



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA INDUSTRIALE

Corso di Laurea in Ingegneria dei Materiali

TESI DI LAUREA MAGISTRALE

**BIOCERAMICI A BASE
WOLLASTONITE-APATITE DA POLIMERI
PRECERAMICI E FILLERS**

Relatore: Ing. Enrico Bernardo

Correlatrice: Ing. Laura Fiocco

Laureando: Giovanni Beraldo

Matr: 1035681

ANNO ACCADEMICO 2013-2014

*Ai miei genitori
e a tutte le persone
che mi vogliono bene*

Indice

Abstract	1
Capitolo 1 – I materiali bioceramici	3
1.1 Introduzione	3
1.2 Il tessuto osseo naturale	4
1.3 Definizione e classificazione dei biomateriali	6
1.4 Interazione tra biomateriali e ambiente biologico	8
1.5 Tissue engineering	10
1.6 Ideal scaffold	13
Capitolo 2 – PDCs: Polymer Derived Ceramics	15
2.1 Caratteristiche ed applicazioni del processo	15
2.2 Polimeri preceramici	16
2.2.1 Polimeri a base siliconica	16
2.2.2 Polimeri caricati con fillers	19
2.3 Fasi del processo di trasformazione	21
2.3.1 Formatura	21
2.3.2 Reticolazione	22
2.3.3 Conversione	23
2.4 Bioceramici a base wollastonite (Ca-silicato)	25
Capitolo 3 – Schiume ceramiche a base $\text{CaCO}_3/\text{SiO}_2$	29
3.1 Procedura sperimentale	29
3.1.1 $\text{CaO}/\text{SiO}_2 = 0,8$	32
3.1.2 $\text{CaO}/\text{SiO}_2 = 1,6$	33
3.2 Analisi schiume cellulari	34
3.2.1 Densità	34
3.2.2 XRD	35
3.2.3 Interconnessione porosità	37

3.2.4 Compressione	37
3.2.5 Foto al SEM	40
3.3 Analisi cellulari	43
3.3.1 Test di bioattività	43
3.3.2 Test cellulare	46
3.4 Variante con CaCO ₃ biologico	50
3.4.1 Calcinazione e DTA	50
3.4.2 Analisi dati e confronto	51
Capitolo 4 – Strutture ceramiche a base CaCO₃	55
4.1 Procedura sperimentale	55
4.2 Sinterizzazione CaCO ₃ puro	56
4.3 Tecnica di formatura con polimero sacrificale	58
4.4 Tecnica 3D printing	61
Capitolo 5 – Caratterizzazione e strumentazione	65
5.1 Analisi diffrattometriche	65
5.2 Misure di densità	68
5.3 Analisi termica differenziale	70
5.4 Analisi allo stereomicroscopio	72
5.5 Microscopio elettronico a scansione SEM	72
5.6 Prove meccaniche in compressione	74
Conclusioni	77
Ringraziamenti	79
Riferimenti bibliografici	83

Abstract

Il presente lavoro di tesi è incentrato sullo sviluppo di una nuova strategia di sintesi per creare scaffold bioceramici ad alta porosità a base wollastonite-idrossiapatite per rigenerazione ossea. Grazie a questa nuova tecnologia, trattata nel secondo capitolo della presente tesi, si possono ottenere materiali ceramici funzionali avanzati, prodotti dalla pirolisi controllata di polimeri preceramici caricati con fillers di varia natura. Nella produzione delle schiume a base carbonato di calcio e silice, obiettivo preponderante del lavoro sperimentale, si è sfruttata la formazione in situ di pori e l'utilizzo di fillers per la creazione di porosità controllata. L'introduzione di fillers (riempitivi) rappresenta una delle strategie più diffuse per ottenere un'efficace compensazione del ritiro volumetrico associato alla conversione ceramica dei precursori polimerici, che rappresenta la principale criticità della presente tecnica produttiva. Nel capitolo tre verranno descritte le due principali composizioni indagate, la tecnica di sintesi utilizzata ed i risultati sperimentali ottenuti ai fini della caratterizzazione meccanica, fisica, chimica e biologica per entrambe le tipologie di campioni. L'efficacia del metodo viene provata dall'analisi di diffrazione ai raggi X che mostra l'effettiva presenza delle fasi cristalline previste. Porosità, distribuzione delle dimensioni delle interconnessioni e resistenza meccanica misurate sono risultate adatte alla penetrazione cellulare ed alla rigenerazione ossea. Le analisi di bioattività e di crescita cellulare in vitro sui costrutti hanno evidenziato l'effettiva biocompatibilità degli scaffold prodotti. Il capitolo 4 tratta invece di nuove tecniche di formatura inerenti a materiali aventi composizione preponderante di carbonato di calcio, da sviluppare ed implementare in relazione a future ricerche. A seguito della sezione prettamente sperimentale un ultimo capitolo, il quinto, viene dedicato alla presentazione della strumentazione utilizzata nell'ambito di tesi e alla descrizione delle tecniche di caratterizzazione impiegate, riassumendo il funzionamento degli strumenti e riportando le leggi matematiche di cui ci si è serviti per l'ottenimento dei dati numerici.

Capitolo 1

I materiali bioceramici

1.1 Introduzione

“ Se puoi creare un materiale che sopravvive all’esposizione a radiazioni ad alta energia, puoi ottenere un materiale che sopravviva all’interno del corpo umano? ”.

Questa è la domanda che nell’estate del 1967 il Col. Klinker pose ad L.L.Hence durante un trasferimento verso la U.S. Army Material Reserch Conference tenutasi a New York City.

La domanda fu dettata dalla consapevolezza, acquisita dal colonnello durante la guerra del Vietnam, che le tecnologie mediche del tempo non riuscivano a fornire materiali, sfruttabili come protesi, che non venissero rigettati dal corpo. Questa conversazione fu lo spunto per il tentativo di sviluppare qualcosa di nuovo, cioè creare un materiale che non formasse tessuto cicatriziale all’interfaccia, ma desse luogo ad un legame vivo con i tessuti danneggiati. Il materiale Bioglass® creato qualche anno dopo fu la risposta a tale domanda nonché il primo materiale bioceramico prodotto e brevettato.

Una categoria di materiali proposti come biomateriali adatti alla funzione di sostituire i tessuti danneggiati o malati, è quella dei materiali ceramici; essi hanno avuto negli ultimi quarant’anni un notevole sviluppo catalizzato 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 ceramico invece ha la possibilità di replicare il tessuto che sarà chiamato a sostituire e quindi potrà non subire rigetto.

Oggi giorno i bioceramici trovano applicazione in vari settori: in ortopedia sono impiegati in prodotti per osteosintesi o sottoforma di rivestimento per le protesi articolari, in otorinolaringoiatria per la sostituzione degli ossicini del padiglione auricolare, in odontoiatria per la realizzazione di denti artificiali e per rivitalizzare lo smalto dentario danneggiato, nel settore cardiovascolare per il rivestimento in carbonio pirolitico delle valvole cardiache.

I principali bioceramici conosciuti sono: l’allumina (Al_2O_3), importante per la bioinerzia, la durezza, le proprietà tribologiche; altri ceramici bioinerti come il biossido di titanio (TiO_2), il biossido di zirconio (ZrO_2) e le porcellane dure; il carbonio pirolitico, unico per la sua emocompatibilità; i fosfati di calcio, distinti nelle forme di idrossiapatite (HA) e β -tricalcio fosfato al variare del rapporto Ca/P, noti per l’osteconduttività; i biovetri e le biovetroc ceramiche, che oltre ad essere bioattivi e osteoconduttivi hanno il pregio di essere osteoproduttivi.

L'applicazione reale cui sono destinati i bioceramici non è di per se innovativa se vengono considerati meramente come materiali impiegati in riparazioni ossee; tuttavia l'innovazione del lavoro sperimentale risiede in due punti fondamentali:

- La modernità dell'approccio rigenerativo, anziché sostitutivo;
- La tecnica di sintesi avanguardistica scelta (PDCs).

La scelta del bioceramico a base wollastonite-apatite deriva dall'unicità del meccanismo con cui tale materiale forma un legame saldo con l'osso naturale. Nel momento in cui un bioceramico entra a contatto con i fluidi corporei, viene rivestito di uno strato di idrossiapatite, la quale si presta al legame con l'osso in virtù della sua strettissima somiglianza; ciò equivale a dire che questa famiglia di bioceramici rispondono agli intenti dell'ingegneria tissutale, ossia indurre il corpo umano a "ripararsi da se", sotto opportuni stimoli, evitando il ricorso alla chirurgia sostitutiva nonché agli interventi invasivi per l'innesto di protesi permanenti (che vanno tuttavia sostituite una volta raggiunta la loro vita utile).

1.2 Tessuto osseo naturale

Il tessuto osseo umano è una forma specializzata di tessuto connettivo, caratterizzata dalla mineralizzazione della matrice extracellulare che conferisce al tessuto una notevole durezza e resistenza. Nonostante la sua durezza e resistenza alla pressione e alla trazione, l'osso è molto leggero; questa associazione alla massima resistenza con il minimo peso necessario e sufficiente, è dovuta alla sua straordinaria organizzazione interna. L'osso non è un tessuto "statico", ma è continuamente rinnovato e rimodellato per tutta la durata della vita. Questo continuo processo di rimodellamento, oltre ad avere una funzione meccanica, assolve al compito fondamentale di regolare la concentrazione di calcio nel plasma.

Il tessuto osseo è il tessuto costitutivo principale dello scheletro, che costituisce l'impalcatura interna del corpo, protegge i visceri e le parti molle e dà inserzione ai muscoli e ai tendini; accoglie inoltre nelle sue cavità il midollo osseo. Oltre a queste funzioni meccaniche, il tessuto osseo svolge un ruolo fondamentale nel ricambio del calcio: le ossa rappresentano la principale sede di deposito del calcio, da cui lo ione Ca^{2+} è continuamente mobilizzato per il mantenimento dell'equilibrio omeostatico dell'organismo.

Il tessuto osseo è costituito da cellule e da una matrice extracellulare, organica ed inorganica. La matrice organica è composta da fibre collagene e da una sostanza amorfa, nella cui costituzione entrano glicoproteine e proteoglicani.

La caratteristica più saliente del tessuto osseo maturo è la sua struttura lamellare: il tessuto è organizzato in 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; le cellule ossee (osteociti) sono accolte in cavità a forma di lente biconvessa, scavate nella matrice calcificata, denominate lacune

ossee. 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.

Come già detto, una delle caratteristiche distintive del tessuto osseo, che lo differenzia dagli altri tipi di connettivi, è quella di possedere elementi minerali nella sua matrice, che vanno a costituire una impalcatura dura e compatta essenziale per le funzioni di sostegno e di locomozione proprie dell'osso stesso.

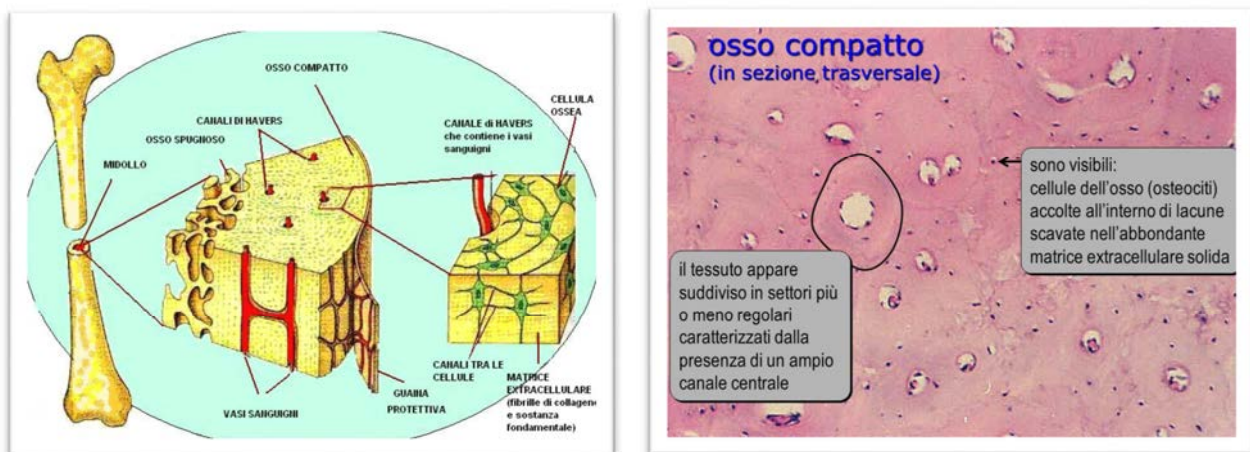


Figura 1.1 Struttura minerale dell'osso umano

La sostanza intercellulare dell'osso è costituita da due componenti: la matrice organica e la matrice inorganica: la matrice inorganica o minerale dell'osso aumenta durante lo sviluppo e l'accrescimento, raggiungendo nell'adulto il valore del 65% circa del peso secco dell'osso. La composizione della matrice minerale varia con l'età e in rapporto a vari fattori dietetici ed è costituita principalmente da calcio, combinato con ossigeno, fosforo e idrogeno a formare una molecola cristallina definita idrossiapatite. Gli studi di diffrazione ai raggi X dimostrano che i minerali sono principalmente presenti come cristalli submicroscopici di una varietà di apatite simile all'*idrossiapatite* (HA), avente formula bruta $[Ca_{10}(PO)_4(OH)_2]$. Le indagini chimiche rivelano che i sali di calcio sono combinati con il collagene e con i proteoglicani della matrice organica. Al microscopio elettronico i cristalli di idrossiapatite appaiono come sottili aghi prismatici, lunghi 20-40 nm e spessi 1,5-3 nm. Studi di microscopia elettronica dimostrano inoltre che i cristalli minerali sono distribuiti come particelle contigue lungo i fasci di fibrille collagene ma anche lungo le singole fibrille e nello spessore delle fibrille stesse, con le quali si combinano chimicamente. Durante la calcificazione dell'osso, i cristalli di idrossiapatite si allineano ordinatamente lungo le fibrille collagene, dapprima a intervalli regolari di 60-70 nm e successivamente per tutta la loro estensione. L'osso decalcificato perde la sua durezza e rigidità e diventa flessibile, ma conserva la resistenza alla trazione, la forma macroscopica e la struttura microscopica. Quando invece sono distrutti i suoi costituenti organici (fibre e cellule), mediante calcinazione (combustione prolungata con libero accesso di aria), un trattamento che risparmia la componente minerale, l'osso conserva la forma e

le dimensioni originali ma perde la sua resistenza diventando estremamente fragile. Questi dati dimostrano che i costituenti inorganici dell'osso sono 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 Definizione e classificazione dei biomateriali

Correva l'anno 1974 quando, durante il VI Simposio Annuale Internazionale, si cercò di dare una definizione esaustiva di biomateriale:

“Biomateriale è una sostanza inerte, sia nei confronti dell'organismo che dal punto di vista farmacologico, progettata per essere impiantata o incorporata in un sistema vivente”.

Per rispondere a tali requisiti, i biomateriali sono 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. Infatti, i biomateriali sono usati nella costruzione di dispositivi e impianti biomedici, progettati al fine di riparare o sostituire un tessuto vivente danneggiato o per ripristinare una funzionalità compromessa.

Esistono varie sottocategorie di materiali biocompatibili. Possono essere classificati sulla base degli effetti prodotti sul materiale stesso in seguito all'innesto: da qui la distinzione tra biostabili e biodegradabili. Oppure sulla base dell'interazione materiale-organismo: da qui la definizione di biotossici, bioinerti, biorisorbibili. Infine, sulla base della loro natura chimica: polimerici, metallici, ceramici, compositi, biologici.

Sono definiti *biostabili* i materiali che, impiantati, non subiscono sostanziali trasformazioni chimiche o fisiche nel tempo; al contrario sono *biodegradabili* i materiali che, impiantati, subiscono trasformazioni.

Biotossici sono i materiali che provocano reazioni avverse dell'organismo; possono essere quei materiali contenenti nichel, cadmio, vanadio, carburi, metilmetacrilati ed altri.

Sono *bioinerti* i materiali stabili dal punto di vista chimico-fisico, non tossici e che presentano interazioni minime con l'ambiente biologico, permettendo una buona coesistenza fra impianto ed organismo, pur rivestendosi di tessuto cicatriziale in quanto **non esiste** materiale completamente inerte a contatto col corpo umano! Esempi di materiali bioinerti: tantalio, titanio, alluminio,

zirconio, polietilene ad altissimo peso molecolare (UHDPE), acciaio. Essi infatti sono molto usati nelle protesi d'anca, tuttavia è notevole la differenza di rigidità (modulo di Young) fra metallo ed osso e ciò provoca lo *stress shielding*, ossia uno sbilanciamento della distribuzione del carico rispetto alla condizione fisiologica, nel momento in cui si trasferisce dall'osso al metallo, con conseguente parziale atrofizzazione degli osteoblasti non sollecitati.

I materiali *biorassorbibili* sono costituiti esclusivamente da sostanze che possono essere metabolizzate dall'organismo dissolvendosi in presenza dei fluidi corporei e i cui prodotti di dissoluzione vengono espulsi tramite i reni. In tale categoria rientrano: Acido Poliglicolico (PGA), Acido Polilattico (PLA), fosfati di calcio, biovetri. Vengono utilizzati quando la loro presenza nell'organismo è solo temporaneamente desiderata; vengono poi gradualmente rimpiazzati dal tessuto biologico.

Sono *bioattivi* i materiali che 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.

La bioattività viene valutata sulla base di un parametro (I_B) che la relaziona al tempo ($t_{0,5}$) impiegato dal 50% della superficie del materiale di legarsi all'osso, come si vede nell'Eq.1.1:

$$I_B = 100/t_{0,5} \quad \text{Eq.1.1}$$

In tale categoria rientrano due diversi tipi di materiali: materiali 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. I bioceramici sviluppati in questa tesi fanno parte di tale sottocategoria.
- 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. Essi danno luogo a reazioni all'interfaccia non molto veloci e minimo rilascio di ioni.

1.4 Interazione tra biomateriali e ambiente biologico

Nei primi istanti temporali successivi all'impianto del biomateriale nell'organismo umano avvengono delle intrinseche dinamiche interfacciali indipendenti dal tipo di biomateriale innestato. L'ambiente biologico è attivo e aggressivo nei confronti dei corpi riconosciuti come *non-self*: per tale ragione l'interfaccia tra il biomateriale e l'ambiente biologico è sede di un importante catena di eventi che condizionano sempre il successo o il fallimento dei dispositivi protesici.

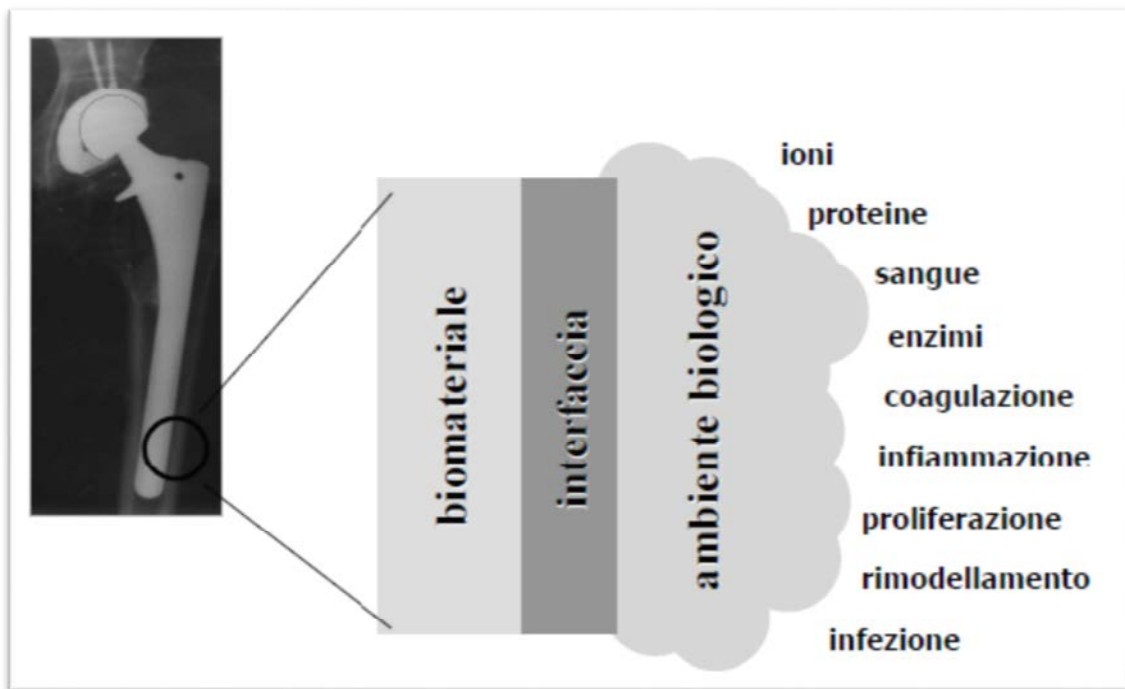


Figura 1.2 Schematizzazione del contatto biomateriale-ambiente biologico (protesi d'anca)

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: tale processo coinvolge sempre le fasi di coagulazione, infiammazione, proliferazione cellulare, rimodellamento tessutale 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 molteplici:

- 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 e quindi ad infezioni e formazione di capsule fibrotiche;
- La durata che spesso è limitata e richiede un secondo intervento di revisione o sostituzione (una tradizionale protesi d'anca in titanio ha una vita di esercizio di 12-15 anni in media);
- 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.

Si possono venire a creare 2 tipi di interazioni tra l'impianto ed il tessuto:

- Interazione *extracellulare* che è determinata dalle caratteristiche della superficie del materiale. Una porosità nanometrica in superficie e la presenza di gruppi Si-OH giocano un ruolo importante sull'assorbimento di proteine e collagene da parte del materiale. L'assorbimento delle proteine è seguito dalla coagulazione e dall'attivazione del sistema di adesione cellulare. Le interazioni tra i ricettori degli osteoblasti e i corrispondenti leganti per le proteine contribuiscono all'adesione cellulare. Un'altra conseguenza importante dell'assorbimento delle proteine è la trasformazione degli zimogeni in enzimi attivi. Tutte le sostanze presenti sulla superficie dell'impianto hanno un effetto diretto sulla differenziazione delle cellule e sulla loro proliferazione. Sulla superficie dei ceramici bioattivi è favorita la proliferazione degli osteoblasti rispetto a quella dei fibroblasti (cellule tipiche del tessuti connettivo).
- Interazione *intracellulare* che può essere causata dal rilascio di silicio solubile dalla superficie dei biomateriali con alti valori di I_B . Studi hanno dimostrato che il silicio solubile è un potente mitogeno per le cellule umane simili agli osteoblasti, aumentando la sintesi del DNA e favorendo il rilascio dell'osteocalcina. Pertanto tale elemento gioca un ruolo fondamentale nella riparazione dei tessuti e nell'osteogenesi.

Gli osteoblasti (cellule che formano il tessuto osseo) creano una matrice extracellulare che mineralizza sottoforma di minerale nano-cristallino e collagene sulla superficie dell'impianto, mentre la degradazione progressiva dello stesso continua nel tempo.

Per gli scaffolds bioattivi è necessario essere in grado di controllare la velocità di solubilità, o di dissoluzione, del materiale di cui sono composti: è necessaria 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 bioreattività al fine di sviluppare nuovi materiali per la rigenerazione dei tessuti *in situ* e per la *tissue engineering*.

1.5 Tissue engineering

La *tissue engineering* è emersa come un approccio promettente per la riparazione e la rigenerazione dei tessuti e organi persi o danneggiati in conseguenza di traumi, lesioni, malattie o dell'invecchiamento. Ha inoltre la potenzialità di superare il problema della carenza di tessuti ed organi disponibili per i trapianti.

Nell'approccio più comune uno *scaffold* con un'architettura ben definita funge da struttura temporanea per l'attecchimento cellulare, la loro proliferazione e differenziazione nei tessuti ed organi desiderati.

Attualmente lo standard migliore nella chirurgia ricostruttiva consiste nell'autotrapianto, cioè nell'asportazione del tessuto del paziente da un sito donatore e nel trapianto nel sito danneggiato. Alternative sono gli *omoinnesti* (trapianto da un altro paziente) e gli *eterotrapianti* (tessuti provenienti da specie diverse). Tutti gli impianti ortopedici attuali sono carenti nelle tre caratteristiche più importanti dei tessuti viventi: la capacità di auto-ripararsi, l'abilità di mantenere un corretto apporto di sangue e la capacità di modificare la loro struttura e le loro proprietà in risposta ai fattori ambientali come ad esempio un carico meccanico. Hanno, inoltre, una durata limitata e poiché l'aspettativa di vita cresce continuamente, è richiesto uno spostamento dell'attenzione dalla sostituzione dei tessuti alla loro rigenerazione, in modo da soddisfare la crescente richiesta di riparazioni ortopediche a lungo termine.

Una strada per ripristinare i tessuti malati o danneggiati al loro stato originario sarebbe quella di applicare la *tissue engineering* ai tessuti in laboratorio. In una tipica applicazione le cellule dovrebbero essere prelevate dal paziente (le cellule osteogeniche nel caso del tessuto osseo) e seminate su di uno *scaffold* sintetico che funge da substrato e da stimolo per la crescita del tessuto in tre dimensioni, creando così un biocomposto vivente; questo costruito può essere impiantato di nuovo nel paziente. Con il passare del tempo, tale struttura dovrebbe riassorbirsi progressivamente nel corpo creando prodotti di decomposizione non tossici, alla stessa velocità con cui le cellule producono la loro matrice extracellulare.

La figura 1.3 mostra i cambiamenti che avvengono nella popolazione delle cellule progenitrici degli osteoblasti in presenza di prodotti ionici di dissoluzione biologicamente attivi.

Al fine di formare nuovo tessuto osseo è essenziale che le cellule progenitrici subiscano la mitosi. Le cellule osteoprogenitrici presenti devono ricevere gli stimoli chimici corretti dall'ambiente che le

circonda, in modo da permettere l'inizio delle parti attive del ciclo cellulare. Le cellule a riposo sono nella fase G0. Ogni nuovo ciclo cellulare inizia dopo che una cellula ha completato la mitosi precedente. Se l'ambiente chimico circostante è adatto, dopo un periodo critico di crescita nella fase G1, la cellula entra nella fase S in cui comincia la sintesi del DNA. La fase S porta eventualmente alla duplicazione di tutti i cromosomi del nucleo. Ora la cellula è pronta per subire la mitosi in una seconda fase chiamata G2. Durante questa fase la cellula si prepara a dividersi e controlla l'accuratezza della duplicazione usando gli enzimi riparatori del DNA. Per la transizione G2-M è necessario un aumento critico della massa e la sintesi e attivazione di diversi fattori di crescita. Se l'ambiente non permette il completamento della fase G1 o della G2, le cellule procedono ad una soppressione programmata chiamata apoptosi.

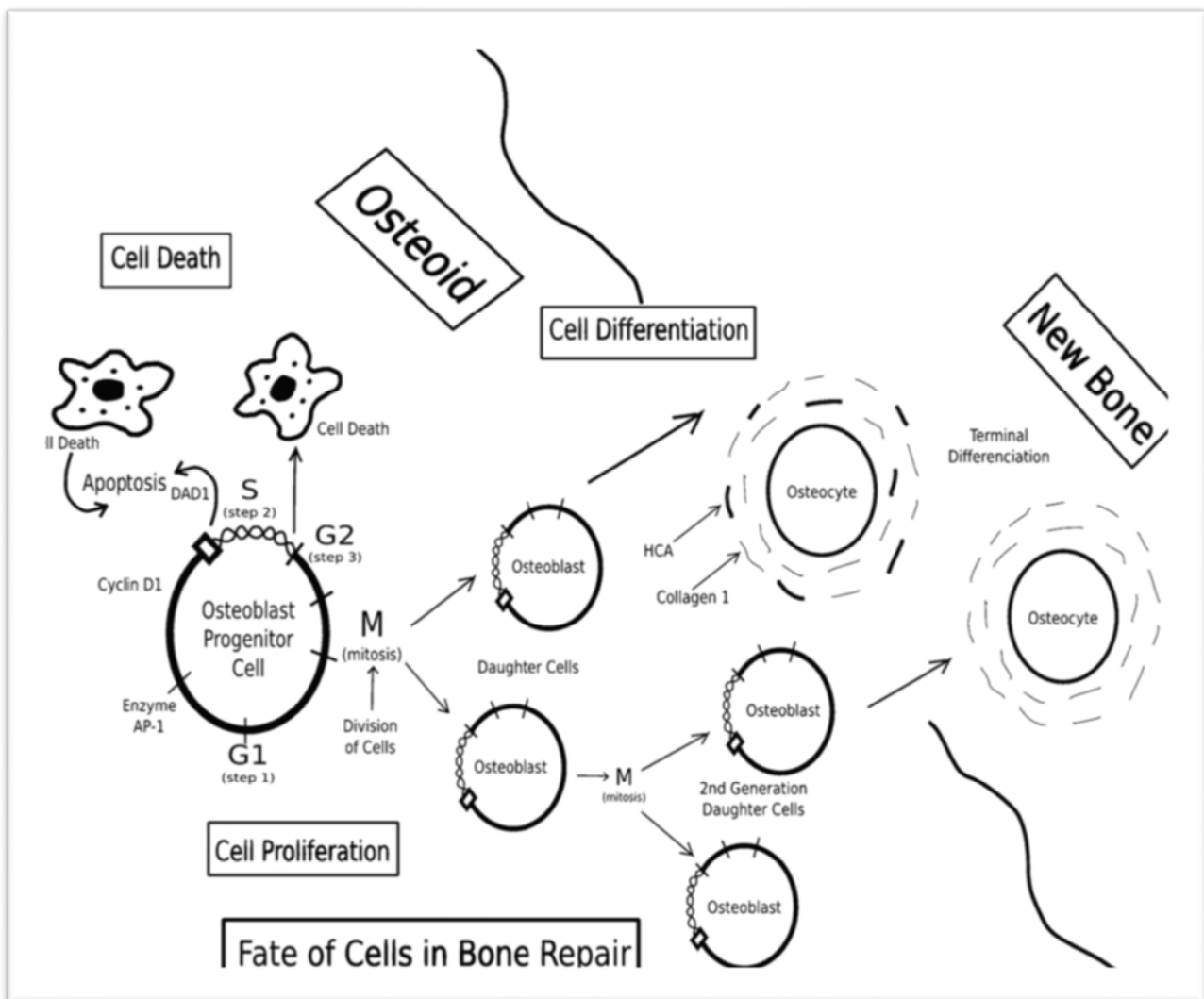


Figura 1.3 Schematizzazione del ciclo delle cellule osteogeniche

I materiali bioinerti o quelli bioattivi di classe B non producono le condizioni che permettano alle poche cellule osteoprogenitrici presenti di superare i check-points del ciclo. Solo i materiali di classe A sono in grado di consentire una rapida formazione dell'osso *in vivo* tramite un processo chiamato osteoproduzione.

