



**UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA**



**DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA DELL'INFORMAZIONE
CORSO DI LAUREA IN BIOINGEGNERIA INDUSTRIALE**

**“OTTIMIZZAZIONE TOPOLOGICA E CARATTERIZZAZIONE
MECCANICA DI STRUTTURE CELLULARI TPMS IN
IDROSSIAPATITE PER RIGENERAZIONE OSSEA”**

Relatore: Prof. Hamada Elsayed

Laureando: Francesco Carollo

Matricola 2052510

Correlatore: Prof. Enrico Bernardo

ANNO ACCADEMICO 2022 – 2023

Data di laurea 30/11/2023

ABSTRACT

Il tessuto osseo è il secondo tessuto più trapiantato al mondo dopo il sangue, con milioni di interventi all'anno. Ad oggi il *gold standard* nel trattamento di particolari patologie o traumi di grandi dimensioni del tessuto osseo è rappresentato ancora dal trapianto di osso autologo o, al limite, eterologo; tuttavia, queste due opzioni hanno una serie di limitazioni intrinseche, prima fra tutte la disponibilità limitata. Proprio per soddisfare questa richiesta, negli ultimi anni il mercato dei sostituti ossei sintetici è cresciuto enormemente: i materiali senz'altro più utilizzati in medicina rigenerativa e per applicazioni di ingegneria tissutale dell'osso sono i materiali bioceramici. Questi biomateriali sono biocompatibili, bioattivi e possono essere lavorati con tecniche di stampa 3D per produrre scaffold con struttura tridimensionale anche molto complessa.

Le *Triply periodic minimal surface (TPMS)* sono strutture estremamente interessanti per la realizzazione di innesti ossei sintetici per le particolari caratteristiche topologiche, l'interconnessione dei pori e le eccellenti proprietà meccaniche. In questa tesi sono state selezionate cinque diverse topologie TPMS, stampate con tecnologia DLP, per studiarne la porosità e la resistenza meccanica: *IWP*, *Neovius*, *Gyroid*, *Diamond* e *Primitive*. Per la scelta del materiale sono state confrontate le proprietà e la stabilità termica delle polveri di HA e β -TCP dopo il trattamento termico. I campioni prodotti sono stati sottoposti a trattamento termico e successivamente a prove meccaniche di compressione per valutarne la resistenza. La topologia con miglior performance è stata selezionata per la seconda parte della tesi in cui sono stati variati i valori di porosità aperta e le dimensioni della cella unitaria per studiarne gli effetti sulle proprietà meccaniche delle strutture stampate.

L'obiettivo principale di questo lavoro è quello di ottimizzare le caratteristiche topologiche e strutturali, selezionare i parametri di stampa più efficaci e i materiali più idonei per ottenere degli scaffold coerenti con il modello geometrico di partenza e con porosità e proprietà meccaniche che favoriscano l'adesione e la proliferazione cellulari e supportino la rigenerazione del tessuto osseo.

INDICE:

| | |
|--|----|
| ABSTRACT | 2 |
| INTRODUZIONE | 5 |
| 1 STATO ATTUALE DELL'ARTE | 7 |
| 1.1 Il tessuto osseo | 7 |
| 1.1.1 Composizione e organizzazione strutturale | 8 |
| 1.1.2 Rimodellamento osseo | 11 |
| 1.1.3 Patologie del tessuto osseo | 12 |
| 1.1.4 Proprietà meccaniche del tessuto osseo | 16 |
| 1.2 Biomateriali e innesti per rigenerazione ossea | 18 |
| 1.2.1 Biomateriali ceramici | 20 |
| 1.2.2 Ingegneria tissutale dell'osso e materiali cellulari: TPMS | 23 |
| 1.2.3 Tecniche di stampa 3D | 26 |
| 1.3 Finalità della Tesi | 29 |
| 2 MATERIALI E METODI | 30 |
| 2.1 Realizzazione degli scaffold | 30 |
| 2.1.1 Topologie TPMS e creazione dei modelli geometrici | 31 |
| 2.1.2 Stampa dei provini: <i>Digital Light Processing</i> | 32 |
| 2.1.3 Resina e polvere ceramica | 36 |
| 2.1.4 Trattamenti termici | 37 |
| 2.2 Misure di densità e caratterizzazione meccanica | 39 |
| 2.2.1 Densità geometrica, apparente e porosità | 39 |
| 2.2.2 Prove di compressione | 40 |
| 2.3 Analisi di superficie | 43 |
| 2.3.1 Microscopio ottico | 43 |
| 2.3.2 Analisi SEM | 44 |
| 2.3.3 Analisi XRD | 45 |
| 3 DISCUSSIONE DEI RISULTATI | 46 |
| 3.1 Stampa e caratterizzazione dei provini | 46 |
| 3.1.1 Composizione delle polveri ceramiche | 46 |
| 3.1.2 Analisi XRD delle polveri | 51 |
| 3.1.3 Effetto del tempo di esposizione | 54 |

| | |
|---|-----------|
| 3.1.4 Conformità al modello geometrico | 58 |
| 3.1.5 <i>Shrinkage</i> | 60 |
| 3.2 Effetto della porosità e delle dimensioni della cella sulle proprietà meccaniche | 62 |
| 3.2.1 <i>Neovius Surface</i> | 62 |
| 3.2.2 Prove di stampa | 63 |
| 3.2.3 Misure di densità | 65 |
| 3.2.4 Proprietà meccaniche | 66 |
| 3.2.5 Analisi SEM dei campioni | 67 |
| 4 CONCLUSIONI | 71 |
| BIBLIOGRAFIA & SITOGRAFIA | 75 |

INTRODUZIONE

L'osso è un tipo di tessuto connettivo specializzato con un'organizzazione strutturale gerarchica estremamente complessa che gli conferisce la caratteristica durezza per le sue eccezionali proprietà meccaniche. Queste caratteristiche peculiari sono dovute alla ricca presenza di cristalli di sali minerali e permettono al tessuto osseo di svolgere funzioni strutturali e di movimento. Ricopre inoltre un ruolo metabolico fondamentale agendo da riserva di calcio e fosforo per l'organismo ed è sede del processo di ematopoiesi [3].

L'osso è caratterizzato da un fisiologico equilibrio fra il continuo riassorbimento di vecchio tessuto e la deposizione di nuovo: il rimodellamento osseo, un processo fondamentale che permette all'osso di ottimizzare la propria struttura in funzione delle sollecitazioni esterne a cui è sottoposto. Questo processo permette all'osso di auto-ripararsi in caso di lesioni o fratture lievi; tuttavia, se i danni sono più importanti, come traumi, tumori, patologie genetiche o osteoporosi, il rimodellamento osseo non è sufficiente a sanarli [1].

Per questo motivo, l'osso è il secondo tessuto più trapiantato al mondo dopo quello ematico; L'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) stima che solo in America più di un milione e mezzo di persone ogni anno soffrano di difetti ossei di grandi dimensioni che richiedono trattamenti chirurgici invasivi. Attualmente, il numero di donatori non è sufficiente a soddisfare la richiesta in continuo aumento; per superare i limiti del trapianto di tessuto eterologo, la medicina rigenerativa deve ricorrere alle alternative sintetiche che sono altamente riproducibili, facilmente sterilizzabili, senza problemi legati alla disponibilità e finemente regolabili dal punto di vista strutturale e delle proprietà meccaniche.

L'ingegneria tissutale (*tissue engineering, TE*) e la medicina rigenerativa sono due campi interdisciplinari che sono emersi e si sono ampiamente sviluppati nel corso degli ultimi decenni per creare sostituti biologici e/o sintetici in grado di mimare il tessuto naturale. I tre elementi principali della TE sono: le cellule, prelevate direttamente dal paziente oppure dal donatore; la matrice, che può essere naturale o sintetica e il sistema di coltura. Lo *scaffold* ottenuto si può funzionalizzare e arricchire con proteine, peptidi, fattori di crescita, farmaci e ioni. Per la rigenerazione ossea i materiali più interessanti sono i materiali bioceramici, una particolare categoria di composti ceramici che si distinguono per le ottime proprietà biologiche; sono infatti biocompatibili, bioattivi, osteoconduttivi, potenzialmente osteoinduttivi e hanno una composizione analoga a quella della matrice minerale dell'osso naturale. Tra questi, i più utilizzati per l'ingegneria del tessuto osseo (*bone tissue engineering*) sono i fosfati di calcio, i vetri bioattivi e i silicati di calcio. Il principale limite dei materiali bioceramici è legato alla loro difficile lavorabilità, dovuta ai legami chimici ionici e covalenti

tra gli atomi che li rendono duttili e fragili. Per la realizzazione di componenti ceramiche negli anni sono state sviluppate numerose tecniche di *additive manufacturing* che permettono di stampare anche strutture molto complesse con estrema precisione. Il processo di stampa prevede la creazione di un modello tridimensionale CAD del componente in cui sono contenute tutte le caratteristiche geometriche e topologiche del pezzo, in ambito biomedico questo file è solitamente ricavato da immagini ottenute con strumentazione di imaging come CT oppure MRI. Il file CAD viene successivamente convertito in file STL in modo da poter eseguire lo *slicing* del modello tridimensionale e ottenere quindi una serie di immagini bidimensionali dei vari strati successivi della struttura che poi saranno effettivamente stampati dalla stampante 3D. Tra queste tecniche di stampa 3D sicuramente la stereolitografia è una delle più utilizzate e apprezzate per la semplicità del processo, la precisione e risoluzione della stampa e la grande varietà di materiali utilizzabili. Questa metodologia si basa sulla polimerizzazione per irradiazione con luce UV di resine polimeriche fotosensibili nelle quali è possibile disperdere anche polveri bioceramiche.

In questa tesi è stato utilizzato il Digital Light Processing (DLP), una tecnica stereolitografica, per la realizzazione di cinque modelli con topologie TPMS (*Triply periodic minimal surface*): IWP, Neovius Surface, Primitive Surface, Diamond e Gyroid. Queste superfici sono note in letteratura per l'elevata resistenza meccanica e per la capacità di favorire e stimolare l'adesione e la proliferazione delle cellule del tessuto osseo all'interno dello scaffold [18].

L'obiettivo di questo progetto di tesi è stato quello di studiare e ottimizzare le caratteristiche geometriche e topologiche delle superfici selezionate come lo spessore delle pareti e la densità relativa, e i parametri del processo di stampa come il tempo di esposizione alla luce di ogni layer, in modo tale che i verdi realizzati fossero il più simile possibile ai modelli geometrici creati con un software di modellazione (*Rhinoceros*). Per la produzione dei provini si è scelto di testare composizioni diverse di polveri di idrossiapatite e β -fosfato tricalcico in modo da selezionare quella che garantiva la migliore stampabilità e la maggiore resistenza meccanica a compressione della struttura. La porosità dei provini è stata misurata prima e dopo i trattamenti termici per valutarne l'effetto. Attraverso prove meccaniche di compressione monoassiale è stata selezionata la topologia più resistente, è stata aumentata la porosità del modello geometrico, sono state ridotte le dimensioni della cella unitaria e sono state ripetute le misure di densità e resistenza meccanica. Infine, mediante analisi SEM e al microscopio ottico, è stata caratterizzata la superficie dei provini stampati. I risultati sono stati analizzati e confrontati in vista di una possibile futura applicazione di queste strutture per uno studio in vitro con cellule umane.

1. STATO ATTUALE DELL'ARTE

La rigenerazione ossea è un complesso e lungo processo fisiologico di formazione ossea, che si osserva durante la normale guarigione di fratture e traumi ed è di fondamentale importanza per il rimodellamento del tessuto osseo durante tutta la vita. Tuttavia, ci sono specifiche condizioni cliniche in cui la normale rigenerazione non è sufficiente e quindi è necessario l'intervento della medicina rigenerativa, come nel caso di ricostruzione scheletrica di grandi difetti ossei creati da traumi, infezioni, resezione tumorale e anomalie scheletriche oppure casi in cui il processo rigenerativo è compromesso come in seguito a necrosi avascolare, pseudoartrosi atrofica e osteoporosi [1]. L'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) stima che solo in America più di un milione e mezzo di persone ogni anno soffrano di difetti ossei di grandi dimensioni per un costo complessivo di trattamenti e terapie che supera ampiamente il miliardo di dollari. Le possibili opzioni di trattamento rimangono limitate e spesso comportano interventi successivi, complicanze cliniche, scarsi risultati funzionali fino alla perdita dell'arto interessato dalla lesione. Attualmente le principali strategie di guarigione si basano sull'utilizzo di autoinnesti, allotrapianti e xenotrapianti il cui limite maggiore però è dato dalla carenza di tessuto disponibile e dalla possibile non integrazione dell'innesto con conseguente peggioramento delle condizioni del paziente. Il 50% di queste applicazioni risente di complicazioni dovute ad ossificazione ritardata o pseudoartrosi; il 30% presenta frattura dell'allotrapianto e il 15% infezione del sito. Vista la grande necessità di trovare soluzioni efficaci e definitive, negli ultimi decenni un numero sempre maggiore di gruppi di ricerca si è dedicato allo sviluppo di scaffold ed impianti biocompatibili che favoriscano e supportino la rigenerazione del tessuto osseo danneggiato. Questi impianti sono realizzati principalmente con tecniche di *additive manufacturing* (AM) per riprodurre la struttura porosa e trabecolare naturale dell'osso, fondamentale per lo scambio di nutrienti e rifiuti e per l'angiogenesi, e con materiali biocompatibili, biodegradabili, osteoconduttivi e osteoinduttivi capaci quindi di stimolare e promuovere la deposizione di nuova matrice extracellulare, fungendo da impalcatura per la proliferazione degli osteoblasti [2].

1.1 IL TESSUTO OSSEO

Il tessuto osseo è un tipo di tessuto connettivo specializzato che costituisce la struttura portante del corpo umano e della maggior parte dei vertebrati. Il tessuto osseo svolge diverse funzioni nel corpo umano: in primo luogo fornisce sostegno strutturale consentendo al corpo di mantenere una postura eretta, di reggere il peso corporeo e, insieme ai muscoli, rende possibile il movimento degli arti e la locomozione. Inoltre, protegge i tessuti molli e i

principali organi vitali come il cervello, il cuore e i polmoni contenuti rispettivamente nella scatola cranica e nella gabbia toracica. Il tessuto osseo è anche coinvolto nella rigenerazione e maturazione delle cellule del sangue attraverso il processo dell'emopoiesi che avviene nel midollo osseo rosso contenuto nelle ossa lunghe [3].

Infine, il tessuto osseo svolge il ruolo di deposito di minerali come calcio e fosforo indispensabili per il metabolismo e la sopravvivenza dell'organismo: quando il corpo ha bisogno di calcio per altre funzioni vitali come la contrazione muscolare o la trasmissione nervosa questo può essere prelevato dalla riserva presente nell'osso e in caso di carenza di calcio nella dieta l'osso può anche essere riassorbito per mantenere i livelli di calcio nel sangue [3,4].

1.1.1 Composizione e organizzazione strutturale

Il tessuto osseo è formato da una componente cellulare e da un'abbondante matrice extracellulare (*extra-cellular matrix, ECM*) che a sua volta è costituita per il 60-65% da materiale inorganico mentre per il restante 35-40% da materiale organico. Nella componente organica si distinguono una parte fibrosa e una amorfa. La parte fibrosa presenta le caratteristiche del tessuto connettivo propriamente detto ed è costituita fino al 96% da triple eliche di collagene di tipo I con diametro di 1,5 nm e lunghezza nell'ordine dei 300 nm e per il restante 4% da una frazione mucopolisaccaridica legata a una proteina non-collagene. La parte amorfa è composta invece da glicoproteine e proteoglicani. La matrice minerale dell'osso è responsabile della rigidità e della durezza caratteristiche di questo tessuto ed è costituita per la maggior parte da fosfato di calcio, carbonato di calcio e, per circa il 10%, da fosfato di magnesio e fluoruro di calcio. La componente principale (circa l'85%) è rappresentata da nanocristalli aghiformi di idrossiapatite $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$ lunghi poche decine di nanometri e spessi 1,5-3 nm. Oltre a questi costituenti nella matrice si trovano anche piccole quantità di altre apatiti come la carbonatoapatite e la fluoroapatite [3,4].

La matrice extracellulare del tessuto osseo, grazie alla sua particolare organizzazione strutturale, promuove e sostiene l'adesione, la proliferazione e la differenziazione di diversi tipi cellulari responsabile anch'essi delle specifiche caratteristiche e funzioni dell'osso. Le cellule *osteoprogenitrici* o *preosteoblasti* sono presenti soprattutto durante l'accrescimento e in misura minore nell'individuo adulto; hanno grande capacità proliferativa, producono e secernono fattori di crescita e differenziamento che regolano la deposizione di nuovo tessuto osseo. Gli *osteoblasti* sintetizzano la matrice extracellulare e ne permettono la calcificazione, sono anche in grado di innescare il riassorbimento osseo in modo diretto e indiretto; quando

termina il processo di formazione di nuovo tessuto gli osteoblasti rallentano la loro attività metabolica e si trasformano in osteociti. Gli *osteociti* sono le cellule caratteristiche dell'osso maturo, sono responsabili del suo mantenimento e sono in grado di avviare il processo di rimodellamento osseo in determinate circostanze o in risposta a specifici stimoli; gli osteociti sono cellule terminali, incapaci di duplicarsi e con una autonomia di vita determinata.

Infine, gli *osteoclasti* sono preposti al riassorbimento osseo attraverso l'azione dei due ormoni paratormone e calcitonina [4].

Il tessuto osseo è un materiale nano-composito con una struttura gerarchica altamente organizzata e con un'architettura porosa; i cinque livelli strutturali del tessuto osseo sono rappresentati in *Figura 1.1*. A livello di macrostruttura l'osso può essere suddiviso in osso compatto e osso spugnoso. L'osso compatto o corticale è denso e resistente e costituisce la maggior parte della struttura esterna degli ossi. L'osso spugnoso o trabecolare è meno denso e più poroso e si trova prevalentemente all'interno degli ossi formando una complessa rete alveolare con porosità compresa tra il 50 e il 90%. Il livello microstrutturale (10-500 μm) comprende i sistemi Haversiani; gli osteoni; unità strutturali del tessuto osseo formati da un canale centrale detto *canale di Haver*, che contiene i vasi sanguigni e i nervi, circondato da lamelle concentriche di matrice ossea, e le singole trabecole. Le lamelle rappresentano la sub-microstruttura (1-10 μm). La nanostruttura (da poche centinaia di nm fino a 1 μm) è formata invece da collagene fibrillare sul quale si organizzano i cristalli minerali. Infine, la sub-nanostruttura, con dimensioni inferiori alle centinaia di nm, è rappresentata dalla struttura molecolare dei minerali, del collagene e delle proteine che costituiscono l'osso [5].

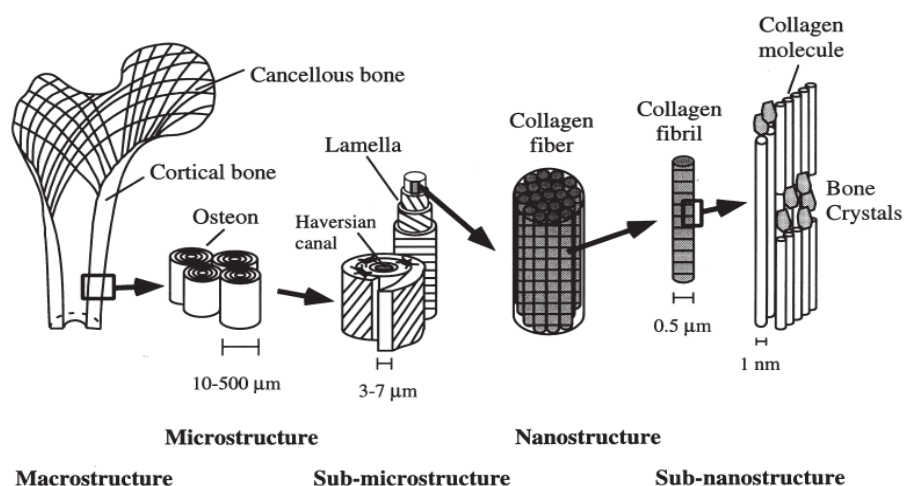


Figura 1.1 Rappresentazione dei livelli di organizzazione strutturale gerarchica del tessuto osseo [5].

