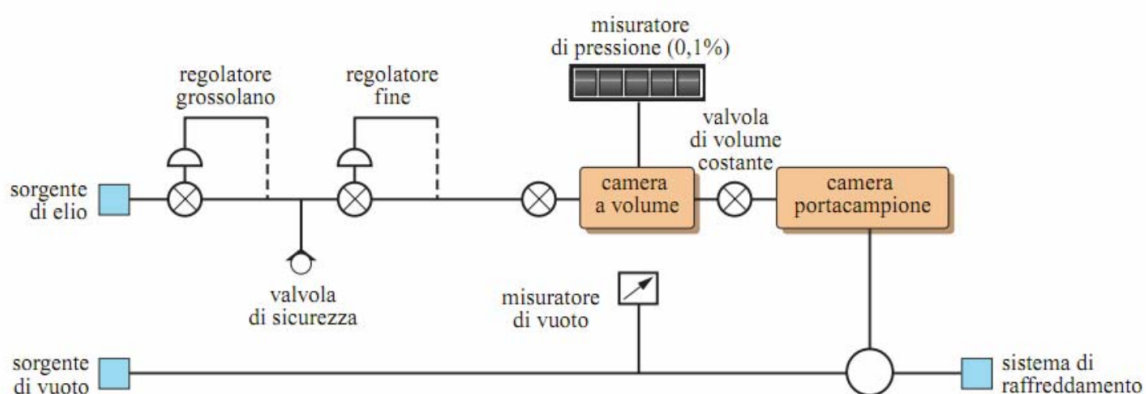


Figura 6.2. Schema di un generico picnometro ad elio a doppia camera.

In questo stato, il volume occupato dall'elio è pari a $V_1 + V_2 - V_g$; applicando la legge di Boyle ai due stati si ottiene la seguente espressione: $P_1 V_1 = P_2 (V_1 + V_2 - V_g)$ (6.1)

da cui si ricava il volume del campione: $V_g = V_1 + V_2 - P_1 V_1 / P_2$ (6.2)

La densità del campione viene ricavata dal rapporto massa/volume; il peso del campione viene misurato prima della prova. Attraverso misure di diverse forme dello stesso campione, è possibile ricavare due tipi di densità:

- Densità apparente, *apparent density*, calcolata non considerando la porosità aperta e quindi valutando solo il volume occupato dal materiale stesso e dalla porosità chiusa;
- Densità vera, *true density*, calcolata considerando solo il volume effettivamente occupato dal materiale, senza quindi alcun tipo di porosità.

La densità apparente si ottiene inserendo nello strumento i campioni porosi integri, di qualsiasi geometria. In questo modo gli atomi di elio, essendo di piccole dimensioni, riescono a diffondere e penetrare nei pori aperti presenti nel campione.

Per misurare la densità vera si necessita invece di un trattamento di macinazione del campione a polvere fine, in modo da eliminare ogni traccia di porosità chiusa. Gli atomi di elio sono in grado di diffondere in tutti gli spazi liberi possibili, occupando anche il volume che prima era associato alla porosità chiusa. Dalle due misure si ricava banalmente la porosità aperta e totale in %; la porosità chiusa sarà la differenza tra le due.

A.4 Microscopio elettronico a scansione - Analisi SEM

Le micrografie SEM sono state ottenute attraverso lo strumento FEI Quanta 200 ESEM (Eindhoven, Paesi Bassi) e hanno permesso lo studio della morfologia dei campioni, permettendo anche la visualizzazione della porosità e una sua stima dimensionale.

Le immagini vengono prodotte bombardando la superficie del campione con un fascio di elettroni incidenti e acquisendo le informazioni dal fascio di elettroni prodotti.

La struttura di un microscopio elettronico è piuttosto complessa e presenta una serie di elementi fondamentali:

- Una sorgente di elettroni ed una colonna in alto vuoto attraverso cui il fascio può accelerare (cannone elettronico);
- Una serie di lenti elettroniche a condensatore che regolano il diametro del fascio per mettere a fuoco il campione;
- Una serie di aperture, costituite da microfori su un film metallico, attraverso le quali passa il fascio alterando le proprietà;
- Controllo sulla posizione del campione lungo i tre assi principali e sull'asse di rotazione del provino stesso;
- Un'area di interazione tra fascio e campione che genera numerosi tipi di segnale e che viene processata per restituire immagini o spettri.