L'architettura 3D dell'osso mineralizzato è creata dagli osteoblasti quando le cellule vengono esposte a concentrazioni critiche di elementi insolubili rilasciati dai materiali bioattivi. Il ruolo della vetroceramica è principalmente quello di rilasciare le concentrazioni critiche di ioni biologicamente attivi alla velocità necessaria per la proliferazione e la differenziazione delle cellule. I marcatori cellulari suggeriscono che la crescita delle cellule su materiali inerti o di classe B, come substrati di HA densa, non è in grado di formare nuovo osso mineralizzato ma fornisce una struttura più simile a quelle che si trovano nei tessuti cicatriziali.

Il ciclo delle cellule non fornisce solo la struttura per la proliferazione delle stesse, ma determina anche la funzione e la differenziazione di alcune cellule esistenti. Le cellule dell'osso coprono un largo intervallo di fenotipi che include principalmente gli osteoblasti, cellule in grado di sintetizzare prodotti specifici per le cellule dell'osso come il collagene di tipo I. Tuttavia una popolazione fondamentale di cellule dell'osso è data dagli osteociti; questi sono in grado di sintetizzare e mantenere la matrice mineralizzata dell'osso in cui risiedono. Così, gli osteociti rappresentano la popolazione di cellule responsabile della produzione della matrice extracellulare e della mineralizzazione, che rappresenta lo step finale nello sviluppo dell'osso e probabilmente anche il più cruciale data l'importanza del legame tra collagene e HCA che determina le funzionalità meccaniche dell'osso.

Quindi, la formazione del tessuto osseo avviene in varie fasi:

- Attivazione e migrazione di cellule mesenchimali indifferenziate, mediante chemiotassi;
- Ancoraggio cellulare alla matrice, grazie alla fibronectina;
- Mitosi e proliferazione delle cellule mesenchimali guidata dai fattori di crescita;
- Mineralizzazione della cartilagine;
- Iniziazione vascolare e condrolisi;
- Differenziazione di osteoblasti e deposizione di matrice ossea;
- Mineralizzazione del nuovo tessuto.

Inoltre, la formazione di tessuto osseo richiede necessariamente la presenza di:

- Un segnale osteoconduttivo;
- Un substrato in grado di ricevere il segnale e in grado di fare da supporto per la neoformazione dell'osso (delivery-system);
- Cellule rispondenti: cellule indifferenziate in grado di differenziarsi in cellule ossee, fibroblasti e cementoblasti.

1.6 Ideal scaffold

La progettazione di una protesi artificiale ha come obiettivo la realizzazione di un dispositivo che replichi un organo o un tessuto naturale sia dal punto di vista funzionale sia da quello morfologico. Diventa quindi necessaria la conoscenza dell'organo/tessuto naturale che si vuole riprodurre e saper conoscere sommariamente i vincoli (prestazioni, forma...) e le possibili interazioni tra protesi artificiali e tessuto, a seguito dell'impianto nel corpo.

Quando un dispositivo biomedico viene impiantato in un organismo vivente, il tessuto interessato reagisce alla presenza di questo corpo estraneo tramite una serie di fenomeni che vengono definiti come *host response*. Il primo evento che si verifica al contatto materiale-ambiente biologico è l'adsorbimento proteico sulla superficie dell'impianto. Tale fenomeno influenza il successo dell'impianto, permettendo l'instaurarsi di interazioni fra materiale e tessuto biologico. L'adsorbimento delle proteine è influenzato sia dall'adesione cellulare che dalla coagulazione del sangue. La modalità e la forma con cui le proteine interagiscono con la superficie esterna sono fondamentali per le fasi successive, fra le quali l'instaurarsi di interazioni cellula-superficie e cellula-cellula. La superficie del materiale risulta quindi importantissima nelle prime fasi dell'implantologia, poiché guida il tipo e la morfologia delle cellule che vanno ad accrescersi su di essa. L'interazione fra la superficie e il tessuto in formazione dipende dalla biocompatibilità, dalla bioattività e dalla morfologia superficiale del materiale protesico. La bioattività e la biocompatibilità di un materiale possono essere valutate mediante prove in vitro di coltura cellulare e incubazione proteica.

Uno scaffold ideale è quello che replica la matrice extracellulare del tessuto che deve essere rimpiazzato e quindi può funzionare come *template* in tre dimensioni sul quale le cellule possono legarsi, moltiplicarsi e migrare. I criteri che uno scaffold ideale per la rigenerazione ossea deve rispettare sono i seguenti:

- Essere costituito di un materiale biocompatibile e quindi non citotossico;
- Fungere da *template* per la crescita dei tessuti in 3 dimensioni;
- Avere un network di macro-pori interconnessi, con pori del diametro maggiore di 100 μm per la penetrazione delle cellule, la crescita dei tessuti, la vascolarizzazione e il trasporto dei nutrienti verso il centro del tessuto che si sta rigenerando sull'impianto. Inoltre deve possedere meso-pori ($2 \text{ nm} < \text{misura pori} < 50 \text{ nm}$) che promuovono l'adesione cellulare;
- Legarsi al tessuto ospitante senza la formazione di tessuto cicatriziale: è quindi costituito di un materiale osteoconduttivo;
- Possedere una morfologia superficiale che promuove l'adesione delle cellule e l'assorbimento dei metaboliti biologici;
- Influenzare i geni nelle cellule che rigenerano l'osso in modo da permettere una differenziazione ed una proliferazione cellulare efficiente;
- Riassorbirsi alla stessa velocità con cui viene riparato il tessuto creando prodotti di degradazione non tossici e che possono essere espulsi facilmente dal corpo;

- Deve poter essere creato con dei processi che forniscono dei componenti dalla forma irregolare che deve combaciare perfettamente con quella del difetto dell'osso del paziente;
- Possedere proprietà meccaniche sufficienti a permettere la rigenerazione dei tessuti in applicazioni particolari come quelle delle ossa in siti portanti;
- Avere la potenzialità di essere riproducibile commercialmente e sterilizzabile rispettando gli standards richiesti a livello internazionale per quanto concerne l'utilizzo clinico.

Gli *scaffolds* per la *tissue engineering* sono solitamente costituiti da materiali polimerici biodegradabili, sintetici o naturali. Tuttavia l'uso di questi materiali è difficoltoso per la rigenerazione di ossa portanti dato che possiedono una bassa resistenza meccanica. Invece, sebbene siano fragili, gli *scaffolds* costituiti a partire da materiali inorganici come i bioceramici basati sul calcio fosfato sono in grado di fornire una resistenza meccanica maggiore.

Capitolo 2

PDCs – Polymer Derived Ceramics

La tecnologia PDCs rappresenta la possibilità di realizzare componenti ceramici attraverso una pirolisi controllata di precursori polimerici. Gli steps del processo sono tre: si inizia con la formatura del polimero preceramico, seguito dalla sua reticolazione ed infine si effettua un ciclo termico opportuno per ottenere la trasformazione in ceramico. La varietà dei precursori disponibili e la facilità con cui possono essere manipolati e formati, fanno dei polimeri preceramici una risorsa tecnologica spendibile in numerosi campi.

2.1 Caratteristiche ed applicazioni del processo

I polimeri preceramici furono proposti circa 30 anni fa come precursori per la fabbricazione di ceramici avanzati contenenti silicio, generalmente definiti come ceramici derivati da polimeri o PDCs. Il processo di trasformazione dal polimero al materiale ceramico fu una rivoluzione tecnologica notevole nella scienza e tecnologia dei materiali ceramici e permise lo sviluppo di fibre ceramiche o rivestimenti stabili ad altissime temperature (oltre i 2000°C), ottimizzando alcune proprietà come la resistenza al creep. Negli ultimi anni sono stati fatti enormi progressi nella scoperta di proprietà funzionali associate ai PDCs. Inoltre, le tecniche di caratterizzazione che oggi si spingono fino a scala nanometrica hanno permesso di capire le caratteristiche intrinseche dei PDCs correlate alla loro resistenza chimica, al creep ed al loro comportamento da semiconduttori. Dal punto di vista tecnologico e processistico, tali polimeri vengono utilizzati come leganti chimicamente attivi per la produzione di ceramici tecnici, vengono modificati per permettere la formazione di mesopori ordinati, sono testati per la giunzione di ceramici avanzati con impieghi strutturali nonché sintetizzati in componenti massivi e macroporosi. Molti campi strategici per l'ingegneria sono adatti all'applicazione dei PDCs, tra i quali materiali resistenti alle alte temperature (nel settore automobilistico, aerospaziale, dell'energia), ad elevata durezza, nel campo dell'ingegneria chimica (supporti di catalizzatori, nanotecnologie), come materiali funzionali nella micro e nano elettronica.

I polimeri preceramici 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.

Alcune applicazioni:

- *Fibre*: costituiscono il campo 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.

2.2 Polimeri preceramici

I polimeri preceramici sono polimeri organici-inorganici la cui ossatura contiene solitamente atomi di Si che forniscono un residuo ceramico grazie ad un trattamento termico, attraverso l'eliminazione di frazioni organiche (dovuta alla rottura dei legami C-H nel range di temperature tra 600 e 800°C e al rilascio di H₂, CH₄ ed altri composti volatili).

2.2.1 Polimeri a base silconica

I precursori ceramici attualmente più utilizzati e che hanno avuto maggiore sviluppo sono quelli a base silconica. Essi sono caratterizzati da una catena Si-X e da gruppi funzionali organici legati ad un atomo di silicio:

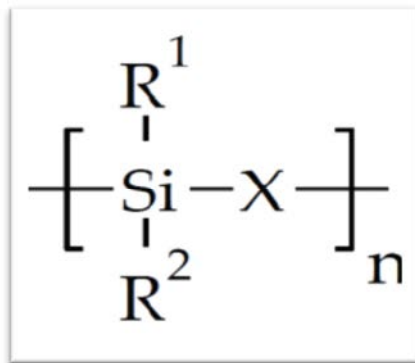


Figura 2.1 Unità strutturale di un polimero silconico

A seconda del gruppo –X- legato in catena, si possono ottenere diversi polimeri preceramici:

- Poliorganosilani (X = Si);
- Poliorganocarbosilani (X = CH₂);
- Poliorganosilossani (X = O);
- Poliorganosilazani (X = NH);
- Poliorganosililcarbodiimmidi (X = [N=C=N]).

Modificando i gruppi funzionali attaccati all'atomo di silicio è possibile modificare proprietà ottiche, elettroniche e reologiche del polimero. Normalmente i gruppi R attaccati all'atomo di silicio sono l'idrogeno, gruppi alifatici o aromatici. In particolare la solubilità, la stabilità termica e la viscosità sono funzione della temperatura e sono caratteristiche importanti per la processabilità del polimero. Inoltre in base ai costituenti è possibile prevedere il contenuto di carbonio nel ceramico derivato.

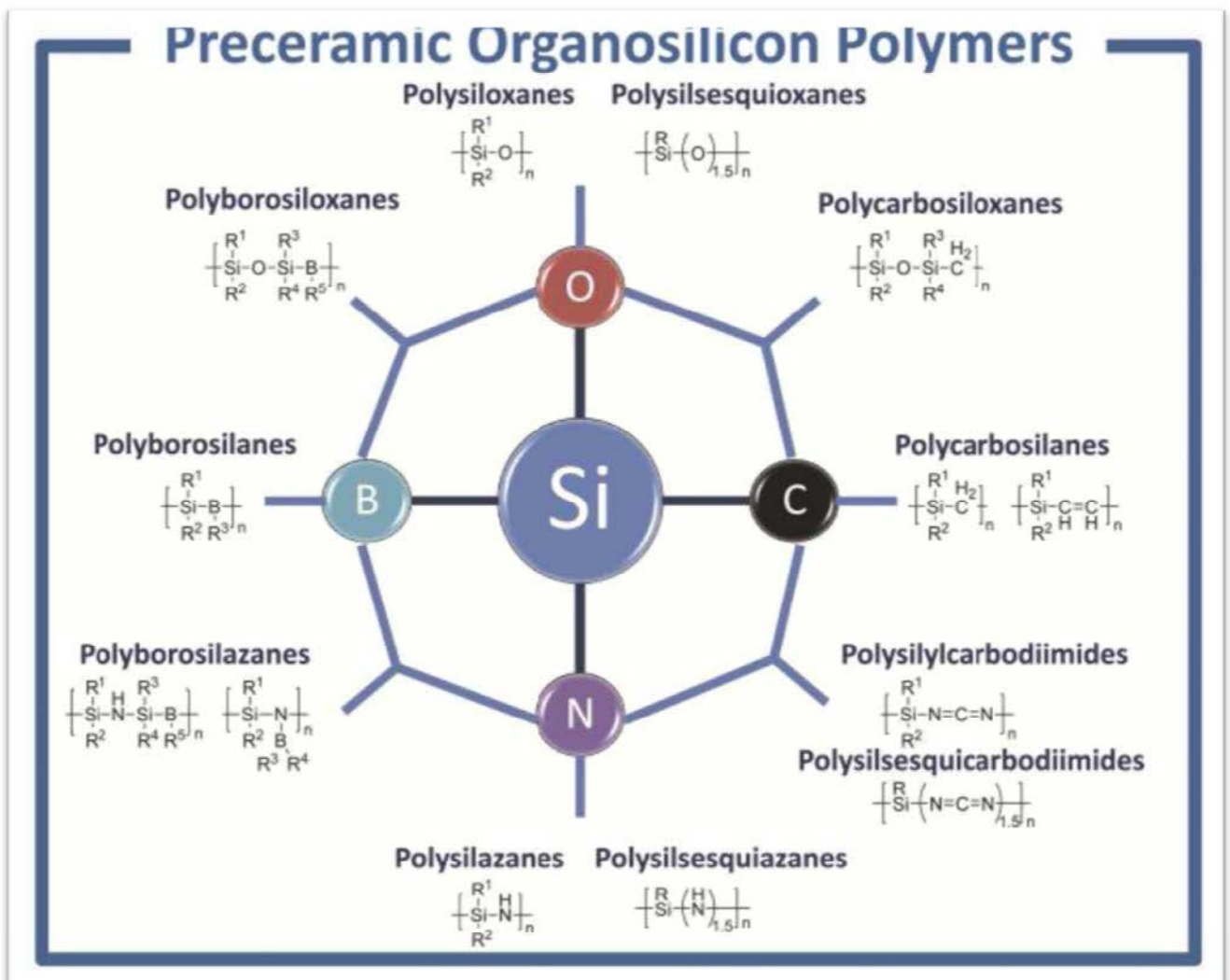


Figura 2.2 Classi principali di precursori ceramici contenenti silicio

Fra tutte le classi di polimeri preceramici, i più impiegati sono i polisilossani (chiamati anche siliconi) poiché uniscono alle proprietà di stabilità chimica e termica costi contenuti.

Le caratteristiche principali espresse da un polimero di questo tipo sono:

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

L'ampio utilizzo dei siliconi è dovuto alla loro semplicità di sintesi e alla stabilità termo-meccanica: ciò li rende 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, bassa idrofobicità e sono liquidi pur avendo elevato peso molecolare.

Il metodo principale di sintesi, nonché il più rapido, prevede la reazione di cloro(organo)silani, prodotti secondari ad alta purezza dell'industria del silicone, con acqua:

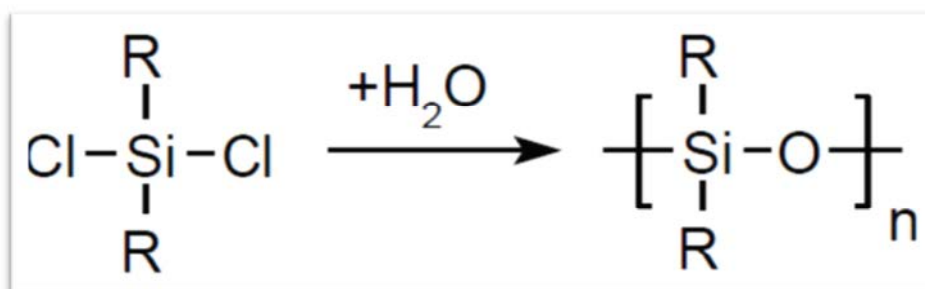


Figura 2.3 Sintesi di polisilossani da clorosilani

La scelta del tipo di polimero preceramico da utilizzare nella soluzione specifica viene ponderato sulla base di vari parametri: il tipo di residuo ceramico prodotto, la quantità di carbonio presente, il comportamento reologico nonché la resa percentuale. Per gli scopi del progetto si sono scelti due tipi di resina siliconica: MK ed H62C.

- Silres® H62C: è un polisilossano contenente metili, fenili, vinili, idrogeno che a temperatura ambiente si presenta viscoso. Reticola grazie alla presenza dei gruppi fenili, senza rilascio di prodotti gassosi. La sua resa ceramica si attesta al 58% in peso, poiché presenta una struttura poco ramificata e abbastanza lineare, permettendo quindi la volatilizzazione dei frammenti a minore peso molecolare;

- Silres® MK: è un metil-fenil polisilossano che si presenta solido sottoforma di polvere a temperatura ambiente. Può essere reticolato termicamente grazie alla presenza dei gruppi funzionali –OH, con liberazione di H₂O, oppure utilizzando adeguati catalizzatori. Al termine della pirolisi, mostra una resa in SiO₂ pari all'84% in peso; un valore tanto elevato è dovuto alla presenza di catene molto ramificate.

Preceramic polymer	Main ceramic phase (processing in inert atmosphere at 1000°C)	Physical form	Glass transition temperature [°C]	Ceramic yield (at 1000°C in N2/Air) wt%	Class	Composition (1000°C in N ₂)
H62C	SiOC	Liquid	-	58	Methylphenylvinyl -hydrogen- polysiloxane	n.a.
MK	SiOC	Powder	35-55	84	Methyl- polysilsesquioxane	SiO _{1.52} C _{0.64}

Tabella 2.1 Caratteristiche tecniche dei polimeri PDCs utilizzati

2.2.2 Polimeri caricati con fillers

La conversione da polimero a ceramico si realizza con notevole rilascio di gas, un ritiro volumetrico superiore al 30% e la formazione di porosità micro e macrometriche. Questi fenomeni si traducono nella presenza, all'interno del componente, di numerose cricche e difetti che comportano la trasformazione da polimero preceramico a manufatto ceramico completamente densificato virtualmente irraggiungibile, se non per dimensioni molto ridotte (qualche centinaio di micrometri). L'introduzione di fillers (riempitivi) è la soluzione migliore per ottenere componenti massivi con una porosità residua ridotta. I fillers possono essere di diversa natura (polimerica, metallica, ceramica) e di dimensioni e forma diversificata (polveri micro e nanometriche, fogli, nanotubi, fibre lunghe o corte); possono inoltre dividersi a seconda della reattività in attivi o passivi.

I fillers *passivi* sono inerti e quindi non reagiscono con il polimero preceramico in nessuna fase del trattamento termico. Hanno lo scopo principale di diminuire il ritiro volumetrico durante la ceramizzazione, eliminando la presenza di micro difetti come cricche o pori di dimensioni elevate, creando una via d'uscita per i gas generati durante la trasformazione. Le polveri ceramiche aggiunte possono costituire la frazione volumetrica preponderante; in tal caso il polimero preceramico costituisce una fase legante attiva che permette una maggiore densificazione rispetto ai leganti polimerici tradizionali.

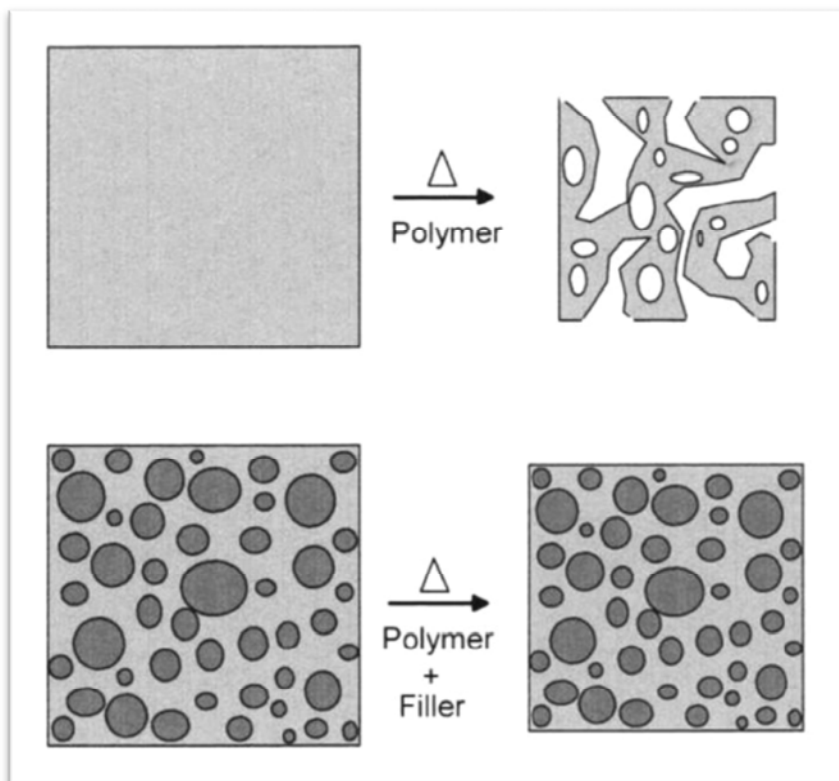


Figura 2.4 Riduzione del ritiro volumetrico e della porosità caricando il PDC con fillers passivi

I fillers *attivi* sono quelli in grado di reagire con i residui gassosi, l'atmosfera di trattamento e il residuo ceramico per dare vita a carburi, nitruri, ossidi e siliciuri. Il conseguente aumento di volume dovuto alla formazione di tali composti, anche del 50%, è in grado di compensare efficacemente il ritiro generato dal polimero e consente la realizzazione di componenti “*near net-shape*”. Il risultato, infatti, è un componente ceramico che può avere forma complessa e che può subire ritiri volumetrici anche inferiori allo 0,1% grazie ad un preciso controllo dei fattori tempo e temperatura durante la fase di pirolisi.

La combinazione di diversi polimeri di partenza con fillers attivi o passivi come fibre o particelle, offre la possibilità di creare materiali molto diversi con numerose strutture realizzabili: tali strutture sono caratterizzate da un reticolo tridimensionale interconnesso del filler reagito con la matrice del polimero ceramizzato. Le proprietà meccaniche del componente dipendono in primo luogo dalla porosità residua; la tenacità a frattura, il modulo di Young e la resistenza allo shock termico vengono migliorati con l'inserimento di un filler in percentuali massime attorno al 50%, dopodiché si osserva un rapido calo delle proprietà dovuto all'ulteriore presenza di porosità che non risulta eliminabile se non effettuando un trattamento a temperature sensibilmente più elevate, a discapito peraltro di altre proprietà.

2.3 Fasi del processo di trasformazione

Il precursore polimerico rappresenta un sistema inorganico/organometallico in grado di portare alla formazione di un ceramico di definita composizione chimica ed organizzazione strutturale, attraverso una precisa serie di trattamenti, che costituiscono l'*iter* base di ogni processo operante con i PDCs. Questo processo può essere idealmente diviso in tre fasi: formatura, reticolazione del polimero e successiva conversione ceramica con trattamento di pirolisi (definita anche fase di *curing* del polimero).

Gli intervalli termici in cui avvengono tali stadi sono rappresentati in Figura 2.5:

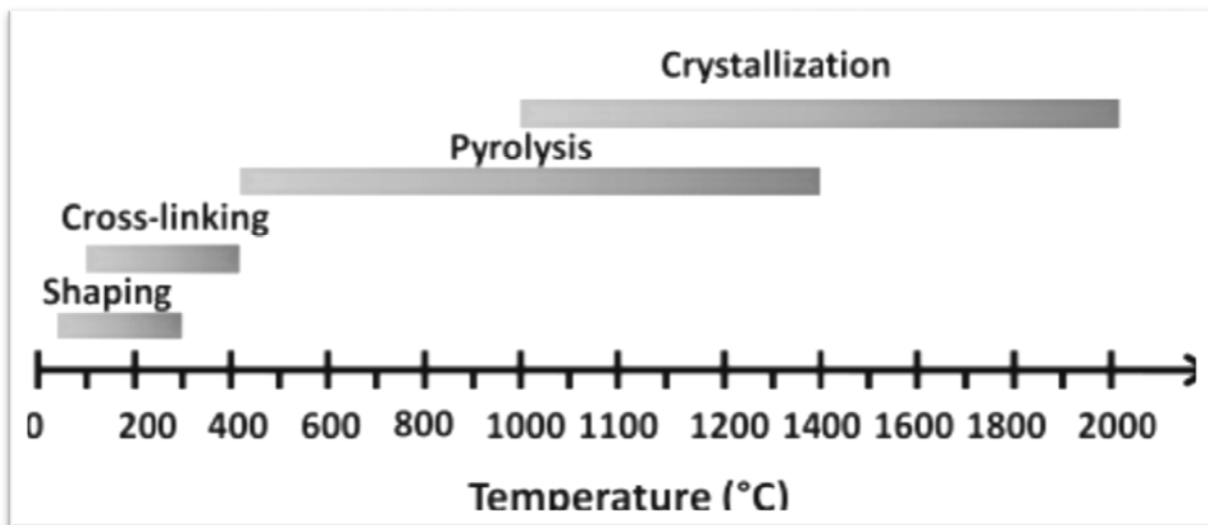


Figura 2.5 Fasi del processo di trasformazione in funzione della temperatura

La fase di formatura viene preceduta dall'aggiunta dei fillers al polimero e dalla miscelazione, operazione condotta a temperatura ambiente, con lo scopo di creare un composto omogeneo.

2.3.1 Formatura

Questo stadio del processo di trasformazione dei precursori rappresenta l'aspetto più vantaggioso di tale tecnologia, poiché essi sono di natura polimerica alla temperatura di lavorazione e quindi possono essere formati con le tradizionali tecniche di processabilità dei polimeri, numerose e semplici da gestire. Tra queste si segnalano oltre allo stampaggio, soffiatura ed estrusione anche iniezione, estrusione, RTM (Resin Transfer Molding), infiltrazione polimerica e filatura di fibre.

L'utilizzo dei polimeri preceramici non caricati con fillers permette esclusivamente di ottenere fibre, rivestimenti e ceramici porosi, a causa dell'evoluzione della fase polimerica nel corso della trasformazione successiva alla formatura.

La scelta fra le differenti tecniche deve prendere in considerazione, oltre alla tipologia di prodotto finito che si intende ottenere, anche la natura dei precursori stessi. Infatti i polimeri preceramici possono essere liquidi o solidi, in funzione della loro architettura e del loro peso molecolare. Se solidi possono essere sciolti in svariati solventi organici o essere fusi a basse temperature

(generalmente $< 150^{\circ}\text{C}$). Questo fatto spesso conduce a componenti che possiedono dettagli molto accurati rispetto ai sistemi basati sulle polveri.

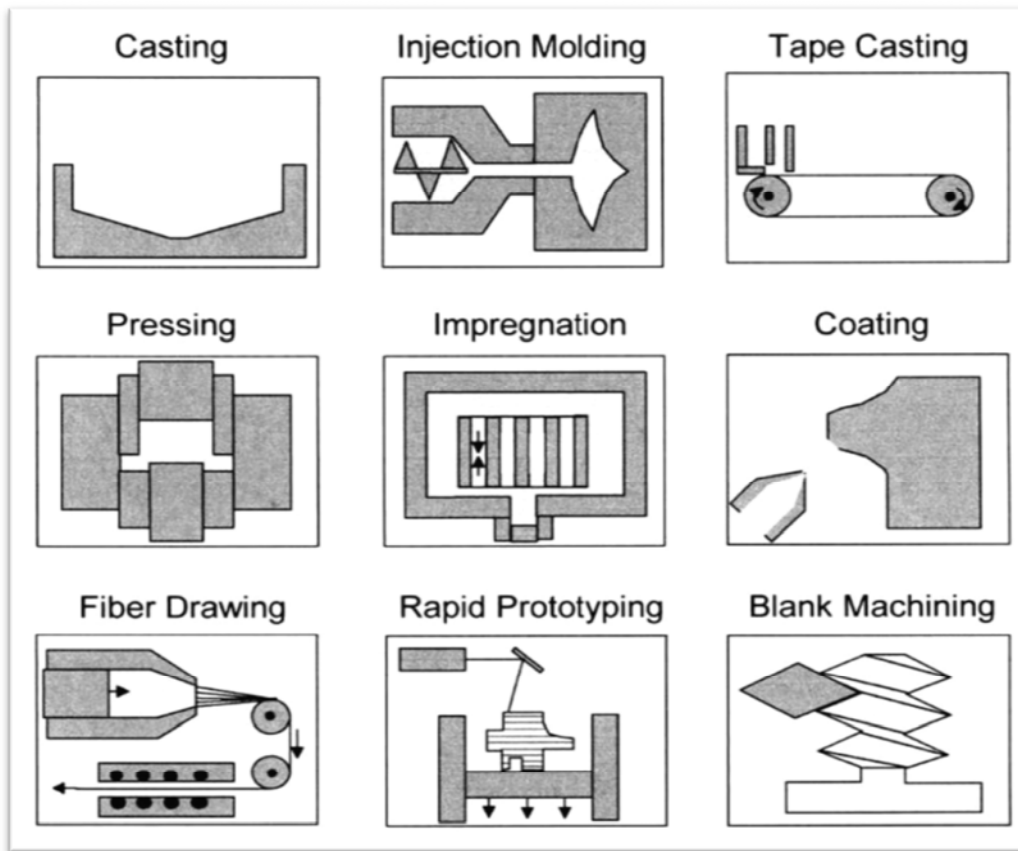


Figura 2.6 Tecnologie di formatura per PDCs

Data la forma alla massa iniziale, l'oggetto costituito dal polimero preceramico prosegue la sua trasformazione attraverso una seconda fase: la reticolazione.

2.3.2 Reticolazione

In seguito al processo di formatura, la reticolazione del polimero è fondamentale per ottenere un materiale infusibile durante la successiva pirolisi ad elevata temperatura. La reticolazione può essere ottenuta facilmente se nel polimero preceramico sono presenti dei gruppi funzionali che consentono i meccanismi di poliaddizione e policondensazione, come i gruppi $-\text{OH}$, $-\text{H}$ oppure $-\text{C}_2\text{H}_3$ (vinile): in questo caso la reticolazione, o *cross-linking*, si ottiene in un range di temperature comprese fra 150°C e 250°C . In presenza di opportuni catalizzatori e iniziatori radicalici, le temperature possono essere abbassate, con il conseguente vantaggio di fare aumentare la resa ceramica, poiché si riduce l'evaporazione degli oligomeri.

A seconda del tipo di meccanismo agente, vengono rilasciati sottoprodotti come acqua ed etanolo. Il rilascio di gas è causa di bolle che possono rimanere intrappolate nel polimero: tale fenomeno può

essere sfruttato per la realizzazione di ceramici porosi auto-schiumanti, oppure può essere indesiderato se l'obiettivo è la realizzazione di un componente denso e privo di porosità.