L'organizzazione delle fibre di collagene nella matrice extracellulare divide il tessuto osseo in fibroso e lamellare. Il primo è caratterizzato da fibre di collagene di grandi dimensioni, con diametro compreso tra i 5 e i 10 μm , che si dispongono nello spazio come nel tessuto connettivo denso; il tessuto fibroso è il primo ad essere deposto durante lo sviluppo dell'individuo e nei processi riparativi conseguenti ad un trauma per venire poi riassorbito e sostituito con tessuto di tipo lamellare. Il tessuto osseo lamellare è il più diffuso e costituisce quasi completamente l'osso compatto e buona parte di quello spugnoso. In questo tipo di tessuto le fibre di collagene e gli osteociti si organizzano in strati ordinati e sovrapposti a formare le lamelle ossee che, in base alla loro disposizione, distinguono due tipi di tessuto lamellare: quello semplice con poche lamelle parallele tra loro e quello osteonico, nel quale le lamelle si organizzano attorno al canale di Havers in modo concentrico. Gruppi di 8-10 lamelle organizzate attorno ad un canale rappresentano l'unità fondamentale del tessuto osseo: *gli osteoni*. Oltre ai canali di Havers sono presenti dei collegamenti vascolari perpendicolari ai primi, denominati canali di Volkmann (*Figura 1.2*). La struttura dell'osso presenta delle piccole cavità nella matrice minerale che contengono gli osteociti maturi, dette lacune ossee, dalle quali si diramano in tutte le direzioni i canalicoli ossei che mettono in connessione lacune vicine [5].

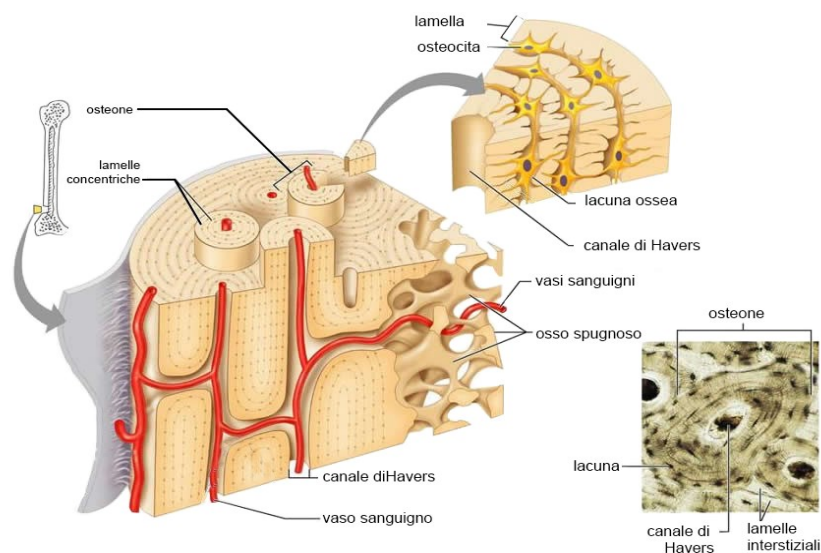


Figura 1.2 Organizzazione del tessuto osseo lamellare: l'immagine rappresenta gli osteoni che si sviluppano attorno ai canali Haversiani in cui scorrono i vasi sanguigni. I canali di Volkmann si sviluppano perpendicolarmente [5].

1.1.2 Rimodellamento osseo

Il rimodellamento osseo è il processo di continuo adattamento strutturale dell'osso alle sollecitazioni provenienti dall'esterno, in modo da avere una struttura sempre adatta ai reali sforzi biomeccanici a cui è sottoposto il sistema scheletrico dello specifico soggetto. In condizioni di equilibrio fisiologico, a livello del tessuto osseo gli osteoclasti continuano a riassorbire l'osso maturo mentre gli osteoblasti depositano nuova matrice extracellulare che poi mineralizza. Il ciclo di rimodellamento presenta tre fasi consecutive: riassorbimento, durante il quale gli osteoclasti digeriscono il vecchio osso; inversione, durante la quale le cellule mononucleari iniziano a disporsi e proliferare sulla superficie ossea, e formazione, fase in cui gli osteoblasti depositano nuovo tessuto fino a quando l'osso riassorbito viene completamente sostituito. Gli osteoclasti e gli osteoblasti che realizzano un ciclo di rimodellamento costituiscono un'unità multicellulare di rimodellamento osseo (*BMU*, "*Bone Multicellular Unit*"). In *Figura 1.3* è riportata la successione delle fasi del meccanismo del rimodellamento osseo.

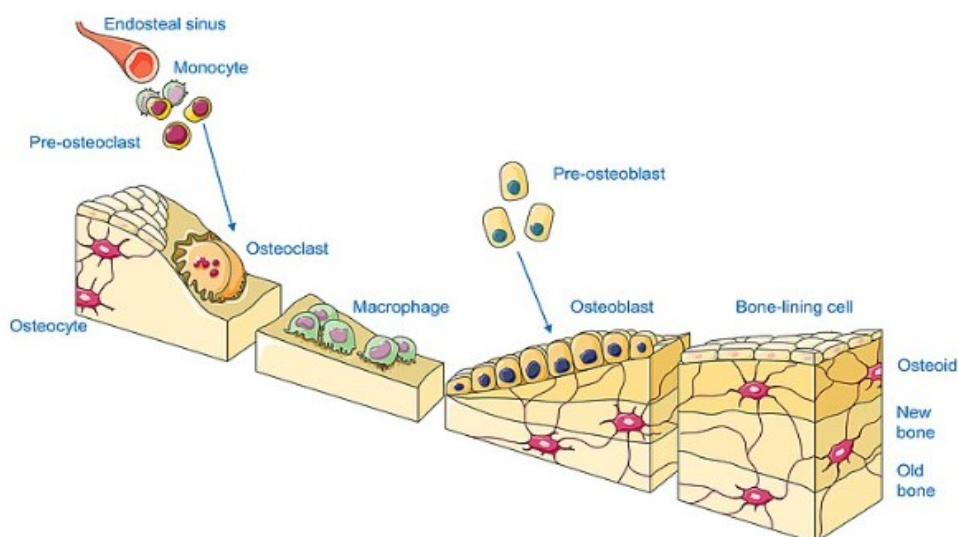


Figura 1.3 Rappresentazione delle fasi del processo di rimodellamento osseo [6].

Durante la crescita e in particolari condizioni degenerative la quantità di osso depositata è molto maggiore rispetto a quella degradata ma nell'individuo adulto e sano questi due processi fisiologici si equivalgono mantenendo costante la massa totale dell'osso. Il rimodellamento rende l'osso un tessuto estremamente dinamico, in cui il continuo rinnovamento permette di preservarne la salute e di adattarne la struttura e le caratteristiche in risposta ai carichi e agli stimoli meccanici a cui è sottoposto. In questo complicato processo intervengono moltissimi fattori e segnali ambientali sia a livello locale che sistemico che

permettono la continua riparazione dei danni a livello microscopico dell'osso mediante la generazione di tessuto osseo secondario. Tra questi i principali regolatori sistemici sono l'ormone paratiroideo (PTH), il calcitriolo, l'ormone della crescita, i glucocorticoidi, gli ormoni tiroidei e gli ormoni sessuali. Per quanto riguarda la regolazione locale sono stati recentemente identificati un gran numero di citochine e fattori di crescita. Inoltre, numerosi studi sostengono che il rimodellamento sia coinvolto anche nel mantenimento dell'equilibrio del livello di calcio e altri minerali nel sangue [6].

Sebbene l'osso sia in grado di auto-ripararsi, nei casi più gravi come in presenza di traumi estesi, tumori, patologie genetiche e osteoporosi dovuta all'invecchiamento, la rigenerazione naturale del tessuto osseo deve essere compensata con la medicina rigenerativa e l'ingegneria tissutale [6].

1.1.3 Patologie del tessuto osseo

Il tessuto osseo può essere affetto da numerose patologie e traumi che ne possono modificare le caratteristiche strutturali e funzionali; le principali cause che portano allo sviluppo di queste complicazioni sono di natura genetica, metabolica, come variazioni nella produzione e nel trasporto dei fattori che regolano l'accrescimento osseo con conseguente alterazione dei processi di deposizione e riassorbimento e, infine, possono essere legate all'età dell'individuo. L'invecchiamento determina infatti una condizione di *osteopenia* fisiologica, ovvero una maggiore attività degli osteoclasti a discapito della deposizione della matrice da parte degli osteoblasti. Nei casi più gravi, insorge l'*osteoporosi*, malattia che provoca una riduzione della massa ossea e modifiche microstrutturali che aumentano il rischio di *fratture* [7].

Anche nel caso di tumore dell'osso (*osteosarcoma*), si ha un'alterazione dell'omeostasi del tessuto osseo soprattutto nel caso in cui sia necessaria l'asportazione chirurgica di una parte di osso [7].

I pazienti che soffrono di osteoporosi presentano un tessuto osseo caratterizzato da bassa densità minerale e dal deterioramento della microarchitettura (assottigliamento delle trabecole e aumento della dimensione dei pori), con conseguente aumento della fragilità ossea. Questa situazione porta a un aumento del rischio di frattura (in particolare di vertebre, femore, omero, ossa del polso e della caviglia) a causa di traumi anche minimi [8]. Questa malattia è comune soprattutto nelle donne dopo la menopausa a causa delle alterazioni ormonali legate a questa condizione che alterano l'omeostasi naturale dell'osso. Con l'età, l'azione degli osteoclasti sovrasta quella degli osteoblasti riducendo la massa minerale effettiva del tessuto osseo; l'architettura tridimensionale trabecolare dell'osso si assottiglia e la struttura si indebolisce.

Oltre all'età e agli scompensi ormonali, anche la predisposizione genetica, l'assunzione di alcuni farmaci specifici, problemi di salute riguardanti altri organi, scarsa nutrizione (scarso apporto di calcio e Vitamina D) e uno stile di vita poco sano possono portare all'insorgere di questa patologia. Attualmente, i trattamenti disponibili per l'osteoporosi sono solamente farmacologici e aiutano solo a rallentare il decorso della malattia [7,8].

In *Figura 1.4* è riportato un confronto al microscopio ottico tra l'osso sano e quello affetto da osteoporosi [8].

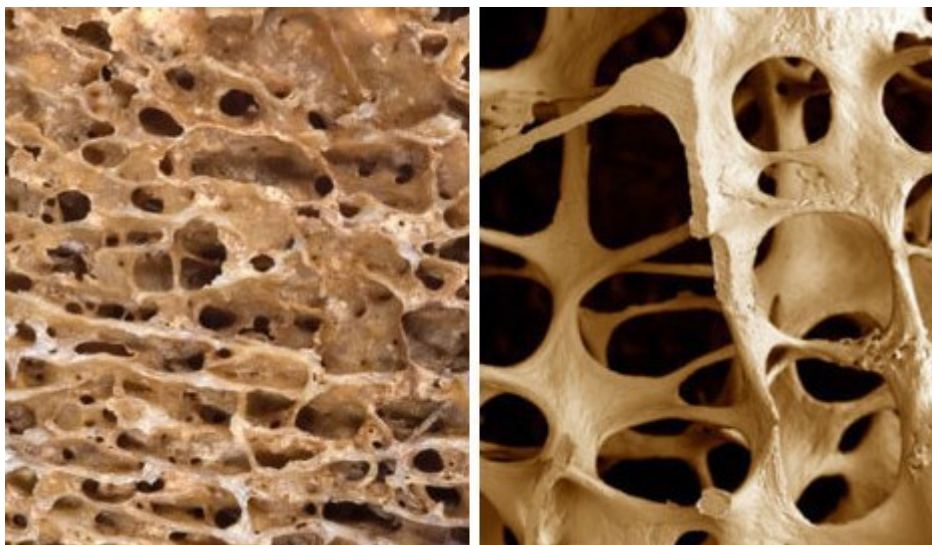


Figura 1.4 *Ingrandimento al microscopio ottico di campioni di tessuto osseo sano (sinistra) e affetto da osteoporosi (destra). A causa della progressiva diminuzione della componente minerale dell'osso le trabecole sono visibilmente più fine e le dimensioni dei pori notevolmente maggiori [8].*

La frattura ossea è un'interruzione dell'integrità strutturale dell'osso che può essere di origine traumatica o spontanea (patologica). Nel caso di un trauma, l'osso si frattura quando è sottoposto ad uno sforzo tale da superare i limiti di resistenza dell'osso stesso. Il trauma può interessare l'osso direttamente o indirettamente. Nel primo caso l'osso si frattura nel punto in cui viene applicata la forza; in caso di trauma indiretto, invece, la frattura si manifesta ad una certa distanza dal punto di applicazione della forza, la quale si propaga lungo la catena cinetica di un arto o della colonna vertebrale fino a raggiungere la sede di frattura. Esistono poi fratture da stress o da sovraccarico funzionale determinate dalla ripetizione di continue sollecitazioni sull'osso. Infine, le fratture possono essere causate da una brusca e violenta contrazione muscolare (fratture da avulsione) che determina un distacco osseo in corrispondenza dell'inserzione tendinea del muscolo stesso [9].

In base alle indicazioni dell'Istituto Superiore di Sanità (ISS) le fratture vengono classificate in [10]:

- *Frattura composta* (senza dislocazione dei frammenti) o *scomposta* (con dislocazione dei frammenti): in rapporto all'eventuale spostamento dei segmenti fratturati si distinguono fratture composte, in cui i segmenti di frattura conservano la loro posizione anatomica, e fratture scomposte, in cui si verifica uno spostamento dei frammenti [10].
- *Frattura chiusa o esposta*: in base all'integrità o meno della cute si distinguono fratture chiuse (in cui la cute rimane integra) e fratture esposte ad elevato rischio di infezione (in cui vi è lacerazione della cute ed esposizione esterna dell'osso) [10].
- *Frattura completa o incompleta*: a seconda che la frattura interessi tutto lo spessore dell'osso (frattura completa) o una parte di esso (frattura incompleta o semplice infrazione ossea) [10].
- *Frattura stabile o instabile*: quando subentrano forze deformanti come la forza muscolare che impediscono il contatto reciproco tra i due segmenti ossei si parla di frattura instabile. In questi casi viene compromessa l'immobilità della frattura con conseguente ritardo nella guarigione. In mancanza invece di forze deformanti, si parla di frattura stabile [10].
- *Fratture semplici, pluriframmentarie o comminute*: in base al numero di frammenti ossei prodotti la frattura si definisce semplice se genera due frammenti ossei ben distinti. Se invece genera numerosi frammenti prende il nome di frattura pluriframmentale o comminuta (presenza di più rime di frattura) [10].
- *Fratture trasverse, oblique, spiroidi o longitudinali*: in base al decorso e alla forma della rima di frattura (la fessura che separa i due frammenti ossei) [10].

Il processo di guarigione della frattura può essere di tipo *primario* o *secondario*. Nel primo caso, se la frattura viene ridotta e immobilizzata, durante la guarigione non si ha la formazione del callo; nel secondo, invece, si osserva la formazione del callo e il successivo rimodellamento [9]. Le fasi della guarigione secondaria sono:

1. *Formazione dell'ematoma* (dal giorno 1 al giorno 5). L'ematoma è causato dalla rottura dei vasi sanguigni nel sito della frattura. In questa fase vengono rilasciati dei fattori che richiamano le cellule infiammatorie del sistema immunitario per ripulire il sito e iniziare il processo di guarigione.

2. *Formazione di un callo fibrocartilagineo* (dal giorno 5 al giorno 11). In questa fase si forma un tessuto ricco di fibrina che viene poi popolato dalle cellule mesenchimali. Quest'ultime iniziano a differenziarsi in fibroblasti, condroblasti e osteoblasti (*condrogenesi*) e producono uno strato di cartilagine ialina che delinea il confine della frattura.

3. *Formazione del callo osseo* (dal giorno 11 al giorno 28). Durante questa fase il callo fibrocartilagineo viene riassorbito e inizia il processo di calcificazione che porta alla formazione di un callo calcificato di osso immaturo; nel frattempo i nuovi vasi sanguigni continuano a proliferare portando nel sito nuove cellule staminali mesenchimali.

4. *Rimodellamento osseo* (dal giorno 28 fino ai mesi o anni successivi). In questa fase finale si osserva la deposizione di nuovo tessuto osseo da parte degli osteoblasti contemporaneamente al riassorbimento del tessuto immaturo da parte degli osteoclasti.

Diversi fattori possono alterare questo processo di guarigione; possono essere *locali* come l'infezione, lo scarso apporto di sangue, l'eccessivo movimento o disallineamento della frattura; oppure *sistemici*, come l'età, l'obesità, l'anemia, la malnutrizione, il fumo e problemi legati al sistema endocrino [9]. Per promuovere e velocizzare la guarigione della ferita si prescrivono al paziente integratori di calcio e vitamina D, elettrostimolazione del tessuto, ultrasuoni, oppure innesti di tipo autologo o allogenico (da donatore) [9].

Le fasi della guarigione secondaria sono descritte di seguito e rappresentate in *Figura 1.5* [9].

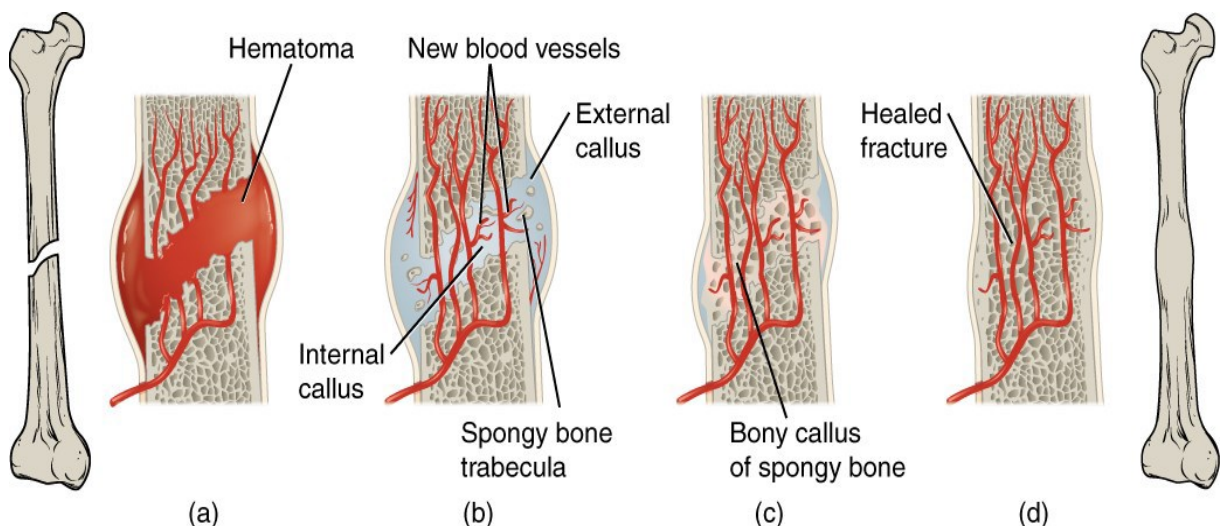


Figura 1.5 Fasi del processo di guarigione secondaria [9].

L'ultima grande categoria di patologie che possono colpire l'osso sono i tumori, causati dalla differenziazione incontrollata delle cellule del tessuto osseo che poi si accumulano a formare

una massa irregolare. Nella maggior parte dei casi i tumori sono *benigni*, ovvero curabili ed asportabili senza il rischio di diffusione in altre parti del corpo. Alcuni, però, sono *maligni* e il loro trattamento consiste solitamente in una combinazione di chemioterapia, radiazioni e interventi chirurgici [11].