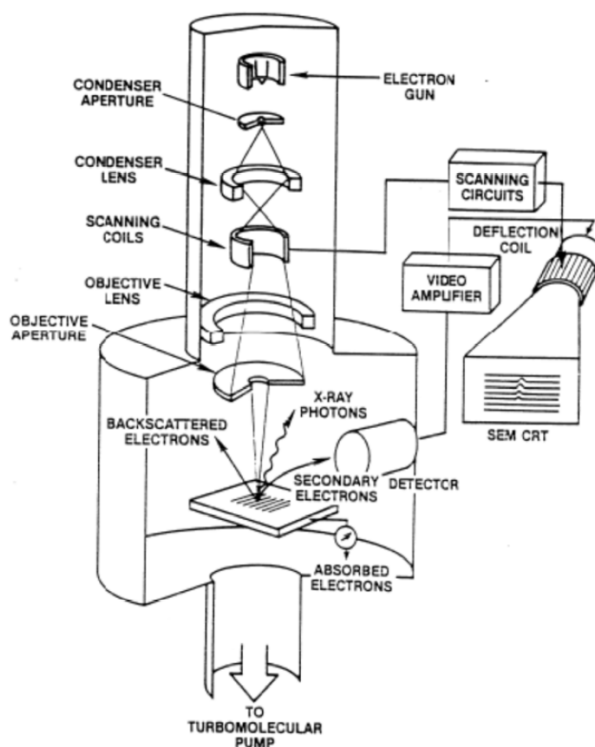


Figura 6.3. Schematizzazione di un microscopio elettronico a scansione (SEM).

I microscopi di questo genere possono avere diverse tipologie di cannone elettronico, il cui requisito è quello di garantire un fascio stabile con energia regolabile. Esistono tre sorgenti principali: la sorgente in tungsteno (W), in esaboruro di lantanio (LaB_6) oppure quelle ad emissione di campo FEG (*Field Emission Gun*).

Lo strumento utilizzato monta un cannone a sorgente FEG (FEI Quanta 200 ESEM, Eindhoven, Paesi Bassi). Questo tipo di cannone sfrutta il fenomeno quantistico dell'effetto tunnel, scoperto nel 1920 da Fowler e Nordheim. Un catodo FEM consiste in una punta di tungsteno con un diametro inferiore ai 100 nm che consente di instaurare una differenza di potenziale con un primo anodo: si sviluppa un campo elettrico, concentrato sulla punta metallica, che permette l'estrazione di elettroni generando corrente. La differenza di tensione tra la punta ed il secondo anodo determina l'accelerazione degli elettroni; maggiormente gli elettroni vengono accelerati lungo la colonna, maggiore energia cinetica possiedono e più elevato risulta il loro potere penetrante nella materia.

Le immagini ottenute con una sorgente FEG sono di qualità superiore rispetto alle sorgenti tradizionali, poiché riescono a garantire un segnale con meno rumore e maggiore luminosità (10^8 A/cm^2), sebbene necessitino di un maggiore grado di vuoto (10^{-11} Torr).

A.5 Prove meccaniche in compressione

La macchina usata per le prove meccaniche è una Instron 1121 UTM (Instron, Danvers, MA). Si tratta di una macchina dotata di una cella di carico da 10000 N, e nella configurazione per la prova di compressione viene equipaggiata con due piatti di acciaio, come si osserva nel dettaglio di *Figura 6.4*: un piatto è fisso e serve di appoggio per il campione da testare, l'altro è invece collegato alla traversa mobile e può quindi compiere spostamenti verticali dall'alto verso il basso a velocità controllata e costante.