Altre strategie per realizzare la reticolazione del polimero coinvolgono l'utilizzo di radiazioni UV (se sono presenti gruppi foto-sensibili), raggi γ , fasci elettronici, gas o plasma.

La reticolazione risulta fondamentale anche per ottenere un'elevata resa ceramica alla fine della pirolisi: infatti il *cross-linking* è causato nel polimero da elevati gradi di ramificazione e alto peso molecolare, quindi saranno meno presenti oligomeri e catene corte che potrebbero volatilizzarsi alle alte temperature e di conseguenza una resa ceramica più alta.

L'introduzione di fillers produce i medesimi effetti della reticolazione sulla reologia del composto multifasico: la viscosità aumenta e la limitazione al flusso incrementa. Se sono presenti fillers in quantità rilevanti, la reticolazione non è più un aspetto fondamentale nel processo, poiché la matrice polimerica tende comunque a mantenere la forma impressa se caricata.

2.3.3 Conversione

La conversione avviene tramite un processo di sintesi intrinseco alla tecnologia PDCs utilizzata: la trasformazione del polimero in materiale ceramico avviene tramite una decomposizione termica che avviene al di sopra di circa 400°C in base al tipo di precursore scelto. Alla fine del trattamento rimane 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, che porta alla scissione dei legami chimici (Si-H, Si-C, C-H), al distacco di alcuni gruppi funzionali organici (CH_4 , C_6H_6 , CH_3NH_2) e alla formazione di un *network* inorganico.

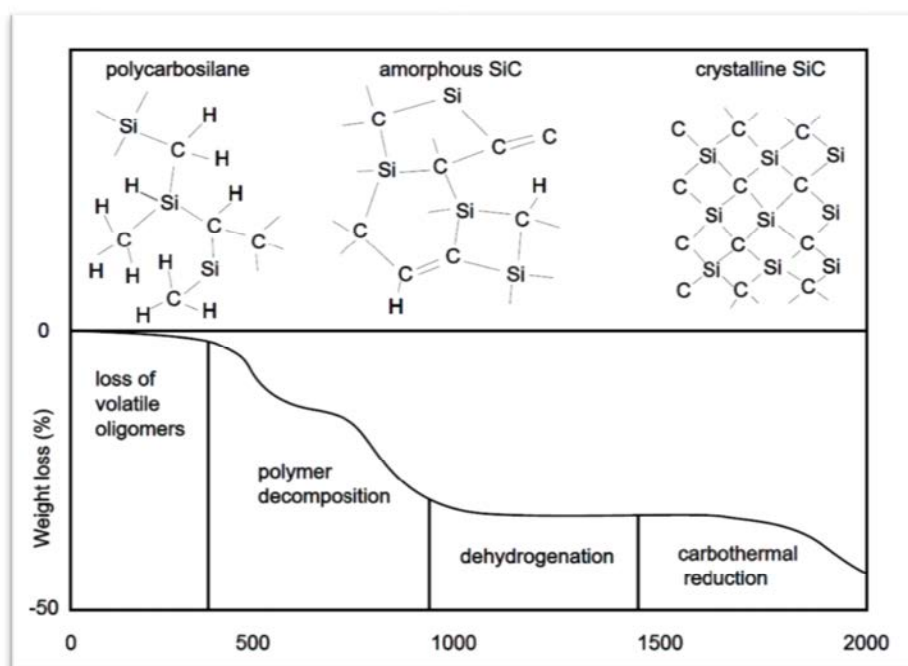


Figura 2.7 Trasformazioni strutturali durante la decomposizione termica di un polycarbosilano condotta in atmosfera inerte (Ar)

L'intero processo può essere semplificato in una sequenza di fenomeni, ognuno dei quali ha luogo in un *range* di temperature ben definito; nel caso delle resine polisilossaniche, è stato osservato che tra i 600°C e gli 800°C il metano è la specie più rilasciata, mentre nel range fra i 600°C e i 1100°C lo è l'idrogeno. L'analisi quantitativa e lo studio dettagliato del comportamento di un polimero nel corso del processo di decomposizione vengono condotti attraverso un'analisi termo-gravimetrica (TGA), nella quale si osserva la suddivisione delle diverse fasi dell'intero processo.

Dalla figura 2.7 si evince che la decomposizione termica avviene tra i 400°C e i 1000°C: tale fase è quella che comporta la maggiore perdita di peso del polimero, a causa della scissione dei legami chimici e del rilascio di sottoprodotti gassosi.

Oltre i 1000°C, la perdita in peso incrementa ulteriormente a causa delle reazioni di deidrogenazione e di riduzione carbotermica, tuttavia con contributi meno significativi della decomposizione termica.

La porosità, durante l'intero processo, è "transiente": sopra i 400°C si forma una porosità aperta mentre oltre gli 800°C-1000°C subisce un calo in quanto si attivano meccanismi di flusso viscoso.

La resa ceramica o *ceramic yield* è un parametro basilare da considerare nell'ambito dei polimeri preceramici. Tale resa viene definita come il rapporto tra la massa iniziale di polimero e la massa del residuo finale, dopo pirolisi. Il processo di conversione da materiale organico ad inorganico può considerarsi terminato tra gli 800°C e 1000°C ed è normalmente associato ad una perdita in peso variabile tra il 10% e il 30%, il che comporta rese ceramiche fra il 70% ed 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 tale motivo, la reticolazione rappresenta uno step imprescindibile prima di condurre la pirolisi. Anche la presenza di gruppi laterali possiede 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; tale fenomeno, sommato alla contrazione volumetrica, inevitabilmente comporta formazione di cricche e porosità all'interno del materiale. Il ritiro volumetrico, più o meno pronunciato, è dovuto al conseguente incremento di densità che si osserva passando dalla fase polimerica ($\rho = 0,8-1,2 \text{ g/cm}^3$) alla fase ceramica ($\rho = 2,2-2,6 \text{ g/cm}^3$ per SiO_2).

Al completamento della pirolisi, i ceramici così ottenuti mostrano una struttura amorfa: il network amorfo è costituito da una miscela di legami covalenti, tra cui i più rilevanti sono Si-C, Si-O, Si-N e C-C; possono essere presenti anche legami con altri atomi a seconda dei precursori scelti, usati per migliorare le *performances* del ceramico finale.

A temperature più elevate, sia nel corso del trattamento termico sia durante la vita in servizio, è possibile che la struttura amorfa ottenuta alla fine della pirolisi subisca ulteriori riarrangiamenti: il risultato consiste in una progressiva separazione di fase e cristallizzazione, accompagnate anche dal rilascio di prodotti gassosi, quali CO, SiO, N₂. Anche questo fenomeno dipende dalla natura dei

precursori di partenza e come conseguenza si è osservata la formazione di nanocristalli e di zone ricche in C soggette a grafittizzazione.

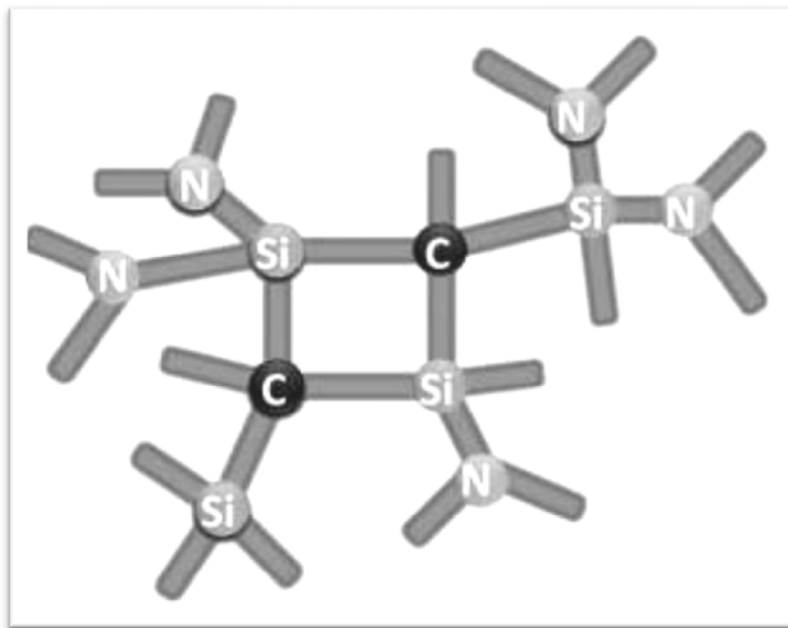


Figura 2.8 Struttura di un network amorfo di un ceramico derivante da Polisilazani, con legami covalenti Si-C e Si-N

Normalmente la devitrificazione è associata al degrado delle proprietà dei PDCs, poiché molte delle loro qualità risiedono proprio nella struttura amorfa. La temperatura massima di utilizzo del ceramico prima della comparsa di tali fenomeni si colloca tra i 1000°C e i 1800°C ed è influenzata dal tipo di legami covalenti presenti nel reticolo amorfo.

Altro aspetto fondamentale nel corso della conversione è il tipo di atmosfera in cui avviene la pirolisi. In generale, un'atmosfera ossidante porta alla formazione di una matrice di silice amorfa completamente privata del carbonio, il quale viene coinvolto nelle reazioni di ossidazione. Al contrario un'atmosfera non ossidante permette di ottenere caratteristiche di elevata stabilità termica, resistenza al creep, resistenza a corrosione ed ossidazione in quanto conserva una struttura amorfa comprendente legami covalenti del tipo Si-O, Si-N, Si-C.

2.4 Bioceramici a base wollastonite (Ca-silicati)

La wollastonite appartiene alla classe dei bioceramici e riveste grande importanza per le sue caratteristiche che la rendono adatta come materiale per riparazioni e rigenerazioni ossee.

Come si evidenzierà nel presente lavoro di tesi, si possono ottenere scaffolds a base di wollastonite partendo da un silicone (Silres® H62C) additivato da polveri di carbonato di calcio di dimensioni micrometriche.

In natura esistono diversi silicati di calcio, ciascuno dei quali ha un proprio rapporto CaO/SiO_2 :

- Silicati C_3S : sono caratterizzati dal rapporto $\text{CaO}/\text{SiO}_2 = 3:1$. Esistono in diverse forme polimorfe che si differenziano tra loro per la struttura (monoclina, triclina o romboedrica) e per la diversa orientazione dei tetraedri di SiO_4 . Tali silicati non sono bioattivi.
- Silicati C_2S : sono caratterizzati dal rapporto $\text{CaO}/\text{SiO}_2 = 2:1$. Presentano cinque diverse forme allotropiche; tra queste la fase β (denominata *Larnite* avente formula bruta $[\beta\text{-}2\text{CaO}\cdot\text{SiO}_2]$) è una fase metastabile, mentre la fase γ (conosciuta come *Olivina*) è quella stabile che si ottiene a partire dai 1300°C . Entrambe tali forme presentano una certa bioattività.
- Silicati CS : sono caratterizzati dal rapporto $\text{CaO}/\text{SiO}_2 = 1:1$. Di questi fa parte anche la *Wollastonite* avente formula bruta $[\text{CaO}\cdot\text{SiO}_2]$. In natura esiste in diverse forme polimorfe, a seconda della struttura assunta. Ogni silicato infatti, può essere considerato come una variazione del reticolo cristallino del quarzo nel quale alcuni atomi di silicio sono sostituiti da atomi di calcio; questi atomi stabiliscono interazioni ionico-covalenti con gli ossigeni non pontanti del reticolo.

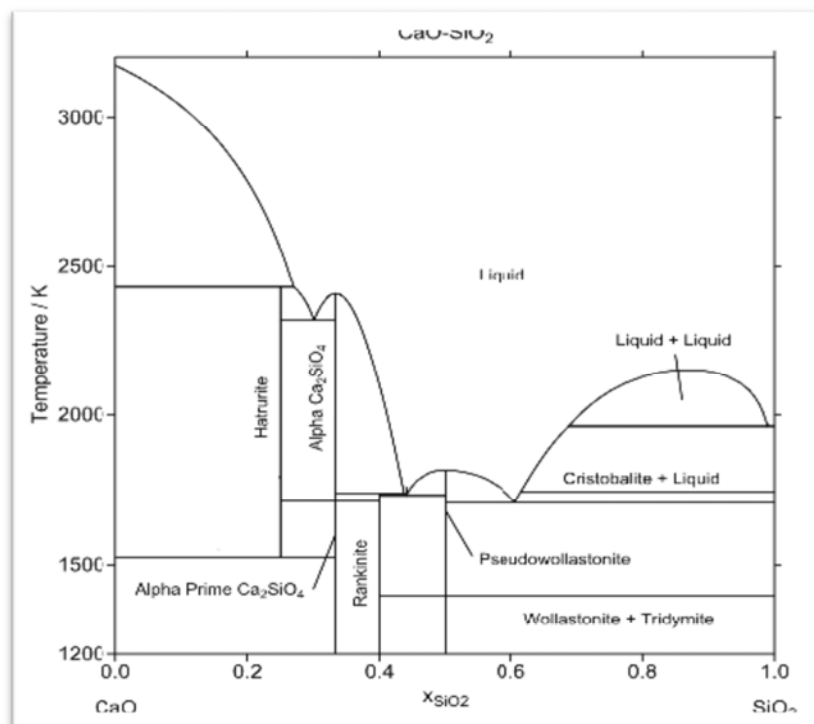
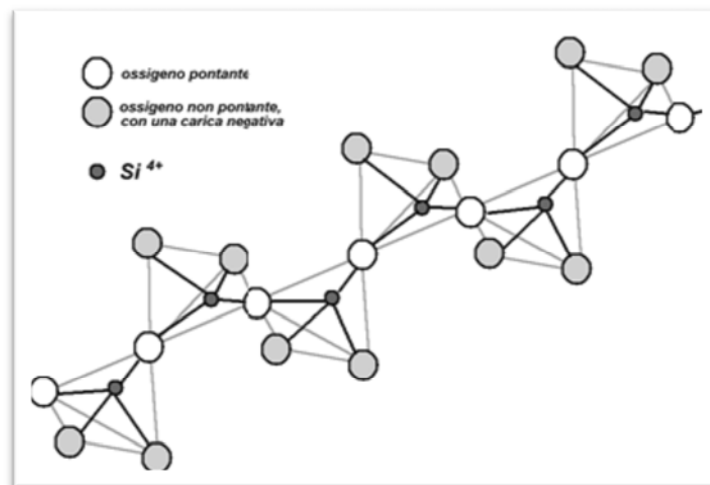


Figura 2.9 Diagramma di fase silice-calcite

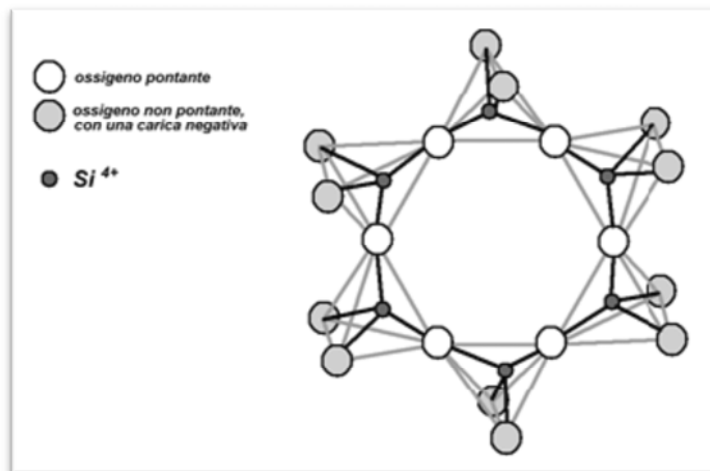
In base alla struttura spaziale i silicati si possono distinguere in silicati a catena (Wollastonite 1A, Wollastonite 2M) oppure in silicati ad anello (ciclowollastonite).

Le fasi allotropiche del CaSiO_3 sono tre: Wollastonite 1A o TC (β -Wollastonite), Wollastonite 2M o parawollastonite (β -Wollastonite), Wollastonite 7° o pseudowollastonite (α -Wollastonite). A basse temperature si forma β -Wollastonite che si convertirà in α -Wollastonite al di sopra dei 950°C . Test in vitro hanno rilevato la bioattività della Wollastonite: essa infatti, se esposta ad un fluido biologico simulato (SBF) è in grado di formare uno strato superficiale di idrossiapatite (HA, avente formula chimica $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$): avviene una parziale dissoluzione della Wollastonite superficiale che, rilasciando ioni Ca^{2+} , crea zone ricche in silicio che interagiscono con gli ioni PO_4^{3-} presenti in soluzione formando HA. Questo strato superficiale di idrossiapatite è un requisito essenziale per applicazioni quali la sostituzione e rigenerazione ossea, grazie ad una notevole somiglianza con la componente inorganica dell'osso e di conseguenza eccellente biocompatibilità e osteoconduttività. La Wollastonite presenta una bioattività diversa a seconda della propria fase allotropica: la fase α ha una bioattività maggiore della fase β , che tuttavia possiede proprietà meccaniche leggermente superiori.

Figura 2.10 Struttura dei silicati SC



a) a catena



b) ad anello

Capitolo 3

Schiume ceramiche a base $\text{CaCO}_3/\text{SiO}_2$

Questo capitolo è prettamente sperimentale: in esso viene resocontato della procedura sperimentale seguita e dei risultati ottenuti per la realizzazione di schiume ceramiche a base calcio-silice con due differenti rapporti molari. Ad una procedura standard già precedentemente utilizzata con buoni risultati operativi per quanto riguarda la prima composizione, si è affiancata un'implementazione della stessa in alcuni punti ritenuti ottimizzabili come tempi e temperature di trattamento per le successive composizioni e variazioni dei reagenti di partenza. Infatti sono stati utilizzati in questo lavoro sperimentale due differenti precursori ceramici e due differenti carbonati di calcio, mentre l'agente schiumante è rimasto inalterato.

3.1 Procedura sperimentale

La procedura seguita non può non basarsi sullo schema proposto:

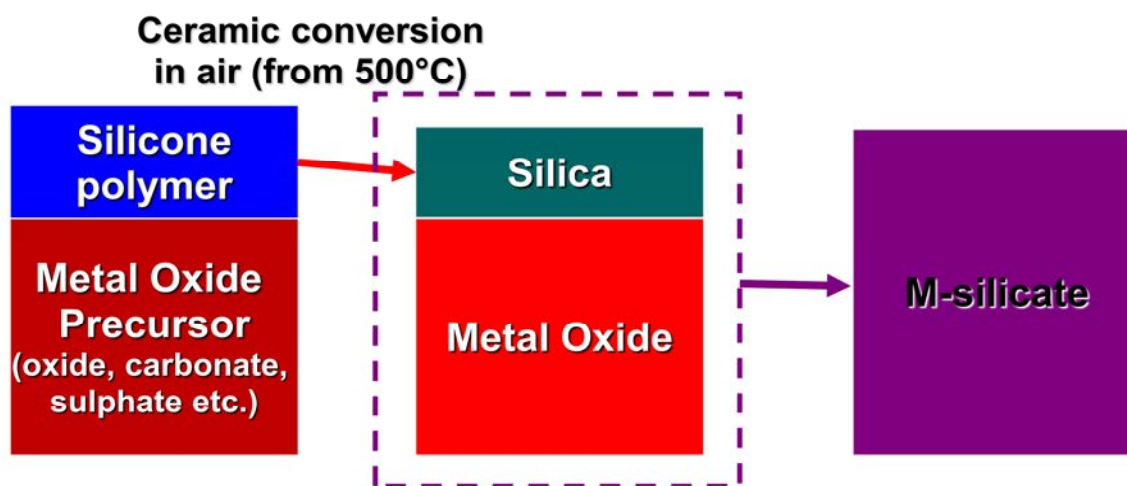


Figura 3.1 Schematizzazione di reazione filler-residuo ceramico

La sintesi parte da un polimero preceramico additivato con fillers in polvere ed agente schiumante secondo degli steps di riferimento:

- Dissoluzione polimero preceramico in un opportuno solvente (10-20% contenuto in peso) e mescolamento meccanico;
- Introduzione filler sotto mescolamento;
- Introduzione agente schiumante (2% wt.);

- Mescolamento magnetico tramite ultrasuoni per 10 minuti;
- Asciugatura in aria a 60°C fino a completa evaporazione del solvente;
- Formatura miscela viscosa in opportuni stampi in carta di alluminio di forma cilindrica, misuranti approssimativamente 15 mm di diametro e 30 mm di altezza ;
- Schiumaggio miscela e reticolazione polimero a 300°C per 30 min;
- Ceramizzazione non reattiva controllata in forno a 700°C con heating rate di 5°C/min e mantenimento in temperatura di 60 min;
- Fosfatizzazione carbonato di calcio: 14 giorni in soluzione 1 M di fosfato di sodio a 60°C;
- Ceramizzazione reattiva controllata in forno a 900°C con heating rate di 2°C/min e mantenimento in temperatura per 120 min;

Per tali miscele si è utilizzato come filler carbonato di calcio minerale micrometrico, come polimero preceramico l'H62C e come agente schiumante l'idrazina.

La miscelazione avviene in un recipiente in vetro pirex in cui vengono aggiunti filler ed agente schiumante in più passaggi, mentre tramite un magnete si ha una miscelazione continua del composto. Successivamente tale soluzione viscosa viene omogeneizzata nel miscelatore ad ultrasuoni che disgrega, tramite azione meccanica, eventuali agglomerati di polvere.

La soluzione finale viene suddivisa in piccoli stampi cilindrici creati con la carta di alluminio di 3 grammi ognuno, ed inseriti successivamente in forno appoggiati su di un supporto refrattario poroso per essere processati secondo il ciclo termico predetto, al fine di reticolare il polimero. Una volta estratti, vanno lasciati raffreddare in aria calma.

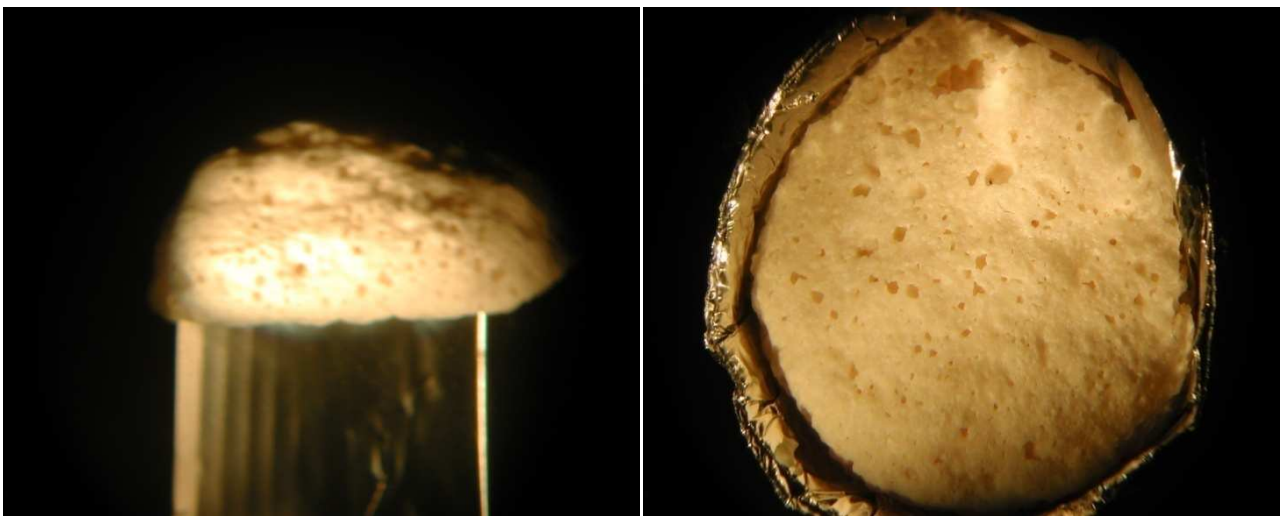


Figura 3.2 Formatura e schiumaggio di provini cilindrici in Al dopo reticolazione

I provini dopo schiumaggio diventano porosi, grazie all'azione dell'idrazina che libera molecole di ammoniaca a partire da 250°C , e rigidi a causa della reticolazione del preceramico che inizia attorno ai 150°C . Poiché la viscosità del polimero non renda vano l'effetto dello schiumaggio collassando, è necessario che la reticolazione abbia inizio fin da subito all'interno del forno: si effettua pertanto un inserimento diretto alla temperatura di 300°C .

Una volta estratti, i provini vengono liberati dall'alluminio in cui erano contenuti e resi prismatici tramite un taglierino: in questo modo si elimina la parte corticale a contatto con lo stampo che chiude la porosità all'interfaccia.

Dopo schiumaggio i provini risultano flessibili e di colore ocra e possiedono già la struttura porosa che avranno a fine trattamento, con piccole differenze soltanto nelle dimensioni finali.

Il secondo trattamento termico cui vengono sottoposti è la ceramizzazione non reattiva, durante la quale si ha conversione del preceramico in silice ma non reazione con il carbonato aggiunto che rimane pertanto passivo. I campioni a fine trattamento assumono consistenza meccanica, rigidità nonché una tonalità grigio chiara, oltre ad un ritiro volumetrico non trascurabile.

Segue la fosfatizzazione del carbonato di calcio che consiste nel mettere i campioni in soluzione acquosa 1 molare (1 mol/L) di fosfato disodico ad una temperatura stabile di 60°C per 14 giorni.

Ultimo trattamento, dopo essere stati tolti dalla soluzione fosfatante ed essiccati, consiste nella ceramizzazione reattiva in cui viene creata la composizione finale ricercata a base wollastonite/apatite. I campioni alla fine dei trattamenti risultano di una tonalità più chiara di grigio, dovuto al cambiamento di struttura cristallina ed alla conversione da carbonato di calcio a calce.

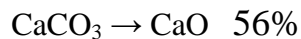
	Materie prime	Produzione	Note
Polimero preceramico	H62C	Wacker-Chemie GmbH, AG, Germany	Liquido viscoso
Filler	CaCO_3 micrometrico	Industrie Bitossi, Vinci, Italy	Polvere < 10 μm
Agente schiumante	N-N' Di-carbamoyl-hydrazine [DCH]	Alfa Aesar GmbH, Germany	Polvere fine, 2% sul peso totale
Solvente	Alcol isopropilico [$\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$]		Usato per diluire i polimeri preceramici
Agente fosfatante	Fosfato disodico [Na_2HPO_4]		Soluzione 1 molare

Tabella 3.1 Materie prime di partenza

3.1.1 $CaO/SiO_2 = 0,8$

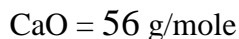
La prima composizione investigata possiede rapporto fra calce e silice di 0,8 molare; al fine di ottenere tale valore occorre effettuare un bilanciamento ponderale che consideri le rese nelle conversioni da polimero preceramico a residuo ceramico, nonché la conversione fra carbonato di calcio e calce viva.

I valori percentuali di resa sono:



Tale rapporto equivale a dire che per ogni mole di silice si hanno 0,8 moli di calce.

Il peso molecolare degli elementi considerati è:



Quindi: 60 g/mole di SiO_2 si combinano con $0,8 \cdot 56 \text{ g/mole CaO} \rightarrow 44,8 \text{ g/mole CaO}$.

Allo stesso modo 10 g di SiO_2 si combinano con $\frac{44,8}{6} = 7,47 \text{ g di CaO}$, ossia tenendo conto della

$$\text{resa } \frac{7,47}{0,56} = 13,3 \text{ g di CaCO}_3.$$

Sapendo che la resa ceramica del polimero preceramico utilizzato è del 58%, per avere 10 g di SiO_2

$$\text{necessito di } \frac{10}{0,58} = 17,2 \text{ g di H62C}.$$

Se si mettono a rapporto gli effettivi valori ricavati in peso di $CaCO_3$ ed H62C ottengo il rapporto

$$\text{molare di partenza [} \frac{13,3}{17,2} = 0,8 \text{].}$$

Quindi partendo da 10 grammi di precursore polimerico, è sufficiente impostare una proporzione per ottenere il corretto valore in massa del filler da aggiungere:

$$17,2:10 = 13,3:x$$

Necessito pertanto di 7,73 g di $CaCO_3$.

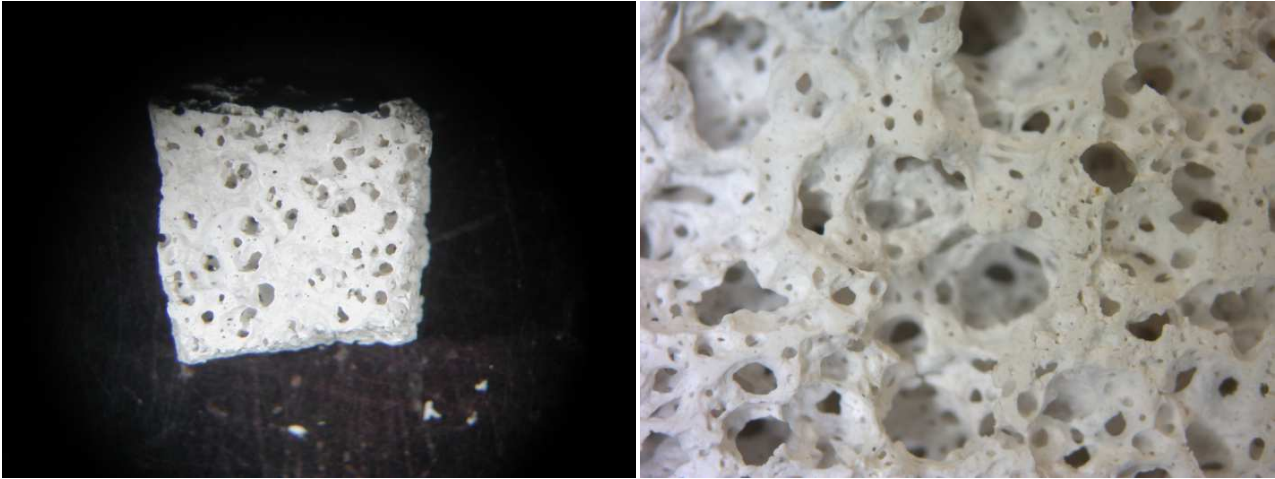


Figura 3.3 Morfologia campioni con rapporto molare calce/silice 0,8

3.1.2 $\text{CaO}/\text{SiO}_2=1,6$

La seconda generazione di campioni è stata creata raddoppiando il rapporto molare calce-silice, e quindi raddoppiando il quantitativo di carbonato di calcio nella composizione di partenza. Tale scelta è stata dettata dalla necessità di legare nei composti finali (wollastonite, apatite, silicati di- e tri-calcici) la maggiore quantità possibile di silice al fine di evitare o perlomeno minimizzare la formazione di cristobalite, una forma allotropica della silice nociva ai fini della biocompatibilità. I risultati dal punto di vista della crescita cellulare, nonché della quantità residua analizzata tramite diffrazione, sono positivi e rispondono alle previsioni.