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

Alcuni esempi di tumori benigni sono l'ostecondroma e il condroblastoma, mentre tra i tumori maligni i più diffusi sono l'osteosarcoma (*Figura 1.6*) e il condrosarcoma. In questi ultimi casi, può risultare necessario un intervento chirurgico per asportare la massa tumorale e una parte di tessuto sano ma, se il tumore è troppo esteso e coinvolge anche nervi e vasi sanguigni circostanti, si ricorre all'amputazione (nel caso degli arti) [11].



Figura 1.6 Radiografia di osteosarcoma a livello del femore distale [11].

1.1.4 Proprietà meccaniche del tessuto osseo

Le proprietà meccaniche del tessuto osseo variano notevolmente tra osso corticale e trabecolare e in base a caratteristiche e funzione dell'osso specifico.

A livello macrostrutturale, l'osso corticale presenta un modulo di Young, che esprime il rapporto tra tensione e deformazione nel caso di condizioni di carico monoassiale, compreso tra i 14 e i 20 GPa mentre a livello microstrutturale il valore diminuisce a circa 5 GPa [12,13].

L'osso trabecolare invece, data la sua diversa funzione, presenta resistenza e rigidità notevolmente inferiori rispetto all'osso compatto (80-90% inferiori). L'osso corticale ha comportamento elastoplastico lungo la direzione principale (distale-proximale) grazie alla presenza delle fibre di collagene che aumenta la duttilità dell'osso, migliorandone il comportamento post-elastico e quindi la capacità di assorbimento degli urti e limitando il rischio di rotture complete della struttura ossea (*Figura 1.7*). Il collagene aumenta anche la tenacità dell'osso e quindi la sua capacità di opporsi alla propagazione di fratture nella struttura. L'osso corticale è caratterizzato da una forte anisotropia dovuta alla sua particolare conformazione; il sistema delle strutture Haversiane, infatti, è fortemente orientato dal punto di vista spaziale in funzione della posizione nell'osso e del relativo stato meccanico locale. Più precisamente il corticale mostra comportamento ortotropo: le proprietà meccaniche cambiano notevolmente dalla direzione di allineamento degli osteoni rispetto alle direzioni mutuamente ortogonali appartenenti al piano trasverso alla direzione principale [12].

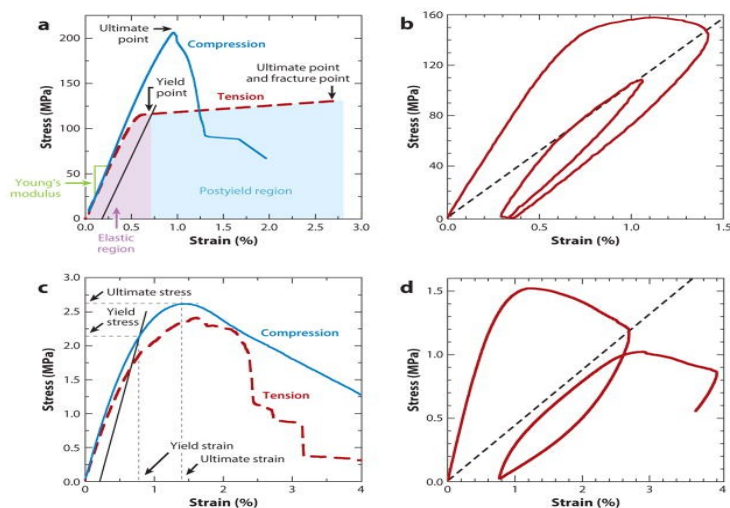


Figura 1.7 Rappresentazione dei grafici tensione-deformazione per l'osso corticale e trabecolare in prove di trazione e compressione monoassiale (a-c). Le immagini b e d mostrano test di carico-scarico-carico (load-unload-reload) [12].

Le proprietà meccaniche del tessuto osseo dipendono da numerosi fattori come l'età, il grado di mineralizzazione, l'idratazione e dalla presenza di particolari patologie come l'osteoporosi. Il contenuto minerale dell'osso diminuisce con l'età e anche con l'assunzione di bifosfonato somministrato nel trattamento dell'osteoporosi. Con l'età, inoltre, si ha una maggior formazione di AGE, acronimo che sta per *Advanced Glycation End-products*, una serie di composti chimici prodotti quando gli zuccheri si combinano con proteine o grassi, che vanno a modificare la matrice organica dell'osso e una riduzione dell'osteopontina, una proteina fondamentale nella formazione di matrice extrafibrillare (EFM). Le alterazioni appena menzionate concorrono a ridurre l'energia dissipata una volta raggiunta la tensione ultima e la

capacità di trasferire il carico alle fibrille collagene mediante lo scorrimento delle fibrille stesse con aumento dei prodotti di glicazione; la riduzione dell'osteopontina o la sua assenza riducono la resistenza alla frattura. A questo riguardo i dati sperimentali forniscono differenze sino al 20-25% riguardo al massimo del modulo elastico per le fasce d'età 25-34 e 60-95 anni; in forma analoga diminuisce la resistenza ultima. Per quanto riguarda l'idratazione, al diminuire della frazione liquida (in peso, w%) si verifica una transizione da duttile a fragile: l'osso poco idratato (w%=2.5) segue un andamento elasto-fragile mentre nel caso di idratazione fisiologica (w%=10.5) si ha una estesa zona di plasticità, tipica di un materiale duttile [12,13].

Nell'osso spugnoso la conformazione spaziale dipende principalmente dal tipo di condizioni meccaniche applicate al tessuto, sulla base delle quali la struttura si ottimizza per ottenere le maggiori capacità di resistenza e di minor peso possibile. Questo processo di ottimizzazione determina proprietà di densità e orientamento delle trabecole fortemente differenziati a seconda della locazione del tessuto. L'osso trabecolare è visibilmente poroso e il suo comportamento meccanico dipende da questa porosità ed in particolare dalla densità strutturale (volume di un campione di osso trabecolare a cui sia sottratto il volume dei pori) dello specifico sito anatomico. La rigidità e la resistenza dell'osso spugnoso presentano quindi una marcata dipendenza dalla densità strutturale con differente comportamento tra stati di trazione e compressione [13].

1.2 BIOMATERIALI E INNESTI PER RIGENERAZIONE OSSEA

Il tessuto osseo è in grado di autorigenerarsi mantenendo la sua omeostasi ma, come già anticipato nei paragrafi precedenti, in presenza di gravi patologie o traumi estesi, i normali processi fisiologici non sono sufficienti a garantire il completo recupero strutturale e funzionale dell'osso. Per questi motivi il tessuto osseo è uno dei tessuti più trapiantati, secondo soltanto al sangue, con più di quattro milioni di operazioni ogni anno. Sebbene negli ultimi decenni il numero di donazioni di tessuto muscoloscheletrico sia sempre aumentato, rimane sempre una grave carenza di tessuto donato. Questa necessità ha spinto la ricerca a sviluppare e studiare nuove alternative all'innesto di tessuto donato [14].

L'innesto osseo applicato deve avere specifiche caratteristiche: deve essere osteoinduttivo; quindi, deve favorire e stimolare l'osteogenesi e il differenziamento delle cellule primitive pluripotenti in cellule caratteristiche del tessuto osseo (osteoblasti, osteoclasti, ecc.). L'innesto deve inoltre essere osteoconduttivo, ossia il nuovo tessuto deve poter crescere sulla sua superficie dell'impianto conformandosi alla morfologia e struttura del materiale. Infine,

l'innesto deve permettere l'osteointegrazione ancorandosi all'osso naturale con la formazione di nuovo tessuto e formare tessuto fibroso all'interfaccia [14].

Tra gli innesti ossei, attualmente il gold standard rimane l'osso autologo o *autograft* grazie alle eccellenti istocompatibilità, osteoconduzione, osteoinduzione e osteogenesi. Questi autografts vengono prelevati da specifici siti anatomici del paziente dove la quantità d'osso è più abbondante: l'osso spugnoso viene asportato dalla cresta iliaca oppure dalle porzioni distali di radio e tibia, mentre l'osso corticale viene raccolto dal perone, dalle costole o ancora dalla cresta iliaca. Oltre all'osso autologo i chirurghi possono utilizzare osso eterologo o *allograft*; in questo caso l'innesto viene prelevato da un donatore. Sebbene questa tecnica non comporti problemi di mobilità e disponibilità come gli autografts, può causare invece la trasmissione di malattie a cui può associarsi il rigetto dell'impianto. In *Tabella 1.1* sono riportate le proprietà di autograft e allograft a confronto [14,15].

| <i>Bone Graft</i> | <i>Structural Strength</i> | <i>Osteo-Conduction</i> | <i>Osteo-Induction</i> | <i>Osteogenesis</i> |
|-------------------|----------------------------|-------------------------|------------------------|---------------------|
| <i>Autograft</i> | | | | |
| Cancellous | No | +++ | +++ | +++ |
| Cortical | +++ | ++ | ++ | ++ |
| <i>Allograft</i> | | | | |
| <i>Cancellous</i> | | | | |
| Frozen | No | ++ | + | No |
| Freeze-Dry | No | ++ | + | No |
| <i>Cortical</i> | | | | |
| Frozen | +++ | + | No | No |
| Freeze-Dry | + | + | No | No |

Tabella 1.1 Confronto tra proprietà meccaniche e biologiche di autografts e allografts. Vengono riportate anche le differenze tra osso spugnoso e compatto e fra tessuto congelato e liofilizzato [15].

Nell'ambito dei trapianti d'osso negli ultimi anni è cresciuta notevolmente la richiesta di materiali e scaffold sintetici in grado di risolvere i limiti degli innesti autologhi ed eterologhi e capaci al contempo di promuovere la rigenerazione del tessuto. Questi materiali eliminano il rischio di trasmissione di malattie e sono estremamente riproducibili sia dal punto di vista chimico che strutturale. Grazie a queste caratteristiche il mercato dei sostituti ossei sintetici è cresciuto esponenzialmente negli ultimi decenni per un giro d'affari annuale superiore ai due miliardi di dollari [4].

1.2.1 Biomateriali ceramici

Con il termine biomateriale si intende qualunque materiale sintetico progettato per un utilizzo prolungato a contatto con mezzi biologici in modo da minimizzare le eventuali reazioni avverse da parte dell'organismo. Il concetto di biomateriale è profondamente mutato evolvendosi negli anni: dai biomateriali di prima generazione, bioinerti e con specifiche proprietà meccaniche si è passati poi a quelli di seconda generazione, bioattivi, biodegradabili e in grado di stabilire un vero e proprio legame con il tessuto ospite. Infine, si è giunti ai biomateriali di terza generazione, capaci di indurre risposte cellulari e tissutali [3].

I biomateriali ceramici sono generalmente composti inorganici refrattari che contengono elementi metallici e non, con composizione e proprietà variabili all'interno di un largo spettro. Dal punto di vista dei legami chimici si passa da composti tipicamente ionici a composti prevalentemente o del tutto covalenti. I ceramici sono normalmente solidi policristallini ma possono presentarsi anche come solidi amorfi o monocristallini. Nella maggior parte di questi materiali i legami primari sono di tipo misto ionico-covalente, infatti, nei legami tra elementi con diversa elettronegatività, la nuvola elettronica si addensa in corrispondenza dell'elemento più elettronegativo creando così una parziale carica positiva e una negativa. La percentuale di carattere ionico del legame è di fondamentale importanza poiché determina la struttura cristallina e le proprietà del materiale.

I principali vantaggi dei ceramici sono la durezza, l'elevata temperatura di fusione e la bassa conducibilità termica ed elettrica. Inoltre, grazie alla durezza di questi materiali il coefficiente d'attrito è estremamente basso conferendo caratteristiche tribologiche migliori rispetto alle altre classi di materiali. Le proprietà dei materiali ceramici sono influenzate da diversi fattori come composizione chimica delle polveri, composizione e distribuzione delle fasi, caratteristiche dei bordi di grano e popolazione granulometrica [3].

Tra i vari composti inorganici i materiali bioceramici presentano migliore bioinerzia e bioriassorbibilità; i più importanti sono *l'ossido di alluminio (corindone)*, *l'idrossiapatite (HA)*, il *β -fosfato tricalcico (TCP)*, i *vetri bioattivi o bioglass (BG)* ed il *carbonio pirolitico*. Le principali applicazioni biomediche di questi materiali si hanno nei settori ortopedico, maxillo-facciale, odontoiatrico, otorinolaringoiatrico e cardiovascolare. La principale applicazione dei bioceramici nella pratica chirurgica è comunque nella sostituzione di tessuto osseo danneggiato in seguito alla rimozione di cisti, tumori, traumi o affetto da difetti congeniti. Per questo fine servono materiali in grado di integrarsi con il tessuto osseo mantenendo inalterate nel tempo le proprietà meccaniche oppure materiali riassorbibili, gradualmente sostituiti da tessuto osseo sano neoformato.

Le principali complicazioni legate all'utilizzo di materiali bioceramici sono quelle tipiche dei ceramici classici come l'elevata fragilità, la duttilità quasi nulla e le difficoltà di manipolazione in sede chirurgica.

I materiali bioceramici possono essere suddivisi in tre categorie: *ceramiche bioinerti*, caratterizzate da elevata resistenza; *ceramiche biattive*, in grado di creare legami con il tessuto osseo e con i tessuti molli e *ceramiche riassorbibili*, coinvolte in numerosi processi metabolici [3,16].

Tra i materiali ceramici bioinerti la più diffusa è senz'altro l'*allumina* (Al_2O_3); molto usati sono anche il *biossido di titanio* (TiO_2), il *biossido di zirconio o zirconia* (ZrO_2), le porcellane dure e la *cordierite*. L'allumina viene principalmente ricavata dalla bauxite e dal corindone nativo in cui gli ioni ossido occupano le posizioni reticolari di una cella esagonale compatta, mentre gli ioni alluminio occupano 2/3 delle posizioni interstiziali ottaedriche mantenendo così la neutralità elettrica. L'allumina comune (allumina α) viene preparata per calcinazione dell'allumina triidrato; in questo modo si ottiene l'allumina calcinata con struttura cristallina romboedrica. Per essere utilizzabile come biomateriale, l'allumina deve possedere un grado di purezza del 99.5% e un contenuto in quarzo e ossidi di metalli alcalini inferiore allo 0.1% (normativa ASTM) [3].

Il principale materiale ceramico biattivo è il fosfato di calcio; in base al rapporto Ca/P, alla presenza di acqua e impurezze e in funzione della temperatura, questo composto cristallizza in due forme: l'*idrossifosfato di calcio o idrossiapatite* (HA) e il *β -trifosfato di calcio* (β -TCP). La prima si forma in ambiente umido a temperatura inferiore ai 900°C, mentre il secondo si forma in ambiente secco a temperature superiori ai 900°C. Entrambe queste forme hanno eccellente biocompatibilità e sono in grado di creare legami diretti con il tessuto osseo già dopo quattro settimane dall'impianto [3]. L'HA sintetica rappresenta una buona alternativa all'osso naturale; infatti, sebbene l'idrossiapatite sintetica non possieda la struttura altamente cristallina del tessuto naturale, viene metabolizzata dall'organismo con velocità che dipende da struttura, composizione chimica e area superficiale dell'impianto. In ambiente biologico la superficie di questi materiali si ricopre di uno strato biologicamente attivo composto da microcristalli di HA e piccole quantità di gruppi carbonato; questi cristalli sono in grado di instaurare forti legami con il tessuto osseo circostante [16,17].

Altra categoria di bioceramici utilizzata in ambito biomedico è quella dei vetri biologici o biovetri (BG), materiali ceramici policristallini appartenenti al gruppo delle vetroceramiche, ottenuti con processi industriali. La cristallizzazione controllata dei vetri permette al materiale di nucleare e cristallizzare sotto forma di ceramica molto fine con eccellenti proprietà

meccaniche e termiche. Tra i biovetri, i più conosciuti sono sicuramente il *Bioglass* e il *Ceravital*. Il Bioglass è un vetro silicato fortemente modificato che presenta una quantità di ossido di fosforo (P_2O_5) del 6% e che viene prodotto mediante rapido raffreddamento di una miscela di materiali di partenza allo stato liquido oppure tramite metodo *sol-gel*. Il sol è una sospensione colloidale stabile di nanoparticelle (amorfe o cristalline con substruttura densa, porosa o polimerica) in un liquido mentre il gel è una rete tridimensionale porosa continua che circonda e supporta la fase liquida; nella maggior parte dei casi, la gelazione, ossia la formazione del gel, è dovuta a legami covalenti tra le particelle presenti nel sol mentre la struttura del reticolo dipende dalla natura delle particelle. In ambiente biologico il Bioglass stimola la deposizione di HA grazie ad un complesso meccanismo a più stadi. Inizialmente si assiste alla diffusione verso l'esterno dell'impianto di cationi mobili come ioni alcalini, alcalino terrosi, silicati e fosfati, e allo scambio protonico con i liquidi fisiologici circostanti. Questo fenomeno provoca la formazione di un sottile strato di gel di silice superficiale profondo 300-400 μm . La modificazione superficiale con il rilascio di silicati complessi genera una soluzione colloidale che impedisce la diminuzione del pH e l'attivazione dei fagociti. Successivamente, dall'ambiente fisiologico migrano nel sito ioni calcio e fosfato formando fosfosilicati e fosfati di calcio colloidali. Le micelle colloidali che si formano flocculano e aderiscono al gel di silice grazie all'attrazione elettrostatica; in questo modo si generano nuclei di fosfati di calcio che crescono e formano uno strato di HA che, a circa due mesi dall'impianto, inizia a cristallizzare. Infine, con l'insinuarsi nella struttura reticolare dell'HA dei carbonati presenti, si produce la carbonatoapatite, la componente minerale naturale del tessuto osseo sano [3,18]. Le fasi del meccanismo di interazione tra biovetro e tessuto osseo sono riportate in *Tabella 1.2* [18].

| Stage | Reaction Event |
|-------|--|
| 11 | Crystallization of matrix |
| 10 | Cellular attachment |
| 9 | Differentiation of stem cells |
| 8 | Attachment of stem cells |
| 7 | Action of macrophages |
| 6 | Adsorption of biological moieties |
| 5 | Nucleation and crystallization of calcium phosphate to HCA |
| 4 | Precipitation of amorphous calcium phosphate |
| 3-2 | Dissolution and re-polymerization of surface silica |
| 1 | Ion exchange |
| 0 | Initial glass surface |

Tabella 1.2 Stadi del meccanismo di interazione tra tessuto osseo e vetro biologico [18].

1.2.2 Ingegneria tissutale dell'osso e materiali cellulari: TPMS

In caso di trauma esteso all'osso o in seguito a frattura o asportazione di una massa tumorale, è necessario l'impianto di un supporto esterno, con specifiche caratteristiche fisiche e meccaniche, che non provochi reazioni avverse e che sia capace di stimolare la formazione di nuovo tessuto osseo sano [19]. In seguito all'impianto si innesca la risposta infiammatoria dell'organismo con richiamo in loco di fluidi e numerosi tipi diversi di cellule che contribuiscono alla formazione di un trombo ricco di fattori di crescita e citochine che attivano le cellule del sistema immunitario. Speciali cellule del sistema immunitario, i macrofagi, fagocitano ed eliminano tutto ciò che viene riconosciuto come non self e, nel caso il corpo estraneo abbia dimensioni rilevanti come un impianto, più macrofagi si uniscono a formare cellule multinucleate dando avvio al processo denominato *risposta da corpo estraneo*. Il processo termina con la formazione di una capsula fibrotica che isola il corpo estraneo dal resto dell'organismo impedendo l'integrazione e qualsiasi azione bioattiva [19,20]. Per queste ragioni, i biomateriali utilizzati devono essere biocompatibili e in grado di instaurare interazioni positive con il tessuto circostante. Di fondamentale importanza sono le proprietà meccaniche, la velocità di degradazione, ma anche la morfologia e le caratteristiche superficiali dello scaffold come la rugosità, la porosità e l'interconnessione tra i pori della struttura. L'ingegneria tissutale del tessuto osseo (*Bone Tissue Engineering, BTE*) va oltre la semplice sostituzione del tessuto mancante o danneggiato, studiando e sviluppando materiali e strutture innovative che permettano l'osteointegrazione e la rigenerazione dell'osso autologo attraverso stimoli bioattivi. Questi scaffold porosi possono essere inoltre arricchiti con fattori di crescita e cellule osteoprogenitrici autologhe oppure funzionalizzati con peptidi, proteine e altri gruppi funzionali per migliorarne la biocompatibilità e l'efficacia [20]. Gli elementi caratteristici dell'ingegneria tissutale del tessuto osseo sono riportati in *Figura 1.8*.