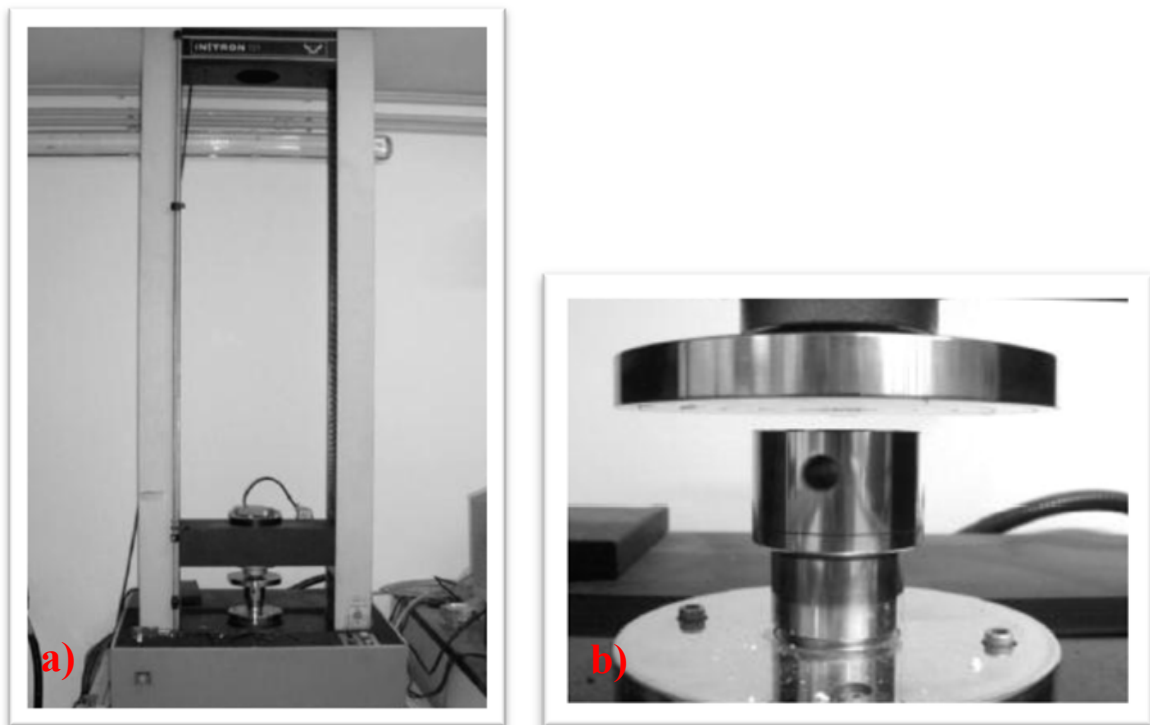


Figura 6.4. a) *macchina Instron 1121 UTM in configurazione di prova a compressione;*
b) *Ingrandimento dei piatti circolari fra i quali avviene la compressione.*

Impostata la velocità di avanzamento della testa di 0,5 mm/min, la macchina registra uno sforzo proporzionale allo spostamento imposto. Una cella di carico, posta sulla testa, produce un segnale elettrico di intensità direttamente proporzionale alla forza esercitata sul campione; il segnale viene elaborato e visualizzato sul monitor di un computer.

Dai valori di forza e corsa registrati dalla macchina è possibile risalire allo sforzo di compressione (σ_{comp}) a cui vengono sottoposti i provini:

$$\sigma_{comp.} = F/A \quad [\text{N}/\text{mm}^2] \quad (6.4)$$

dove F è la forza misurata dalla macchina, A è l'area su cui viene esercitata la forza. Esprimendo la forza in N e l'area in mm^2 si ottiene un valore dello sforzo in MPa.

Per una comprensione più chiara del comportamento meccanico dei campioni prodotti in questo lavoro di Tesi, si considera la rappresentazione proposta dagli autori Gibson e Ashby per quanto riguarda la deformazione e cedimento delle schiume cellulari o *scaffolds*. Il modello offerto dai due autori prevede una idealizzazione delle schiume a celle aperte come uno sviluppo spaziale continuo di unità cellulari separate da travicelle, le quali possono essere formate da materiale solido o a loro volta da materiale poroso e sono in grado, a seconda dello sforzo di cui risentono e della natura del materiale, di dare flessione (*bending*), instabilità al carico di punta (*buckling*), rottura fragile (*crushing*), snervamento (*yielding*). Nel caso di schiume a celle chiuse, il modello rimane valido, con la differenza che le celle adiacenti sono separate l'una dall'altra da pareti di materiale e al loro interno possono esserci gas e/o porzioni di materiale solido. I due casi sono visualizzati in *Figura 6.5*.