Dal punto di vista morfologico si evidenzia una struttura più deformata e criccata dovuta ad una maggiore presenza di filler che viene difficilmente complessata dalla matrice polimerica; anche la miscelazione è più problematica a causa dell'elevata viscosità e necessita di metodi più drastici come il mixer rotante.

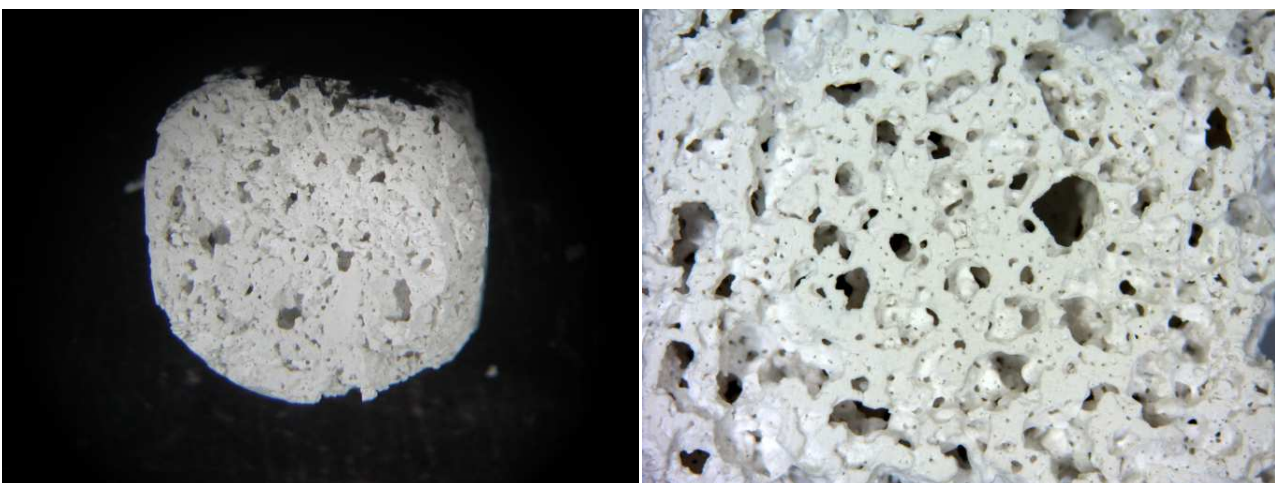


Figura 3.4 Morfologia campioni con rapporto molare calce/silice 1,6

Con questo rapporto, partendo da 10 grammi di precursore polimerico, considerando le rese delle trasformazioni come nel caso precedente, ottengo:

$$17,2:10 = 26,6:x$$

Ossia 15,46 g di CaCO₃, esattamente il doppio della prima formulazione.

3.2 Analisi schiume cellulari

Le schiume cellulari ottenute sono state investigate secondo diverse procedure mirate ad ottenere valori delle proprietà chimico-fisiche, meccaniche nonché strutturali ed in ultima istanza biologiche. La caratterizzazione completa si avvale di misure densitometriche, di resistenza meccanica in compressione, di diffrattometria nonché di analisi allo stereo microscopio e al microscopio elettronico a scansione (SEM). Oltre al valore assoluto della misura, che identifica una grandezza numerica da confrontare con altri dati relativi a pubblicazioni scientifiche o già presenti in letteratura, si è ricercato un confronto diretto fra le due diverse composizioni indagate al fine di rilevare, a seconda dei parametri considerati, quale formulazione risultasse migliore.

3.2.1 Densità

I valori di densità media e di porosità aperta eseguiti su almeno 5 campioni differenti, per ogni step di sintesi di entrambe le famiglie di schiume, sono riepilogati nella seguente tabella 3.2:

Formulazione schiume	Densità geometrica (g/cm ³)	Densità apparente (g/cm ³)	Porosità (%)
CaO/SiO ₂ =0.8 700 °C	0.341 ± 0.085	2.536 ± 0.004	87
CaO/SiO ₂ =0.8 700 °C + Phosph.	0.369 ± 0.070	2.309 ± 0.017	84
CaO/SiO ₂ =0.8 700 °C + Phosph. + 900 °C	0.266 ± 0.018	2.851 ± 0.070	91
CaO/SiO ₂ =1.6 700 °C	0.681 ± 0.062	2.962 ± 0.050	64
CaO/SiO ₂ =1.6 700 °C + Phosph.	0.801 ± 0.035	2.518 ± 0.008	68
CaO/SiO ₂ =0.8 700 °C	0.958 ± 0.064	2.679 ± 0.007	77

La densità geometrica viene calcolata misurando massa e volume dei campioni ceramici rispettivamente con bilancia di precisione (Sartorius GMBH 1081) e calibro millimetrico.

La densità apparente è quella delle schiume inserite per intero nel picnometro a gruppi di 2-3 per misura, pertanto prende in considerazione il volume totale occupato dal solido (quindi il suo

ingombro esterno), compresi quindi gli spazi vuoti che può permeare il gas. Tale valore consente infatti il calcolo della porosità aperta grazie alla formula:

$$\text{Porosità} = 1 - \left(\frac{\rho_{geom}}{\rho_{app}} \right) \quad \text{Eq.3.1}$$

La discrepanza di valori della porosità fra i campioni a 0,8 e quelli ad 1,6 sono da ricercare nella reologia della miscela di partenza. I campioni contenenti più fillers non consentono, durante lo schiumaggio, la formazione di una porosità morfologicamente omogenea e ciò va a discapito del valore percentuale stesso che risulta inferiore di 10-15 punti rispetto ai campioni contenenti meno carbonato in partenza.

Per quanto riguarda l'andamento dei valori di densità geometrica durante gli step di sintesi, si può evidenziare un comportamento differente per le due famiglie di campioni: se dopo il trattamento di fosfatizzazione tale valore cresce per entrambe (come ci si poteva attendere), dopo la seconda ceramizzazione il valore cala per i campioni a 0,8 e cresce per i campioni ad 1,6.

L'andamento che ci si aspettava risulta effettivamente solo nei primi campioni in quanto dopo trattamento a 900°C , con annessa decomposizione del carbonato a calce, si ha un ritiro volumetrico; nei secondi, nonostante la trasformazione suddetta, il valore aumenta.

3.2.2 XRD

Il più importante strumento di caratterizzazione degli scaffold ceramici risulta essere la diffrazione ai raggi X, tramite cui si viene a conoscenza delle strutture cristalline presenti al loro interno durante le varie fasi ed i vari trattamenti a cui sono soggetti nel processo di sintesi. La figura 3.5 mostra gli spettri XRD per le 2 famiglie di schiуме ad ognuno dei 3 steps di sintesi.

Dopo la prima ceramizzazione non reattiva a 700°C , come previsto, il carbonato di calcio non si è decomposto (CaCO_3 – PDF#86-2334) ed il trattamento termico ha comportato soltanto la formazione di una matrice amorfa di SiO_2 derivata dalla decomposizione termica del polimero preceramico. Nello spettro non è evidente la presenza della silice con un picco caratteristico proprio perché si tratta di una sostanza amorfa e quindi priva di un piano cristallografico; è presente una lieve curvatura dello spettro fra i 20 ed i 35° che ne testimonia la presenza.

Dopo fosfatizzazione, il carbonato di calcio continua a rimanere presente, sebbene una certa quantità dello stesso è stata fosfatizzata: si forma pertanto idrossiapatite sulla superficie ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ - PDF#74-0566 - PDF#03-0747).

Dopo la seconda ceramizzazione reattiva a 900°C , l'idrossiapatite contenuta e precedentemente identificata non viene modificata, mentre il carbonato di calcio si decompone completamente in ossido di calcio e reagisce con la matrice circostante ricca in silice. Ciò comporta l'ottenimento

della wollastonite come componente principale (CaSiO_3 - PDF#420547) e di un altro silicato di calcio ben evidente nello spettro (Ca_2SiO_4 - PDF#83-0460).

La silice non reagita con l'ossido di Ca si trasforma in cristobalite cristallina; tale composto deleterio al fine della biocompatibilità, presente nei campioni con rapporto molare di 0,8, è in eccessiva quantità. Lo spettro di rifrazione dei campioni aventi rapporto molare 1,6 (b) varia rispetto ai precedenti (a) esclusivamente per i campioni che hanno completato il processo di sintesi. La figura mostra che il quantitativo maggiore di Ca che possiedono tali campioni reagisce con la silice per formare più Ca_2SiO_4 (PDF#83-0460) che CaSiO_3 (PDF#42-0547). Un'immediata conseguenza è la reazione completa della silice che concorre nella formazione del silicato di calcio e quindi comporta una minore quantità di cristobalite residua, se comparata allo spettro relativo ai campioni della prima composizione investigata (a). Il picco relativo all'idrossiapatite appare più intenso rispetto a quello relativo ai campioni 0,8.

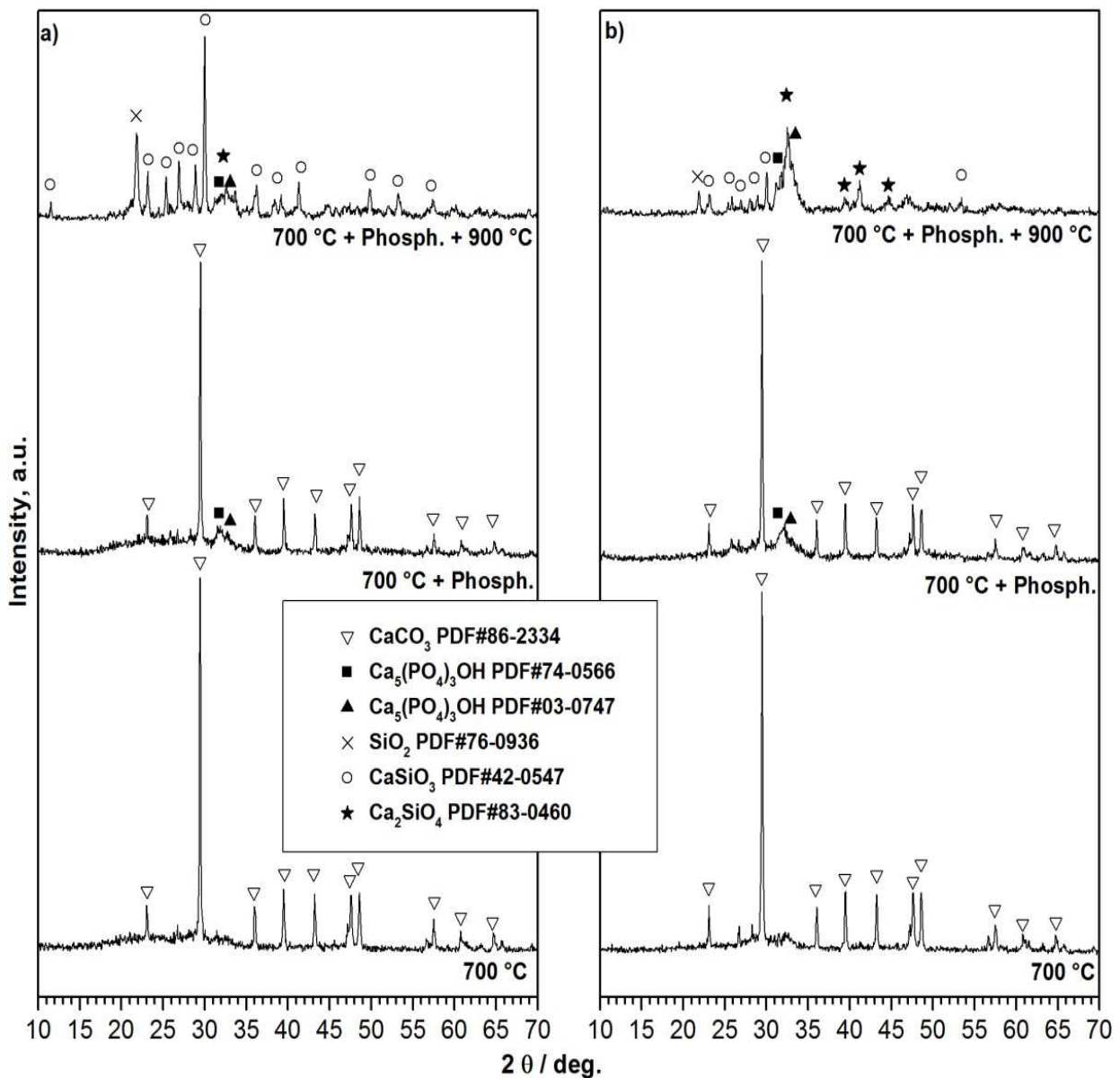


Figura 3.5 Spettro XRD per i campioni a rapporto molare 0,8 (a) e 1,6 (b) per ognuno dei 3 step di sintesi

3.2.3 Interconnessione porosità

Per le applicazioni di ingegneria tissutale ossea la porosità, la dimensione dei pori e l'interconnessione degli stessi sono parametri critici della loro struttura 3D: in generale, pori interconnessi aventi un diametro significativo uguale o superiore a $100\ \mu\text{m}$ e porosità aperta maggiore del 50% sono considerati i requisiti minimi per consentire la penetrazione cellulare, crescita dei tessuti ed eventuale vascolarizzazione.

La figura 3.6 mostra la distribuzione dimensionale delle interconnessioni, in cui l'asse verticale rappresenta la derivata del volume di mercurio introdotto all'interno della schiuma ceramica, relativo al diametro di interconnessione dei pori.

Nei campioni aventi rapporto molare $\text{CaO}:\text{SiO}_2 = 0,8$ maggiori interconnessioni rispetto ai campioni ad 1,6 presentano un diametro maggiore dei $100\ \mu\text{m}$.

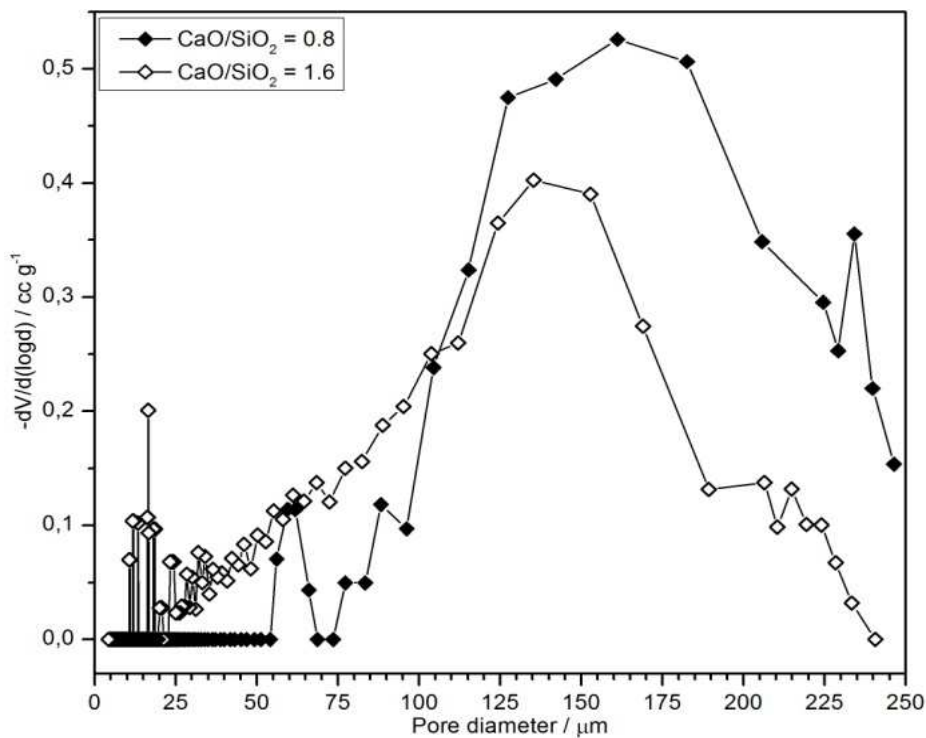


Figura 3.6 Distribuzione del diametro dei pori ottenuto su campioni dopo completa sintesi

I valori di distribuzione dimensionale delle interconnessioni precedentemente riportati, sono stati ottenuti mediante un porosimetro ad infiltrazione di mercurio (PoreMaster 33, Quantachrome).

Essendo una tecnica distruttiva, non può venire utilizzata per seguire la variazione dimensionale dei pori dello scaffold in funzione della temperatura di sinterizzazione.

3.2.4 Compressione

I risultati delle prove in compressione sui provini sono stati criticamente valutati in quanto campioni ceramici. Ciò equivale a dire che la natura stessa dei materiali, governati dalla teoria della frattura in campo elastico, comporta una dispersione dei risultati tutt'altro che trascurabile; pertanto si sono omessi nel computo del calcolo dei valori medi i risultati isolati non in linea con la maggior parte

dei valori. Spesso valori troppo elevati erano causati da zona corticale creata durante la formatura in seguito allo schiumaggio non omogeneo, mentre valori troppo inferiori alla media erano dati da evidenti difetti nella struttura.

Oltretutto i valori di sforzo critico a rottura σ sono stati calcolati da una media di 5 prove per ogni tipo di trattamento e tale limitato numero pregiudica in parte la veridicità delle misure ottenute; tuttavia non era possibile per problemi logistici e di quantità dei materiali di partenza testare un numero elevato di provini. Ad ogni modo, i risultati ottenuti non sono fuorvianti e danno una indicazione qualitativa dell'andamento della resistenza specifica dei campioni a seguito dei vari trattamenti cui sono sottoposti.

Dai grafici di sforzo si possono notare due andamenti differenti della forza esercitata nel tempo: nel primo caso (campioni a 0,8) si hanno dei picchi di cedimento di alcuni piani reticolari progressivi in intensità fino a raggiungere il massimo sforzo sopportabile dalla struttura che successivamente inizia a collassare.

Nel secondo caso, afferente ai campioni con rapporto molare doppio, si nota un picco principale in cui si ha schiacciamento dei piani reticolari e altri sotto-picchi (che generalmente non superano il primo in intensità) dovuti ad un transitorio impaccamento delle celle, prima del cedimento definitivo. Nel primo caso il valore della forza di cedimento è stato calcolato dalla media dei valori dei primi 5 picchi, mentre nel secondo caso si è assunto il valore corrispondente al primo picco.

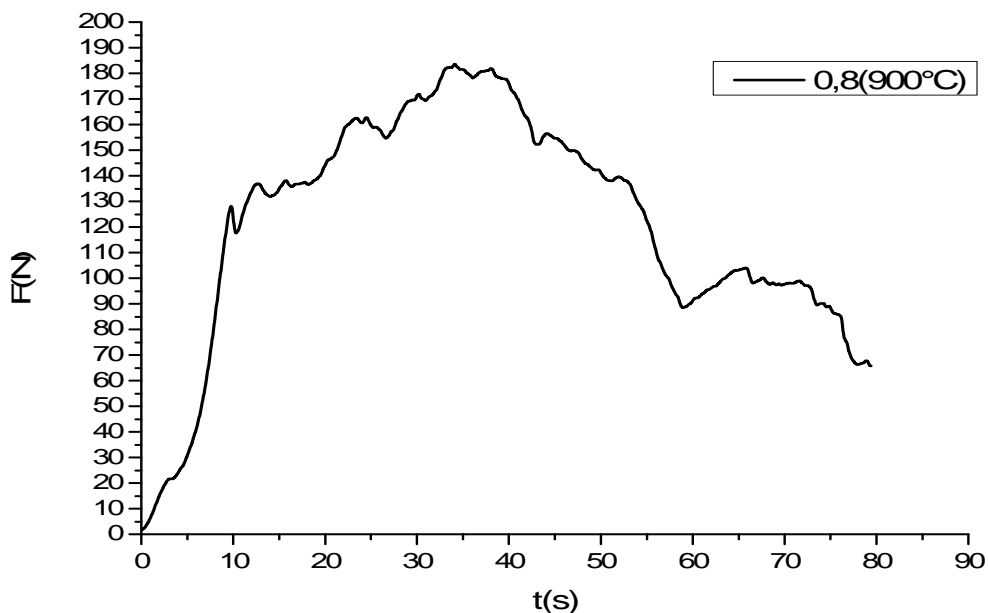


Figura 3.7 (a) Esempio di grafico Forza vs Tempo ottenuto da una prova in compressione su campione a struttura cellulare per la composizione $CaO:SiO_2=0,8$

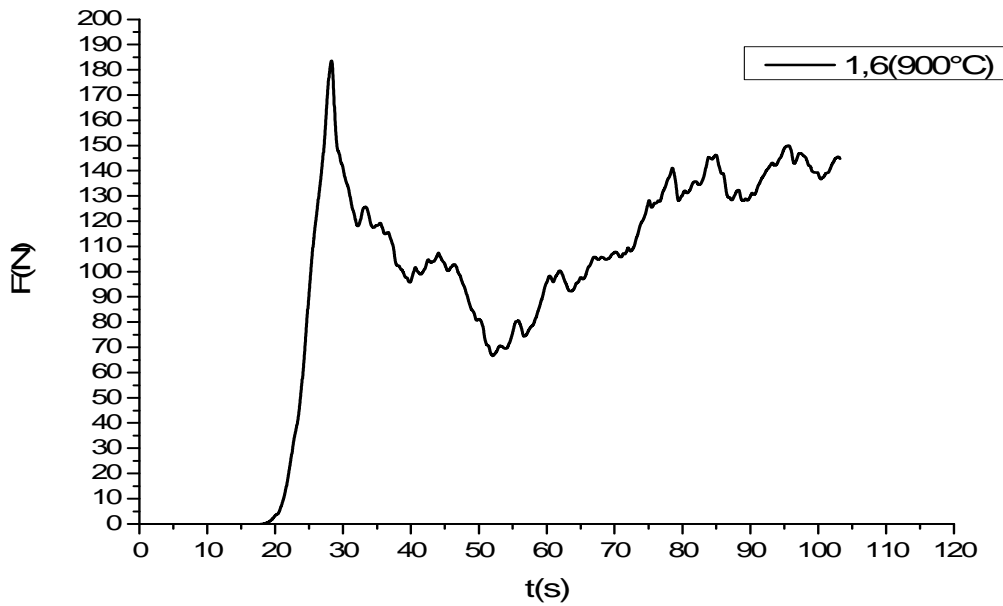


Figura 3.7 (b) Esempio di grafico Forza vs tempo ottenuto da una prova in compressione su campione a struttura cellulare per la composizione $\text{CaO}:\text{SiO}_2=1,6$

I risultati sono stati monitorati dopo ogni step di sintesi per entrambe le famiglie di campioni: dopo la prima ceramizzazione, dopo la fosfatizzazione e dopo la seconda ceramizzazione.

I risultati sono riportati in tabella 3.3:

	Sforzo critico medio σ [MPa]	Densità bulk ρ [g/cm ³]	Resistenza specifica σ/ρ [(N·m)/Kg]
0,8 I [^] ceramizzazione	$1,6 \pm 0,3$	$0,928 \pm 0,012$	1,73
0,8 Fosfatizzati	$1,0 \pm 0,3$	$1,031 \pm 0,05$	0,97
0,8 II [^] ceramizzazione	$2,0 \pm 0,7$	$0,523 \pm 0,048$	3,82
1,6 I [^] ceramizzazione	$1,5 \pm 0,7$	$0,958 \pm 0,064$	1,57
1,6 Fosfatizzati	$1,0 \pm 0,7$	$0,801 \pm 0,035$	1,25
1,6 II [^] ceramizzazione	$1,6 \pm 0,2$	$0,681 \pm 0,062$	2,35

Un dato importante per valutare la resistenza dei campioni, dato che le analisi sono state condotte su strutture porose, è quello della resistenza specifica σ/ρ . Questo valore è facilmente calcolabile dividendo la resistenza meccanica a compressione per la densità geometrica, ottenendo la resistenza assunta a parità di massa e quindi confrontabile in senso assoluto. Ne emerge una resistenza notevolmente più alta per i campioni trattati a 900°C, ossia al termine della loro sintesi in cui si sono create le strutture silicatiche definitive.

Le prove di compressione effettuate sono servite per caratterizzare le schiume dal punto di vista meccanico e valutare di quanto la loro resistenza si discosta da quella di un osso poroso:

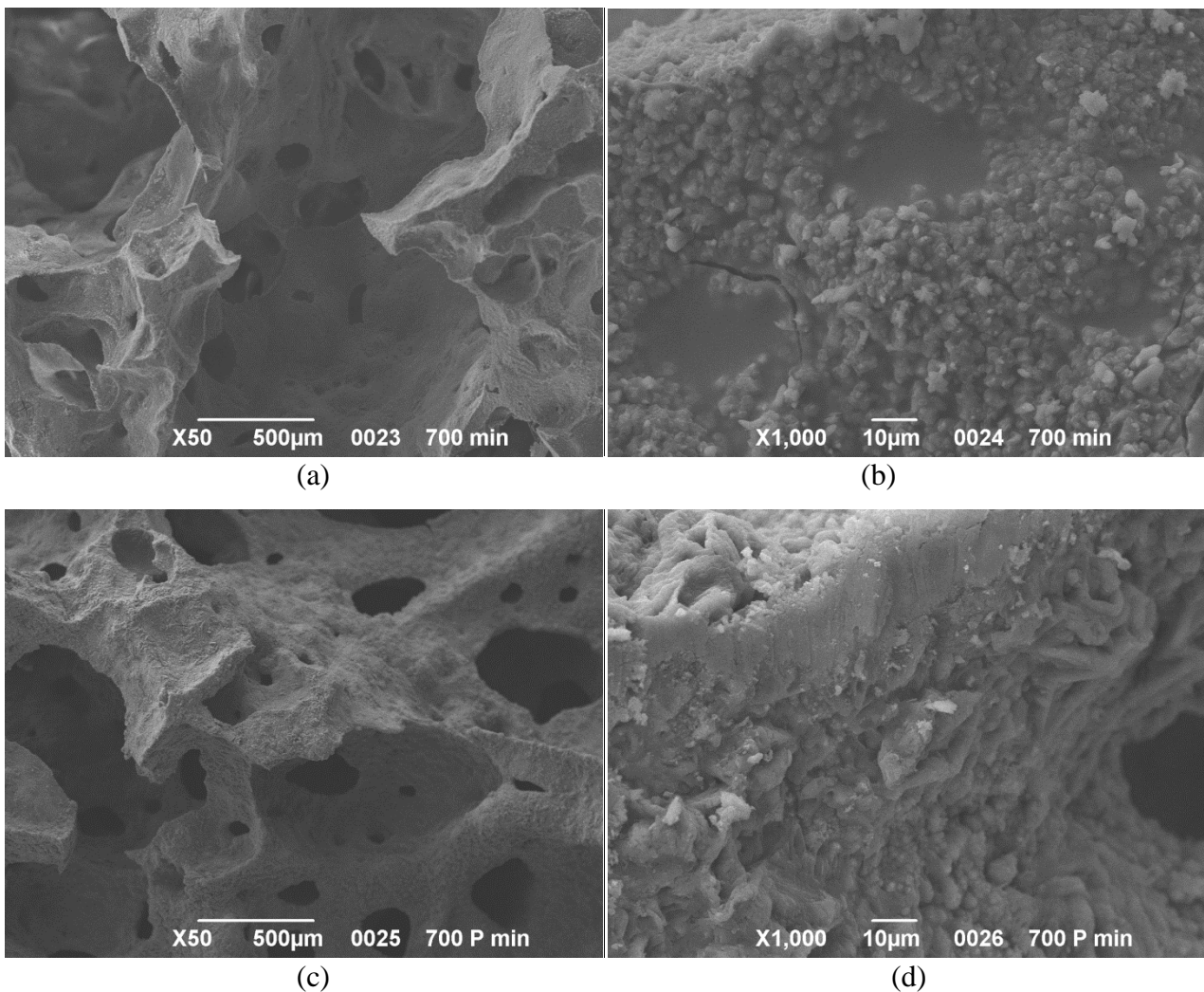
Caratteristiche meccaniche	Osso corticale	Osso poroso
Resistenza a compressione [MPa]	100-230	2-12
Resistenza a flessione [MPa]	50-150	10-20
Tenacità a frattura [MPa·m ^{1/2}]	2-12	Non individuata

Tabella 3.4 Caratteristiche meccaniche degli ossi corticali e degli ossi porosi

I valori ottenuti di resistenza specifica per i campioni finali rientrano nel campo di valori della resistenza a compressione delle ossa porose.