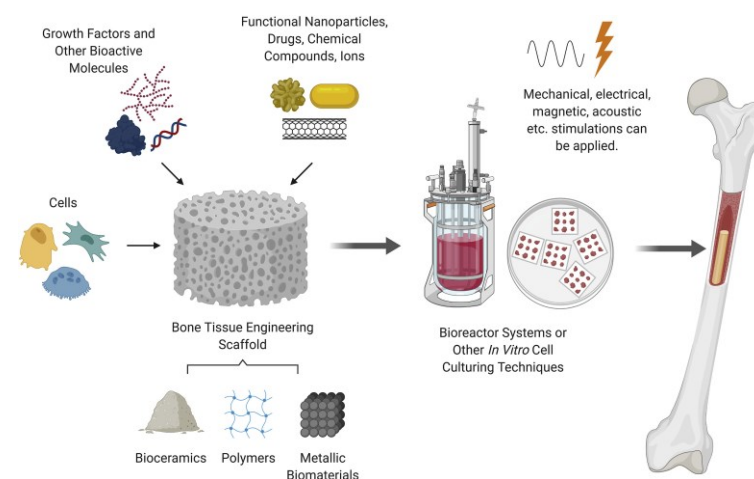


Figura 1.8 Rappresentazione degli elementi fondamentali della Bone Tissue Engineering [4].

I materiali cellulari (*Cellular Materials*) sono strutture tridimensionali formate da un network di travi e superfici interconnesse con proprietà che dipendono dalle caratteristiche del materiale che costituisce la matrice, dalla topologia e dalla forma delle celle e dalla densità relativa (ρ_{rel}), definita come il rapporto tra densità della schiuma e densità del solido. Affinchè un materiale si possa definire cellulare deve avere una porosità superiore al 70% e una densità relativa inferiore a 0.3. Generalmente queste strutture sono ottenute per ripetizione nello spazio di una cella fondamentale con specifica geometria e con dimensioni nell'ordine dei millimetri o micrometri [21]. In letteratura i materiali cellulari vengono classificati in base alle caratteristiche, all'organizzazione e alla geometria della cella unitaria (*Figura 1.9*). Una prima distinzione riguarda l'organizzazione della struttura che può essere regolare e periodica (*regular*), casuale (*random*) oppure pseudoperiodica (*pseudorandom*). Nel primo caso la cella unitaria si ripete regolarmente nello spazio; nel secondo l'organizzazione è completamente casuale mentre nell'ultimo si ha una combinazione delle due forme precedenti con zone ordinate alternate a zone random in base ai fini progettuali. Una seconda distinzione si basa sulla configurazione geometrica della cella considerando strutture schiumose, strutture 2D (a nido d'ape) e strutture tridimensionali. L'ultima distinzione si basa sui criteri di deformazione e divide le strutture in *bending-dominated* and *stretching-dominated*. Un'architettura *bending-dominated* ha modulo elastico e carico di snervamento maggiori rispetto ad un'architettura *stretching-dominated* con la stessa densità relativa; per questi motivi, le prime sono più adatte per un design più leggero della struttura mentre le seconde sono da preferirsi per applicazioni in cui è richiesto grande assorbimento d'energia [21].

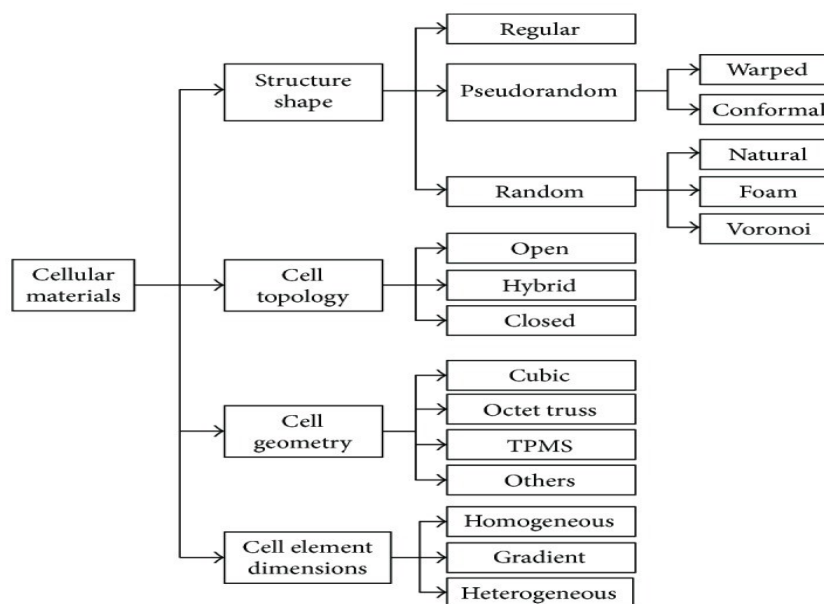


Figura 1.9 Classificazione dei materiali cellulari [21].

Tra le varie categorie di materiali cellulari, negli ultimi anni, hanno assunto sempre maggiore rilevanza e interesse le strutture TPMS (*Triply periodic minimal surface*), superfici periodiche con simmetria cubica e con curvatura media nulla, tale da minimizzare l'area superficiale per determinate condizioni al contorno.

Rispetto ad altri tipi di strutture porose, la struttura porosa dei TPMS presenta due principali vantaggi: la struttura porosa complessiva dei TPMS può essere accuratamente descritta da espressioni matematiche e, di conseguenza, le proprietà di base come la porosità e la superficie specifica del volume possono essere controllate direttamente dai parametri di espressione della funzione; la superficie dei TPMS è molto liscia (smooth) senza curve strette o punti di connessione della struttura porosa del reticolo (*Tabella 1.3*) [22].



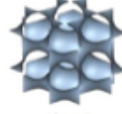

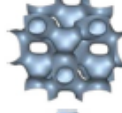

| Unit name | Mathematical expressions | 3D models |
|---------------------|--|---|
| P | $f(x, y, z) = \cos(\omega_x x) + \cos(\omega_y y) + \cos(\omega_z z) = C$ |  |
| G | $f(x, y, z) = \sin(\omega_x x) \cos(\omega_y y) + \sin(\omega_z z) \cos(\omega_x x) + \sin(\omega_y y) \cos(\omega_z z) = C$ |  |
| D | $f(x, y, z) = \cos(\omega_x x) \cos(\omega_y y) \cos(\omega_z z) - \sin(\omega_x x) \sin(\omega_y y) \sin(\omega_z z) = C$ |  |
| I-WP | $f(x, y, z) = 2[\cos(\omega_x x) \cos(\omega_y y) + \cos(\omega_y y) \cos(\omega_z z) + \cos(\omega_z z) \cos(\omega_x x)] - [\cos(2\omega_x x) + \cos(2\omega_y y) + \cos(2\omega_z z)] = C$ |  |
| F-RD | $f(x, y, z) = 4\cos(\omega_x x) \cos(\omega_y y) \cos(\omega_z z) - [\cos(2\omega_x x) \cos(2\omega_y y) + \cos(2\omega_y y) \cos(2\omega_z z) + \cos(2\omega_x x) \cos(2\omega_z z)] = C$ |  |
| I ₂ -Y** | $f(x, y, z) = -2[\sin(2\omega_x x) \cos(\omega_y y) \sin(\omega_z z) + \sin(\omega_x x) \sin(2\omega_y y) \cos(\omega_z z) + \cos(\omega_x x) \sin(\omega_y y) \sin(2\omega_z z)] + \cos(2\omega_x x) \cos(2\omega_y y) + \cos(2\omega_y y) \cos(2\omega_z z) + \cos(2\omega_x x) \cos(2\omega_z z) = C$ |  |

Tabella 1.3 Espressioni matematiche e rappresentazioni della cella unitaria delle principali TPMS [22].

La struttura complessiva che si viene a formare è altamente interconnessa. Le morfologie fondamentali delle celle unitarie di queste strutture sono già implementate in numerosi softwares di modellazione come Rhinoceros e CAD semplificandone notevolmente la realizzazione con la maggior parte delle normali tecniche di additive manufacturing.

Grazie alle caratteristiche superficiali implicite dei TPMS, controllando la distribuzione dei parametri periodici e dei parametri di curvatura, è possibile generare strutture biomimetiche

simili alle strutture porose naturali come l'osso trabecolare. Attualmente esiste una grande varietà di algoritmi di progettazione che permettono di creare strutture porose TPMS non uniformi (gradienti), non omogenee e multiscala [22].

Anche per quanto riguarda le proprietà meccaniche queste strutture presentano proprietà eccezionali: hanno resistenza a compressione maggiore rispetto ai tradizionali scaffold porosi inoltre è stato accertato che la particolare configurazione morfologica e superficiale impedisce effetti di concentrazione delle tensioni e accumulo di energia.

Infine, le TPMS hanno dato eccellenti risultati anche nell'applicazione in vitro grazie alla loro permeabilità superficiale e alla geometria locale che promuovono l'adesione, il differenziamento, la proliferazione e la migrazione di cellule mesenchimali umane all'interno dello scaffold con conseguente generazione di nuovo tessuto osseo [23].

1.2.3 Tecniche di Stampa 3D

Per realizzare scaffold bioceramici con strutture complesse e superfici precise e dettagliate le tecniche convenzionali come la pressatura a secco, lo stampaggio a iniezione e la colata non sono adatte; al contrario, i processi di stampa 3D rappresentano la migliore alternativa per la produzione di componenti bioceramiche grazie alla grande precisione, alla riproducibilità, alla velocità e alla relativa semplicità di questi processi [24].

L'*American Society for Testing and Materials (ASTM)* indica con il termine *additive manufacturing (AM)* il processo di unione di materiali per ottenere oggetti da modelli 3D, generalmente strato per strato (*layer by layer*) a differenza delle tecnologie tradizionali manifatturiere sottrattive [24]. Esistono sette diverse classi di AM che possono essere utilizzate con materiali ceramici, polimerici, metallici, idrogeli ma anche cellule viventi per la realizzazione di scaffold biologici. Tutte le tecniche di stampa 3D prevedono un processo comune che inizia con la progettazione di un modello tridimensionale, un file CAD (Computer-Aided Design) nel quale sono definite tutte le caratteristiche geometriche e morfologiche del componente da realizzare. In ambito clinico il modello viene generalmente creato sulla base di immagini ottenute mediante tecniche di imaging o scanning biomedicale come risonanza magnetica (*MRI*) oppure tomografia computerizzata (*CT*). Il file CAD deve poi essere convertito in formato STL (*Standard Triangulation Language*) e 'affettato' in una serie successiva di strati con spessore compreso tra i 25 e i 100 μm che saranno poi stampati uno sopra l'altro dalla stampante (*slicing*) [24,25]. In *Figura 1.10* sono riportate le fasi fondamentali del processo di AM.

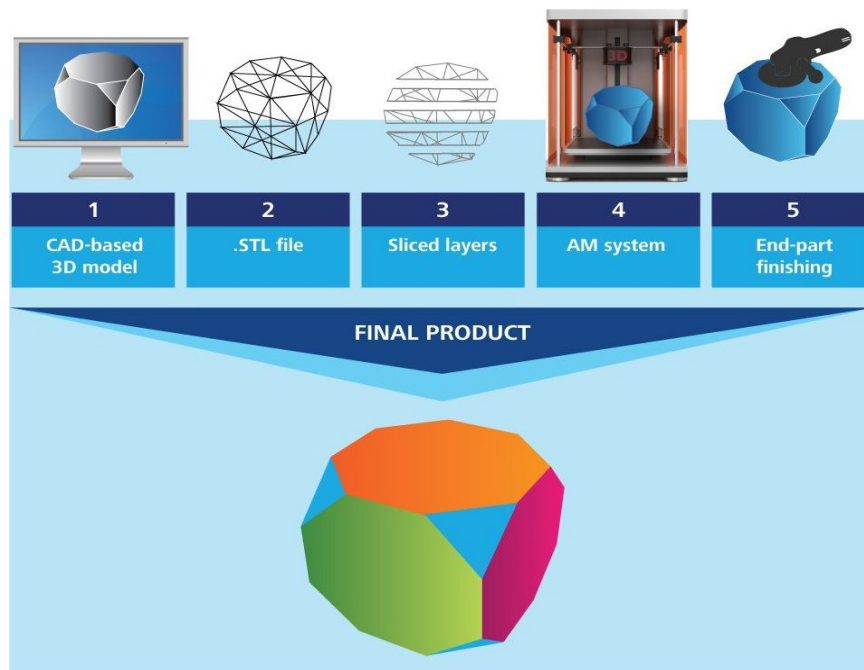


Figura 1.10 Schematizzazione delle fasi del processo di additive manufacturing [25].

Le principali tecniche di additive manufacturing utilizzate in ambito biomedicale sono elencate di seguito mentre in *Figura 1.11* è riportata una classificazione più specifica delle tecnologie di stampa 3D attualmente disponibili:

- *Selective laser melting (SLM)*. In questo processo il componente è formato strato per strato mediante fusione selettiva delle polveri di partenza con un fascio laser guidato e computerizzato in atmosfera protetta. L'SLM garantisce un'ottima finitura superficiale, bassi tempi di produzione, basso spreco di materiale e scarsa necessità di supporti. Questa tecnica viene utilizzata principalmente con i materiali metallici come titanio, alluminio e acciaio [21].
- *Selective laser sintering (SLS)*. Questo metodo è molto simile al precedente; una polvere altamente compatta di materiale termoplastico viene deposta su una superficie e un raggio laser, guidato dal computer, la fonde. Solitamente vengono utilizzate polveri polimeriche oppure ceramiche [21].
- *Direct ink writing (DIW)*. Questo processo è stato sviluppato per produrre componenti ceramiche attraverso l'estrusione di un filamento di materiale da un ugello. L'inchiostro non necessita di essere riscaldato ad alte temperature ma deve avere proprietà reologiche specifiche che permettano l'estrusione allo stato liquido e una rapida solidificazione una volta deposto [26].
- *Fused deposition modelling (FDM)*. La semplicità del processo, il basso costo e l'ampia gamma di materiali utilizzabili la rendono una delle tecniche di AM più

utilizzate. Il processo si basa sulla fusione e deposizione di un filamento termoplastico solitamente in materiale polimerico come l'acido polilattico (PLA) e l'acrilonitrile butadiene stirene (ABS) [25].

- *Vat Photopolymerization*. Questa categoria include la *Stereolitografia (SLA)*, ideata da Charles Hull nel 1986 e prima tecnica di AM ad essere commercializzata, e il *Digital Light Processing (DLP)*, tecnologia che verrà approfondita nel secondo capitolo (materiali e metodi) in quanto elemento fondamentale di questo progetto di tesi. Questi processi si basano sulla solidificazione controllata di una resina liquida fotosensibile mediante il fenomeno chimico della fotopolimerizzazione in cui la luce ultravioletta (UV) induce la polimerizzazione del materiale monomero che solidifica in pochi secondi. La Vat Photopolymerization presenta accuratezza, risoluzione e rifinitura superficiale superiori a tutte le altre tecnologie di AM arrivando ad una precisione di 20 μm [27].

In campo biomedico le possibili applicazioni delle tecnologie di additive manufacturing sono estremamente diversificate partendo dalla produzione di strumenti chirurgici e modelli anatomici per pratica preoperatoria fino alla stampa di tessuti e organoidi con inchiostro contenente cellule vive (bio-ink) e alla realizzazione di impianti e protesi su misura per il paziente. Queste tecniche sono già ampiamente utilizzate nell'ingegneria tissutale, in odontoiatria e in ortopedia ma anche nel settore farmaceutico per il rilascio controllato di farmaci (*drug delivery*) [25].

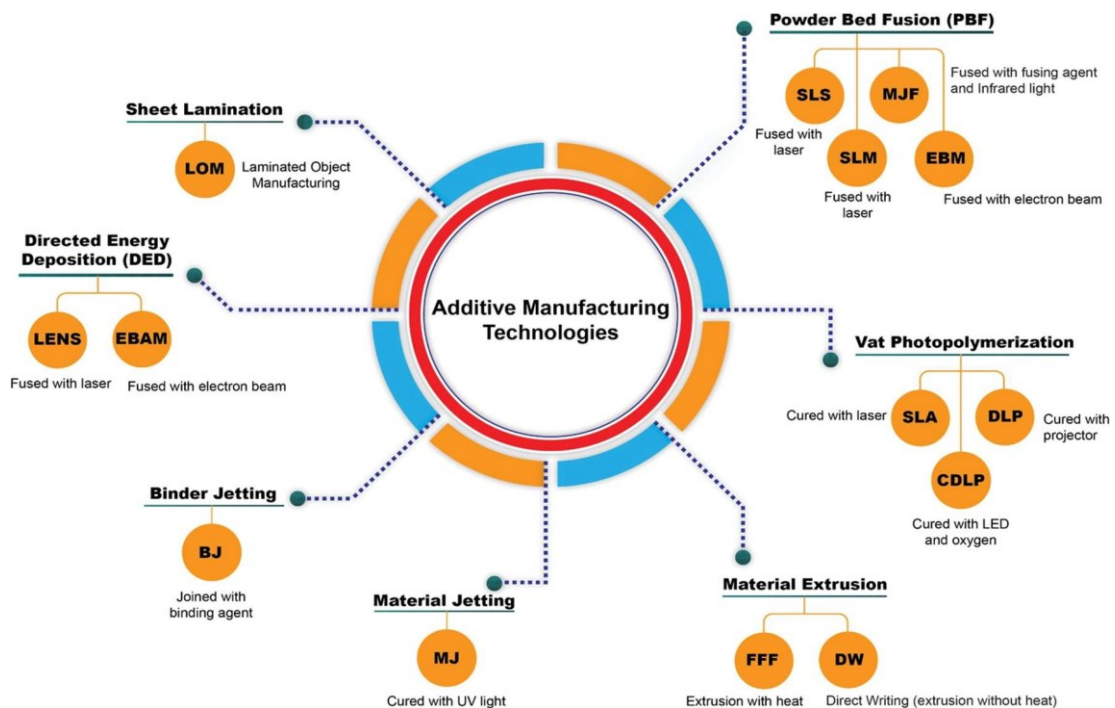


Figura 1.11 Classificazione delle diverse tecnologie di Additive Manufacturing [27]

1.3 FINALITA' DELLA TESI

Grazie all'additive manufacturing è possibile realizzare scaffold e innesti tridimensionali cellulari con materiali biocompatibili e bioattivi che stimolano la deposizione di nuova matrice ossea, come il β -TCP e l'idrossiapatite, e con topologie e strutture complesse e articolate. Queste strutture devono avere caratteristiche geometriche e meccaniche tali da favorire e supportare la rigenerazione del tessuto osseo; inoltre, devono avere tempi di degradazione tali da permettere un'adeguata osteogenesi senza generare residui dannosi per l'organismo. Di fondamentale importanza sono i valori della porosità, che deve essere almeno del 70%, e della resistenza a compressione; la resistenza della struttura diminuisce con l'aumento della porosità, quindi, è necessario raggiungere un compromesso accettabile che garantisca una porosità simile a quella del tessuto naturale e una resistenza meccanica adeguata. In questo progetto di tesi sono state selezionate le geometrie TPMS più studiate e con le migliori caratteristiche presenti in letteratura, per realizzare degli scaffold cubici in idrossiapatite e β -TCP mediante Digital Light Processing (DLP). È stata calcolata la densità geometrica e apparente prima e dopo la sinterizzazione per valutare e confrontare la porosità e lo *shrinkage* di ogni campione. Mediante prove meccaniche di compressione monoassiale è stato poi individuato il materiale più resistente la struttura meccanicamente più performante. Attraverso la selezione e l'ottimizzazione delle caratteristiche topologiche e morfologiche e dei parametri del processo di stampa, come il tempo di esposizione per ogni layer, si è cercato di ottenere degli scaffold con proprietà coerenti e simili al modello geometrico. L'obiettivo principale di questo lavoro è stato quello di ottenere dei provini in β -TCP con specifiche topologie e caratteristiche tali da avere il miglior compromesso tra porosità della struttura, resistenza a compressione, finitura superficiale e rispetto del modello geometrico realizzato con Rhinoceros. Al termine della caratterizzazione è stata scelta la struttura con le migliori proprietà meccaniche, strutturali e morfologiche e questa è stata ulteriormente ottimizzata riducendo le dimensioni delle celle unitarie nell'ottica di una migliore interazione con le cellule del tessuto osseo nei saggi in vitro. In quest'ultima fase di scelta è stata anche presa in considerazione la capacità di ogni modello di favorire l'adesione e la proliferazione cellulari; infatti, è ampiamente dimostrato in letteratura che le cellule, nell'interagire con un corpo esterno, favoriscono le forme concave con angoli di curvatura prossimi allo zero mentre strutture porose interconnesse permettono una migliore propagazione e colonizzazione, con conseguente integrazione dello scaffold con l'osso naturale.