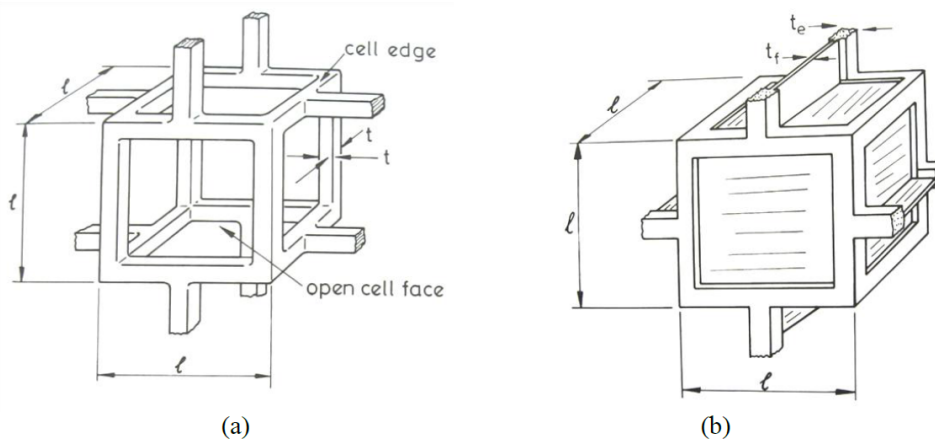


Figura 6.5. Modello Gibson-Ashby per materiali cellulari: a) a celle aperte; b) a celle chiuse.

In *Figura 6.6* è riportato il modello per il grafico σ - ϵ di schiume fragili (ceramiche) sottoposte a compressione che Gibson e Ashby hanno proposto.

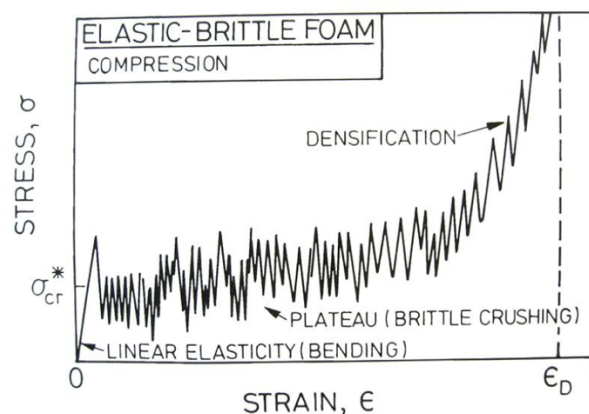


Figura 6.6. Schematizzazione del grafico σ - ϵ in compressione per schiume di tipo elastico-fragile.

Il grafico in *Figura 6.6* mostra tre diverse porzioni:

- 1) *Regime lineare elastico*: a bassi valori dello sforzo, il comportamento lineare elastico delle schiume è controllato dalle pareti delle celle. Se la porosità è aperta, le travicelle che nel modello di Ashby collegano una cella all'altra si flettono (*bending*) senza rompersi; se la porosità è chiusa si ha anche uno stiramento delle pareti che separano le celle l'una dall'altra;
- 2) *Plateau*: nel caso in esame delle schiume ceramiche, questa regione a sforzo pressoché costante è associata al collasso delle celle in seguito a fenomeni di frattura fragile (*brittle crushing*), ma si ricorda per completezza che il plateau potrebbe anche essere associato a fenomeni di *buckling* elastico nelle schiume elastomeriche o a fenomeni di snervamento plastico nelle schiume metalliche;
- 3) *Densificazione*: la regione finale mostra un improvviso e rapido aumento dello sforzo dovuto al fatto che ormai tutte le celle sono collassate, le pareti e i tratti di collegamento tra le celle sono a contatto e quella che viene misurata è la resistenza dei residui di materiale solido, non più la resistenza della schiuma.

I meccanismi di deformazione e cedimento nominati sono stati visualizzati da Gibson e Ashby come in *Figura 6.7*: si può vedere la flessione delle celle immaginata per spiegare la regione elastica lineare del grafico σ - ϵ e la frattura fragile che avviene durante la fase di plateau.