3.2.5 Foto al SEM

Si riportano di seguito le foto dei campioni al microscopio elettronico dopo i vari step di sintesi per entrambe le composizioni dei campioni:



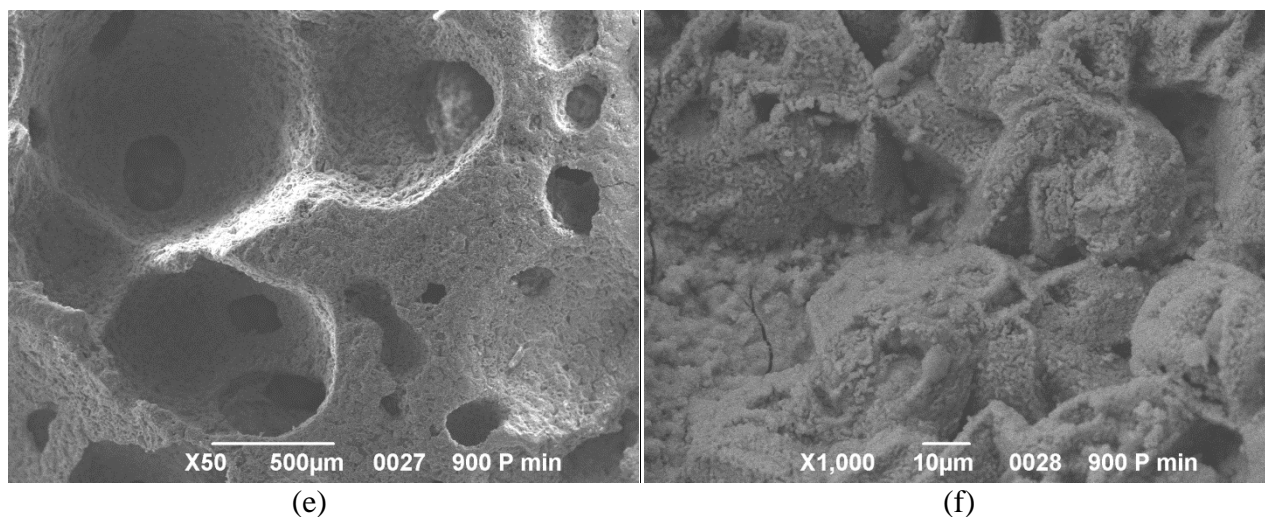


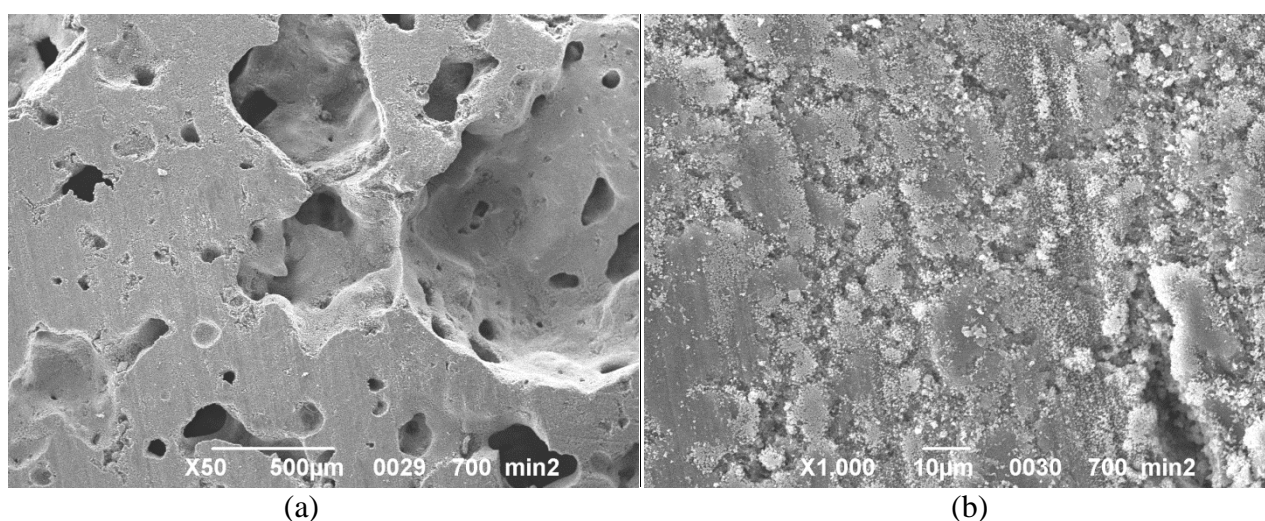
Figura 3.8 Micrografie SEM di campioni aventi rapporto molare $\text{CaO}/\text{SiO}_2=0,8$ a diversi ingrandimenti

(a) e (b) dopo trattamento termico a 700°C

(c) e (d) dopo fosfatizzazione

(e) e (f) dopo trattamento termico a 900°C

Nella figura (a), ottenuta dopo il trattamento di ceramizzazione non reattiva, si nota la porosità aperta ed interconnessa della schiuma ceramica e ad ingrandimenti superiori (b) si possono osservare delle microcricche dovute al ritiro volumetrico conseguente al trattamento termico ed alla conversione del preceramico. Le figure successive (c) e (d) sono state effettuate sui campioni fosfatizzati e pertanto in esse si notano i cristalli di idrossiapatite formati in superficie a formare un layer che ricopre la struttura 3D. Infine le figure (e) ed (f) mostrano la struttura finale a base wollastonite-apatite in cui permangono i depositi di HCA ma che per mezzo del trattamento termico a 900°C sono stati “sinterizzati” nella struttura.



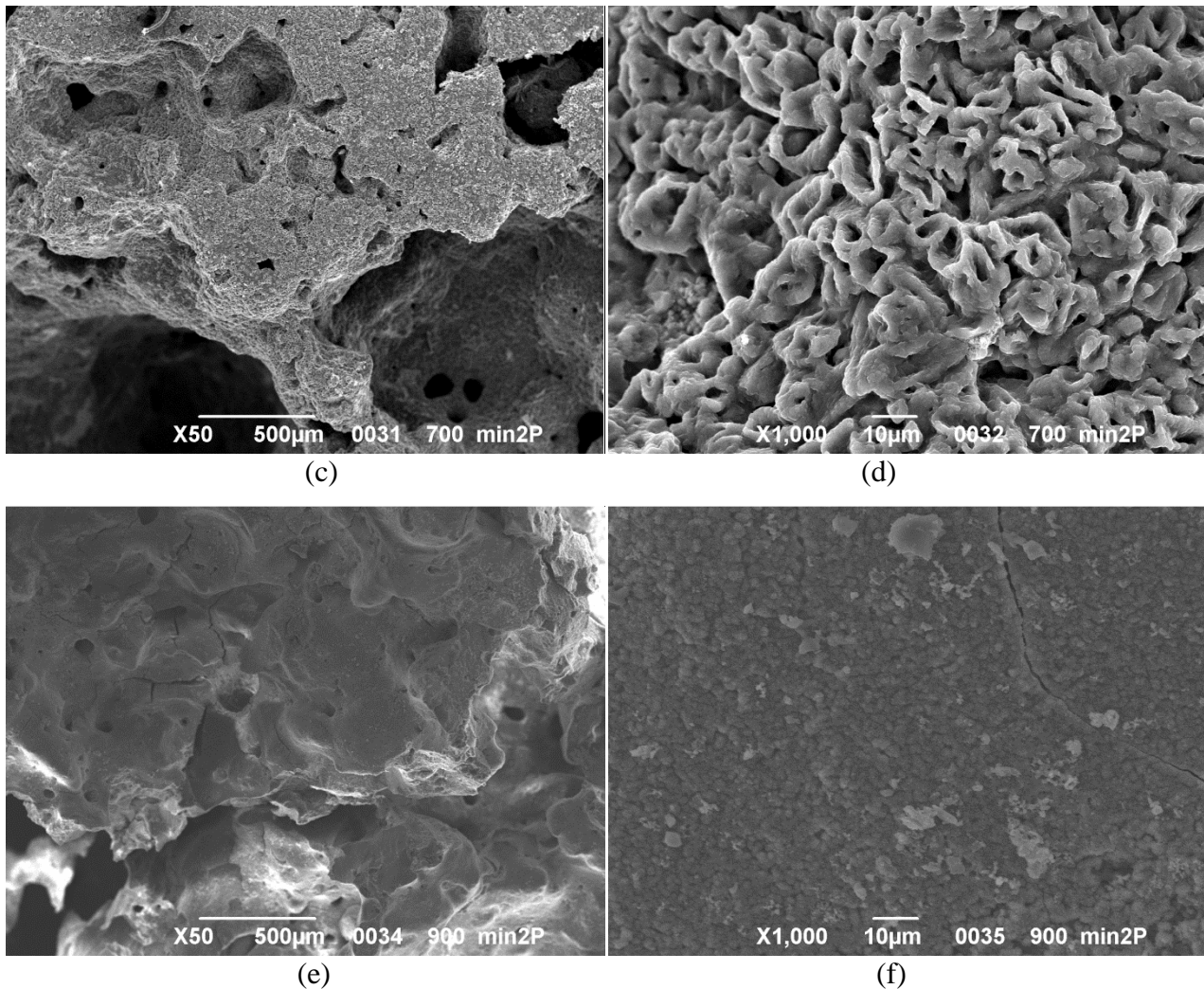


Figura 3.9 Micrografie SEM di campioni aventi rapporto molare $\text{CaO/SiO}_2=1,6$ a diversi ingrandimenti

(a) e (b) dopo trattamento termico a 700°C

(c) e (d) dopo fosfatizzazione

(e) e (f) dopo trattamento termico a 900°C

Nella figura (a) si osserva per i campioni ad 1,6 una minore omogeneità della struttura porosa, già riscontrata allo stereomicroscopio, e una minore interconnessione fra i pori, evidenziata nell'analisi al porosimetro, rispetto ai campioni aventi rapporto molare di 0,8. Questa evidenza, come già spiegato, è dovuta alla reologia della miscela di partenza che risulta più viscosa in quanto la maggior quantità di fillers aggiunto viene complessato con più difficoltà dalla matrice ceramica. A maggiori ingrandimenti (b) si nota una struttura più chiusa sulle cui pareti rimane del carbonato di calcio non miscelato alla silice formata. Al contrario dopo fosfatizzazione, il layer di idrossiapatite formato è più consistente del precedente caso poiché il carbonato di calcio è presente in maggiore quantità, come testimoniano le figure (c) e (d). A sintesi completa, secondo le micrografie (e) ed (f), si notano cricche residue di entità superiore a quelle dei corrispondenti campioni a 0,8 e una presenza superficiale di altri tipi di silicati di calcio che si formano oltre alla wollastonite.

3.3 Analisi cellulari

Le schiуме ceramiche a base wollastonite-idrossiapatite sviluppate in questo lavoro sperimentale precedentemente presentate, sono state sottoposte a dei test biologici al fine di appurare il loro possibile impiego come protesi per rigenerazione ossea.

I test biologici e cellulari sono stati sviluppati all'estero presso il *Materials Department, Imperial College London (South Kensington Campus, London SW7 2AZ, UK)*.

3.3.1 Test di bioattività

I test biologici effettuati sulle schiуме ceramiche di composizione precedentemente specificata avente rapporto molare 0,8 ed 1,6 sono indicativi in senso qualitativo e quantitativo della bioattività degli scaffold stessi.

La procedura sperimentale prevede l'immersione dei campioni in una soluzione che simuli una concentrazione ionica analoga a quella del plasma umano. Si è stabilito di usare un rapporto di dissoluzione pari a 75 mg / 50 ml: pertanto i campioni sono stati tagliati in frammenti di 37,5 mg ciascuno ed immersi in 25 ml di SBF (*Simulated Body Fluid*). I campioni sono stati incubati ad una temperatura di 37°C con agitazione di 120 rpm ed analizzati ai seguenti time points: 1, 2, 4, 8, 24, 72, 168, 336, 504 ore. Ad ogni time points è stato misurato il pH e si è prelevato 1 ml di soluzione. Dopo diluizione con 9 ml di HNO_3 2M, la soluzione è stata analizzata tramite uno spettroscopio ICP (Inductive Coupled Plasma, Modello iCAP 6300 Series Duofoor) per rilevare la concentrazione ionica di Si, Ca e P in soluzione. Tutti gli esperimenti sono stati replicati 3 volte.

Ad ogni time points, la schiuma è stata lavata con acqua distillata, essiccata ed analizzata con uno spettroscopio ad infrarossi in riflettanza (ATR-FTIR) al fine di verificare la crescita dello strato di HCA.

Il comportamento dello scaffold in SBF è stato investigato al fine di monitorare le reazioni interfacciali del materiale, il profilo di dissoluzione ed il cambiamento di pH in funzione del tempo. Le figure 3.10 mostrano la concentrazione ionica di calcio [Figura 3.10 (a)], silicio [Figura 3.10 (b)] e fosforo [Figura 3.10 (c)] rilasciato dagli scaffold in SBF, determinato dall'analisi allo spettroscopio ICP, in funzione del tempo. La barra dell'errore rappresenta la deviazione standard calcolata in base alle 3 prove effettuate. Il cambiamento di pH in funzione del tempo è mostrato in figura 3.10 (d).

Il SBF non contiene ioni di silicio, come evidenziato dal controllo. Dopo immersione dei campioni con rapporto $\text{CaO}:\text{SiO}_2 = 0,8$ in soluzione per 24 ore, la concentrazione di Si è incrementata di 57 $\mu\text{g/ml}$. Dalle 24 alle 72 ore, la concentrazione di Si incrementa fino a 72 $\mu\text{g/ml}$, ma con una più lenta velocità di rilascio, finchè la soluzione ha raggiunto la saturazione di tale elemento. Dalle 72 ore fino a 21 giorni, la quantità di Si rilevata in SBF si è mantenuta approssimativamente attorno ai 70 $\mu\text{g/ml}$. In partenza SBF contiene circa 80 $\mu\text{g/ml}$ di ioni Ca; il trend di figura 3.10(a) mostra una concentrazione costante di circa 72 $\mu\text{g/ml}$. Il profilo di rilascio di ioni Ca dalla schiuma ceramica risulta simile a quello del Si: la concentrazione trovata cresce gradualmente fino a raggiungere un *plateau* di saturazione a 249 $\mu\text{g/ml}$ dopo 7 giorni. La concentrazione di Ca, comunque, decresce

lievemente quando il tempo di immersione cresce da 7 a 21 giorni, raggiungendo il valore di 225 $\mu\text{g/ml}$ dopo 21 giorni. Tale effetto è dovuto alla combinazione degli ioni Ca con gli ioni P, per formare uno strato superficiale di idrossiapatite carbonata.

Rispetto al fosforo, SBF ne contiene circa 30 ppm: il livello di controllo mostra livelli di P compresi fra 28 e 24 $\mu\text{g/ml}$ dopo 21 giorni di immersione. Contrariamente, quando i campioni vengono immersi in SBF, la concentrazione di P decresce rapidamente fino a 2 $\mu\text{g/ml}$ dopo 72 ore. Ci si aspetta che il P venga rilasciato dalla schiuma ceramica grazie allo step di fosfatizzazione previsto nel processo di sintesi. La formazione del layer di idrossiapatite (HCA) superficiale, evidenziato anche dallo spettro infrarosso (figura 3.11) è la ragione della decrescita della concentrazione di tale elemento in soluzione, ed implica una buona bioattività.

I profili di dissoluzione per i campioni aventi rapporti molari $\text{CaO}:\text{SiO}_2=1,6$ sono evidenziati nella stessa figura 3.10 e ottenuti nelle medesime condizioni dei campioni precedenti con rapporto 0,8. I trend di concentrazione di Ca, Si e P in funzione del tempo sono simili ai precedenti descritti, ma presentano alcune differenze nei valori di concentrazione e nella velocità di dissoluzione.

La quota di ioni Ca rilasciati è piuttosto elevata, raggiungendo 320 $\mu\text{g/ml}$ dopo 2 settimane [Figura 3.10 (a)]; il tasso di rilascio degli ioni di Si risulta inferiore ai campioni con rapporto molare 0,8 e costante da 72 ore fino a 3 settimane per raggiungere infine i 75 $\mu\text{g/ml}$ [Figura 3.10 (b)].

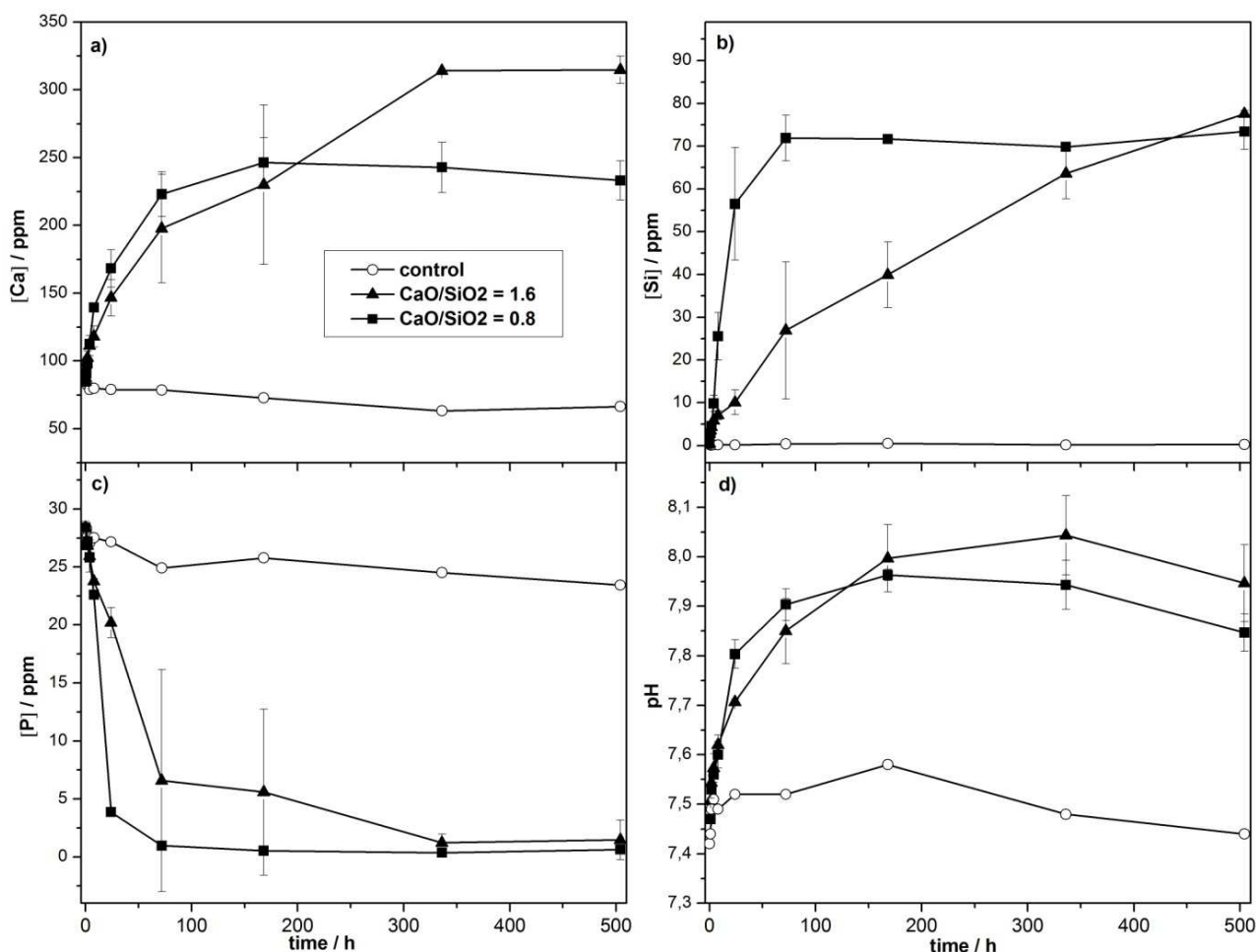


Figura 3.10 Profili di dissoluzione e pH in funzione del tempo dopo immersion in SBF per 21 giorni a 37°C e 120 rpm.

Il tasso di rilascio del P è anch'esso inferiore rispetto ai precedenti campioni e dopo 2 settimane è già completa la rimozione dalla soluzione [Figura 3.10 (c)].

Il trend di controllo del pH, a causa della dissoluzione dei campioni, porta ad incrementare il valore da 7.42 a 7.75 dopo una settimana, come mostrato in figura 3.10 (d). Per quanto riguarda i campioni a 0,8 il valore aumenta fino a 7,85 dopo una settimana e si mantiene all'incirca costante fino alla seconda settimana, per poi diminuire leggermente. Per i campioni ad 1,6 l'andamento è poco differente, con un valore massimo di 8 raggiunto dopo 2 settimane ed un decremento a 7,95 fra le 2 e 3 settimane.

Lo spettro FTIR dei campioni dopo 3 settimane di immersione nel SBF è mostrato in figura 3.x: sono riscontrabili negli spettri bande vibrazionali a 571 e 602 cm^{-1} riconducibili al bending del gruppo fosfato (PO_4^{3-}) e a 1070 cm^{-1} corrispondente allo stretching.

Inoltre si sono osservate anche bande a $1350\text{-}1550\text{ cm}^{-1}$ e a 873 cm^{-1} corrispondenti al gruppo carbonato (CO_3^{2-}). Considerata la presenza nell'HCA dei gruppi caratteristici fosfato e carbonato, la presenza delle suddette bande vibrazionali può essere associata alla formazione di un layer superficiale di HCA.

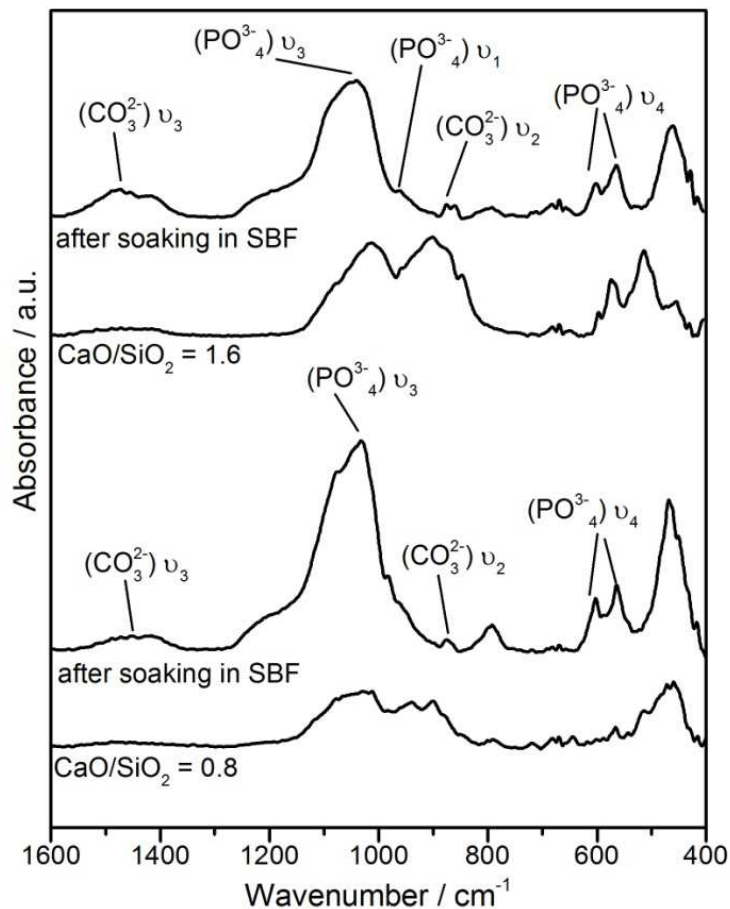


Figura 3.11 Spettro FTIR delle schiume dopo immersione in SBF per 21 giorni a 37°C e 120 rpm

3.3.2 Test cellulare

Per i test cellulari sono stati selezionati dei precursori degli osteoblasti identificati con la sigla MC3T3. La coltura cellulare è stata mantenuta ad un'atmosfera umida di 37°C, con 5% di CO₂ e 21% O₂ per 21 giorni. Il test è stato eseguito al fine di valutare l'adesione delle cellule alla superficie degli scaffolds, la morfologia cellulare e la formazione di matrice ossea.

A tal fine ci si è avvalsi di un microscopio elettronico a scansione (JEOL, JSM 6010L; LEO GEMINI 1525 FEGSEM) su provini ricoperti precedentemente di uno strato superficiale d'oro.

L'immagine di figura 3.12 (a) è riferita ad un campione avente rapporto molare CaO:SiO₂= 0,8 dopo 3 giorni a contatto con la coltura: essa mostra che le cellule si sono diffuse attraverso la superficie 3D del campione, colonizzando anche i pori, ed hanno formato un layer compatto seguendo l'architettura superficiale dei pori.

Le figure 3.12 (b) e (c) si riferiscono allo stesso campione che è rimasto immerso nella coltura per 21 giorni: le cellule hanno formato noduli di tessuto osseo minerale, sottoforma di precipitati globulari bianchi.

Per quanto riguarda i campioni aventi rapporto molare doppio, la maggiore presenza di CaO comporta un'aumento dello strato di HCA e quindi ci si aspetta un miglioramento dell'attaccamento cellulare; ciò effettivamente avviene come evidenziato in figura 3.12 (d).

Dopo 3 giorni di coltura, le cellule risultano diffuse sulla superficie e nelle interconnessioni, mostrando un profilo allungato, per cui non concorrono a formare un layer compatto di cellule come in figura 3.12 (a).

Oltre alla presenza di un elevato contenuto di Ca nella composizione dei campioni, anche la differenza di pH può spiegare questa discrepanza nella morfologia cellulare: dopo 3 giorni è a 7,4 per i campioni a 0,8 e a 7,7 per i campioni a 1,6.

Dopo 3 settimane tali campioni dimostrano tuttavia di avere maggiori noduli mineralizzati di tessuto osseo formati dalle cellule rispetto ai precedenti scaffold, come si può vedere dalle figure 3.12 (e) ed (f). Questa evidenza è prova del miglioramento della biocompatibilità della seconda formulazione più ricca in calcio.

L'adesione cellulare allo scaffold è essenziale per sviluppare un saldo ancoraggio delle stesse nelle applicazioni di ingegneria tissutale. L'idrossiapatite è chimicamente simile alla componente minerale delle ossa dei mammiferi e la sua innata capacità di assorbire le proteine del siero gioca un ruolo vitale nel produrre matrice per l'attaccamento cellulare seguente.

La formazione di HCA sulla superficie 3D dello scaffold consente un eccellente attaccamento cellulare. Come evidenziato in figura 3.13, l'espressione delle due proteine del citoscheletro come *vimentina* ed *actina* è rilevabile nei precursori degli osteoblasti utilizzati per il test cellulare (MC3T3) in entrambe le tipologie di campioni dopo 3 giorni di coltura. Si può notare una maggiore espressione di queste due proteine nei campioni aventi CaO:SiO₂= 1,6.

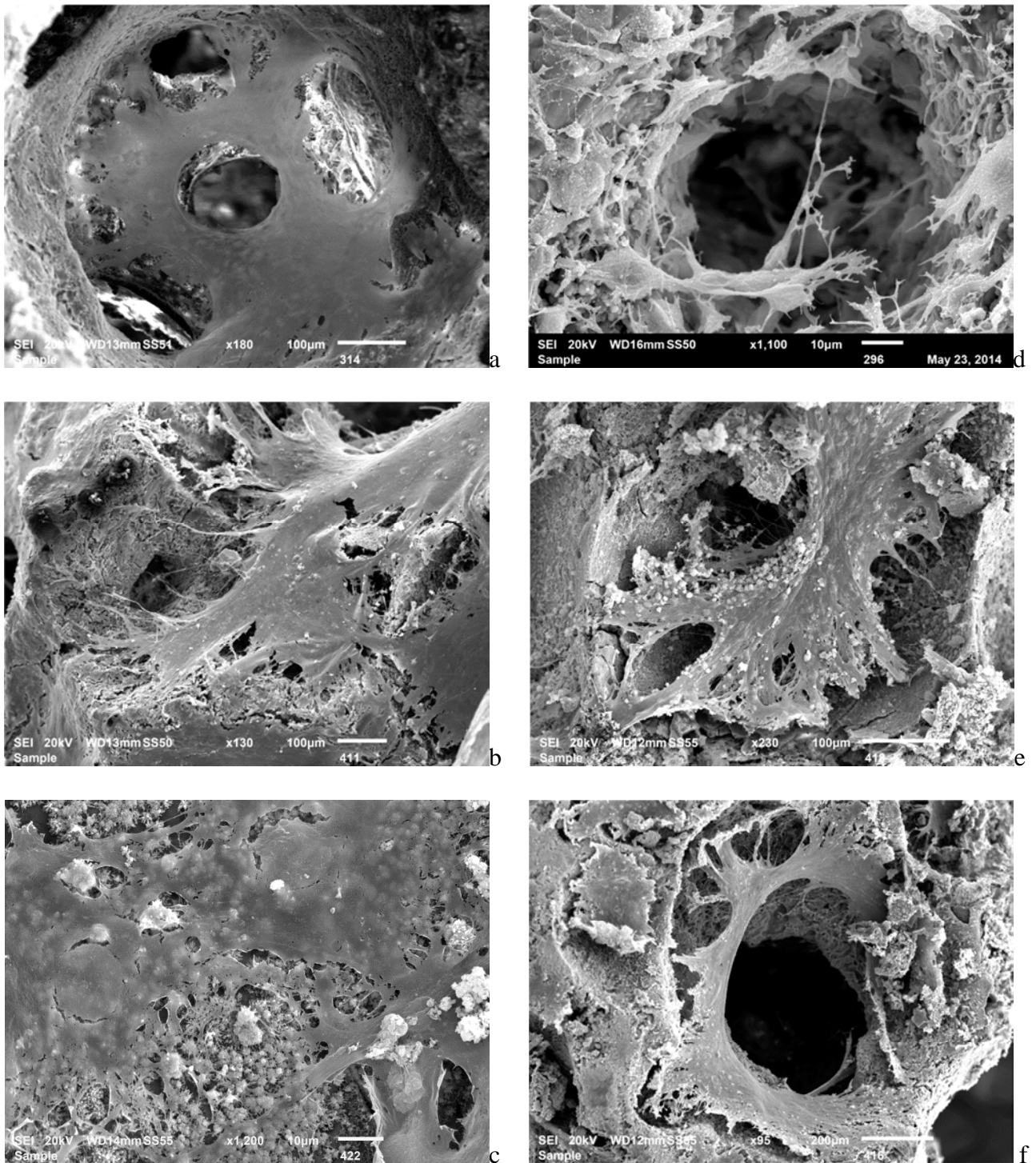


Figura 3.12 Micrografie SEM della crescita cellulare sugli scaffold a $\text{CaO}:\text{SiO}_2=0,8$ dopo 3 giorni (a) e dopo 21 giorni (b,c) e $\text{CaO}:\text{SiO}_2=1,6$ dopo 3 giorni (d) e dopo 21 giorni (e,f).

Ulteriori analisi hanno dimostrato una maggiore espressione di collagene di tipo I, *osteopontina* ed *osteocalcina* negli scaffold 1,6 a testimonianza della predilezione delle cellule MC3T3 per i substrati più ricchi in Ca ai fini della differenziazione osteogenica. [Figura 3.14]

Osteopontina ed osteocalcina sono dei marker primari e secondari di differenziazione osteogenica: essi si legano alle cellule quando queste si sono sviluppate ed hanno dato inizio alle loro funzioni vitali. Pertanto la loro presenza testimonia una corretta crescita e sviluppo di matrice ossea

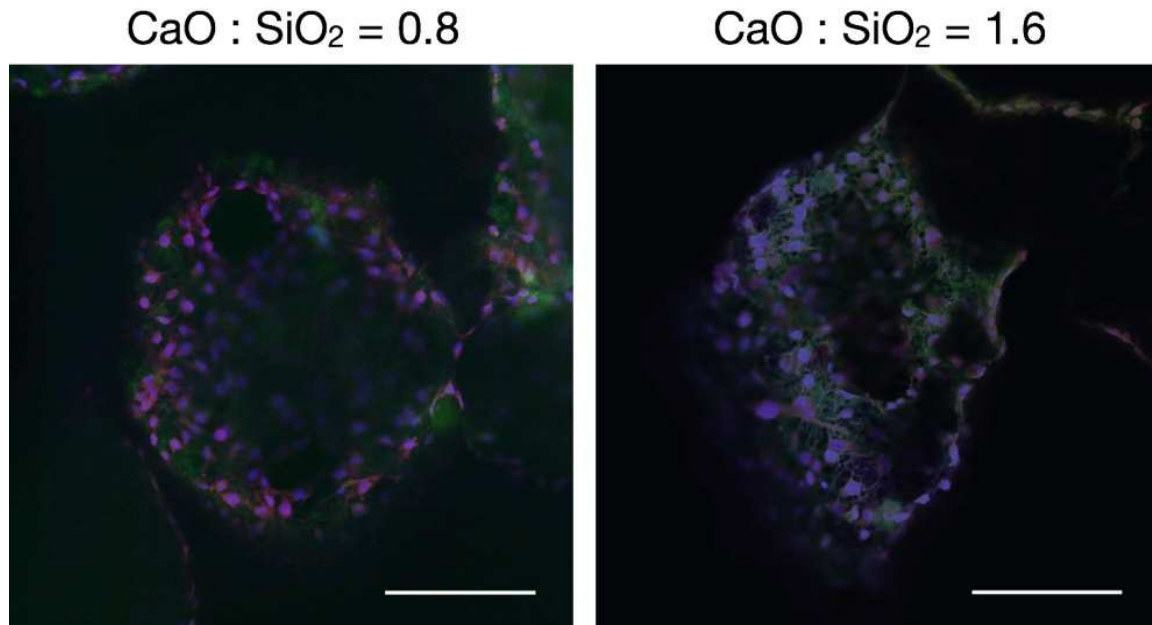


Figura 3.13 Espressione delle proteine vimentina (in verde) ed actina (in rosso) delle cellule MC3T3 seminate sugli scaffolds ceramici dopo 3 giorni di coltura. Scala = 200 μ m.