2. MATERIALI E METODI

In questo secondo capitolo saranno riportati i materiali e la strumentazione utilizzata per la realizzazione dei provini mentre saranno spiegate e approfondite le tecniche e le procedure, alcune delle quali sono già state introdotte nel capitolo precedente, impiegate per la modellizzazione, la stampa e la caratterizzazione degli scaffold. Tutti gli strumenti e i materiali presentati in questa tesi sono stati messi a disposizione dai Dipartimenti di ingegneria industriale e Fisica Tecnica dell'Università degli Studi di Padova.

2.1 REALIZZAZIONE DEGLI SCAFFOLD

Gli scaffold per la rigenerazione del tessuto osseo danneggiato o malato devono avere specifiche caratteristiche e proprietà morfologiche, strutturali e meccaniche. L'osso è un tessuto metabolicamente attivo ed in continuo rimodellamento e per questo motivo l'impianto inserito nel sito lesionato deve essere in grado di integrarsi perfettamente e stimolarne la rigenerazione senza alterarne l'omeostasi o la funzionalità. Gli impianti devono essere realizzati in materiale altamente biocompatibile per non generare reazioni avverse da parte del sistema immunitario del paziente ma al contempo devono essere bioattivi e, soprattutto, biodegradabili, in modo da essere completamente degradati nel tempo e sostituiti da osso sano [28]. Come anticipato nel primo capitolo, di fondamentale importanza è la scelta delle caratteristiche geometriche e strutturali come lo spessore delle pareti, le dimensioni dei pori e delle celle unitarie. Questi fattori vanno accuratamente considerati e calibrati affinché il modello geometrico possa essere stampato senza delaminazioni dei layers o difetti strutturali e superficiali che possono a loro volta compromettere le proprietà meccaniche del provino.

Gli scaffold per la riparazione dell'osso devono fornire un ambiente adatto all'adesione e alla proliferazione delle cellule. Pertanto, un impianto ideale per la riparazione ossea deve avere le seguenti caratteristiche: buona biocompatibilità, per favorire l'adesione, la proliferazione e la differenziazione delle cellule; la degradabilità e la velocità di degradazione devono corrispondere alla velocità di rigenerazione e riparazione del tessuto osseo umano; la struttura interna tridimensionale dei pori deve essere interconnessa per soddisfare lo scambio di nutrienti e metaboliti, ma anche per guidare la crescita cellulare e, infine, deve avere una certa resistenza meccanica per sopportare gli stimoli a cui è sottoposto il sito dell'impianto [28]. Le attuali tecnologie di stampa 3D permettono di produrre scaffold bioceramici con strutture macroscopiche tridimensionali anche molto complesse con grande precisione, accuratezza e in breve tempo partendo dalle polveri di materiale ceramico come idrossiapatite o tricalcio fosfato unite in percentuale variabile ad un monomero liquido che polimerizza solidificandosi

se esposto alla luce UV [27,28]. Il verde ottenuto dalla stampa viene poi pulito con specifici solventi da eventuali residui di resina e sottoposto a crosslinking e trattamenti termici ad alta temperatura che permettono la sinterizzazione delle polveri [28].

2.1.1 Topologie TPMS e creazione dei modelli geometrici

Le TPMS (*Triply Periodic Minimal Structure*) sono una classe di strutture reticolari che presentano una cella unitaria ripetuta nello spazio tridimensionale con curvatura media nulla in ogni punto locale [29]. Queste particolari geometrie possiedono numerosi vantaggi rispetto alle architetture basate su travi e puntoni: le TPMS sono descritte da funzioni matematiche che possono quindi essere manipolate per modificarne la curvatura, le caratteristiche geometriche come le dimensioni dei pori e lo spessore superficiale e le proprietà fisiche come il rapporto superficie-volume e la densità; presentano eccellenti proprietà meccaniche; migliore resistenza alla fatica e maggiore somiglianza all'osso trabecolare umano [29]. Oltre a questo, da uno studio in vitro condotto da Melchels et al. nel 2010 in cui si confrontava la diffusione e la proliferazione cellulari tra una struttura Gyroid (TPMS) e un'architettura con pori casuali, è emerso che il modello TPMS mostra una permeabilità dieci volte maggiore della controparte e una proliferazione notevolmente migliore [30]. Altri studi hanno dimostrato che sia le proprietà meccaniche che l'affinità cellulare dello scaffold dipendono dalle caratteristiche geometriche e morfologiche della specifica topologia [30].

In questa tesi sono state scelte cinque diverse strutture TPMS dalla letteratura: *Gyroid*, *IWP*, *Diamond Surface*, *Primitive Surface* e *Neovius Surface*. Tutte queste geometrie presentano curvatura media nulla in ogni punto locale della superficie e sono descritte matematicamente dalle funzioni riportate in *Tabella 2.1*.

| TPMS Structures | Equations |
|-----------------|---|
| Primitive | $\cos\left(\frac{2\pi}{L}x\right) + \cos\left(\frac{2\pi}{L}y\right) + \cos\left(\frac{2\pi}{L}z\right) = c$ |
| Gyroid | $\sin\left(\frac{2\pi}{L}x\right)\cos\left(\frac{2\pi}{L}y\right) + \sin\left(\frac{2\pi}{L}y\right)\cos\left(\frac{2\pi}{L}z\right) + \sin\left(\frac{2\pi}{L}z\right)\cos\left(\frac{2\pi}{L}x\right) = c$ |
| Diamond | $\cos\left(\frac{2\pi}{L}x\right)\cos\left(\frac{2\pi}{L}y\right)\cos\left(\frac{2\pi}{L}z\right) - \sin\left(\frac{2\pi}{L}x\right)\sin\left(\frac{2\pi}{L}y\right)\sin\left(\frac{2\pi}{L}z\right) = c$ |
| Neovius | $3\left(\cos\left(\frac{2\pi}{L}x\right) + \cos\left(\frac{2\pi}{L}y\right) + \cos\left(\frac{2\pi}{L}z\right)\right) + 4\left(\cos\left(\frac{2\pi}{L}x\right)\cos\left(\frac{2\pi}{L}y\right)\cos\left(\frac{2\pi}{L}z\right)\right) = c$ |
| IWP | $2\left(\cos\left(\frac{2\pi}{L}x\right)\cos\left(\frac{2\pi}{L}y\right) + \cos\left(\frac{2\pi}{L}y\right)\cos\left(\frac{2\pi}{L}z\right) + \cos\left(\frac{2\pi}{L}z\right)\cos\left(\frac{2\pi}{L}x\right)\right) - \left(\cos\left(\frac{2\pi}{L}2x\right) + \cos\left(\frac{2\pi}{L}2y\right) + \cos\left(\frac{2\pi}{L}2z\right)\right) = c$ |

Tabella 2.1 Funzioni matematiche nelle tre coordinate cartesiane $f(x,y,z)$ che descrivono le cinque strutture TPMS scelte per la realizzazione dei provini [29].

I modelli geometrici dei provini sono stati realizzati con Rhinoceros 7, un software applicativo commerciale per la modellazione 3D di superfici sculturate (*free form*). In Rhinoceros, tutte le entità geometriche sono rappresentate mediante NURBS, acronimo di *Non Uniform Rational B-Splines*, rappresentazioni matematiche mediante le quali è possibile definire accuratamente geometrie 2D e 3D come linee, archi e superfici a forma libera. All'interno del programma sono poi stati utilizzati specifici plug-in per la creazione della mesh e della finitura superficiale come Grasshopper e Monolith. I modelli sono stati generati come ripetizione nelle tre direzioni dello spazio di quattro celle cubiche unitarie di 2,5 mm di lato e con porosità dell'85%, in *Figura 2.2* sono riportati i modelli in Rhino delle strutture selezionate.

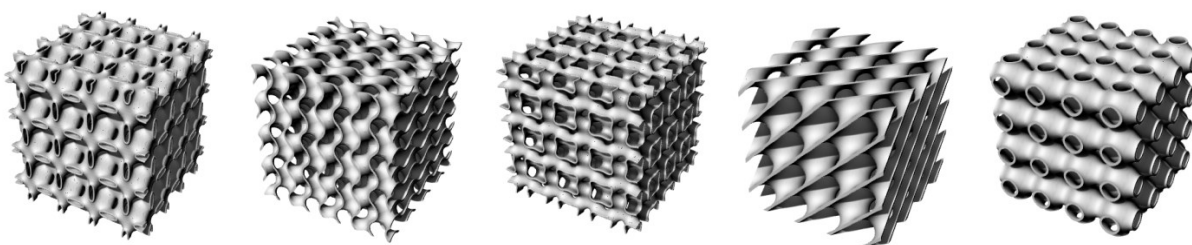


Figura 2.1 Modelli geometrici dei provini realizzati con Rhino7; da sinistra a destra: Neovius, Gyroid, IWP, Diamond e Primitive. I cubi hanno lato di 10mm (ripetizione di quattro celle unitarie), la porosità è dell'85%.

I tre parametri geometrici fondamentali per la caratterizzazione dei modelli sono stati: la porosità, direttamente dipendente dalla densità relativa delle strutture; le dimensioni dei pori e lo spessore delle pareti (*thickness*). Soprattutto da questo ultimo fattore dipende fortemente la stampabilità del modello [29].

2.1.2 Stampa dei provini: *Digital Light Processing*

Il Digital Light Processing (DLP) appartiene alla più ampia categoria delle tecniche di Stereolitografia che si basano su un processo di polimerizzazione localizzata che avviene grazie ad una luce ultravioletta che solidifica strati successivi di un liquido più o meno viscoso formato da una resina fotosensibile ed altre componenti [31]. La stereolitografia fu ideata negli anni '70 da Swainson e Herbert che ebbero l'idea di creare un oggetto 3D strato dopo strato (*layer by layer*) sfruttando la radiazione luminosa e un polimero fotosensibile. Da allora ai giorni nostri si sono succedute quattro generazioni di questa tecnica: la prima, realizzata da Charles Hull, consisteva nella scansione attraverso un fascio laser sopra il materiale liquido. La seconda generazione è nata per superare la bassa efficienza della prima

ed è nota come stereolitografia a proiezione: è in grado di eseguire il curing su ogni strato simultaneamente tramite maschere per la luce. La terza generazione è nata nel 2015 ad opera di Tumbleston et al. che ridussero notevolmente i tempi di stampa grazie ad un processo di continua creazione di un'interfaccia liquida (*Continuous Liquid Interface Production*, da cui la sigla CLIP). L'ultima generazione, detta stereolitografia volumetrica, è in grado di creare oggetti tridimensionali in pochi secondi [32]. La successione cronologica e le caratteristiche principale delle quattro generazioni di stereolitografia sono riportate in *Figura 2.2*.

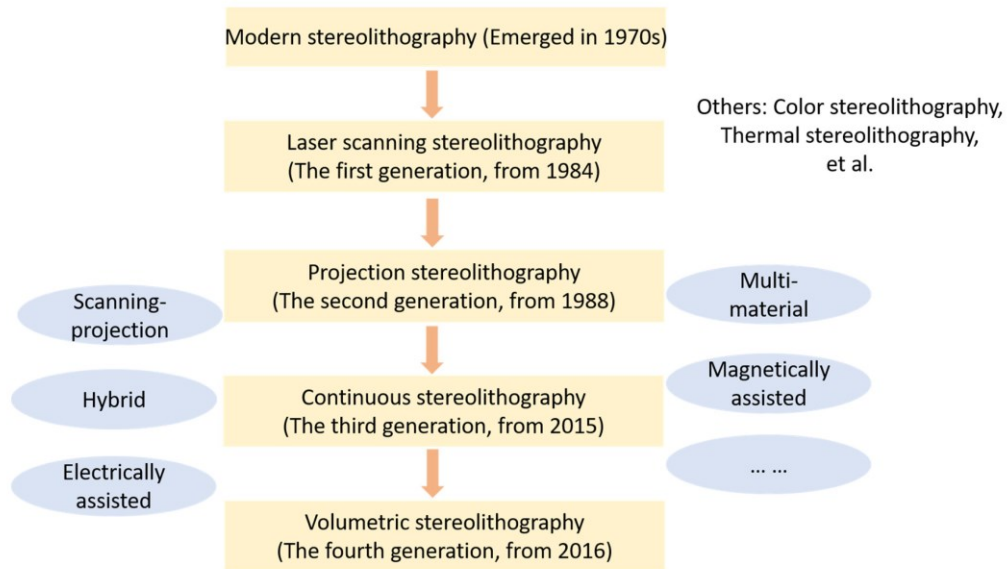


Figura 2.2 Successione cronologica delle quattro generazioni di stereolitografia [32].

La DLP è una tecnologia di stampa 3D molto simile alla stereolitografia ma le stampanti che utilizzano questo processo sono in grado di polimerizzare un intero strato in una sola volta a differenza delle stampanti SLA che tracciano un percorso specifico con il laser. Il principale vantaggio di questa tecnica è la capacità di produrre rapidamente oggetti e parti con architetture e geometrie molto complicate con elevato grado di precisione; inoltre, le stampanti DLP sono relativamente economiche [31].

Per la stampa dei provini utilizzati in questa tesi è stata impiegata una *Original Prusa SL1S*, un modello di stampante stereolitografica prodotto dal marchio ceco *Prusa Research* che, sebbene sia un prodotto relativamente economico e facilmente reperibile nel mercato, garantisce buone prestazioni in termini di velocità di stampa, risoluzione e spessore minimo del layer che può arrivare fino ai 10 μm , (*Figura 2.3*). Questa stampante appartiene alla categoria PSL (*projection-based stereolithography*) anche se la maschera utilizza un pannello LCD (dall'inglese *liquid crystal display*). Il principale vantaggio di questo approccio consiste nel fatto che la maschera

viene generata direttamente sullo schermo eliminando così la distorsione ottica garantendo comunque un'ottima risoluzione. La *Prusa SL1S* si basa su un approccio bottom-up: il fondo del vat è trasparente per permettere il passaggio della luce; la piattaforma si abbassa fino a lasciare dal fondo del vat una quantità di resina pari allo spessore del layer desiderato. Il campione viene stampato rivolto verso il basso con la base sulla piattaforma che viene sollevata di volta in volta dello spessore di un layer [33]. In questa stampante i parametri di controllo regolabili dall'utente sono: lo spessore di ogni layer, che può essere aumentato fino a 100 μm per velocizzare la stampa; il tempo di esposizione alla luce del primo layer, ossia quello a contatto con la piattaforma mobile e il tempo di esposizione dei layer successivi. In questa tesi i parametri selezionati sono stati: 50 μm come spessore del primo layer, 15 secondi come tempo di esposizione del primo layer e 4 e successivamente 2 secondi come esposizione dei layer successivi.



Figura 2.3 Stampante DLP utilizzata in questa tesi: *Original Prusa SL1S*.

Per poter essere stampati, i file dei modelli geometrici dei provini sono stati rielaborati e convertiti in formato *.sls* dal programma *PrusaSlicer*, ideato dalla stessa casa produttrice della stampante, che ‘affetta’ il modello tridimensionale generando una serie di immagini successive (*slice*) dei singoli layer con il profilo bidimensionale che verrà illuminato dal proiettore.

Per ogni modello geometrico sono stati stampati 12 provini che, terminata la stampa, sono stati separati dalla base di appoggio e, per eliminare i residui di resina, sono stati lavati con isopropanolo in successivi bagni ad ultrasuoni; ottenuto il risultato desiderato, i provini sono stati asciugati. I provini sono stati poi sottoposti ad ulteriori trattamenti con luce ultravioletta per permettere la reticolazione (*cross-linking*) delle catene polimeriche e migliorare le proprietà meccaniche del componente. La reticolazione è il processo mediante il quale le catene polimeriche della resina vanno incontro ad una reazione che crea dei legami,

detti legami crociati, fra diverse catene o tra due punti diversi della stessa catena, a livello di gruppi funzionali reattivi. Questi legami sono forti di tipo covalente oppure ionico. Questo trattamento modifica notevolmente le proprietà chimiche e fisiche del materiale rendendolo molto più resistente e meno elastico [32].

Per questo trattamento è stato utilizzato il dispositivo CW1S (*curing and washing machine*) di Prusa Research, (Figura 2.4). In seguito alla stampa i campioni sono stati sottoposti a due cicli consecutivi di dieci minuti con luce UV.



Figura 2.4 Macchina CW1S di Prusa Research per cross linking con luce UV.

In Figura 2.5 è riportata una fotografia dei provini dei modelli dopo la stampa e il trattamento di reticolazione; il colore arancione è dovuto alla resina polimerica utilizzata nella preparazione dell'inchiostro.

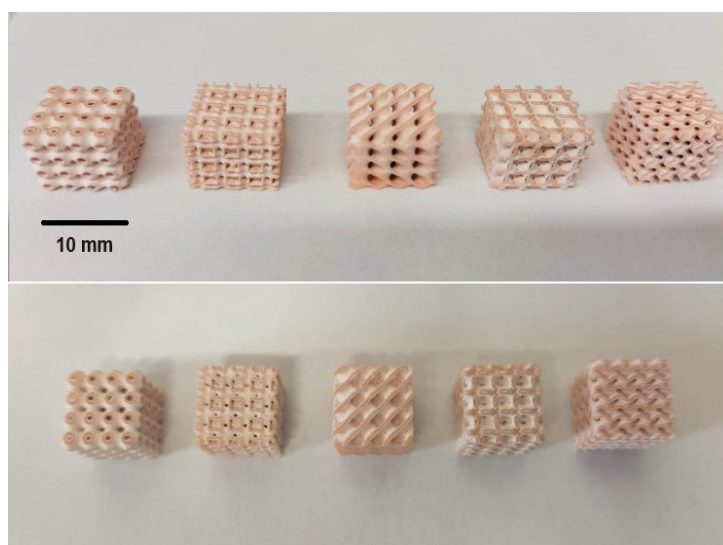


Figura 2.5 Fotografia dei provini dopo la stampa e il cross-linking (green).