Nelle prove a compressione di questa Tesi, per valutare adeguatamente la resistenza, va preso il valore di stress o F del primo picco della deformazione elastica (*bending*).

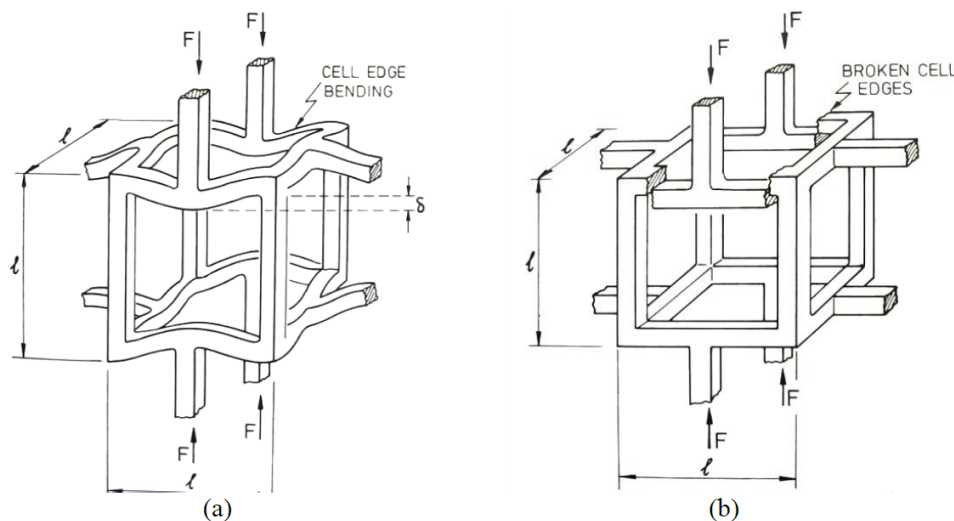


Figura 6.7. Modello di Gibson-Ashby per meccanismi di deformazione-cedimento per schiume a celle aperte: a) bending; b) brittle crushing.

Ringraziamenti

Vorrei esprimere i miei più sentiti ringraziamenti a tutti quelli che mi hanno accompagnato in questo percorso. Prima di tutto un grazie va al prof. Enrico Bernardo per l'opportunità formativa concessami che mi ha permesso di crescere moltissimo sia dal punto di vista professionale che conoscitivo. Ringrazio particolarmente anche il dott. Hamada Elsayed, per la grande disponibilità nel seguirmi durante gli esperimenti e per il sostegno continuo di fronte ad ogni scelta o variazione di progetto. Grazie al professor Bernardo e ad Hamada ho appreso metodologie di lavoro, di interazione con le persone e di analisi che sicuramente faranno la differenza nel mio futuro lavorativo.

Soprattutto grazie alla mia famiglia che mi ha permesso di arrivare fino alla conclusione di questo percorso. Grazie per avermi supportato economicamente e soprattutto moralmente di fronte ad ogni gioia e difficoltà di studio e di percorso.

Un grazie di cuore va a Francesca, per aver condiviso con me questo periodo faticoso ma ricco di soddisfazioni verso uno dei traguardi più importanti. Un grazie infine a tutti gli amici che mi hanno sostenuto e incoraggiato.