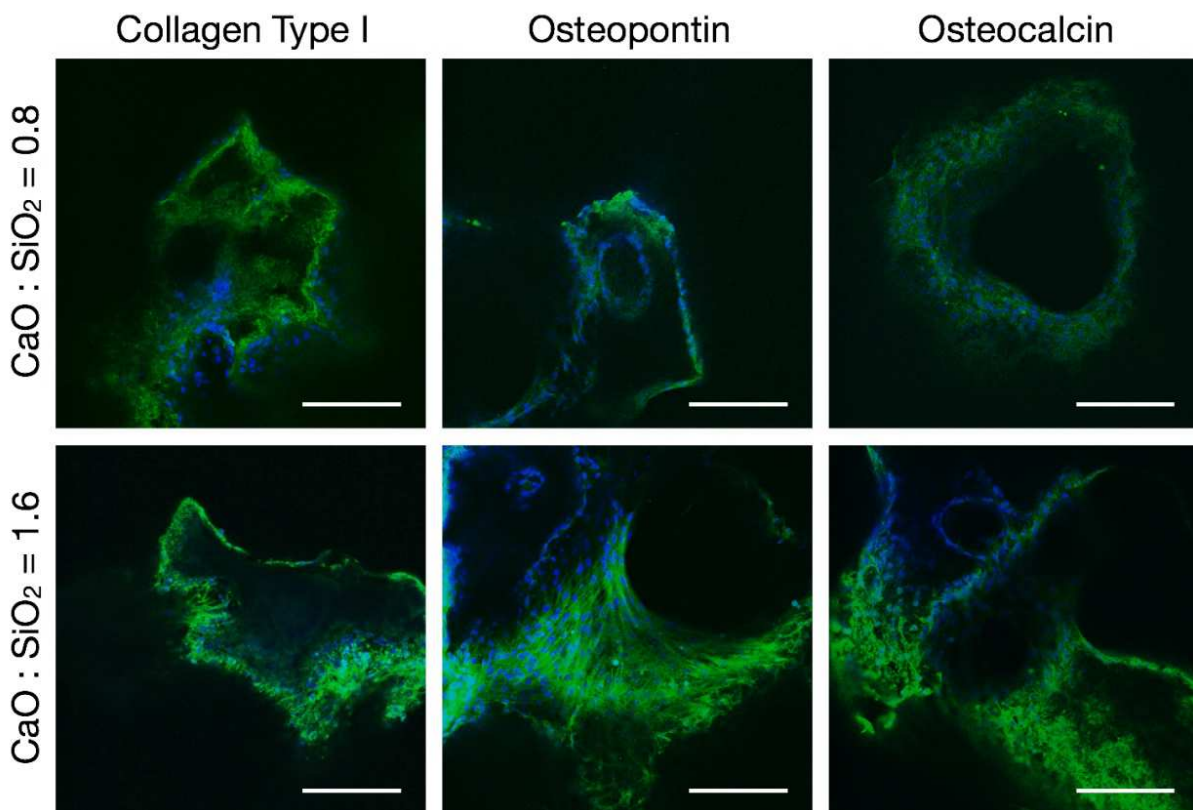


Figura 3.14 Esaminazione immunochimica dopo 21 giorni di coltura delle cellule MC3T3 sulle schiume 3D.

Scala = 200 μ m

I prodotti ionici delle schiume bioattive hanno un significativo impatto sulla differenziazione cellulare delle cellule MC3T3. L'intensificata risposta osteogenica di queste cellule in presenza dei substrati considerati può essere parzialmente spiegata grazie all'incremento degli ioni $[\text{Ca}^{2+}]$ nel bagno di coltura. Il ruolo del calcio relativo agli osteoblasti è ben appurato: moderate quantità di ioni Ca (2-4 mM) sono sufficienti per la proliferazione e la sopravvivenza degli osteoblasti; maggiori quantità degli ioni (6-8 mM) favoriscono la differenziazione osteogenica e la mineralizzazione della matrice su specifici supporti 3D nelle colture di osteoblasti primari.

In conclusione, dopo tali test, si può affermare senza dubbio che le schiume ceramiche sviluppate, in particolare modo i campioni ad elevata composizione di Ca, dimostrano eccellente bioattività, biocompatibilità nonché rilevante capacità osteogenica. Vengono pertanto considerati morfologicamente e biologicamente adatti alla rigenerazione ossea e all'implantologia.

3.4 Variante con CaCO₃ biologico

Il carbonato di calcio minerale usato in precedenza (CaCO₃ micrometrico, Industrie Bitossi) presenta impurezze di metalli pesanti; pertanto ai fini della biocompatibilità non è il miglior candidato possibile. Si è cercato quindi una variabile biologica di tipo “organico” e la si è trovata nel guscio delle uova animale (egg shell waste). Macinata finemente fino a dimensioni nanometriche (egg shell powder), viene utilizzata come nuovo filler per una terza generazione di campioni con rapporto ponderale calce/silice di 0,8.

La motivazione di tale scelta è duplice: da una parte si utilizza un materiale di partenza esente da sostanze inquinanti perché di origine biologica come del resto è il tessuto minerale umano, con caratteristiche fisico-chimiche speculari, e in seconda istanza si utilizza un materiale di scarto il cui unico costo è rappresentato dalla raccolta, purificazione e macinazione.

Tali campioni sono stati processati allo stesso modo dei precedenti aventi carbonato di tipo minerale, ad esclusione di un trattamento preliminare di calcinazione e di una temperatura di schiumaggio, in inserimento diretto, leggermente superiore (320°C rispetto a 300°C).

I risultati ottenuti sono migliori dei precedenti sia dal punto di vista morfologico-strutturale, avendo migliore omogeneità e maggiore connessione delle porosità, sia meccanicamente, esibendo resistenze allo schiacciamento superiori.

In quest’ultimo aspetto sono indubbiamente decisivi la mancanza di cricche e la dimensione nanometrica delle particelle di carbonato di calcio, che consentono alla miscela viscosa di partenza una migliore omogeneità ed assenza di agglomerazioni.

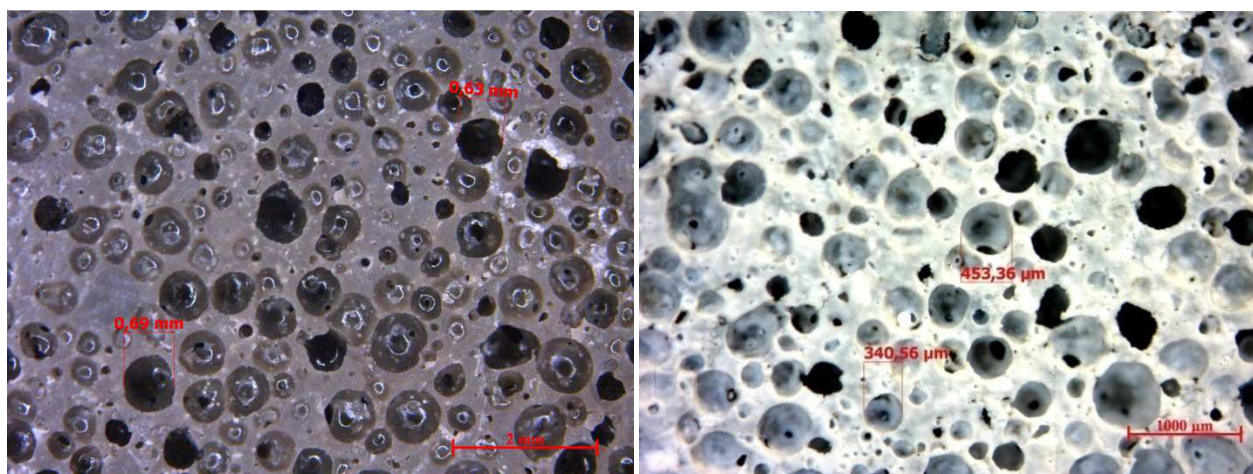


Figura 3.15 Morfologia dopo schiumaggio (a) e dopo ceramizzazione a 700°C (b)

3.4.1 Calcinazione e DTA

Il primo tentativo effettuato con l’egg shell waste macinato ha dato responso negativo: i campioni dopo trattamento di schiumaggio a 320°C, presentavano una struttura viscosa ed appiccicosa in cui si evidenziavano cavità millimetriche che collassavano per creep sotto la forza di gravità. Era evidente che il polimero non era riuscito a reticolare, o perlomeno non del tutto, a causa dell’interazione con sostanze “estranee”; esse, se presenti, andavano ricercate nel filler aggiunto. A

tale scopo si è proceduto con una DTA/TGA, ossia un'analisi termica differenziale e termogravimetrica, su pochi grammi di egg shell powder. Dal grafico risultante si è osservato una reazione esotermica corrispondente ad una diminuzione di massa dovuta alla combustione di materiale organico, nell'intervallo di temperatura $250\div 400^\circ\text{C}$.

Una volta appurato il problema, è stata effettuata sulle polveri di carbonato biologico un trattamento termico preventivo che consisteva nel processare tali polveri ad una temperatura di $450\div 500^\circ\text{C}$, ossia superiore all'intervallo di trasformazione evidenziato nella DTA, per 60 minuti di mantenimento; questo trattamento avrebbe eliminato ogni residuo organico presente e purificato le polveri.

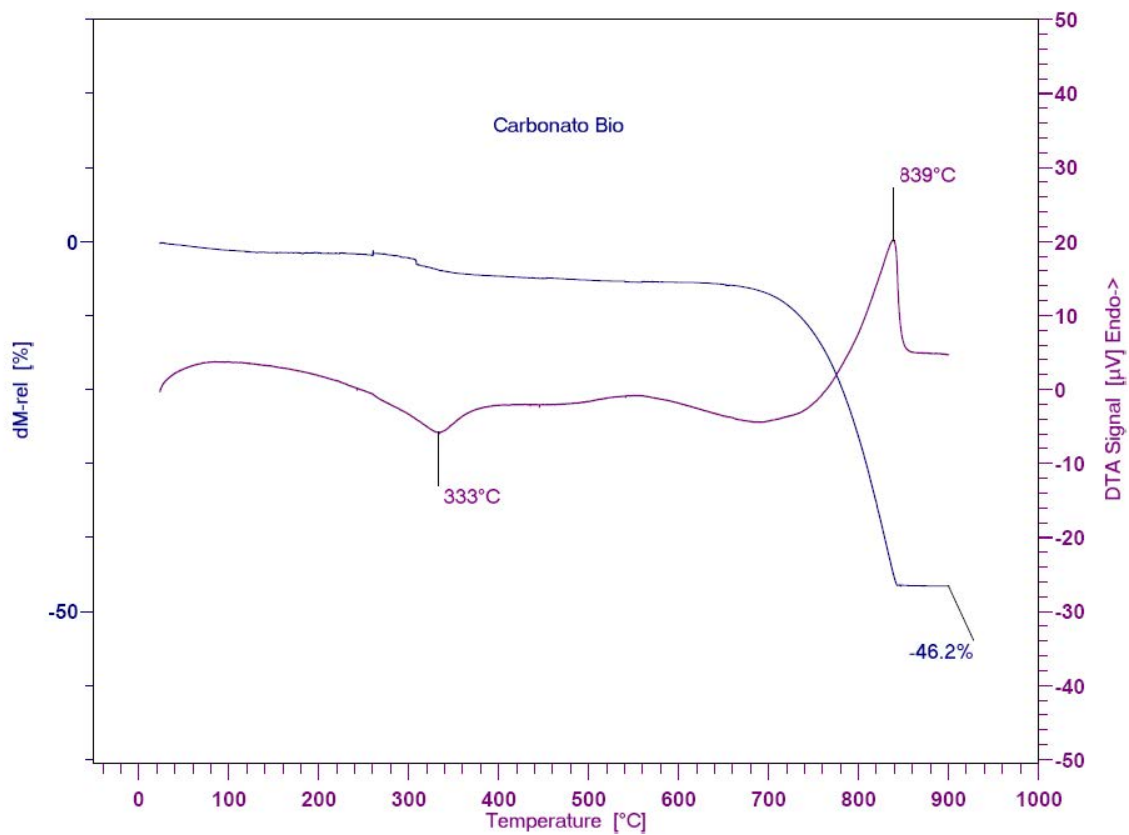


Figura 3.16 Curva DTA/TGA relativa all'egg shell powder

3.4.2 Analisi dati e confronto

La morfologia dei campioni a rapporto molare $\text{CaO}/\text{SiO}_2=0,8$ contenenti carbonato biologico presenta maggiore omogeneità strutturale. Come si può notare dalle immagini al SEM, i pori sono dimensionalmente più omogenei dei corrispondenti campioni contenenti carbonato minerale e tale struttura si mantiene omogenea in tutti gli step di sintesi.

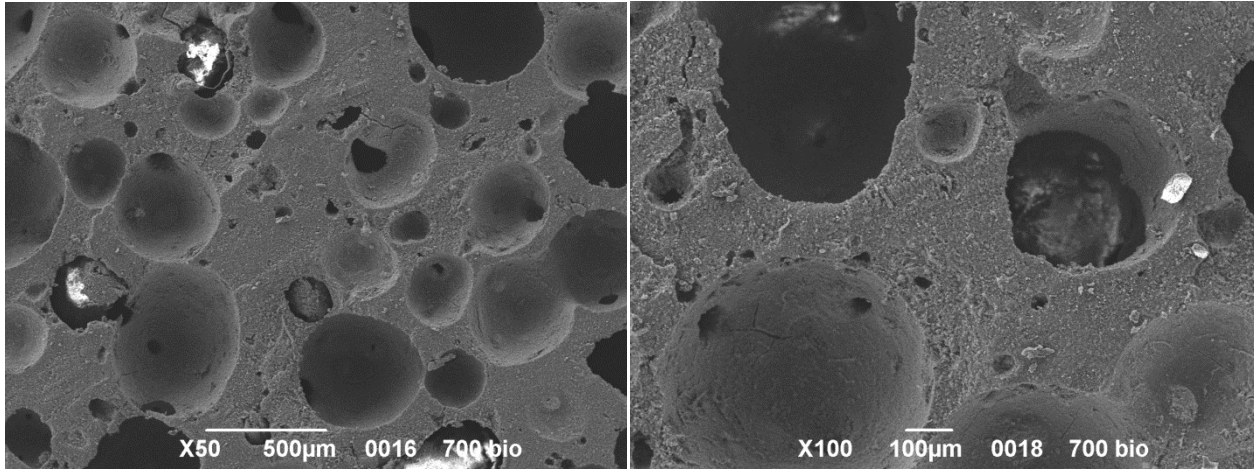


Figura 3.17 Immagini SEM del campione contenente carbonato biologico, ceramizzato a 700°C a diversi ingrandimenti

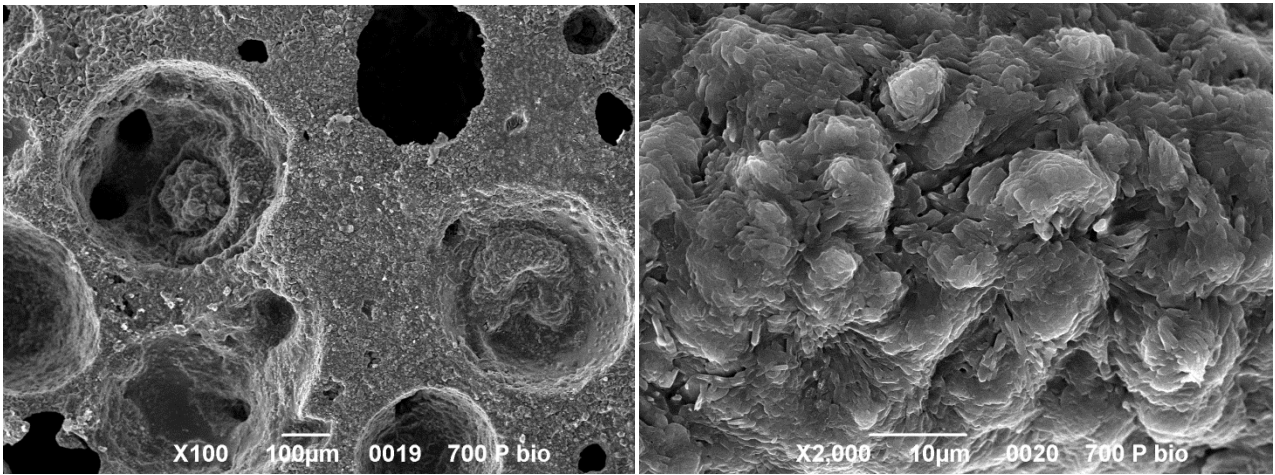


Figura 3.18 Immagini SEM del campione contenente carbonato biologico, ceramizzato a 700°C e fosfatizzato, a diversi ingrandimenti

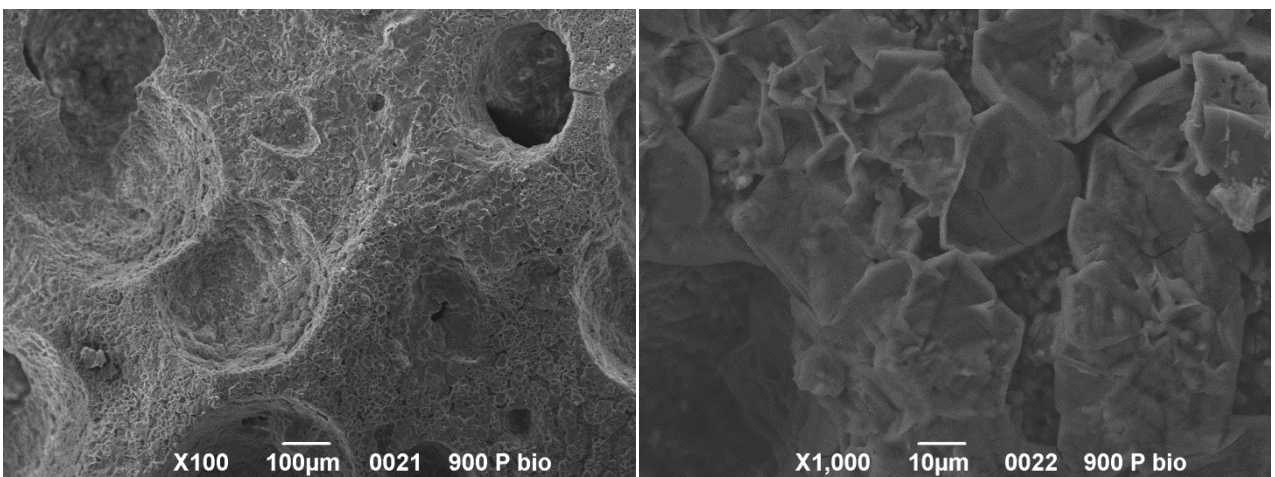


Figura 3.19 Immagini SEM del campione contenente carbonato biologico, ceramizzato a 900°C, a diversi ingrandimenti

L'omogeneità morfologica delle schiume ceramiche ottenute da carbonato biologico si ripercuote nei valori superiori di resistenza a compressione, come risulta dalla tabella 3.4:

	Sforzo critico medio σ [MPa]	Densità bulk ρ [g/cm ³]	Resistenza specifica σ/ρ [(N·m)/Kg]
0,8 I [^] ceramizzazione	2,48 ± 0,8	0,952 ± 0,019	2,6
0,8 Fosfatizzati	1,53 ± 0,4	0,837 ± 0,03	1,83
0,8 II [^] ceramizzazione	2,94 ± 0,8	0,663 ± 0,026	4,43

Le porosità, calcolate con il metodo di Archimede, presentano anch'esse valori molto buoni ed in genere superiori a quelle ottenute con le schiume precedenti. In tabella 3.5 si riportano i valori:

	Porosità aperta [%]	Porosità chiusa [%]	Porosità totale [%]
0,8 I [^] ceramizzazione	66,9	6	72,9
0,8 Fosfatizzati	65,5	2,4	67,9
0,8 II [^] ceramizzazione	67,1	5,7	72,8

Un valore medio leggermente inferiore per la porosità aperta e totale dei campioni fosfatizzati corrisponde alle aspettative, in quanto il processo di deposizione del layer di HCA occlude i pori più piccoli e le interconnessioni più strette.

Capitolo 4

Strutture ceramiche a base CaCO_3

Dopo aver indagato, nel corso del precedente capitolo, la struttura e le caratteristiche delle vetroceramiche a base wollastonite-apatite, nel presente capitolo si è cercato di ottenere strutture porose aventi come elemento preponderante il carbonato di calcio. Questa scelta si è basata sulla necessità, qualora fosse possibile, di ridurre la componente silicatica del materiale ceramico, la quale rimane come elemento residuo dannoso, sottoforma di cristobalite.

4.1 Procedura sperimentale

La base di partenza di questi esperimenti consiste nell'adoperare metodi di formatura differenti da quelli utilizzati in precedenza, ricorrendo alla pressatura a freddo e a caldo utilizzando polimeri sacrificali, nonché alla deposizione di carbonato di calcio in sospensione utilizzando uno scaffold 3D che verrà degradato in un secondo momento.

Lo scopo è quello di conseguire il legame fra le particelle di carbonato di calcio tramite una bassa quantità di silice amorfa che ne aiuti la sinterizzazione.

Per tali esperimenti si è ricorso al carbonato minerale micrometrico (industrie Bitossi) e ad un carbonato nanometrico (Sigma Aldrich), più puro del carbonato micrometrico usato in precedenza. Poiché nanometrico presenta notevole superficie specifica delle polveri, che pertanto tendono ad impaccarsi a causa dell'umidità e ad essere reologicamente complicato da maneggiare in soluzioni viscosi (in alcune circostanze il fluido risulta essere tissotropico). La silice amorfa deriva anche in questo caso dalla degradazione termica di un polimero preceramico; in tali prove si è optato per il Silres®MK che si presenta come una sottile polvere bianca.

Per poter miscelare il carbonato con una bassa percentuale di MK (10%) si utilizza un solvente (tipicamente l'isopropanolo) in misura doppia rispetto al quantitativo in grammi della polvere. La soluzione ottenuta viene amalgamata per mezzo di un miscelatore magnetico per 20 minuti e sottoposta al miscelatore ad ultrasuoni per 10 minuti.

Successivamente si lascia evaporare il solvente in aria o in stufa a temperatura controllata di 60-70°C per accelerare i tempi. La miscela ottenuta viene miscelata in un mulino a palle con cicli di 10-15 minuti e una velocità di rotazione di 330 rpm.

La polvere risultante può essere pressata unidirezionalmente al fine di conferirne proprietà massive sotto forma di pastiglia cilindrica.

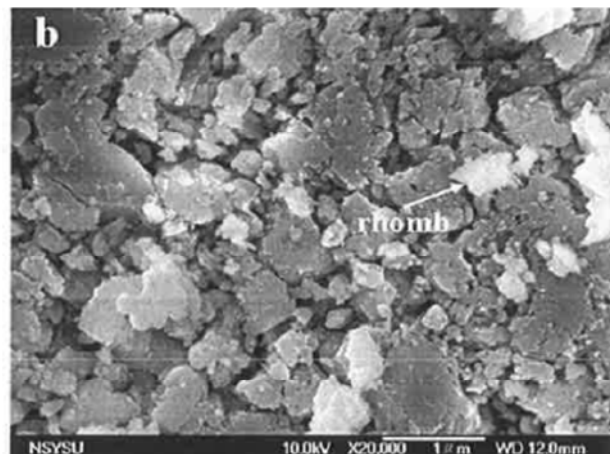
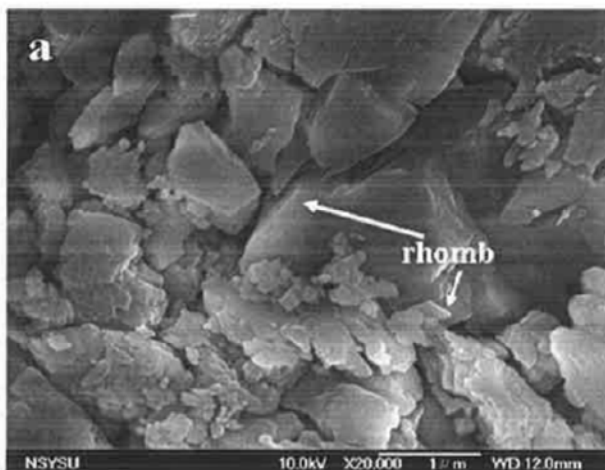
4.2 Sinterizzazione CaCO_3 puro

Il carbonato di calcio è comunemente utilizzato come filler modificatore di proprietà in adesivi, gomme/plastiche, pitture e fluidi oleosi. Oltre a questi impieghi conosciuti, può creare strutture biocompatibili se aggiunto come filler reattivo in un opportuno polimero preceramico (come testimonia quanto sviluppato nel capitolo 3).

Si vuole ora conoscere, per i successivi scopi e fini di questo capitolo, se una polvere di puro carbonato possa diventare una massa compatta policristallina, attraverso un processo di sinterizzazione in aria.

Fini particelle di carbonato, aventi alta superficie specifica e basso punto di fusione, possiedono alta temperatura omologa (T/T_m , con T_m temperatura di fusione), il che risulta benefico in quanto le “proprietà massive” saranno attivate a gradi termici relativamente bassi. Questo avviene perché l’attività termica relativa al coefficiente di diffusione di tutti i materiali con quel determinato tipo di legame è approssimativamente lo stesso, nella stessa frazione della loro temperatura di fusione.

Fig 4.1 Immagini al SEM di pressatura a freddo di un campione di CaCO_3 partendo da polveri romboedriche micrometriche (a) senza macinazione e (b) con macinazione.



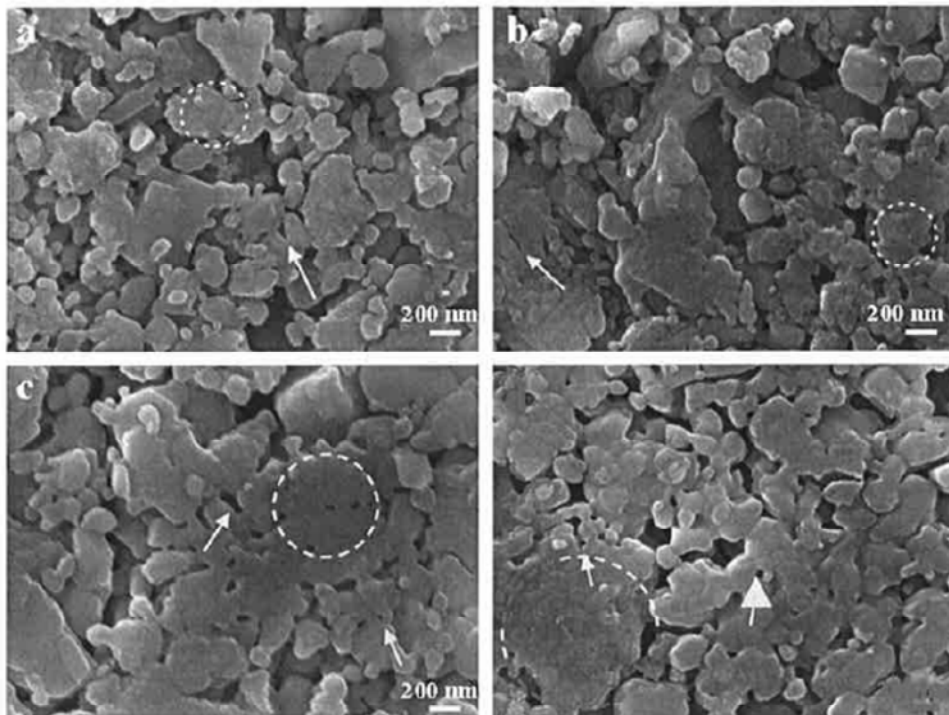
Al fine di aumentarne la superficie specifica, le polveri micrometriche vengono macinate in un mulino a palle operante ad una velocità di rotazione di 500 rpm, con 2 ripetizioni del ciclo di 20 minuti. Le polveri rese sub-micrometriche di carbonato ottenute vengono pressate unidirezionalmente a temperatura ambiente in stampi di 15 mm di diametro, ad una pressione di 40 MPa per il primo tentativo e di 320 MPa per il secondo. Per entrambi la resistenza del verde era sufficiente alla manipolazione, nonostante uno “sfogliamento” dei piani a contatto con la superficie premente del cilindro. Si è quindi proceduto, dopo rettifica superficiale, ad effettuare un ciclo termico di cottura ad una temperatura di 600°C per 30 minuti di permanenza, tramite infornamento diretto una volta raggiunta la temperatura suddetta da parte del forno.

Sulle 2 pastiglie ottenute si è misurata la densità geometrica, che corrisponde alla densità effettiva considerando una sinterizzazione avvenuta totalmente:

Massa polvere	Pressione	Temperatura	Tempo	Densità
4 g	40 MPa	600°C	30 minuti	2,01 g/cm ³
4 g	320 MPa	600°C	30 minuti	2,54 g/cm ³

Tabella 4.1 Valori pastiglie sinterizzate di CaCO_3 nanometrico

Fig 4.2 Immagini al SEM di polvere di CaCO_3 pressata e trattata termicamente a 600°C per 30 minuti: si notano le zone sinterizzate cerchiare e la porosità residua indicata dalle frecce.



La densità teorica del carbonato di calcio massivo si attesta sul valore di $2,71 \text{ g/cm}^3$; ciò implica che la pastiglia soggetta a pressatura a pressione elevata ha sinterizzato in modo migliore rispetto all'altra. Tuttavia la densità raggiunta è inferiore, anche se di poco, a quella teorica e tale fatto implica una presenza di micro-vuoti e micro-cavità all'interno della struttura che comporta una non totale diminuzione di superficie specifica dovuta ai fenomeni di sinterizzazione.

Rimane il fatto importante che dopo trattamento termico le pastiglie hanno aumentato considerevolmente la loro compattezza e resistenza meccanica, il che attesta la buona riuscita dell'esperimento: la polvere di carbonato di calcio è sinterizzabile!

4.3 Tecnica di formatura con polimero sacrificale

Con il metodo PDCs possono essere ottenuti ceramici ad elevata porosità con dimensioni dei pori che variano nel range dei micro-, meso- e macro-pori.

Esistono varie strategie di costruzione di tali strutture, fra cui l'aggiunta di additivi che si decompongono rilasciando gas, l'aggiunta di microsfele polimeriche espandibili, e la miscelazione con microsfele di polimero sacrificale (*Sacrificial template method*).