2.1.3 Resina e polvere ceramica

Per la stampa dei provini mediante DLP è di fondamentale importanza la scelta della resina adeguata da aggiungere alle polveri di materiale ceramico, in modo che l'inchiostro abbia specifiche caratteristiche reologiche e di solubilità. Affinché avvenga la fotopolimerizzazione la resina deve avere tre componenti principali: oligomeri (circa 70%), ossia molecole con peso intermedio che rappresentano la componente principale da cui dipendono le proprietà chimiche e fisiche dello stampato, monomeri (circa 25%) che vengono aggiunti come diluenti reattivi per ridurre la viscosità della resina (in stereolitografia solitamente vengono utilizzate resine acriliche e epossidiche) e, infine, fotoiniziatori (circa 5%), ossia molecole a basso peso molecolare che sono in grado di avviare il processo di polimerizzazione se irradiati con luce ultravioletta [34].

Come resina per l'inchiostro della stampante è stato usato il *Tough Prusa Orange* di Prusa Research, mentre per la componente bioceramica è stata utilizzata *WHITLOCKITE SD*, polvere di β fosfato tricalcico (β -TCP) e *CAPTAL SSD*, polvere di idrossiapatite, prodotte entrambe dall'azienda indiana *Plasma Biotol Limited (Plasma Group Science)*. La resina e le polveri utilizzate sono riportate in *Figura 2.6*.

Per la composizione dell'inchiostro si è scelto inizialmente di usare il 55% wt di polvere (HA e β -TCP) e il 45% wt di resina mentre per la composizione mista idrossiapatite-fosfato tricalcico, le percentuali scelte sono state: 70% in peso di β -TCP e 30% di HA. Prima della stampa l'inchiostro è stato centrifugato con mixer automatico a 2000 rpm per due cicli di 10 minuti ciascuno per ottenere una soluzione liquida ed omogenea.



Figura 2.6 Resina polimerica e polveri bioceramiche utilizzate per la produzione dell'inchiostro: da sinistra a destra sono riportate la resina *Tough Prusa Orange*, la polvere di β -TCP *WHITLOCKITE SD* e la polvere di HA *CAPTAL SSD*.

Successivamente, confrontando i valori di densità relativa e resistenza meccanica dei provini stampati con le diverse polveri bioceramiche, si è deciso di utilizzare solo la polvere di β -TCP. Come già ampiamente discusso nel capitolo precedente, il β -TCP è un biomateriale biocompatibile e bioattivo, è osteoconduttivo, osteoinduttivo e si può facilmente funzionalizzare con ioni o altre molecole; queste caratteristiche lo rendono estremamente interessante per l'ingegneria tissutale dell'osso. Al contrario, l'idrossiapatite è essenzialmente bioinerte in ambiente biologico e nel tempo una parte si trasforma in fosfato tricalcico. Oltre a questo, l'idrossiapatite è caratterizzata da un riassorbimento piuttosto lento a contatto con il tessuto osseo naturale mentre il β -TCP ha una velocità di degradazione decisamente più elevata che favorisce l'angiogenesi nel sito dell'impianto. Infine, il β -TCP ha una resistenza meccanica a compressione maggiore rispetto all'idrossiapatite [16].

2.1.4 Trattamenti termici

Dopo la stampa, la pulizia e le misure di densità i provini verdi sono stati sottoposti a trattamento termico in un forno per ceramici (*BSF-Laboratory Chamber Furnaces* di *Elite Thermal Systems Limited*). Il ciclo di cottura si divide in due fasi: il *debinding* e la sinterizzazione.

Il processo di *debinding* nei materiali ceramici avviene generalmente in atmosfera ossidativa e comporta la completa combustione e quindi eliminazione degli additivi organici, ossia la resina polimerica contenuta nell'inchiostro. Conseguenze dirette di questo trattamento sono un'evidente riduzione di peso e volume dei campioni; per questo motivo il *debinding* è un processo molto delicato che, se il riscaldamento è troppo rapido, può provocare il danneggiamento o la rottura dei campioni con formazione di difetti o cricche [3,35]. Per rimediare a questo problema la temperatura della fornace viene aumentata molto lentamente: in questa tesi i campioni sono stati portati da temperatura ambiente fino a 500°C con velocità di riscaldamento di +0,4-0,5°C/min a seconda delle polveri utilizzate (0,5°C per i provini a base di β -TCP, 0,4°C per i provini in HA e per le polveri miste). In seguito, la temperatura è stata mantenuta per cinque ore.

La sinterizzazione è un trattamento termico che provoca il compattamento dei grani di polvere del materiale per ottenere un solido denso e coeso con specifiche caratteristiche fisico-meccaniche. Questo processo avviene solitamente a temperature molto elevate, ma comunque inferiori al limite di fusione del materiale ed è termodinamicamente favorito poiché, riducendo le superfici interne dei grani, comporta una riduzione dell'energia libera di Gibbs [35]. La sinterizzazione è influenzata da diversi fattori come le dimensioni dell'oggetto, la

forma, lo stato superficiale dei granuli di polvere, la pressione usata per la produzione del compatto, la temperatura raggiunta e l'atmosfera all'interno dei forni di riscaldamento. La trasformazione del *green body* in solido con maggiore resistenza avviene attraverso fasi di carattere macroscopico perché facilmente osservabili e misurabili come l'ulteriore diminuzione del volume, l'aumento della densità e la variazione delle caratteristiche meccaniche. Solitamente la sinterizzazione viene effettuata in un forno o in atmosfera inerte (argon, idrogeno, ossido di carbonio, o ancora sottovuoto per proteggere il materiale dall'ossidazione) [35]. I provini realizzati in questa tesi sono stati portati fino a 1200°C con rampa di riscaldamento di 3°C/min; successivamente i campioni a base di fosfato tricalcico sono stati mantenuti a tale temperatura per tre ore, mentre quelli realizzati in polvere di sola idrossiapatite oppure mista sono stati lasciati a 1200°C per due ore. In *Figura 2.7* è riportato il grafico esemplificativo di un ciclo termico a cui sono stati sottoposti i provini a base di polvere di β -TCP: si possono notare le due rampe di riscaldamento (la prima di +0,5°C/min e la seconda di +3°C/min), la rampa di raffreddamento (-5°C/min) ed i due plateaux corrispondenti alle fasi di *debinding* (500°C) e sinterizzazione (1200°C).

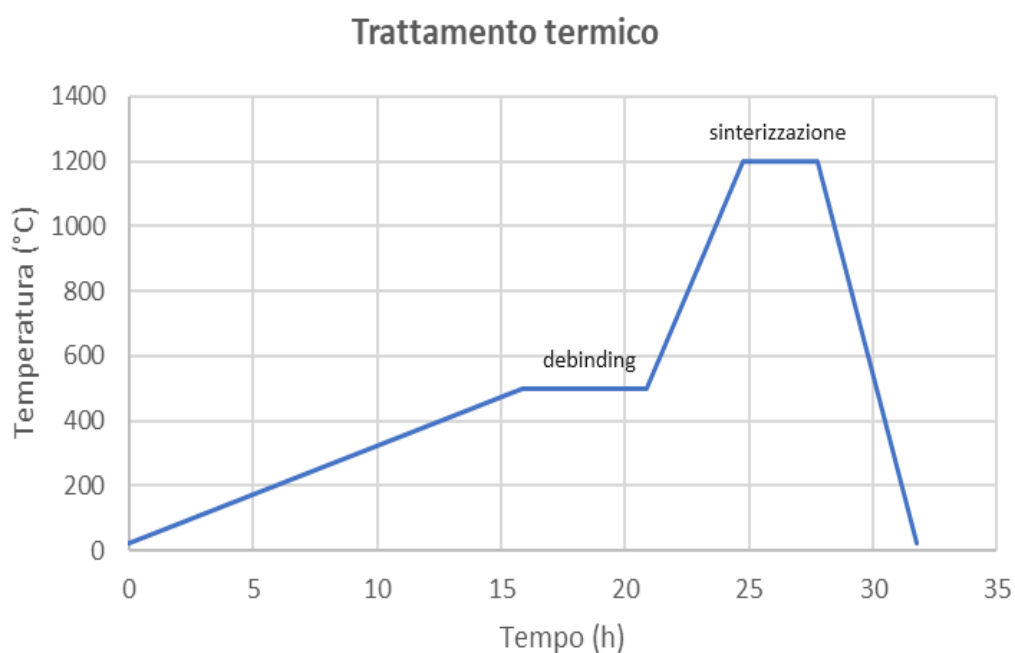


Figura 2.7 Grafico di un trattamento termico. La prima rampa ha una pendenza di 0,5°C/min; la seconda rampa di 3°C/min; la terza rampa di -5°C/min. I due plateaux sono rispettivamente a 500°C (5 ore) e a 1200°C (3 ore).

In *Figura 2.8* è invece riportata una fotografia di un provino a base di polvere di fosfato tricalcico prima e dopo il trattamento termico. Il *green body* presenta ancora la colorazione dovuta alla resina polimerica mentre il provino dopo la cottura è completamente bianco

poiché la resina viene eliminata durante il processo di sinterizzazione. Dall'immagine si può apprezzare anche la contrazione volumetrica (*shrinkage*) dei provini dovuta al ciclo termico (debinding e sinterizzazione); lo *shrinkage* medio misurato su cinque campioni dello stesso modello prima e dopo il trattamento termico è stato del 60%.

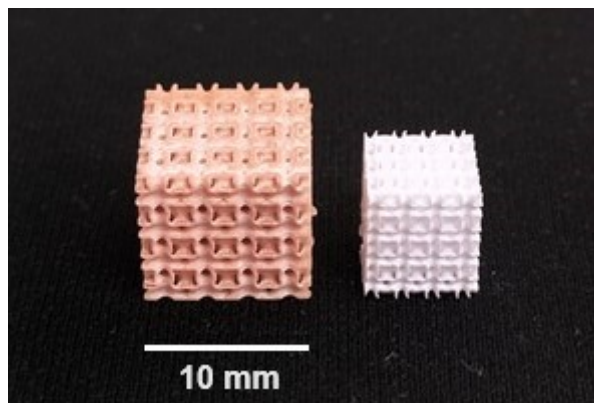


Figura 2.8 Campione composto per il 55% wt da polvere di β -TCP e per il 45% da resina polimerica (modello IWP) prima e dopo la sinterizzazione a 1200°C. Si nota il cambiamento di colore dovuto alla scomparsa della resina e il ritiro volumetrico (*shrinkage*).

2.2 MISURE DI DENSITÀ E CARATTERIZZAZIONE MECCANICA

Tra i campioni stampati sono stati selezionati cinque provini per ogni modello, come riferimento per le misure di densità e per le prove meccaniche di compressione. Con la misurazione della densità geometrica e di quella apparente è stato possibile valutare la precisione della stampa e l'affinità dei campioni con il modello geometrico in termini di porosità sia prima che dopo la sinterizzazione a diversi tempi di esposizione. Con le prove di compressione si è invece studiata la dipendenza delle proprietà meccaniche dei campioni sinterizzati dalla topologia e dalla struttura del singolo modello geometrico.

2.2.1 Densità geometrica, apparente e porosità

Le misure di densità sono state realizzate utilizzando un calibro digitale, una bilancia analitica e un picnometro ad elio (*Ultrapyc 3000, Anton-Paar, Graz, Austria*). Di seguito vengono definite cinque grandezze: la densità geometrica, la densità apparente, la densità vera, la densità relativa e la porosità aperta.

- La *densità geometrica* ρ_{geom} [g/cm³] è data dal rapporto fra la massa del campione misurata con la bilancia analitica e il suo volume, ottenuto come prodotto della lunghezza dei tre lati del provino con il calibro digitale, moltiplicato per 1000.

- La *densità apparente* ρ_{app} [g/cm³] è data dal rapporto fra la massa del campione e la differenza fra il suo volume e il volume della porosità aperta; si misura utilizzando il picnometro sui provini interi.
- La *densità vera* ρ_{vera} [g/cm³] è data dal rapporto fra la massa del campione e la differenza fra il suo volume e il volume della porosità totale, ossia la somma della porosità aperta e di quella chiusa, misurata utilizzando il picnometro sulle polveri.
- La *densità relativa* ρ_{rel} [adimensionale] si calcola come rapporto fra densità geometrica e densità vera ed è equivalente alla differenza tra uno e la porosità totale (somma di porosità aperta e chiusa) del campione.
- La *porosità aperta percentuale* [adimensionale] è calcolata come differenza tra uno e il rapporto tra la densità geometrica e quella apparente, il tutto moltiplicato per cento.

Per ogni campione è stato calcolato il volume misurandone i tre lati prima e dopo il trattamento termico per derivarne, in un secondo momento, le densità e la porosità. Prima di ogni rilevazione della densità apparente il picnometro è stato opportunamente calibrato e impostato in modo che ogni misura fosse ripetuta cinque volte e che la pressione massima raggiunta dal gas all'interno della camera con i campioni fosse di 18 psi. I valori ottenuti sono stati confrontati con la porosità ideale del modello (85%) per valutare la qualità e la precisione della stampa; successivamente è stato ridotto il tempo di esposizione alla luce di ogni layer per aumentare la porosità aperta del verde stampato (da 4 a 2 secondi). Tale procedura è stata ripetuta per tutte le topologie considerate in questa tesi.

2.2.2 Prove di compressione

I provini sinterizzati, dopo la misurazione della densità geometrica e apparente, sono stati sottoposti a prove di compressione per valutarne la resistenza meccanica e studiarne il comportamento a frattura. Per queste prove è stata impiegata una pressa *Quasar 25*, prodotta dall'azienda italiana *Galdabini* con sede a Cardano in Lombardia (Italia). Ogni campione è stato posizionato tra due strati di parafilm con la faccia più danneggiata rivolta verso il basso, questa procedura ha permesso di fissare il provino e di stabilizzarne la base irregolare a causa dei difetti creati durante il procedimento di separazione della struttura dal supporto di base. La velocità di compressione è stata di 0,5 mm/min. Il software della pressa rileva il picco della resistenza a compressione (N/mm²) con il rispettivo carico (N) e deformazione (μm).

In *Figura 2.9* e *Figura 2.10* sono riportate due fotografie in cui si può vedere la pressa utilizzata per le misurazioni e un provino durante la prova di compressione.



Figura 2.9 Set-up sperimentale per le prove di compressione. Il campione viene posizionato fra i due punzoni della pressa: quello inferiore è fisso mentre quello superiore si muove alla velocità di 0,5 mm/min.

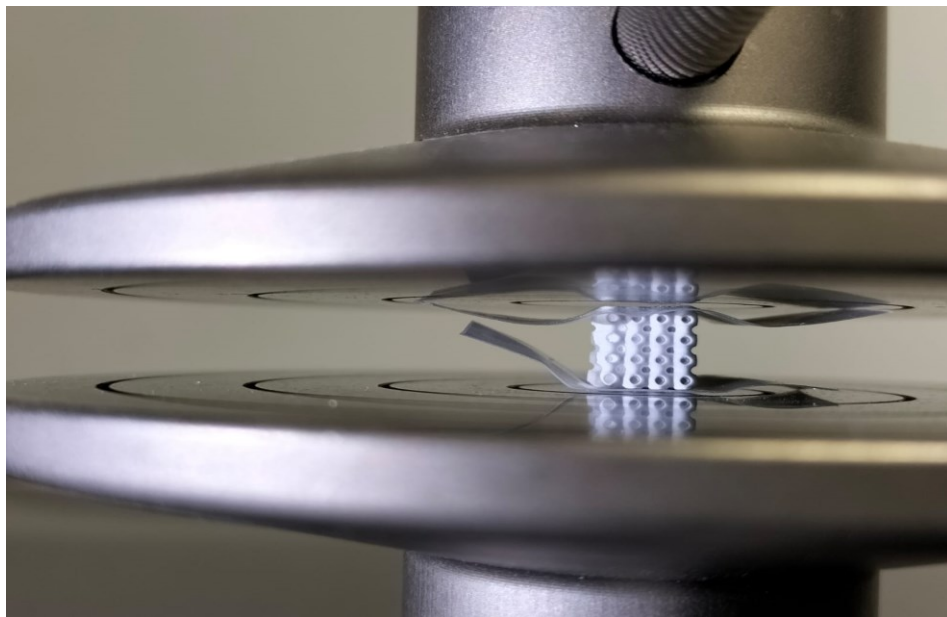


Figura 2.10 Provino con topologia Primitive posizionato tra due strati di parafilm con la faccia danneggiata rivolta verso il basso.

Per valutare l'effetto della porosità sulle proprietà meccaniche della struttura e analizzare i risultati delle prove di compressione si è fatto riferimento al modello matematico di Gibson-Ashby che permette di predire una serie di proprietà di strutture cellulari porose come quelle considerate in questa tesi [36].

In *Tabella 2.1* sono riportate le equazioni fornite dal modello di Gibson-Ashby per la descrizione delle proprietà meccaniche della struttura in termini di modulo elastico E e resistenza σ [36]. Le equazioni variano in base al tipo di risposta che la struttura esibisce in caso di sollecitazione meccanica: se la risposta è di tipo *bending-dominated* prevale la flessione mentre nel caso di risposta *stretch-dominated* prevale lo stiramento [36].

Di seguito vengono definite le costanti e le grandezze che appaiono nelle equazioni in *Tabella 2.1*:

- E^* è il modulo elastico della struttura cellulare porosa;
- E_s è il modulo elastico del materiale che compone la struttura cellulare, considerato come solido pieno (*bulk material*);
- C è la costante di Gibson-Ashby, il cui valore è determinato empiricamente e dipende dalla topologia delle celle e dalla geometria della struttura;
- σ^* è la resistenza della struttura cellulare;
- $\sigma_{y,s}$ è la tensione di snervamento del *bulk material* della struttura.

| Response type | Mechanical property | Formula | Equation number |
|-------------------|-----------------------|--|-----------------|
| Bending-dominated | Modulus (E) | $\frac{E^*}{E_s} = C \left(\frac{\rho^*}{\rho_s} \right)^2$ | 3 |
| | Strength (σ) | $\frac{\sigma^*}{\sigma_{y,s}} = C \left(\frac{\rho^*}{\rho_s} \right)^{\frac{3}{2}}$ | 4 |
| Stretch-dominated | Modulus (E) | $\frac{E^*}{E_s} = C \left(\frac{\rho^*}{\rho_s} \right)$ | 5 |
| | Strength (σ) | $\frac{\sigma^*}{\sigma_{y,s}} = C \left(\frac{\rho^*}{\rho_s} \right)$ | 6 |

Tabella 2.1 Equazioni definite dal modello di Gibson-Ashby per descrivere il comportamento meccanico di una struttura cellulare [36].

Le topologie analizzate in questa tesi presentano una struttura cellulare caratterizzata da una risposta *bending-dominated*, con una costante di Gibson-Ashby pari a 0,2 [37]. L'equazione (4) può quindi essere riscritta come segue, considerando il rapporto (ρ^*/ρ_s) equivalente alla densità relativa ρ_{rel} definita nel sottoparagrafo precedente:

$$\sigma_{comp} = 0,2 \cdot \sigma_{solido} \cdot (\rho_{rel})^{3/2}$$

In particolare:

- σ_{comp} è il valore di resistenza a compressione misurato dal software della pressa al termine della prova meccanica;
- ρ_{rel} è il valore della densità relativa, ricavato dalle misure di densità geometrica e vera ottenute con il calibro, la bilancia e il picnometro;
- σ_{solido} è il valore della resistenza del *bulk material* dei campioni.

Disponendo dei valori di resistenza a compressione (σ_{comp} e ρ_{rel}), è stato ricavato il valore della resistenza del *bulk material* (σ_{solido}) invertendo la formula sopra riportata; i risultati ottenuti corrispondenti ad ogni modello sono stati confrontati e analizzati.