Riferimenti bibliografici

Capitolo 1

1. J. Park e R. S. Lakes (2007). *Biomaterials - An Introduction* (3rd ed.). Springer-Verlag New York, New York (US).
2. J. Park (2008). *Bioceramics - Properties, Characterizations, and Applications*. Springer-Verlag New York, New York (US).
3. C. M. Agrawal, J. L. Ong, M. R. Appleford e G. Mani (2014). *Introduction to Biomaterials*. Cambridge University Press, New York (US).
4. H. R. Rezaie, L. Bakhtiari e A. Öchsner (2015). *Biomaterials and Their Applications*. Springer International Publishing.
5. C. Di Bello (2004). *Biomateriali - Introduzione allo studio dei materiali per uso biomedico*. Pàtron Editore, Bologna (IT).
6. Di Bello, C., & Bagno, A. (2009). *Interazioni tra biomateriali e tessuti*. Bologna:Pàtron Editore.
7. C. Wu e J. Chang (2013). A review of bioactive silicate ceramics. *Biomed. Mater.*, **8**.
8. G. C. Wang, Z. F. Lu e H. Zreiqat (2014). Bioceramics for skeletal bone regeneration. In: *Bone Substitute Biomaterials* (K. Mallick, Ed.), Woodhead Publishing Limited, Cambridge (UK).
9. T. Kokubo (2008). *Bioceramics and their clinical applications*. Woodhead Publishing Limited, Cambridge (UK).
10. C. Wu e J. Chang (2013). Silicate bioceramics for bone tissue regeneration. *J. Inorg. Mater.*, **28**, 29-39.
11. H. Mohammadi, M. Sepantafar e A. Ostadrahimi (2015). The Role of Bioinorganics in Improving the Mechanical Properties of Silicate Ceramics as Bone Regenerative Materials. *J. Ceram. Sci. Tech.*, **06**, 1-8.
12. H. Zreiqat, Y. Ramaswamy, C. Wu, A. Paschalidis, Z. Lu, B. James, O. Birke, M. McDonald, D. Little e C. R. Dunstan (2010). The incorporation of strontium and zinc into a calcium–silicon ceramic for bone tissue engineering. *Biomaterials*, **31**, 3175-3184.
13. S. I. Roohani-Esfahani, C. R. Dunstan, J. J. Li, Z. Lu, B. Davies, S. Pearce, J. Field, R. Williams e H. Zreiqat (2013). Unique microstructural design of ceramic scaffolds for bone regeneration under load. *Acta Biomaterialia*, **9**, 7014-7024.
14. M. Dondi, C. Zanelli, M. Ardit e G. Cruciani (2010). Co-Doped Hardystonite, $\text{Ca}_2(\text{Zn},\text{Co})\text{Si}_2\text{O}_7$, a New Blue Ceramic Pigment. *J. Am. Ceram. Soc.*, **94**, 1025-1030.

15. V. M. Goldschmidt (1926). Die Gesetze der Krystallochemie. *Naturwissenschaften*, **14**, 477-485.
16. M. Zhang, Kaili Lin, J. Chang (2012). *Preparation and characterization of Sr-hardystonite (Sr₂ZnSi₂O₇) for bone repair applications*.
17. Y. Ramaswamy, C. Wu, H. Zhou, H. Zreiqat (2008). Biological response of human bone cells to zinc-modified Ca–Si-based ceramics *Acta Biomaterialia* **4** (2008) 1487–1497.
18. T. M. Freyman, I. V. Yannas, L. J. Gibson (2001). Cellular materials as porous scaffolds for tissue engineering. *Progress in material science* **46** (2001) 273-282.
19. M. Shie, S. Ding, H. Chang (2011). *The role of silicon in osteoblast-like cell proliferation and apoptosis*.
20. E. R. Segnit (1954). The System CaO-ZnO-SiO₂. *Journal of The American Ceramic Society*, **37**, 273-277.
21. D. F. Williams (2008). On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials*, **29**, 2941-2953.
22. L. L. Hench (1988). Bioactive Ceramics. In: *Bioceramics* (P. Ducheyne e J. Lemons, Ed.), **523**, Annals of the New York Academy of Sciences, New York (US).
23. B. D. Ratner, A. S. Hoffman, F. J. Schoen e J. E. Lemons (2013). *Biomaterials Science - An Introduction to Materials in Medicine* (3rd ed.). Academic Press, Kidlington (UK) e Waltham (US).
24. C. Wu e J. Chang (2013). Silicate bioceramics for bone tissue regeneration. *J. Inorg. Mater.*, **28**, 29-39.
25. H. Mohammadi, M. Hafezi, N. Nezafati, S. Heasarki, A. Nadernezhad, S. M. H. Ghazanfari e M. Sepantafar (2014). Bioinorganics in Bioactive Calcium Silicate Ceramics for Bone Tissue Repair: Bioactivity and Biological Properties. *J. Ceram. Sci. Tech.*, **05**, 1-12.
26. M. Kimata (1985). Crystallo-chemical evolution of a crystal structure due to cationic substitution after the example of melilite. *Naturwissenschaften*, **72**, 372-373.