Tale metodo consiste nella miscelazione della polvere di carbonato e preceramico formulata con il Silres®MK con microsfele di polimetilmetacrilato (PMMA, A 910W, Cray Valley Waterborne Polymers Department, Atofina Italia, Milan, Italy) di dimensioni micrometriche ($250 \mu\text{m}$), seguita da pressatura a caldo e dall'eliminazione delle microsfele per mezzo di un trattamento di cottura ($0,5^\circ\text{C}/\text{min}$ fino a 300°C con mantenimento di 60 minuti).

Successivamente, il provino cilindrico poroso risultante viene pirolizzato e convertito in una schiuma ceramica microcellulare tramite un nuovo trattamento termico a 700°C in aria ($1^\circ\text{C}/\text{min}$, mantenimento di 60 minuti).

Con questo metodo quindi si ottengono ceramici porosi, con dimensioni dei pori controllata; modulando la dimensione delle microsfele aggiunte, nonché della loro percentuale in peso sulla massa totale, variano le caratteristiche dei composti porosi realizzati.

Questo procedimento quindi utilizza un *template* che fornisce una struttura in negativo, ed il PMMA assolve a tale scopo. La rimozione della fase sacrificale non lascia difetti nelle pareti delle celle come invece succede nel caso di metodi di replica in positivo. Quindi, solitamente, la resistenza meccanica delle strutture create con il metodo degli elementi sacrificali in negativo è maggiore rispetto a quelle create con la replica in positivo.

Sperimentalmente, la polvere di carbonato di calcio e il polimero Silres®MK in varie percentuali in peso, vengono portati in soluzione con dell'isopropanolo, miscelati ed essiccati in stufa a $70-80^\circ\text{C}$ per accelerare l'evaporazione del solvente. La polvere così ottenuta viene miscelata nella giusta proporzione con microbeads di PMMA; le sfere utilizzate hanno dimensioni superiori ai $200 \mu\text{m}$, perché si vogliono ottenere campioni con pori di dimensioni tali da permettere al liquido biologico di entrare nei pori stessi e permettere così la formazione di nuovo tessuto ed un miglior ancoraggio della protesi ai tessuti circostanti.

La miscelazione viene effettuata in un mulino a palle (modello Frisith) dotato di giara in metallo duro. L'operazione viene eseguita ad una velocità di 300 rpm per 20 minuti (10 minuti per 2 cicli). La polvere miscelata viene successivamente versata in uno stampo cilindrico e pressata mediante l'ausilio di una pressa. Per ottenere la formatura dei campioni, che andranno poi trattati termicamente, si sono utilizzate tecniche di *Cold e Hot Pressing*: esse operano, rispettivamente, con elevate pressioni a temperatura ambiente e ad alta temperatura, attraverso una deformazione a freddo oppure a caldo.

Nella pressatura uniassiale a freddo si lavora con pressioni di 40 MPa a salire, per una ventina di secondi; quella a caldo opera a 170°C per 8 minuti esercitando una pressione che cresce progressivamente fino ad assestarsi ai 30 MPa.

La pressatura semplice uniassiale porta alla formazione di componenti con geometria controllata, buona resistenza al verde e ridotta porosità dello stesso. Queste pastiglie cilindriche del diametro di circa 30 mm, possono essere trasformate in parti ceramiche dense, prive di difetti e con un ritiro uniforme. Inoltre, data l'elevata quantità di fillers presenti che aiuta a ridurre la propagazione delle cricche durante la lavorazione, i componenti possono essere sottoposti a lavorazioni meccaniche anche quando sono sottoforma di "verdi".

I campioni creati in questa ricerca, dopo pressatura, sono stati sottoposti ad un trattamento termico a 300°C per 2 ore con una velocità di $0,5^\circ\text{C}/\text{min}$ per eliminare le microbeads. Tale *heating rate* è stato scelto in base a studi sperimentali precedenti, nei quali si era riscontrata la necessità di imporre gradienti termici estremamente bassi, per permettere sia al polimero siliconico di reticolare e quindi contribuire a creare la giunzione fra le particelle di carbonato di calcio, sia al PMMA di decomporsi lentamente, evitando così una violenta fuoriuscita dei composti gassosi dalla struttura.

Durante il lento riscaldamento la resina fluisce parzialmente (sopra la sua temperatura di transizione vetrosa e prima del *cross-linking*) e riempie completamente, sfruttando la capillarità, i vuoti tra le *microbeads* di PMMA.

Successivamente i campioni sono stati sottoposti al trattamento di ceramizzazione in atmosfera ossidante (aria). Durante tale trattamento la dimensione della porosità diminuisce leggermente a causa di un ritiro isotropico lineare.

Inizialmente è stato sviluppato un campione che contenesse il 10% in peso di SiO_2 : 10 g di polvere di carbonato di calcio diluita in 20 ml di isopropanolo a cui viene aggiunto 1,19 g di MK per tenere conto della resa del polimero che si attesta allo 0,84%.

Il primo rapporto tra polvere "preceramica" così ottenuta e microbeads era del 50% in peso; tuttavia risultava ancora un valore troppo esiguo in quanto la porosità ottenibile a fine trattamento non risultava sufficiente; per avere porosità aperta è necessario avere una quantità di PMMA superiore alla *soglia di percolazione*.

La connessione tra la porosità è dovuta sia alla fuoriuscita dei gas durante la decomposizione, sia al fatto che dopo la pressatura, la maggior parte delle *microbeads* è a contatto.

Si è deciso pertanto di aumentare la quantità di PMMA fino al 75% in peso, per cercare di ottenere una struttura a celle aperte che non fosse però troppo fragile. Infatti, aumentando troppo la quantità

di polimetilmetacrilato, si ottiene una struttura troppo porosa e quindi poco resistente. Per tentare di ovviare a tale problema si è pensato di aumentare al contempo la percentuale di MK nella polvere di partenza dal 10 al 20% in peso, affinché l'effetto legante della silice fosse maggiore.

Le pastiglie prodotte ed i relativi trattamenti termici sono riportati in tabella 4.1:

Campione	Q.polvere	Q. PMMA	Reticolazione	Trattamento termico	RV	RMecc
50-50 CP 40 MPa	2 g	2 g	300°C 2 h – 0,5°C/min	Non effettuato	no	no
40-60 CP 80 MPa	1,6 g	2,4 g	300°C 2 h – 0,5°C/min	Non effettuato	no	no
50-50 HP 30 MPa	4 g	4 g	300°C 2 h – 0,5°C/min	20-700°C – 1°C/min + stazionamento a 700°C 1 h	si	Suff.
35-65 HP 30 MPa	2,8 g	5,2 g	300°C 2 h – 0,5°C/min	20-700°C – 1°C/min + stazionamento a 700°C 1 h	si	bassa
25-75 HP 30 MPa	2 g	6 g	300°C 2 h – 0,5°C/min	20-700°C – 1°C/min + stazionamento a 700°C 1 h	si	bassa

CP = Cold Pressing, HP = Hot Pressing, RV = Resistenza Verde

Tabella 4.2 Campioni con PMMA

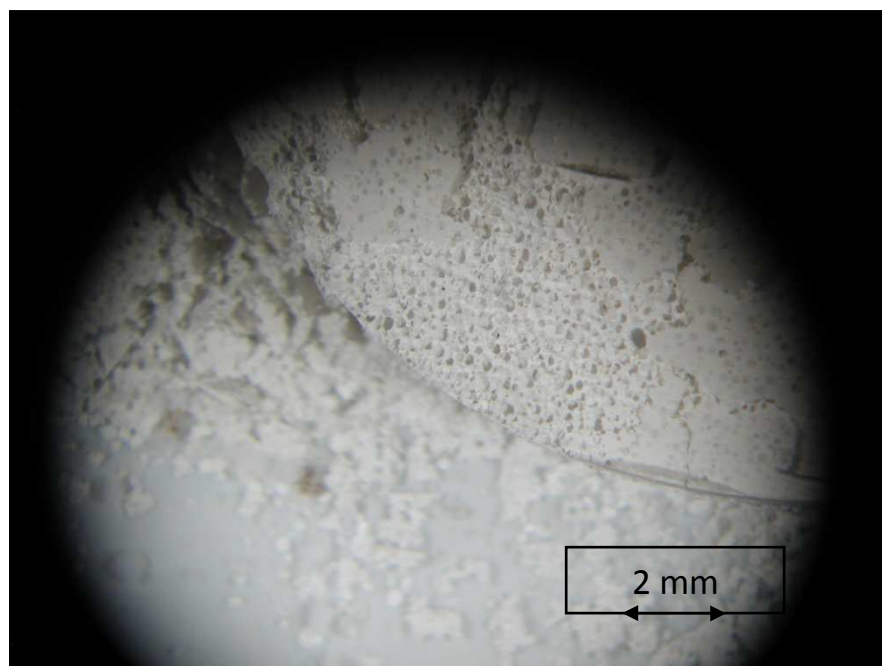


Figura 4.1 Pastiglia 35-65 ceramizzata a 700°C dopo Hot Pressing

I risultati piuttosto scadenti di resistenza meccanica dopo ceramizzazione derivano dal fatto che la silice, formata per decomposizione termica del polimero preceramico ad elevate temperature, non è sufficiente a sinterizzare fra loro le particelle di carbonato di calcio.

La resistenza al verde dopo *Hot Pressing* deriva con ogni probabilità dall'effetto legante delle microbeads che oltre a creare una massa compatta della pastiglia, si legavano fra loro lungo i punti di contatto grazie alla temperatura elevata (170°C) sotto pressione (30 MPa) che le deformava plasticamente.

Le pastiglie sinterizzate a 700°C tuttavia, sebbene prive di resistenza meccanica accettabile, mostrano una struttura porosa omogenea ed interconnessa, a testimonianza del fatto che il processo di formatura funziona ed è replicabile.

4.4 Tecnica 3D printing

Per creare una struttura 3D che funga da “negativo” alla polvere ceramica che si deposita attorno ad esso, viene utilizzata una stampante Itis3D® Maxit.

Essa consente una deposizione di polimero fuso che, con specifici attuatori di posizionamento, può riprodurre velocemente ed accuratamente un modello 3D digitale.

Utilizzando opportuni processi additivi, essa deposita il materiale strato per strato fino a creare una struttura plastica intricata e simmetrica.

La stampante lavora con ABS (Acrylonitrile Butadiene Styrene) o PLA (Polylactic Acid) in forma di fili; lo scaffold utilizzato in questa prova viene prodotto in PLA.

Stampante Maxit 3D	
Area stampabile	210 x 160 x 100 mm
Velocità di stampa	Sopra i 100 mm/s
Spessore layer	0,125-0,3 mm
Sezione ugello	0,5 mm
Sezione filamento	3 mm
Controllo temperatura	$\pm 1^\circ\text{C}$

Tabella 4.3 Dati tecnici stampante Maxit 3D

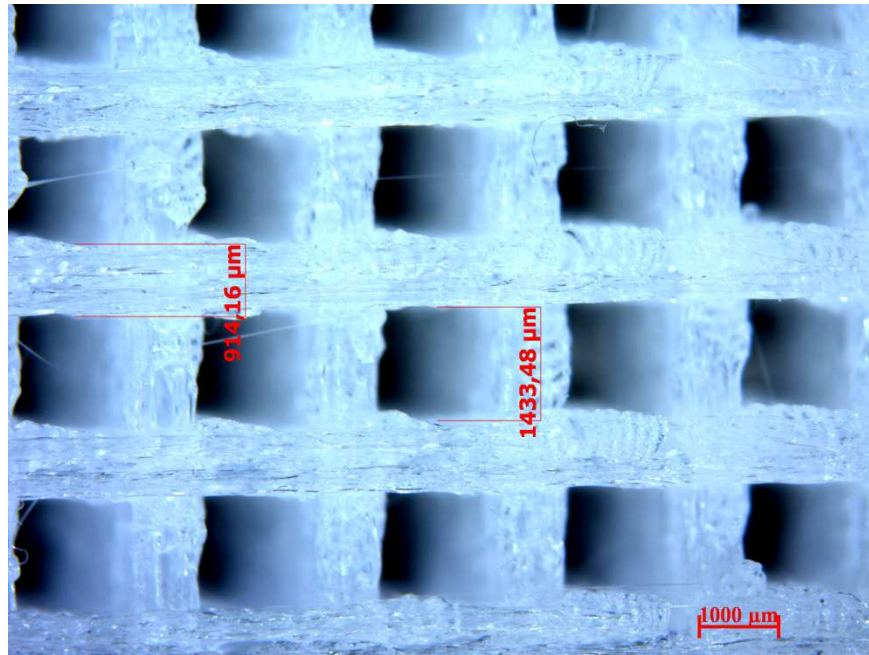


Figura 4.2 Scaffold in PLA creato dalla stampante 3D

La struttura presenta sezioni massive di circa 1 mm e vuoti reticolari di circa 1,5 mm. Poiché essa rappresenta il negativo della struttura ceramica, essa avrà prima di essere trattata termicamente, spessore massivo di 1,5 mm e vuoti reticolari di 1 mm.

Il costrutto di PLA viene immerso in una barbotina contenente in soluzione polvere ceramica di carbonato nanometrico e una determinata percentuale di Silres®MK al fine di garantire una resa ceramica finale dopo trattamento termico del 10% in peso. La deposizione delle polveri ceramiche e la completa evaporazione del solvente a temperatura ambiente richiede parecchi giorni, dopo i quali lo scaffold polimerico risulta totalmente comperto e riempito nelle sue cavità.

Dopo aver eliminato la polvere ceramica in eccesso, lo si tratta termicamente ad una temperatura di 315°C con una velocità di riscaldamento di 0,5°C/minuto e 2 ore di mantenimento che consenta la rimozione dello scaffold in PLA tramite fusione e successiva evaporazione dei suoi costituenti.

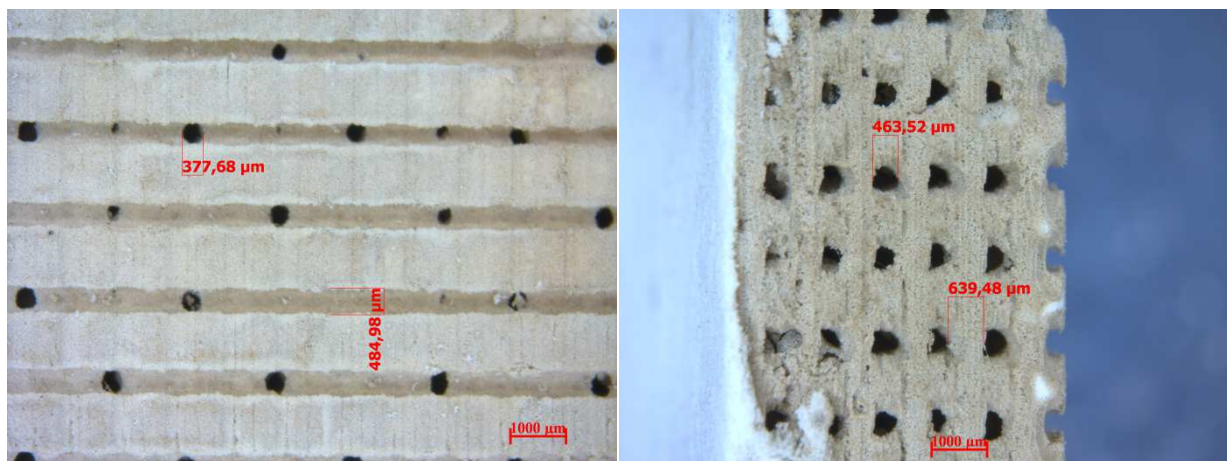


Figura 4.3 Foto allo stereo microscopio del campione ceramico risultante dall'eliminazione della struttura 3D in PLA

Il trattamento termico seguente a 700°C comporta la conversione del preceramico in silice ma non quella del carbonato in ossido di calcio, la quale creerebbe un ritiro volumetrico che la struttura così debolmente legata non sosterebbe.

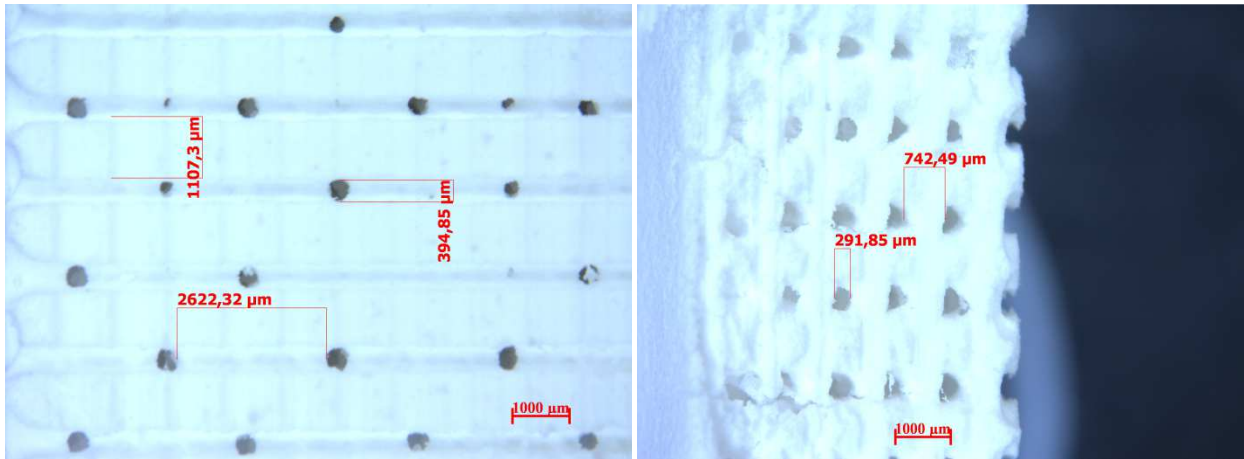


Figura 4.4 Foto allo stereo microscopio del campione ceramico dopo ceramizzazione a 700°C

Dopo ceramizzazione a 700°C si notano lungo lo spessore delle cricche dovute all'assenza di impaccamento in formatura e che pertanto non garantiscono un legame nemmeno dopo sinterizzazione.

Avendo ottenuto sufficiente resistenza meccanica alla manipolazione dopo sinterizzazione, tale campione è stato fosfatizzato secondo le medesime modalità, per quanto concerne concentrazioni, tempi e temperature, applicate ai campioni trattati nel capitolo 3.

Il campione finale, dopo fosfatizzazione è stato fotografato al SEM

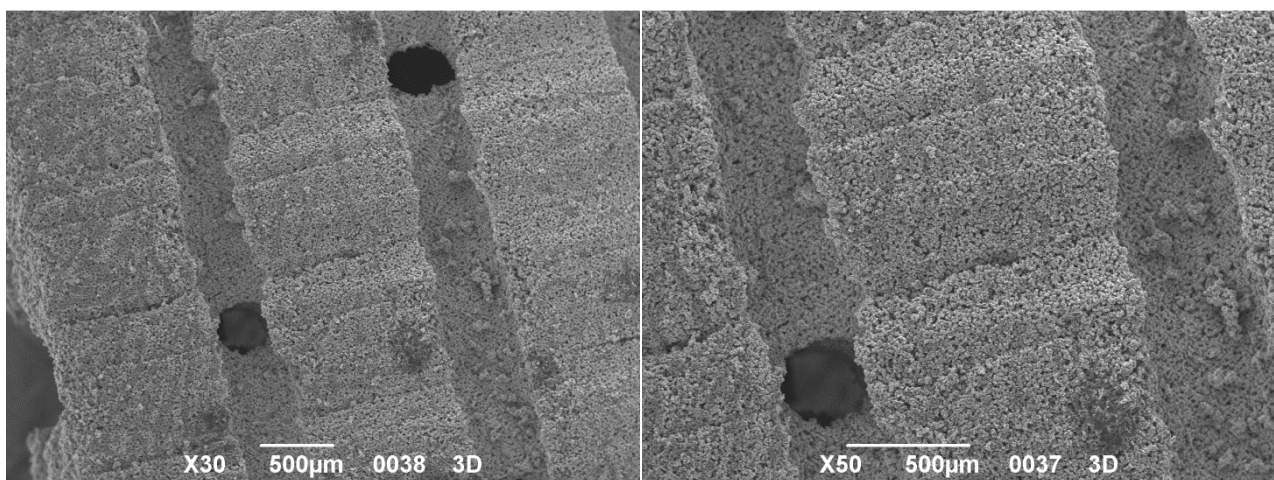


Figura 4.5 Foto al SEM degli scaffold fosfatizzati

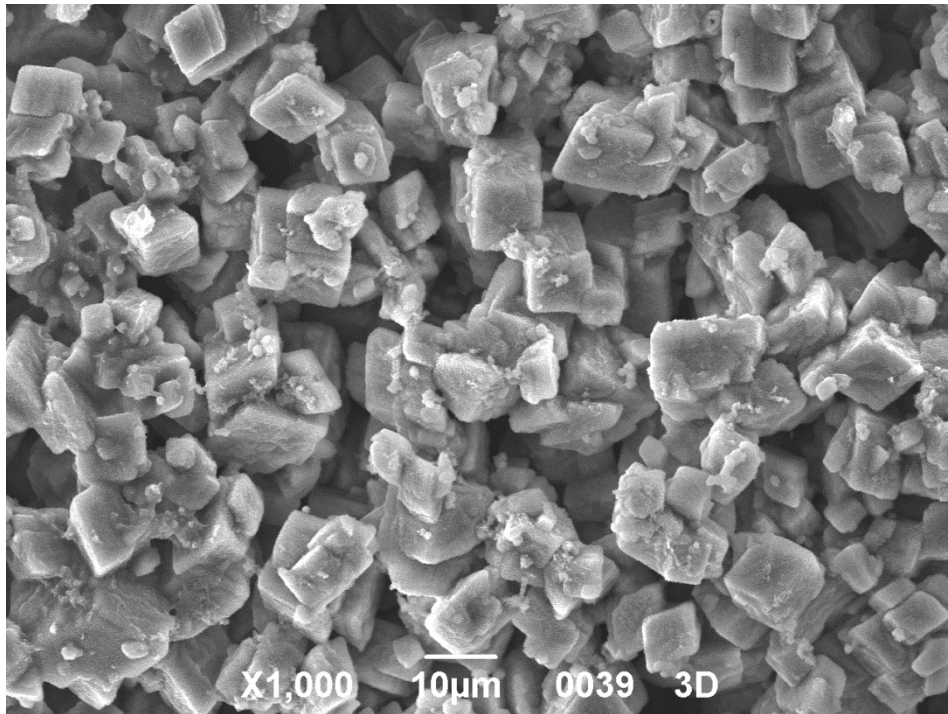


Figura 4.6 Micrografia dei cristalli di HCA formati in superficie

La resistenza meccanica sale ancora un po' dopo tale trattamento, probabilmente a causa della saturazione di alcune cavità già parzialmente occluse ad opera dell'idrossiapatite che si crea in superficie, tuttavia rimane ancora molto modesta. Studi futuri sono orientati ad incrementare tale proprietà agendo sulla percentuale di silice introdotta, aggiunta di additivi leganti e magari utilizzando una pressione esterna di compattazione agente sul costruito depositato.

Capitolo 5

Caratterizzazione e strumentazione

Il presente capitolo descrive, in merito alla caratterizzazione sperimentale, i metodi e gli strumenti dei quali ci si è serviti: diffrattometria a raggi X, misure di densità, analisi termogravimetriche, micrografie allo stereo-microscopio e al SEM, prove meccaniche.

5.1 Analisi Diffrattometriche

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.

I raggi X hanno lunghezze d'onda ($\lambda = 0,5-2,5 \text{ \AA}$) molto inferiori alla luce visibile ($\lambda = 6000 \text{ \AA}$) e vengono prodotti in un tubo radiogeno sotto vuoto, in seguito al passaggio di corrente in un filamento di tungsteno che per effetto termoionico emette elettroni. Il filamento è posto tra due elettrodi ad alta differenza di potenziale con conseguente accelerazione dal catodo (elettrodo) all'anodo (bersaglio). Gli elettroni colpiscono l'anodo con elevata energia cinetica e al punto di impatto vengono prodotti raggi X che si irradiano in tutte le direzioni. Quasi tutta l'energia cinetica viene convertita in calore mentre circa l'1% viene trasformata in radiazione contenente diverse lunghezze d'onda differenti.

Per bassi valori di tensione applicata la radiazione X viene prodotta in uno spettro di frequenze continuo (*radiazione bianca*). Per tensioni maggiori di un certo valore critico tipico del bersaglio, a certi valori della lunghezza d'onda appaiono dei picchi stretti sovrapposti allo spettro continuo detti *linee caratteristiche* del materiale in esame. L'origine di queste linee sta negli atomi del bersaglio: se uno degli elettroni bombardanti ha energia sufficiente per espellere un elettrone K, uno degli elettroni più esterni cade immediatamente nello spazio rimasto disponibile e l'atomo emette un quanto, di lunghezza d'onda definita. In base al materiale usato come bersaglio, quindi, si avrà un fascio di raggi X con una certa lunghezza d'onda.

I raggi X possono interagire con la materia in due modi:

- La materia può assorbire i raggi X in seguito all'interazione di questi con gli atomi, che determineranno transizioni allo stato eccitato ed un aumento di temperatura del materiale. Nel caso dei raggi X, l'elevata energia con cui colpiscono la materia provoca l'espulsione di un elettrone per effetto fotoelettrico da parte dell'atomo con cui interagiscono;

- Diffusione (scattering): la radiazione viene diffusa dalla materia e le onde ad essa associate variano la loro direzione di propagazione. Tale variazione può avvenire con uno scambio di energia tra fotoni e materia (scattering anelastico) o senza scambio di energia (scattering elastico).

La tecnica di diffrazione di raggi X si basa sullo scattering elastico coerente, in quanto la diffusione nasce dalla somma coerente di tutte le onde elettromagnetiche diffuse dagli atomi che si trovano su vari piani atomici. Per manifestarsi richiede la presenza di un ordine a lungo raggio nella struttura del materiale analizzato.

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. L'interferenza è un fenomeno legato alla natura ondulatoria delle onde che vengono a coincidere nel tempo e nello spazio e può essere di tre tipi:

- Interferenza costruttiva: l'onda risultante avrà un'intensità doppia grazie all'assenza di sfasatura che porta a sommare l'intensità delle due onde;
- Interferenza intermedia: la sfasatura è compresa tra 0 e $\lambda/2$ e da questa dipenderà il calo di intensità;
- Interferenza distruttiva: le onde si trovano in opposizione di fase e l'onda risultante sarà nulla.

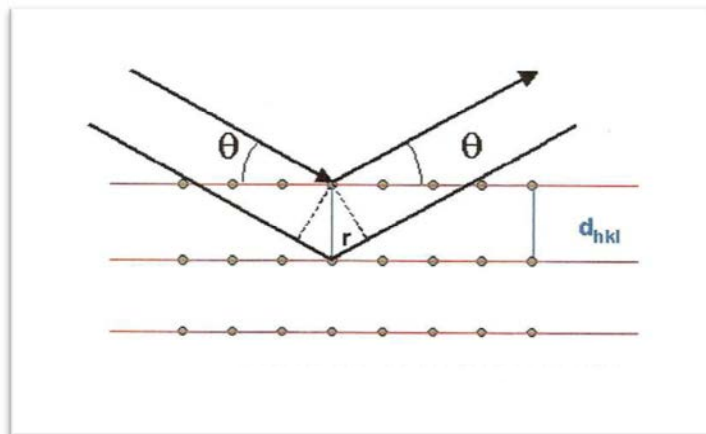


Figura 5.1 Riflessione alla Bragg dei raggi incidenti il reticolo

Nel reticolo cristallino, gli atomi fungono da sorgenti secondarie di radiazione, che darà interferenza costruttiva se si verificherà la relazione (legge di Bragg):

$$2d_{hkl}\sin(\theta) = n\lambda \quad \text{Eq.5.1}$$

Una famiglia di piani reticolari, quindi, sarà in grado di produrre una riflessione costruttiva dei raggi X lungo le direzioni dettate da tale legge.

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 (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 invece un'apparecchiatura con configurazione 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.

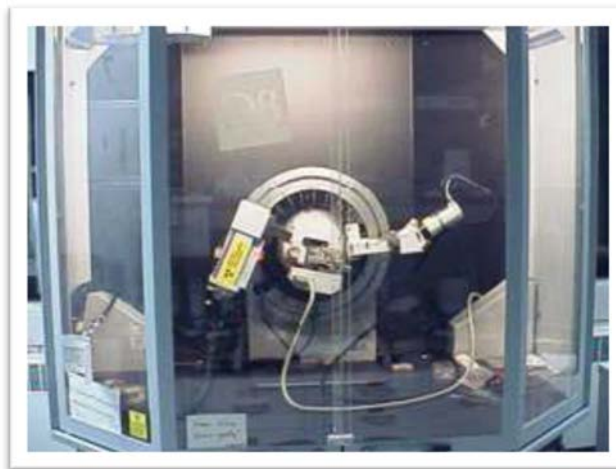


Figura 5.2 Diffrattometro Bruker AXS D8 Advance

La sorgente utilizzata dallo strumento presenta l'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 varrà indagata; se così non fosse, i raggi X risulterebbero riflessi secondo un angolo casuale portando quindi alla costruzione di un diffrattogramma, in definitiva, errato.

Nelle analisi sperimentali si sono effettuate misurazioni nell'intervallo 2θ compreso fra 10° e 70° con un incremento di $0,05^\circ$ ogni 2 secondi.

Il primo scopo di questo tipo di analisi è individuare le fasi cristalline presenti all'interno del campione, mettendo a confronto lo spettro ottenuto con un database cristallografico (Powder Diffraction File-2, ICDD, Newtown Square, PA, USA) grazie al programma open-source "Match!" (Crystal Impact GmbH, Bonn, Germany), che permette di confrontare la corretta sovrapposizione dei picchi tra il dato sperimentale e gli spettri disponibili in letteratura, valutando anche in prima istanza la percentuale delle diverse fasi cristalline presenti. La ricerca dei dati in

letteratura si è svolta filtrando tutte le informazioni presenti e mantenendo solo le composizioni mineralogiche che contenevano gli elementi presenti nella miscela di partenza. Il software è in grado di convertire l'output dello strumento, che restituisce l'angolo di incidenza a cui viene rilevato il picco, in spaziatura tra piani atomici (espressi in nanometri) utilizzando la legge di Bragg. Per riprodurre l'evoluzione strutturale delle fasi cristalline i file immagine (.raw) sono stati convertiti in tabelle di dati (.dat) con il programma "convX" e successivamente importati e analizzati con il software Origin 8.1 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA).

5.2 Misure di densità

Le misure densitometriche sono state condotte con due metodi diversi:

- Per i campioni massivi si è seguito la normativa ASTM-C 373, "Standard Test Method for Water Absorption, Bulk Density, Apparent Porosity and Apparent Specific Gravity of Fired Whiteware Products";
- Per le polveri dei campioni stessi, utilizzando un picnometro ad elio, modello AccuPyc 1330, Micromeritics, Norcross, GA.