2.3 ANALISI DI SUPERFICIE

Per valutare la precisione e la qualità della stampa alcuni provini verdi sono stati preservati per essere sottoposti ad una serie di analisi di superficie. Lo stesso è stato fatto anche con i provini sottoposti a trattamento termico in modo da studiare gli effetti della sinterizzazione sulle caratteristiche morfologiche delle strutture. Mediante queste analisi è stato possibile confrontare i diversi modelli, esaminare l'efficacia della pulizia dei campioni dai residui di inchiostro e, soprattutto, variare i parametri del processo di stampa in modo da ottenere la maggior conformità possibile con i modelli geometrici. I parametri considerati sono stati l'apertura dei pori, l'eventuale presenza di imperfezioni o difetti, l'omogeneità e la precisione dei layer stampati. Di seguito vengono descritte brevemente le tecniche impiegate mentre i risultati saranno discussi e approfonditi nell'ultimo capitolo.

2.3.1 Microscopio ottico

Una prima osservazione delle caratteristiche superficiali è stata fatta utilizzando un microscopio ottico *Leica MZ7.5* dell'azienda tedesca *Leica Microsystems*. Per tutti i campioni selezionati sono state scattate più fotografie delle facce superiori e laterali e a due diversi ingrandimenti (0,8 e 2); lo stesso procedimento è stato ripetuto sia per i provini verdi che per quelli sinterizzati.

Attraverso queste analisi è stato possibile valutare la qualità della stampa, l'apertura dei pori, la presenza di residui di resina oppure di difetti strutturali e delaminazioni dei layer. Inoltre, sono stati confrontati i campioni stampati con polveri diverse e si è osservato come la scelta

del materiale ceramico (HA o TCP) influisce sulla microstruttura del componente. In *Figura 2.11* è riportata una fotografia del microscopio utilizzato.



Figura 2.11 Microscopio ottico utilizzato in questa tesi.

2.3.2 Analisi SEM

Dopo essere stati sottoposti a trattamento termico, una parte dei campioni dei vari modelli stampati sono stati preservati dalle prove di compressione per poter essere esaminati con un microscopio a scansione elettronica (*scanning electron microscope*, SEM). Il microscopio utilizzato in questa tesi è un modello *Quanta 200*, prodotto dall'azienda americana *FEI Company* con sede a Hillsboro, OR, USA. Questo strumento è equipaggiato con detector per la rilevazione degli elettroni secondari (*secondary electron*, SE) e degli elettroni che hanno subito back-scattering (*back-scattered electron*, BSE), in aggiunta ad un detector per la EDS (*energy dispersive X-ray analysis*).

Grazie alle analisi SEM è stato possibile valutare il grado di sinterizzazione delle polveri, la morfologia superficiale delle varie strutture e la composizione dei campioni; si è quindi riusciti ad apprezzare la qualità della stampa anche a grandi ingrandimenti, oltre alla presenza delle caratteristiche topologiche dei singoli modelli o di eventuali impurità e difetti. Nello specifico, sono state raccolte immagini BSE e SE a diversi ingrandimenti dei campioni sinterizzati dei cinque modelli a diversi tempi di esposizione, con diversa composizione delle polveri e a diverse porosità e dimensioni della cella unitaria.

I risultati di queste analisi saranno riportati e commentati nel terzo e ultimo capitolo.

2.3.3 Analisi XRD

La diffrazione a raggi X (XRD, dall'inglese *X-ray diffraction*) è una tecnica non distruttiva utilizzata nella scienza dei materiali per determinare la struttura atomica e molecolare di un materiale. Questo metodo prevede di irradiare un campione del materiale con raggi X incidenti misurando le intensità e gli angoli di diffusione dei raggi X che vengono dispersi dal materiale. L'intensità dei raggi X sparsi viene tracciata in funzione dell'angolo di diffusione e la struttura del materiale è determinata dall'analisi della posizione, dell'angolo e delle intensità dei picchi di intensità sparsi.

Questo tipo di analisi permette di ricavare informazioni sulla struttura cristallina del campione, sullo stato superficiale (formazione di ossidi, transizioni di fase, ricristallizzazione), sulle direzioni di crescita e permette di ottenere un'analisi qualitativa dello stato di compressione e tensione del materiale. Inoltre, si può determinare come la struttura effettiva si discosti da quella ideale per effetto di stress interni o difetti.

Le polveri ceramiche commerciali utilizzate per la produzione dell'inchiostro per la stampante sono state analizzate con un diffrattometro a raggi X *D8 Advance* prodotto dall'azienda statunitense *Bruker*. Le analisi XRD sono state eseguite anche sulle polveri dei provini raccolte dopo le prove meccaniche e opportunamente macinate con mortaio e pestello per studiare l'effetto dei trattamenti termici a 1200°C sui materiali impiegati.

Le polveri confrontate sono state quelle composte per il 100% da idrossiapatite e β fosfato-tricalcico e quella con composizione mista (70% wt di β -TCP e 30% wt di HA). Gli spettri della diffrazione ottenuti per i materiali prima e dopo la sinterizzazione sono stati poi confrontati e analizzati per verificare l'eventuale presenza di cambiamenti di fasi nel β -TCP e, soprattutto, per valutare l'entità della conversione dell'idrossiapatite in beta fosfato-tricalcico durante il trattamento termico. L'HA tende, infatti, a sparire in seguito a trattamenti termici ad alte temperature (1200-1500°C) convertendosi completamente o in parte in fosfato tricalcico; questo processo comporta notevoli cambiamenti delle proprietà meccaniche e delle caratteristiche microstrutturali e superficiali dei campioni realizzati.

I parametri selezionati per le analisi XRD sono stati: l'intervallo di curvatura del raggio (da 9° a 70°), la velocità di incremento (0,05°/sec), il tipo di scansione della superficie del campione (*Locked Coupled, continuous*) e il setting (40kV e 40mA).

Gli spettri ricavati dalla diffrazione sono stati analizzati con il software *Match!* che permette di confrontare i dati raccolti sperimentalmente con le migliaia di spettri conservate nel suo database, in modo da identificare le fasi presenti nei campioni prodotti.

3. DISCUSSIONE DEI RISULTATI

Il terzo capitolo di questo progetto di tesi è dedicato alla raccolta, al commento e al confronto dei risultati ottenuti dalle prove di stampa, dalle prove meccaniche e dalla caratterizzazione strutturale e superficiale dei modelli selezionati. In particolare, si motiverà la scelta delle polveri ceramiche utilizzate; si discuterà poi della bontà della stampa dei campioni al variare del tempo di esposizione del singolo layer, della specifica topologia e del materiale usato. Successivamente si valuterà l'effetto del trattamento termico e della sinterizzazione sulla densità relativa delle strutture e sulle proprietà meccaniche; tutti i valori ottenuti saranno confrontati con i modelli geometrici di partenza per studiarne la coerenza. Basandosi anche sulle informazioni raccolte dalle analisi di superficie (microscopio ottico e SEM) si motiverà la scelta della topologia 'ottima' e delle modificazioni apportate per approfondire lo studio del comportamento meccanico al variare delle caratteristiche strutturali. Mediante diffrazione a raggi X sarà valutata anche l'eventuale scomparsa o conversione dell'idrossiapatite in β -TCP. Infine, si trarranno le conclusioni di questo lavoro mettendo a confronto i punti di forza e le limitazioni e proponendo possibili sviluppi e applicazioni future.

3.1 STAMPA E CARATTERIZZAZIONE DEI PROVINI

Per lo studio preliminare sulle strutture si è scelto di stampare dai 12 ai 20 campioni per ogni modello geometrico. Nei paragrafi seguenti vengono riportati e analizzati i risultati ottenuti dalle misure di densità in modo da poter valutare la qualità di stampa e la coerenza con la porosità teorica del modello generato con Rhinoceros. Di fondamentale importanza è stata la scelta del materiale ceramico e la composizione dell'inchiostro per la stampante: per le polveri sono stati utilizzati l'idrossiapatite (HA) e il β fosfato-tricalcico (β -TCP) in diverse percentuali. Le stampe delle strutture sono state eseguite anche con tempi di esposizione diversi alla luce UV, permettendo così una valutazione dell'effetto della variazione di questo parametro sulle caratteristiche microstrutturali dei provini, sulla porosità aperta e sulla resistenza meccanica a compressione.

3.1.1 Composizione delle polveri ceramiche

L'idrossiapatite e il β fosfato-tricalcico sono due tra i due biomateriali ceramici più studiati e utilizzati nell'ambito dell'ingegneria tissutale dell'osso [38]. Entrambi questi materiali sono altamente biocompatibili e biodegradabili, grazie alla loro composizione molecolare che simula quella della matrice minerale del tessuto osseo naturale. La principale differenza tra HA e β -TCP si osserva nell'interazione con l'ambiente biologico una volta inseriti nel corpo:

l'idrossiapatite è essenzialmente bioinerte, non interagisce quindi con i tessuti biologici, mentre il β fosfato-tricalcico risulta essere bioattivo, stimola cioè una risposta biologica, è osteoconduttivo e osteoinduttivo: promuove quindi l'adesione e la proliferazione cellulari e supporta l'osteogenesi [38].

Per la stampa dei provini si è scelto di utilizzare un inchiostro composto per il 45% wt da resina fotosensibile mentre per il 55% wt da polvere ceramica. La composizione della parte ceramica è stata: 100% HA, 100% β -TCP e una combinazione dei due materiali (70% β -TCP e 30% HA). In *Figura 3.1* sono riportate delle fotografie al microscopio ottico di alcuni provini con topologia Neovius stampati con le diverse polveri prima e dopo la sinterizzazione.

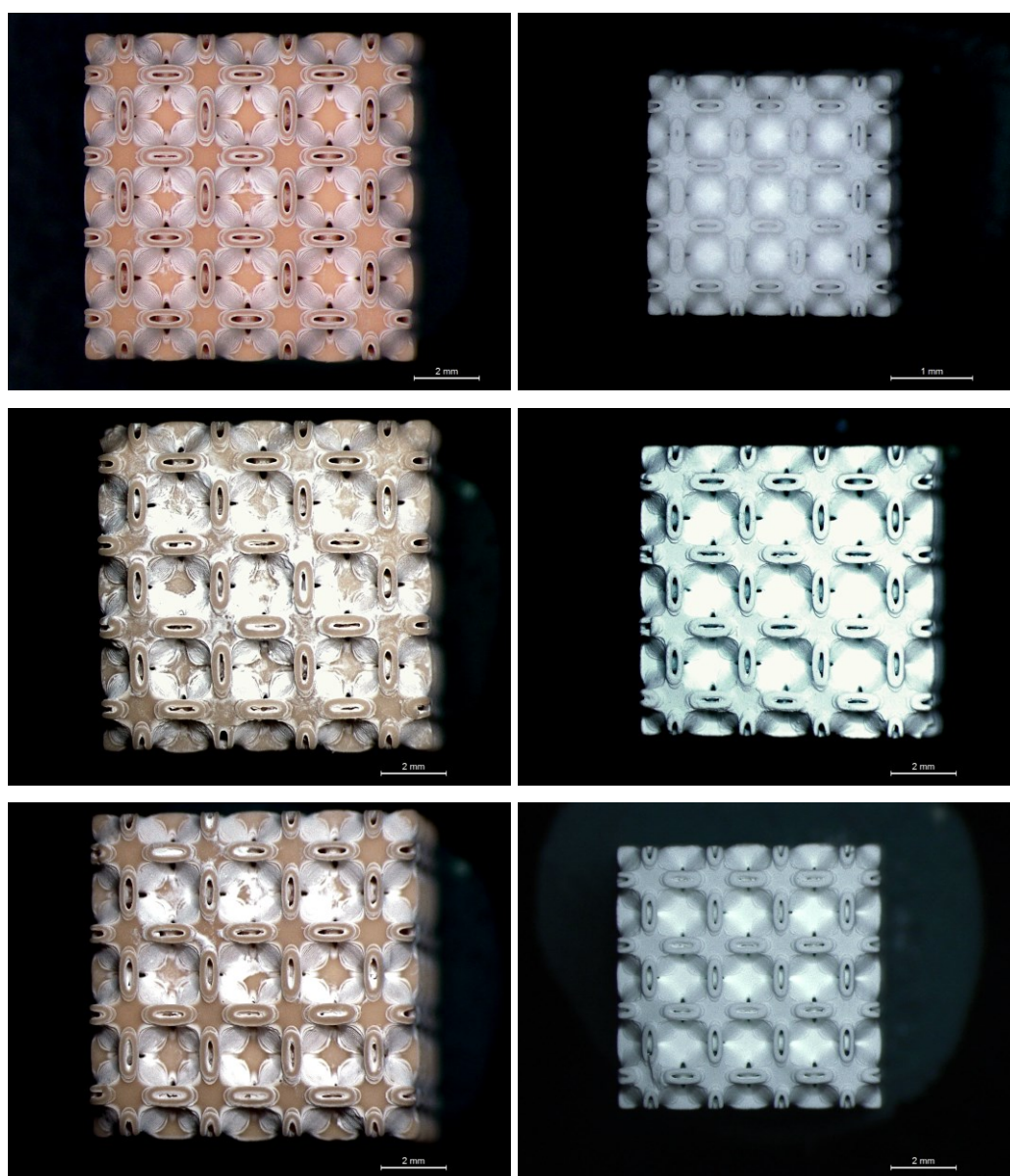


Figura 3.1 Immagini al microscopio ottico dei provini con topologia Neovius prima e dopo la sinterizzazione: 100% β -TCP (in alto), 100% HA (centro) e 70% β -TCP/30% HA (in basso).

Come si può osservare dalle immagini, i provini contenenti solo HA presentano una colorazione più opaca dovuta all'abbondante presenza di gruppi fosfato che conferisce ai campioni il tipico colore azzurro apprezzabile soprattutto dopo la sinterizzazione con l'eliminazione della resina polimerica.

I parametri considerati per la scelta della composizione delle polveri ceramiche sono stati due: la porosità del modello stampato confrontata con quella del modello teorico e la resistenza a compressione del provino. In tutti i casi la porosità aperta del modello teorico era dell'85% e il tempo di esposizione è stato di 2 secondi per ogni layer. I campioni testati sono stati cinque per ogni tipologia di polveri. L'istogramma in *Figura 3.2* riporta i valori percentuali medi di porosità aperta prima e dopo la sinterizzazione dei provini stampati con le tre diverse polveri. Nei campioni stampati con HA e con la polvere mista la differenza tra i valori misurati di porosità prima e dopo il trattamento termico sono significativamente diversi mentre in quelli composti esclusivamente da β -TCP i valori sono quasi coincidenti

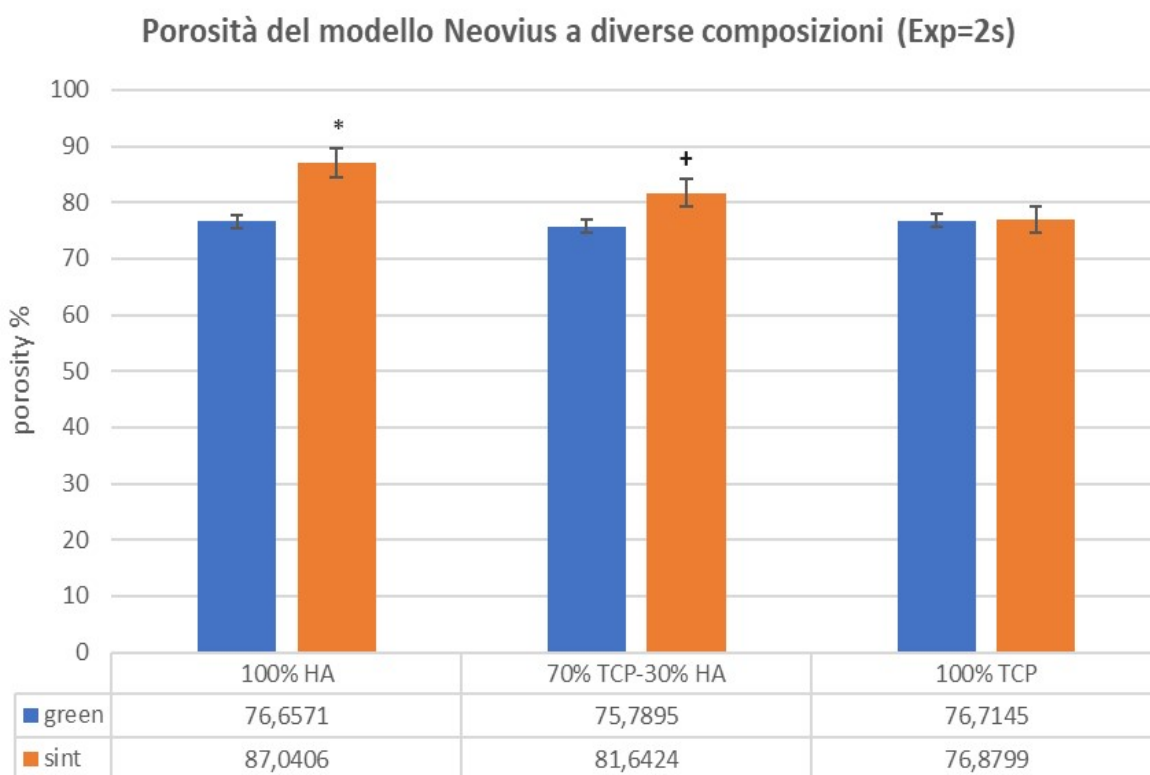


Figura 3.2 Istogramma con i valori percentuali dei provini con topologia Neovius realizzati con diversa composizione delle polveri. I valori sono riportati come media \pm deviazione standard percentuale. I simboli (* e +) indicano un p -value < 0,05.

Tra i risultati spicca il valore della porosità aperta dopo la sinterizzazione dei campioni realizzati in HA che supera addirittura il valore teorico del modello geometrico (85%).

Questi dati sono stati confrontati con quelli ottenuti dalle prove meccaniche di resistenza a compressione per poter scegliere quindi la composizione delle polveri più adatta per il proseguo dello studio.

Nel grafico di seguito sono messe a confronto le resistenze del *bulk material* dei provini stampati con le diverse polveri e sinterizzati, calcolate con l'equazione del modello di Gibson-Ashby partendo dai valori di densità relativa e resistenza a compressione misurata dal software della pressa (è stata considerata una costante $C=0,2$ per strutture cellulari porose aperte).