Capitolo 2

27. L. Fiocco (2016). Silicate ceramics from preceramic polymers and fillers. *Ph.D. Thesis*, Università degli Studi di Padova (IT).
28. P. Colombo, G. Mera, R. Riedel e G. D. Sorarù (2010). Polymer-Derived Ceramics: 40 Years of Research and Innovation in Advanced Ceramics. *J. Am. Ceram. Soc.*, **93**, 1805-1837.
29. G. Parcianello (2012). Advanced ceramics from preceramic polymers and fillers. *Ph.D. Thesis*, Università degli Studi di Padova (IT).
30. P. Greil (2000). Polymer Derived Engineering Ceramics. *Adv. Eng. Mater.*, **2**, 339-348.

31. E. Bernardo, L. Fiocco, G. Parcianello, E. Storti e P. Colombo (2014). Advanced Ceramics from Preceramic Polymers Modified at the Nano-Scale: A Review. *Materials*, **7**, 1927-1956.
32. P. Greil (1998). Near Net Shape Manufacturing of Polymer Derived Ceramics. *J. Eur. Ceram. Soc.*, **18**, 1905-1914.
33. A. Zocca, P. Colombo, C. M. Gomes e J. Günster (2015). Additive Manufacturing of Ceramics: Issues, Potentialities, and Opportunities. *J. Am. Ceram. Soc.*, **98**, 1983-2001.
34. P. Greil (1995). Active-Filler-Controlled Pyrolysis of Preceramic Polymers. *J. Am. Ceram. Soc.*, **78**, 835-848.
35. E. Bernardo, JF. Carlotti, P. M. Dias, L. Fiocco, P. Colombo, L. Treccani, U. Hess e K. Rezwan (2013). Novel akermanite-based bioceramics from preceramic polymers and oxide fillers. *Ceramics International*, **40**, 1029-1035.
36. H. Elsayed, A. Zocca, G. Franchin, E. Bernardo e P. Colombo (2015). Hardystonite bioceramics from preceramic polymers. *Journal of the European Ceramic Society*, **36**, 829-835.
37. A. Zocca, G. Franchin, H. Elsayed, E. Gioffredi, E. Bernardo e P. Colombo (2016). Direct ink writing of a preceramic polymer and fillers to produce hardystonite ($\text{Ca}_2\text{ZnSi}_2\text{O}_7$) bioceramic scaffolds. *J. Am. Ceram. Soc.*, 1-8.
38. L. Fiocco, E. Bernardo, P. Colombo, I. Cacciotti, A. Bianco, D. Bellucci, A. Sola e V. Cannillo (2013). Novel processing of bioglass ceramics from silicone resins containing micro- and nano-sized oxide particle fillers. *J. Biomed. Mater. Res. A.*, **102**, 2502-2510.

Capitolo 3

39. H. Zreiqat, Y. Ramaswamy, C. Wu, A. Paschalidis, Z. Lu, B. J. O. Birke, M. McDonald, D. Little, C. R. Dunstan (2010). *The incorporation of strontium and zinc into a calcium–silicon ceramic for bone tissue engineering*.
40. H. Elsayed, A. Zocca, E. Bernardo, C. M. Gomes, J. Günster e P. Colombo (2014). Development of bioactive silicate-based glass-ceramics from preceramic polymer and fillers. *Journal of the European Ceramic Society*, **35**, 731-739.
41. H. Elsayed, M. Sinico, M. Secco, F. Zorzi, P. Colombo, E. Bernardo (2016). *B-doped hardystonite bioceramics from preceramic polymers and fillers: Synthesis and application to foams and 3D-printed scaffolds*.
42. M. Sinico (2016). *Bioceramici porosi con struttura cristallina melilitica da polimeri preceramici e fillers*. Tesi di Laurea in Ingegneria dei Materiali, DII, Università degli Studi di Padova (IT).
43. C. Wu, Y. Ramaswamy, D. Kwik, H. Zreiqat (2007). The effect of strontium incorporation into CaSiO_3 ceramics on their physical and biological properties. *Biomaterials*, **28**, 3171–3181.