Con il primo metodo si sfrutta il noto principio di Archimede: *"un corpo immerso in un fluido riceve una spinta dal basso verso l'alto pari al peso del volume di fluido spostato"*.

Per avere un'indicazione con una certa attendibilità statistica sulla densità apparente del materiale da processare, risulta necessario effettuare il test su almeno cinque campioni. I provini vengono immersi in acqua distillata bollente per circa un'ora in modo che possano assorbire per capillarità l'acqua nella porosità presente.

Successivamente si lascia raffreddare il bicchiere che li contiene aggiungendo acqua a temperatura ambiente senza rimuoverli dal bicchiere, per evitare possibili danneggiamenti ai campioni stessi. Dopo aver lasciato raffreddare il bicchiere per circa un'ora, si può procedere con le analisi. All'interno del bicchiere è importante avere acqua distillata priva di bolle che possono disturbare la misura; vanno pertanto rimosse collocando il recipiente nel sonificatore prima di iniziare i rilevamenti.

La prima misura che si effettua è il peso in acqua del provino saturo (S) che si effettua ponendo il campione nel punto A indicato in figura 5.3 ed aspettando che la bilancia si stabilizzi su un valore preciso. Successivamente si esegue la tara della bilancia e si ripete la misura anche per gli altri campioni. Il secondo passo è pesare i campioni per valutare il peso degli stessi saturi d'acqua (M), collocandoli a turno nel punto B. A tal fine si prelevano i campioni dal bicchiere e se ne asciuga la superficie con un panno umido: infatti una superficie asciutta potrebbe assorbire acqua per capillarità dall'interno del provino falsando il risultato della misura.

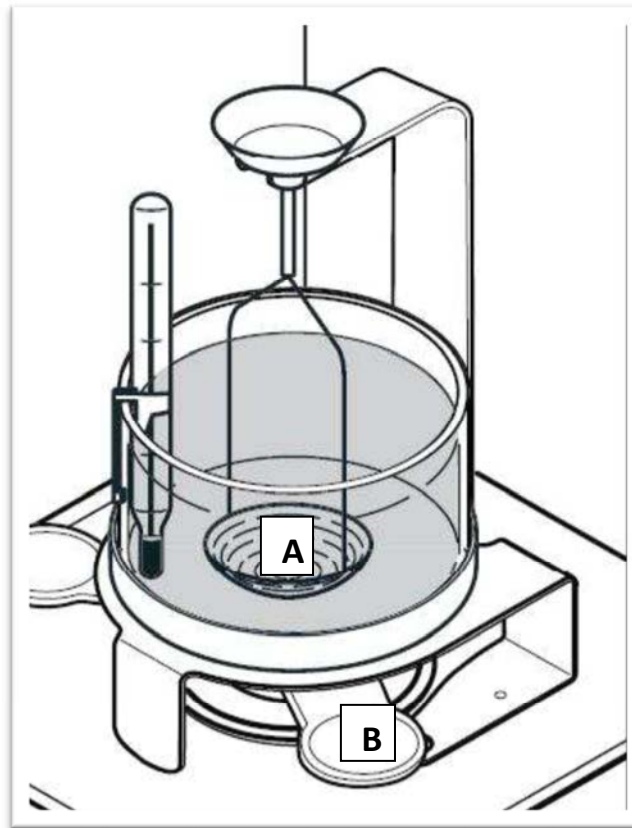


Figura 5.3 Bilancia elettronica utilizzata per le misure di densità e zone di misura:

[A] peso in acqua del campione, [B] peso a secco del campione.

Dopo aver effettuato questa serie di misure, tutti i campioni vengono inseriti all'interno di una stufa e lasciati ad essiccare. L'ultimo passaggio è quello di determinare il peso a secco (P) dei campioni, determinato dopo averli estratti dalla stufa e pesati nel punto B.

Una volta ricavati i tre valori suddetti (S, M, P), è possibile ricavare numerose indicazioni sulla porosità del materiale.

Volume esterno	Volume pori aperti	Porosità apparente	Densità bulk	Assorbimento acqua	Densità apparente
$V = M-S$	$V_{op} = M-P$	$P_{app} = (M-P)/V$	$B = P/V$	$A_{H_2O} = (M-P)/P$	$D_{app} = P/(P-S)$

Tabella 5.1 Proprietà determinabili con il metodo di Archimede

Con il secondo metodo, invece, si ottiene la densità reale del materiale di cui è costituito il campione (D_{pyc}), calcolata solo sul volume effettivamente occupato dal materiale in seguito a macinazione. La misura è stata effettuata con l'ausilio di un picnometro ad elio: la dimensione atomica ridotta dell'elio consente di occupare tutta la superficie e anche i pori più piccoli del campione in esame.

Il rapporto tra il peso a secco del campione ed il volume misurato dal picnometro consente di ottenere la densità reale del materiale, privato anche della porosità chiusa:

$$\rho_{\text{true}} = m / (V - V_{\text{PA}} - V_{\text{PC}}) \quad \text{Eq 5.2}$$

dove si è indicato con V_{PA} e V_{PC} rispettivamente il volume occupato dalla porosità aperta e il volume occupato dalla porosità chiusa.

Usando i dati ottenuti con i due metodi è possibile ricavare la porosità totale, data dal rapporto tra il volume dei pori aperti e chiusi e il volume totale occupato dal campione.

$$P_{\text{tot}} = (\rho_{\text{true}} - B) * 100 / \rho_{\text{true}} \quad \text{Eq 5.3}$$

La porosità chiusa, infine, è data dalla semplice differenza $P_{\text{tot}} - P_{\text{app}}$.

5.3 Analisi termica differenziale

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.

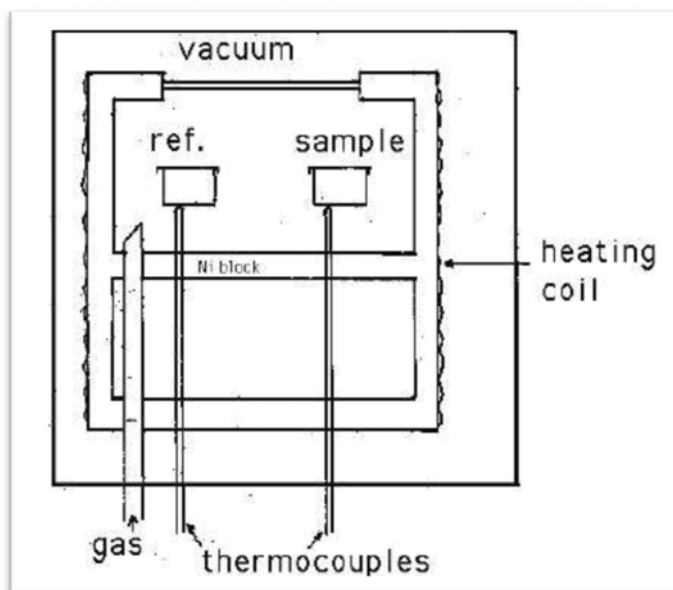


Figura 5.4 Illustrazione schematica di una cella per DTA

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.

Nello svolgimento di questa tesi sono state condotte analisi in aria fino ad una temperatura di circa 1000°C con uno strumento DTA/TGA, STA409 (Netzsch GmbH, Selb, Germany).

5.4 Analisi allo stereomicroscopio

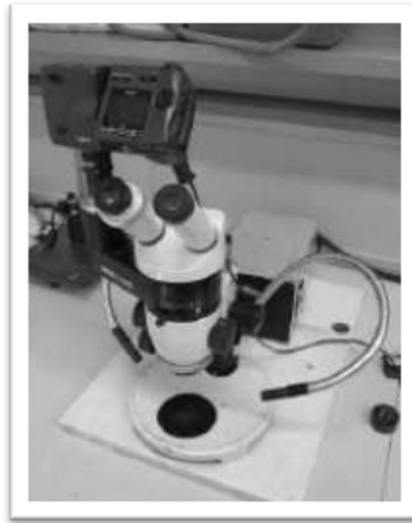


Figura 5.5 Stereomicroscopio

La struttura dei campioni realizzati è stata osservata grazie all'ausilio di uno stereomicroscopio: esso è un particolare microscopio che permette una visione tridimensionale degli oggetti osservati. Lo stereomicroscopio utilizza due percorsi ottici separati diversamente allineati, con due obiettivi e due oculari per fornire immagini diversamente angolate agli occhi destro e sinistro ed osserva gli oggetti principalmente per mezzo della luce riflessa da due lampade laterali, posizionate ad angoli molto inclinati rispetto al piano di osservazione. In questo modo produce una visione stereoscopica del campione in esame, servendosi della luce proveniente dalle lampade laterali e riflessa dal campione.

Lo strumento possiede ingrandimenti che vanno da 6,4X a 40X, quindi permette la visualizzazione della struttura dei campioni e la stima delle dimensioni dei pori.

5.5 Microscopio elettronico a scansione (SEM)

L'acronimo SEM sta per "Scanning Electron Microscope" ed è un tipo di microscopio elettronico; esso non sfrutta la luce come sorgente di radiazione ma un fascio elettronico che colpisce il provino. Dal campione vengono emesse numerose particelle fra le quali gli elettroni secondari, i quali vanno a collidere su di uno speciale rivelatore che li trasforma in impulsi elettrici.

Il fascio non è fisso ma viene fatto scandire: viene cioè fatto passare sul campione in una zona rettangolare, riga per riga, in sequenza. Il segnale creato dagli elettroni secondari viene mandato ad uno schermo dove viene eseguita una scansione analogica. Il risultato è un'immagine in bianco e nero con caratteristiche simili a quelle di una normale immagine fotografica.

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.

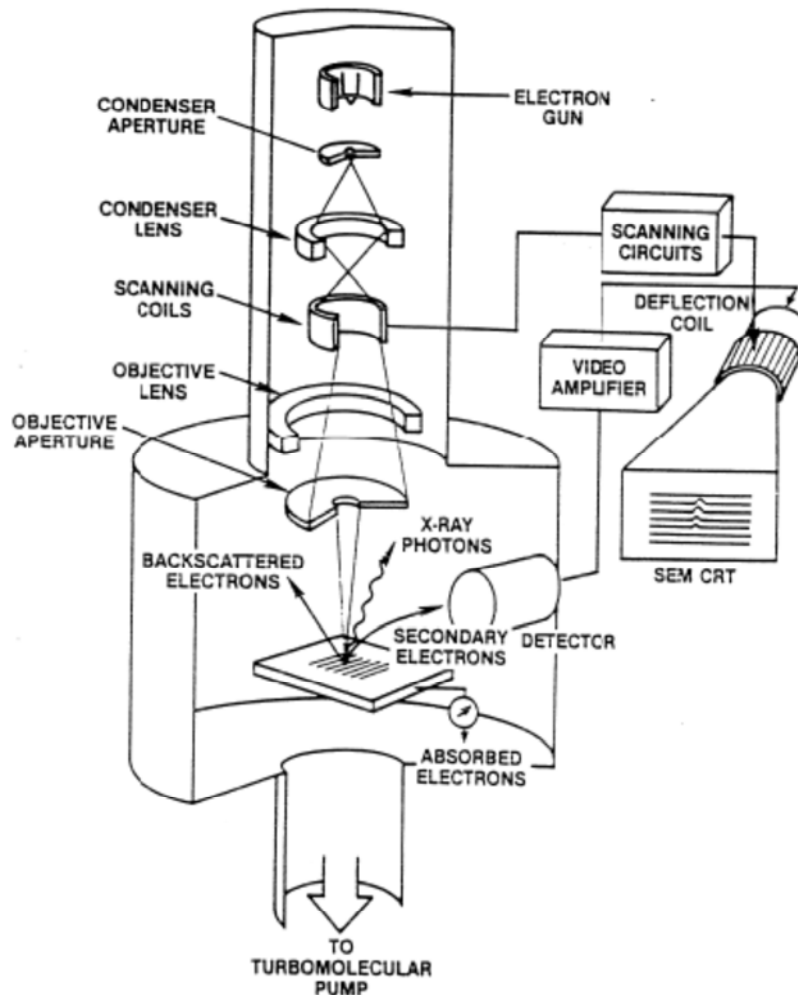


Figura 5.6 Schematizzazione di un microscopio elettronico a scansione (SEM)

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 (LaB₆) oppure quelle ad emissione di campo FEG (Field Emission Gun).

Lo strumento utilizzato monta un cannone a sorgente FEG (FEI Quanta 200 FEG, FEI Company, The Netherlands). 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.

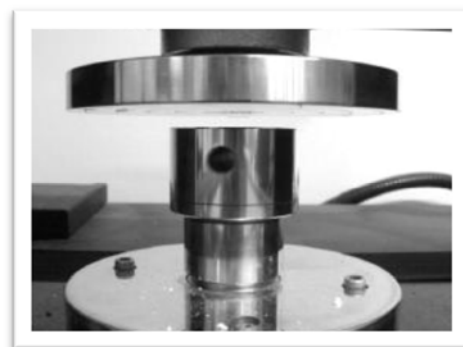
Le immagini ottenute con una sorgente FEG sono di qualità superiore rispetto alle sorgenti tradizionali, poiché riescono a garantire un segnale con meno rumore e maggiore luminosità (10⁸ A/cm²), sebbene necessitino di un maggiore grado di vuoto (10⁻¹¹ Torr).

5.6 Prove meccaniche in compressione

Le prove in compressione sono state effettuate utilizzando un'apposita macchina per test sui materiali *Instron 1121 UTM* (Instron, Danvers, MA) a deformazione controllata.



a)



b)

Figura 5.7 (a) macchina Instron 1121 UTM in configurazione di prova a compressione;

(b) ingrandimento dei piatti circolari fra i quali avviene la compressione.

Delle diverse configurazioni possibili, quella per le prove di resistenza meccanica alla compressione (Figura 5.7- a) è dotata di due piatti circolari (Figura 5.7- b) tra cui viene compresso il campione: il piatto inferiore rimane fisso e funge da appoggio per i provini mentre il piatto superiore è collegato alla traversa mobile e può quindi compiere spostamenti verticali a velocità controllata e costante. Impostata la velocità di avanzamento della testa, 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.

I materiali ceramici sono generalmente fragili; pertanto non è possibile ottenere parametri attendibili riguardo la loro resistenza meccanica a trazione come nel caso dei metalli, tantomeno saranno attendibili prove riguardanti pochi campioni a causa della notevole dispersione di valori ottenibili. Al fine di caratterizzare meccanicamente i campioni, si è optato per delle prove in compressione sui provini prismatici o cilindrici lappati, al fine di ottenere le due superfici orizzontali parallele, paragonabili fra loro in valori di area superficiale ed altezza. La prova in compressione è quella che più corrisponde al reale sforzo a cui vengono sottoposti costrutti protesici di questo tipo, i quali una volta innestati nell'osso umano devono sorreggere il peso del corpo.

La deformazione relativa (ϵ) e lo sforzo di compressione ($\sigma_{\text{compr.}}$) a cui vengono sottoposti i provini, si possono calcolare conoscendo l'area A della faccia del campione sulla quale agisce il carico tramite le seguenti equazioni:

$$\epsilon = v \cdot t / 60 \cdot h \cdot 100 \quad \text{Eq.5.4}$$

$$\sigma_{\text{compr.}} = F/A \quad \text{Eq.5.5}$$

dove v è la velocità di abbassamento della macchina (impostato a 5 mm/min) ed h è lo spessore del campione.

Il diagramma fornito dalla macchina riporta in ascissa il tempo (t) ed in ordinata la forza (F); il programma poi elabora i dati forniti dalla macchina in modo da ottenere le curve sforzo-deformazione del campione in esame.

Conclusioni

L'obiettivo del presente lavoro di tesi è stato la realizzazione e lo studio di bioceramici cellulari a base carbonato di calcio e silice per scopi protesici.

La tecnica scelta per realizzare i campioni (Polymer Derived Ceramics) è basata sull'utilizzo di polimeri preceramici e fillers; essa è innovativa perché consente la formatura dei campioni secondo molteplici metodi, ed è efficace perché permette una sintesi semplice delle miscele di partenza.

La procedura sperimentale prevede di formulare la ricetta di partenza tenendo conto della resa dei polimeri e fillers impiegati; successivamente i precursori vengono dispersi in un solvente idoneo, assieme ad un agente schiumante, e la sospensione essiccata in un cristallizzatore. Dopo formatura in opportuni stampi cilindrici, si eseguono vari trattamenti termici sui composti ottenuti a seconda delle necessità o delle caratteristiche di processabilità delle materie prime.

Per le vetroceramiche ottenute lo scopo principale è stato quello di ottenere una struttura cellulare con porosità aperta, oltre a conseguire le altre caratteristiche meccaniche, chimico-fisiche e biologiche richieste da un *ideal scaffold*.

Per quanto riguarda i silicati di calcio cristallini, sono state indagate due diverse composizioni molari: la prima presenta un rapporto fra ossido di calcio (CaO) e silice (SiO₂) di 0,8 mentre la seconda composizione raddoppia tale rapporto portandolo ad 1,6.

Le prove sono state eseguite utilizzando un polimero preceramico viscoso alla temperatura ambiente (Silres®H62C) e del carbonato di calcio in polvere (CaCO₃ micrometrico) creando uno schiumaggio diretto coadiuvato da uno specifico agente espandente (idrazina). Dopo lo schiumaggio, i campioni sono stati ceramizzati a 700°C (ceramizzazione non reattiva), fosfatizzati per 14 giorni in una soluzione acquosa uno molare di fosfato di sodio e quindi ceramizzati a 900°C (ceramizzazione reattiva).

I campioni ottenuti presentano le fasi previste agli XRD e dopo alcune implementazioni dei cicli termici si sono ottenuti provini aventi le caratteristiche idonee per essere testati biologicamente. L'ottimizzazione dei parametri di processo ha permesso il raggiungimento dei valori di resistenza meccanica, porosità aperta, distribuzione media delle interconnessioni e purezza di fase idonei ad essere testati in vitro.

Le analisi biologiche si sono avvalse di un test di bioattività che poneva gli scaffold a contatto con un fluido biologico che simulasse la concentrazione degli ioni tipica del plasma sanguigno (SBF) e di una semina cellulare sugli stessi immersi in una coltura per tre settimane.

I risultati, sia di rilascio ionico dei campioni, sia al microscopio elettronico, mostrano l'effettiva bioreattività dei costrutti realizzati, specialmente di quelli con rapporto molare calce/silice ad 1,6.

Oltre a tali ottimi risultati, il lavoro sperimentale ha investigato altre tecniche di formatura che prevedono la preparazione della composizione contenente polveri ceramiche (a base carbonato di

calcio) miscelate ad una fase sacrificale contenente microsfele di PMMA. La miscela così ottenuta viene pressata a freddo e/o a caldo per darle consistenza massiva, mentre la struttura porosa viene sviluppata tramite la degradazione specifica delle sfere polimeriche aggiunte che lasciano dei vuoti all'interno della struttura. I risultati non sono stati raggiunti in termini di resistenza meccanica, mentre la struttura morfologica risultante corrisponde alle aspettative perché aperta ed interconnessa.

Un'ultima prova di fattibilità coinvolge uno scaffold di PLA sviluppato grazie ad una stampante 3D che funge da struttura portante attorno a cui si deposita una soluzione di carbonato di calcio con una bassa percentuale di polimero preceramico solido (Silres®MK). Le particelle in soluzione si depositano e si legano attorno a tale struttura in PLA mentre il solvente evapora.

La struttura ottenuta, una volta evaporato il solvente e degradato termicamente lo scaffold, presenta una sufficiente resistenza meccanica per essere sinterizzata a 700°C e successivamente fosfatizzata. Studi futuri sono orientati ad implementare il procedimento per ottenere una resistenza meccanica maggiore.

Ringraziamenti

E' da quand' ero un bambino che ha iniziato a prendere consapevolezza di cosa significasse "università" che sognavo di scrivere i ringraziamenti della tesi di laurea, perché pensavo avrebbero significato l'ultimo passo del mio percorso formativo. Ben consapevole, ora, che niente finisce davvero e che la mia formazione continuerà sempre in accordo col detto (quanto mai vero) "gli esami della vita non finiscono mai!".

Tuttavia fin qui sono arrivato, e da qui voglio ringraziare tutti coloro mi hanno aiutato e sostenuto in questa "avventura" che ha contrassegnato, nel bene e nel male, una parte importante della mia vita. Per quella che ormai è diventata una deformazione professionale, andrò con ordine partendo dall'ambiente universitario: desidero ringraziare il mio relatore Ing.Enrico Bernardo che mi ha seguito con costanza e dedizione durante tutto il periodo passato in laboratorio; di Lui mi colpisce l'entusiasmo e l'impegno, che rinnova ogni singolo giorno, con cui affronta i risultati più o meno buoni, le problematiche e gli insuccessi che inevitabilmente si evidenziano in un lavoro sperimentale di questo tipo. Oltre ad essere stato un punto di riferimento scientifico imprescindibile nel mio lavoro, mi ha indirettamente insegnato che per ottenere dei risultati e per arrivare in alto, il solo talento non basta: occorre credere fortemente in quello che fai e fare tutto al massimo delle proprie potenzialità, pensando sempre positivo.

Rimanendo in ambito universitario ringrazio il Sg. Mauro Gobbin, validissimo tecnico di laboratorio, nonché pazientissimo, per tutte le volte che importunavo non sapendo dove fosse un determinato strumento/solvente ecc...; a dirla tutta lo ringrazio anche per le volte (stranamente poche visti i miei precedenti in casa) in cui di fronte alla rottura accidentale nonché maldestra ("Te sì un savaton!" mi dice spesso mia mamma) di provette, becker e simili strumenti in vetro ha chiuso un occhio aiutandomi a nascondere le "prove" del misfatto.

Da un Mauro ad un altro, è doveroso ringraziare il dottorando Mauro Marangoni il quale, specialmente nei primi mesi, mi ha aiutato molto ad ambientarmi in laboratorio e mi ha pazientemente spiegato l'utilizzo di alcuni macchinari quando ancora per me erano oscuri marchingegni da evitare per non far danni. Lo ringrazio anche per le chiacchierate fatte assieme, sia di confronto su problematiche emerse, sia nei periodi di svago in cui ci raccontavamo delle nostre vite; gli auguro di diventare presto Dottore di Ricerca perché lo merita, non soltanto per le sue capacità intellettive, ma anche per la sua caratura professionale nonché personale.

Un saluto e un abbraccio ad un altro futuro Dottore di Ricerca: Laura Fiocco. Purtroppo non ho avuto la possibilità di lavorare con Lei quanto avrei voluto perché ha girato l'europa nei mesi in cui ero alle prese con le prove sperimentali, ma nel poco tempo che ho avuto la possibilità di passare con lei, ho conosciuto una ragazza capace, solare, seria e responsabile come poche altre ragazze abbia mai conosciuto. La ringrazio sentitamente per il lavoro sui test cellulari presenti nella mia tesi

che ha portato avanti con dedizione e competenza.

Alla mia famiglia non bastano dei ringraziamenti scritti: a mamma Renza e papà Francesco devo questo traguardo più di ogni altro, per il sostegno morale ancora più che materiale e a loro dico soltanto una cosa che le riassume tutte: « sono fiero di essere vostro figlio ».

Ai miei fratelli dico grazie per l'aiuto che mai mi avete negato (col computer sono poco più che una schiappa!) e per tutte le volte che avete sopportato silenziosamente le mie “invasioni di campo” con libri, fogli, computer e quant'altro in giro per casa.

Un abbraccio ed un bacio alla mia ragazza Mariangela (Mery per tutti, perché io lo scrivo con la “e” al posto della “a” e solo noi due sappiamo il motivo...). Da quando sei entrata nella mia vita hai portato notevoli benefici che non starò qui ad elencare perché impiegherei troppo tempo e comunque non sono affari vostri (senza offesa); ma al di là di questo, sento di avere vicino una ragazza meravigliosa che rende una persona migliore anche me....e per questo sarò sempre in debito con te!

Veniamo al capitolo che creerà maggiori recriminazioni: gli amici!

Obbligato, nonché sentito da parte mia, il ringraziamento ai miei compagni d'avventura che citerò in rigoroso ordine alfabetico: Davide, Diego, Enrico e Samuele, o se preferite con le credenziali: dott.Barduca, dott.Ganzer, dott.Guizzo, dott.Reginato (ad essere precisi in questa lista ho messo un titolo di studio in più, ma è la MIA tesi e mi sono preso la facoltà di conferire “*Honoris Causa*” un attestato in più). Assieme a loro non ho condiviso soltanto gli oneri e le fatiche universitarie, bensì una parte importante della mia vita: sono sicuro del fatto che il nostro “sodalizio” non finirà qui ma lo porteremo avanti, pur sapendo che la vita molte volte riserva strade diverse ad ognuno di noi. Magari un giorno, quando ciascuno avrà presumibilmente una propria famiglia ed occupazione, ricorderemo con un po di nostalgia (inevitabile, quantomeno perché eravamo più giovani e spensierati....) da dove eravamo partiti, speranzosi e sognatori, poco più che ragazzini.

La “combriccola” degli amici, per mia enorme fortuna, è bella lunga e voglio intenzionalmente ometterne i nomi per evitare dimenticanze. Desidero abbracciare tutti coloro che mi hanno accompagnato, allietato e sopportato nei momenti di svago (anche troppi dice sempre mia mamma...), nei momenti più felici come in quelli più tristi, quelli che vedo spesso e quelli che non vedo quasi mai (ma so che per me ci sono sempre), quelli che vorrebbero festeggiare sempre e quelli che “una volta a settimana è più che sufficiente”, gli amici vicini e quelli lontani (geograficamente), quelli conosciuti una vita fa e quelli conosciuti l'altro ieri, gli alcolizzati (scherzo, ma un esamino al fegato fossi in voi lo farei...) e gli astemi (solo uno!).

Saluto i ragazzi della squadra di calcetto del Saint Marteen che mi hanno accolto nel loro gruppo e che, anche se solo emotivamente, mi hanno permesso di “ridiscendere” in campo provando l'ebbrezza della sana competizione e.....anche della vittoria che non guasta mai!

Saluto tutti gli zii, le zie, nonna Bruna ed i cugini che compongono la mia bellissima famiglia allargata ed unita, che di questi tempi non è davvero poco!

L'ultimo ringraziamento è per mio nonno Cesco, con cui ho trascorso buona parte della mia infanzia e che ora non c'è più; di lui sento molto la mancanza, per quello che mi ha insegnato

nonché per il suo esempio comportamentale nascosto sotto un atteggiamento a volte brontolone, e non ho problemi ad ammettere che una lacrima mi è scivolata mentre lo ricordo. Mi chiamava dottore molti anni fa quando la laurea era solo un pensiero, se non un miraggio; ci avrebbe tenuto ad essere qui fra noi per vedere suo nipote più grande con l'alloro in testa ma mi consola il fatto che da lassù mi stia guardando da una posizione privilegiata e vegli sempre su di me.

Grazie a tutti voi, davvero, vi voglio bene!!

Giovanni

Riferimenti bibliografici

- Adamo, S., Camoglio, P., Dolfi, A., Molinaro, M., Siracusa, G., Stefanini, M., 2012. *Atlante istologico*, 6^aedizione, Piccin editore.
- Bagno, A., Slides del corso “*Biomateriali e tessuti biologici*”. Università di Padova, anno accademico 2012-2013.
- Balan, C., Riedel, R., 2006. Rheological Investigations of a Polymeric Precursor for Ceramic Materials: Experiments and Theoretical Modeling. *J. Optoelectr. Adv. Mater.*, 8, 561-567.
- Bernardo, E., Colombo, P., 2012. Porous wollastonite-hydroxyapatite bioceramics from a preceramics polymer and micro- or nano-sized fillers. *Journal of the European Ceramics Society*, 32, 399-408.
- Bernardo, E., Colombo, P., Dainese, E., Lucchetta, G., Bariani, P., 2012. Novel 3D wollastonite-based scaffolds from preceramic polymers containing micro- and nano-sized reactive particles. *Advanced Engineering Materials*, 14, No.4.
- Bernardo, E., Carlotti, J.F., Dias, P.M., Fiocco, L., Colombo, P., Treccani, L., Hess, U., Rezwan, K., 2013. Novel akermanite-based bioceramics from preceramic polymers and oxide fillers. *Ceramics International*, 100.
- Cao, W., Hench, L.L., 1996. Bioactive Materials. *Ceramics International*, 22, 493-507.
- Chantrell, P.G., Popper, P., 1965. Inorganic Polymers for Ceramics. *Special Ceramics*, Academic Press, New York, 87-103.
- Colombo, P., Bernardo, E., Parciannello, G., 2013. Multifunctional advanced ceramics from preceramic polymers and nano-sized active fillers. *Journal of the European Ceramics Society*, 33, 453-469.
- Fiocco, L., Bernardo, E., Colombo, P., Cacciotti, I., Bianco, A., Bellucci, D., Sola, A., Cannillo, V., 2013. Novel processing of bioglass ceramics from silicone resins containing micro- and nano-sized oxide particle fillers. *Society For Biomaterials*.
- Greil, P., 2000. Polymer Derived Engineering Ceramics. *Adv.Eng.Mater.*, 2, 339-348.
- Greil, P., 1995. Active-Filler-Controlled Pyrolysis of Preceramic Polymers. *Journal of the American Ceramics Society*, 78, 835-848.

- Jones, J.R., Lee, P.D., Hench, L.L., 2006. Hierarchical porous materials for tissue engineering. *Philosophical transactions of the Royal Society, A*, 263-281.
- Jones, J.R., Hench, L.L., 2003. Regeneration of trabecular bone using porous ceramics. *Current Opinion in Solid State & Materials Science*, 7, 301-307.
- Maruta, M., Matsuya, S., Nakamura, S., Ishikawa, K., 2011. Fabrication of low-crystalline carbonate apatite foam bone replacement based on phase transformation of calcite foam. *Dental Materials Journal*, 30, 14-20.
- Peng-Wen Lin, Pouyan Shen, 2013. Onset sintering-coarsening-coalescence kinetics of calcite powders. *Journal of the European Ceramics Society*, 33, 3265-3272.
- Riedel, R., Mera, G., Hauser, G., Klönczynski, A., 2006. Silicon-Based Polymer Derived Ceramics: Synthesis Properties and Applications-A Review. *Journal of the Ceramics Society of Japan*, 114, 425-444.
- Sunouchi, K., Tsuru, K., Maruta, M., Kawachi, G., Matsuya, S., Terada, Y., Ishikawa, K., 2012. Fabrication of solid and hollow carbonate apatite microspheres as bone substitutes using calcite microspheres as a precursor. *Dental Materials Journal*, 31, 549-557.
- Tesi di Laurea di Laura Fiocco, 2011/2012. Bioceramici porosi da polimeri preceramici e fillers. Università di Padova, Corso di Laurea in Ingegneria dei Materiali.