44. S. Roohani-Esfahani, Y. Chen, J. Shi, H. Zreiqat (2013). *Fabrication and characterization of a new, strong and bioactive ceramic scaffold for bone regeneration*.
45. N. Liu, W. Fan, C. Wu, B. Fan (2013). *The interactions of Mg²⁺ - Zn²⁺ containing silicate materials with stem cells and bacteria*.
46. M. Ardit, G. Cruciani, M. Dondi (2010). The Crystal Structure of Sr-Hardystonite, Sr₂ZnSi₂O₇. *Z. Kristallographie* 225, 298-301.
47. J. Barbier, N. Penin e L. M. Cranswick (2005). Melilite-Type Borates Bi₂ZnB₂O₇ and CaBiGaB₂O₇. *Chem. Mater.*, 17, 3130-3136.
48. S. Qi, Y. Huang, Q. Lin, H. Cheng e H. J. Seo (2015). A bioactive Ca₂SiB₂O₇ ceramics and in vitro hydroxyapatite mineralization ability in SBF. *Ceramics International*, 41, 12011-12019.
49. S. Visentin (2009). Utilizzo di test di vitalità cellulare nella determinazione di citotossicità di dispositivi medici. *Tesi di Laurea in Biotecnologie*, Università degli Studi di Padova.

Capitolo 4

50. L. Fiocco, H. Elsayed, J. Daguano, V. Soares, E. Bernardo (2015). *Silicone resins mixed with active oxide fillers and Ca-Mg Silicate glass as alternative/integrative precursors for wollastonite-diopside glass-ceramic foams*. *Journal of Non-Crystalline Solids*, 44-49.
51. L. Fiocco, H. Elsayed, L. Ferroni, C. Gardin, B. Zavan, E. Bernardo (2015). *Bioactive Wollastonite-Diopside Foams from Pre-ceramic Polymers and Reactive Oxide Fillers*. *materials*, 8, 2480-2494.
52. L. Fiocco, S. Li, M. M. Stevens, E. Bernardo, J.R. Jones (2017). *Biocompatibility and bioactivity of porous polymer-derived Ca-Mg silicate ceramics*.
53. C. Zanette (2009). Caratterizzazione dei meccanismi neuroprotettivi della guanosina e dei ligandi dei recettori sigma. *Tesi di Laurea*, Università degli Studi di Trieste.

Capitolo 5

54. S.I. Roohani-Esfahani, C.R. Dunstan, J.J. Li, Zufu Lu, B. Davies, S. Pearce, J. Field, R. Williams, H. Zreiqat (2013). *Unique microstructural design of ceramic scaffolds for bone regeneration under load*.
55. A. Abarrategi, C. M. Vicente, F. J. M. Vázquez, A. Civantos, V. Ramos, J. V. S. Casado, R. M. Corriá, F. H. Perera, F. Mulero, P. Miranda, J. L. L. Lacomba (2012). *Biological Properties of Solid Free Form Designed Ceramic Scaffolds with BMP-2: In Vitro and In Vivo Evaluation*.
56. M.F. Ashby, L.J. Gibson (1999) *Cellular Solids, Structure and Properties, 2nd edition*. Cambridge University Press.
57. L. Fiocco (2012). Bioceramici porosi da polimeri preceramici e fillers. *Tesi di Laurea in Ingegneria dei Materiali, DII*, Università degli Studi di Padova (IT).

58. G. Beraldo (2014). *Bioceramici a base wollastonite-apatite da polimeri preceramici e fillers*. Tesi di Laurea in Ingegneria dei Materiali, DII, Università degli Studi di Padova (IT).
59. P. Rebesan (2017). Stampa 3D di materiali vetro-ceramici bioattivi. *Tesi di Laurea in Ingegneria dei Materiali*, DII, Università degli Studi di Padova (IT).
60. G. Wang, Z. Lu, D. Dwarte e H. Zreiqat (2012). Porous scaffolds with tailored reactivity modulate in-vitro osteoblast responses. *Materials Science and Engineering C*, **32**, 1818-1826.
61. P. Pagagnin. Realizzazione di scaffolds tridimensionali in vitro per la rigenerazione ossea. *Ph.D. Thesis*, Università degli Studi di Padova (IT).

Siti web

62. <http://webmineral.com/data/Hardystonite.shtml>
63. (ultimo accesso: 28/06/2017)
64. <http://webmineral.com/data/Okayamalite.shtml>
65. (ultimo accesso: 28/06/2017)