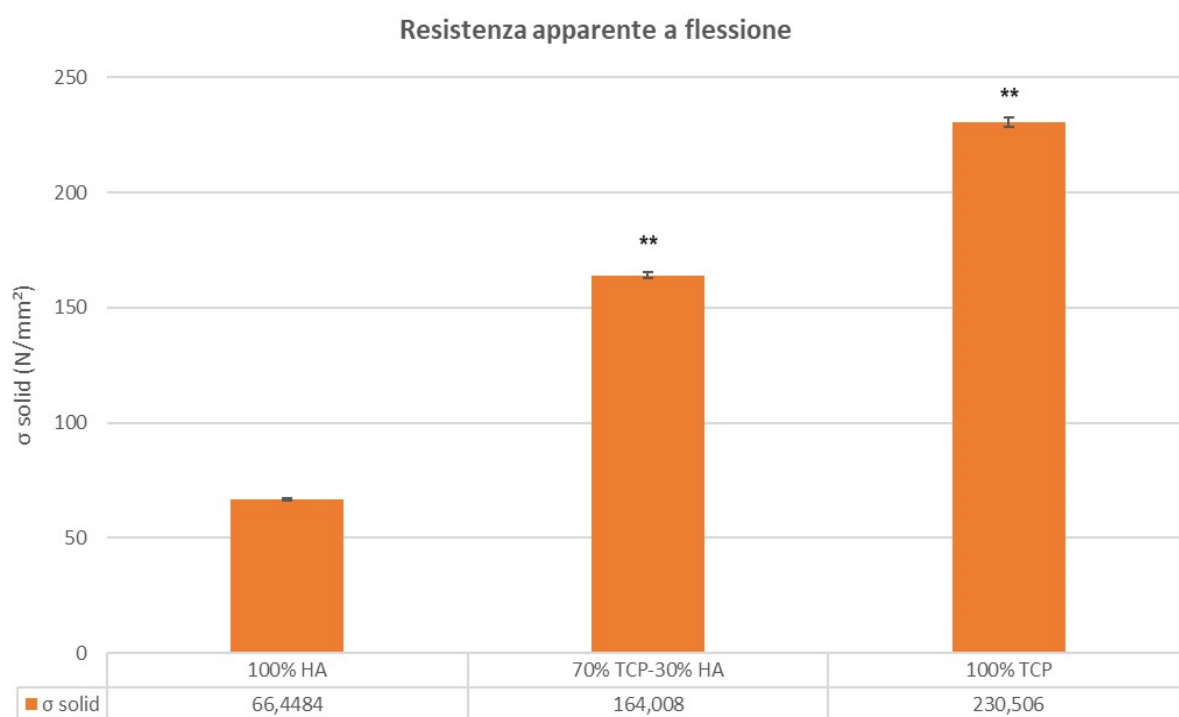
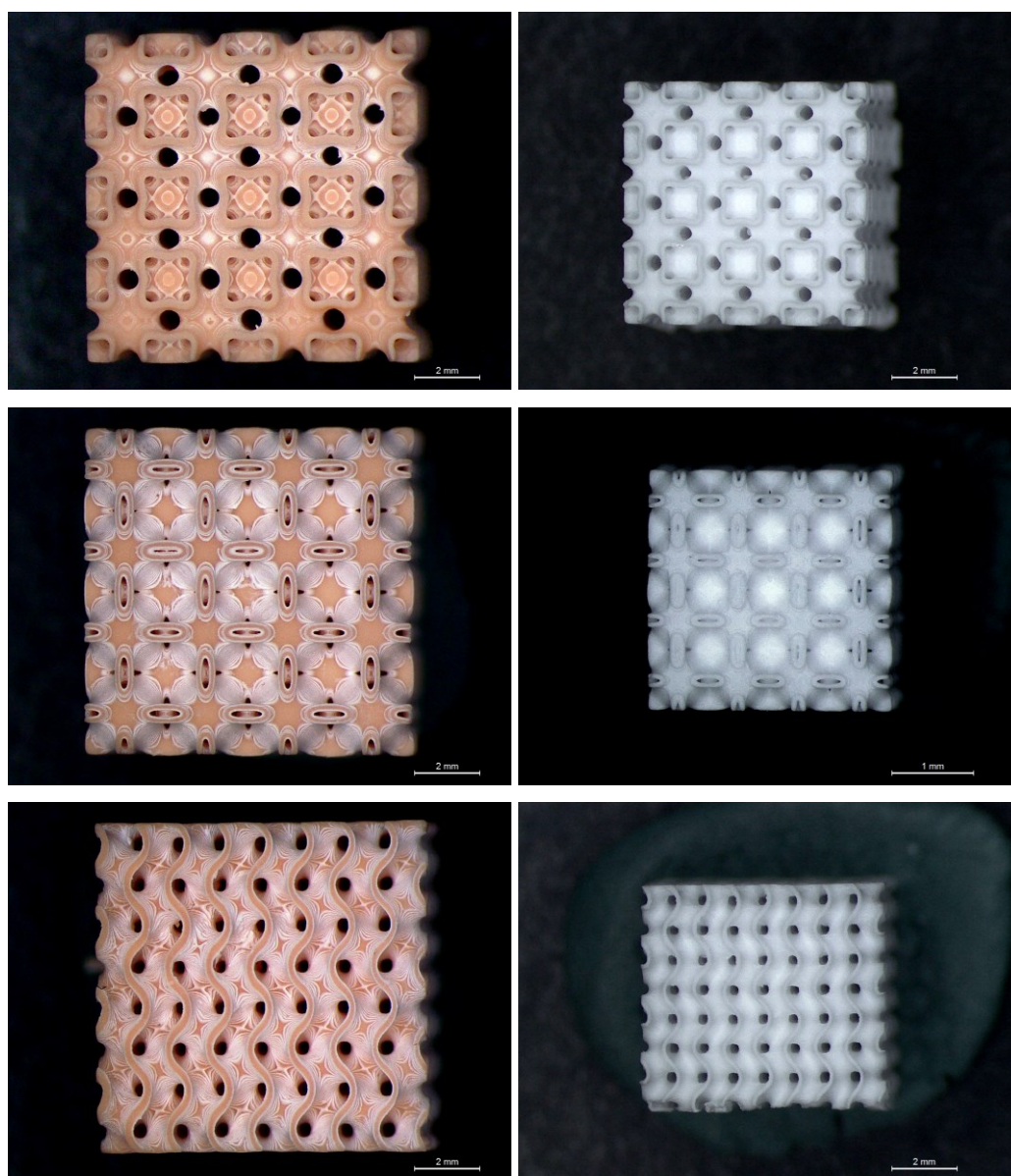


Figura 3.3 Istogramma con le resistenze apparenti a flessione ottenute dal modello di Gibson-Ashby per provini con topologia Neovius con diverse polveri sottoposti a prove di compressione. I valori sono riportati come media \pm deviazione standard percentuale. Gli asterischi (**) indicano un $p\text{-value} < 0,05$.

I campioni a base di sola HA mostrano una resistenza media apparente a flessione quasi quattro volte minore di quelli composti solo da β -TCP, mentre i provini realizzati con la polvere mista dei due materiali presentano resistenza intermedia, ma comunque significativamente maggiore dei primi. Da questi dati emerge chiaramente che i campioni realizzati con polvere di solo beta fosfato-tricalcico sono più resistenti degli altri; la tensione media a rottura del *bulk material* calcolata con il modello di Gibson-Ashby è infatti quasi doppia rispetto a quella dell'osso naturale (~ 120 Mpa). Questi risultati potrebbero essere dovuti al fatto che una parte dell'idrossiapatite si converte in beta fosfato-tricalcico durante il

processo di sinterizzazione a 1200°C provocando delle deformazioni microstrutturali del reticolo cristallino con conseguente indebolimento della struttura [38-39]. L'eventuale scomparsa dell'idrossiapatite e la sua conversione in β -TCP durante il trattamento termico troverà riscontro dagli spettri ottenuti con la diffrazione a raggi X discussi nel paragrafo successivo.

Per la realizzazione di tutti gli altri provini si è scelto di utilizzare solo la polvere di β -TCP che garantisce una maggiore resistenza meccanica, una buona qualità della stampa anche se la porosità aperta dei provini sinterizzati è minore rispetto a quella del modello geometrico. Quest'ultima proprietà è influenzata anche dalle caratteristiche della struttura stampata come sarà dimostrato nei paragrafi successivi. In *Figura 3.4* sono riportate le fotografie al microscopio ottico delle cinque strutture stampate prima e dopo il trattamento termico.



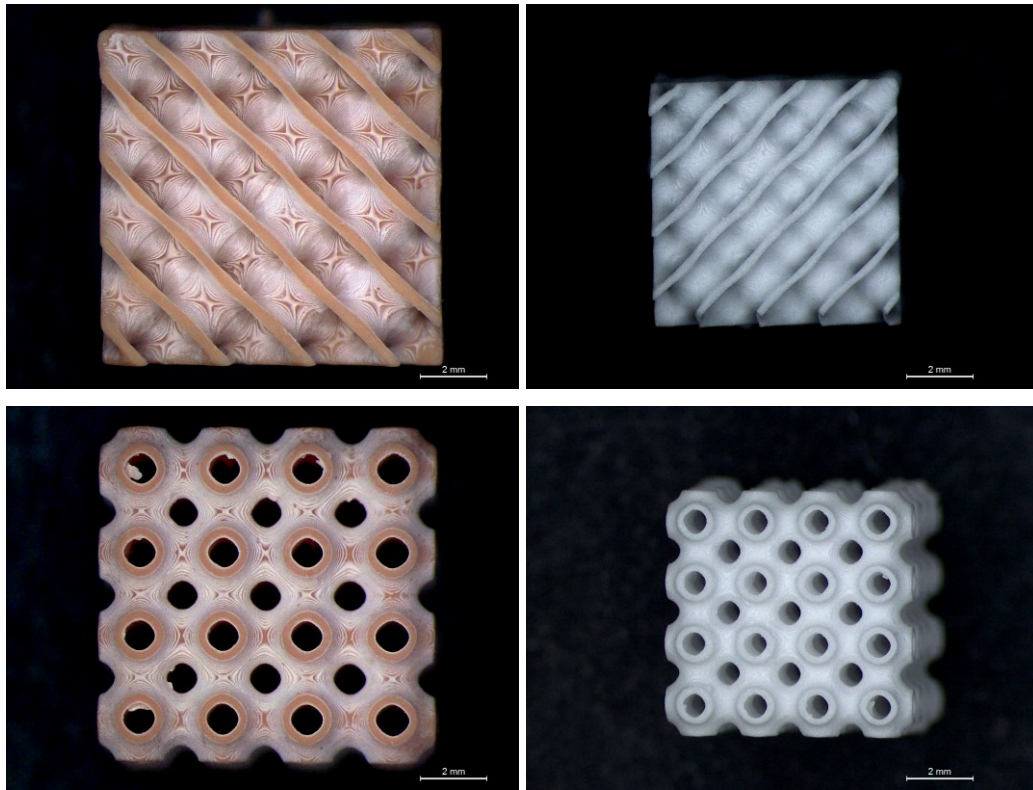


Figura 3.4 Fotografie al microscopio ottico con lo stesso dei provini prima e dopo il trattamento termico (dimensione della cella: 2,5 mm; exposure time: 2 secondi). Nell'ordine: IWP, Neovius Surface, Gyroid, Diamond Surface e Primitive Surface.

3.1.2 Analisi XRD delle polveri

Per valutare gli effetti del trattamento termico e in particolare della sinterizzazione sui materiali utilizzati per la realizzazione degli scaffold, le polveri di idrossiapatite, beta fosfato-tricalcico e della miscela dei due prima e dopo la cottura sono state analizzate con diffrattometro a raggi X. Gli spettri ottenuti sono stati successivamente processati con il software *Match!* per identificare le fasi presenti nelle polveri.

È importante sottolineare che il raggiungimento di eventuali livelli critici di temperatura e/o pressione, necessari per ottenere il materiale, l'idrossiapatite in forma densa, possono portare alla modifica della struttura cristallina e della sua composizione.

In particolare, possono avere luogo trasformazioni di fase, decomposizione delle polveri e deidrossilazione, che comportano un peggioramento delle proprietà del prodotto. La deidrossilazione porta alla formazione dell'ossi-idrossiapatite (OHAp) e dell'ossiapatite (OAp), mentre i prodotti della decomposizione sono fosfato tricalcico (TCP) e fosfato tetracalcico (TTCP). Questi composti mostrano solubilità superiore rispetto all'HA in ambiente acquoso, con una migliore degradazione in vivo, ma compromettono la stabilità chimica e le proprietà meccaniche del materiale [44].

La stabilità chimica del materiale è un parametro che va quindi tenuto in grande considerazione. Come si può vedere dagli spettri delle polveri in *Figura 3.5* sia l'idrossiapatite che il β -TCP sono stabili, l'intensità dei picchi delle polveri commerciali e di quelle sinterizzati sono praticamente sovrapponibili.

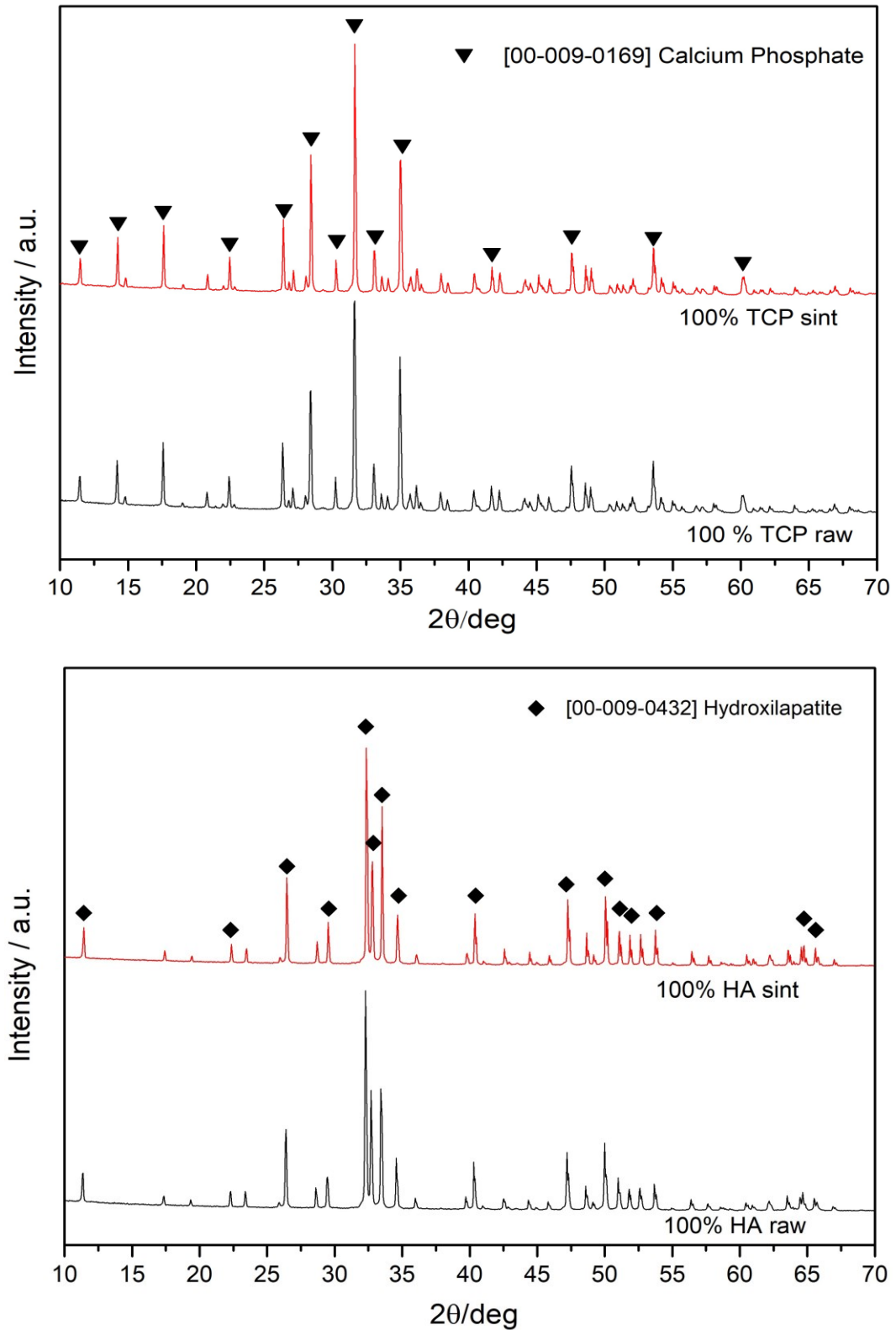


Figura 3.5 Spettri XRD delle polveri grezze e sinterizzate di β -TCP (sopra) e HA (sotto).

Gli spettri della miscela 70% beta fosfato-tricalcico e 30% idrossiapatite sono invece riportati in *Figura 3.6*. In questo caso si riscontrano delle differenze nell'ampiezza dei picchi corrispondenti all'HA tra la polvere grezza e quella sinterizzata. Il trattamento termico ad elevata temperatura ha causato la conversione di una parte dell'idrossiapatite in fosfato tricalcico e questo cambiamento di fase si manifesta come riduzione dell'intensità del segnale rilevato dal diffrattometro a causa della parziale scomparsa dell'idrossiapatite.

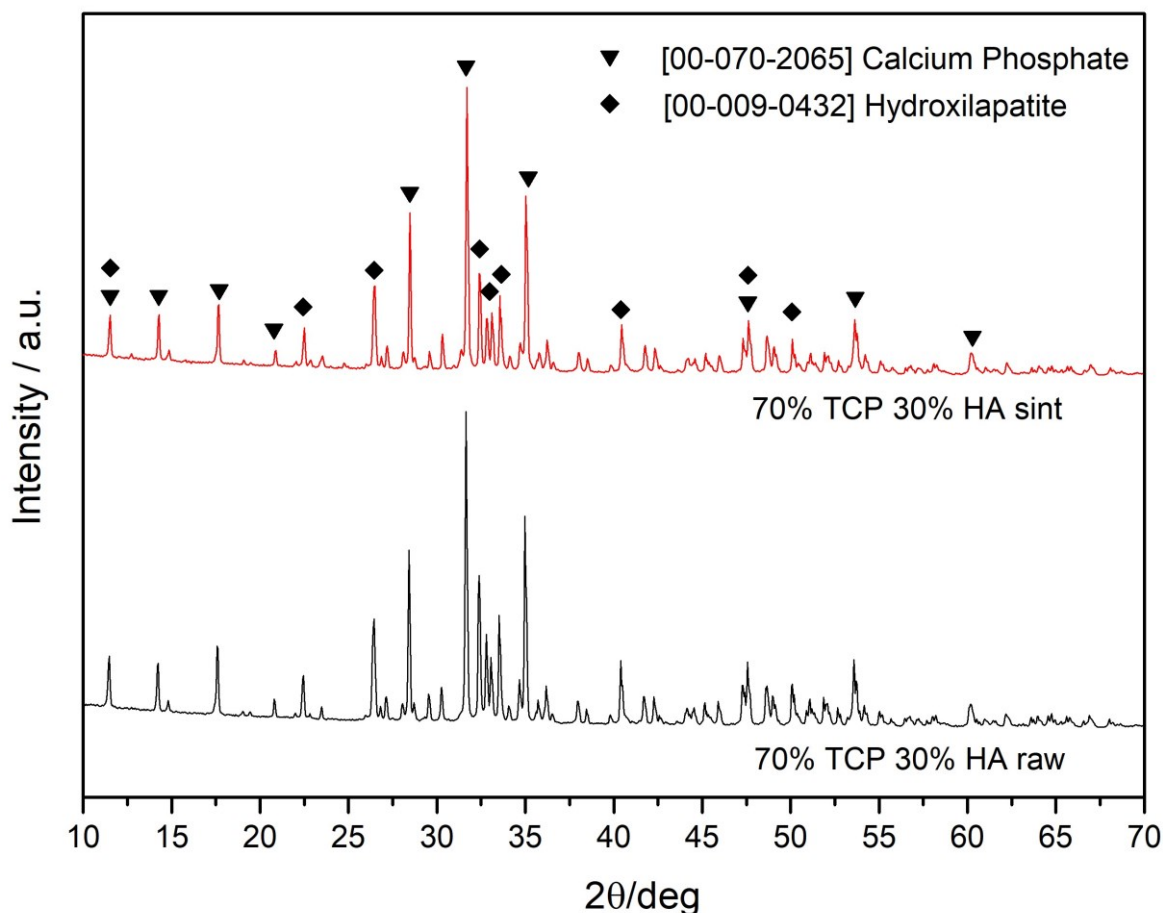


Figura 3.6 Confronto tra gli spettri delle polveri grezze e sinterizzate della miscela di HA e β -TCP. I marcatori indicano i picchi corrispondenti alle due fasi. Si nota la riduzione di intensità dei picchi di HA a causa della sua parziale scomparsa e conversione in TCP.

I risultati delle analisi XRD confermano la stabilità dei materiali impiegati per la realizzazione dei provini. La principale sfida della *bone tissue engineering* è proprio quella di produrre dei materiali sintetici che però abbiano le caratteristiche e le proprietà meccaniche di quelli che compongono il tessuto osseo.

Tra le tre polveri analizzate è stata scelta quella a base di β -TCP per la stampa di tutti i modelli; questo biomateriale, oltre ad essere chimicamente stabile, è biodegradabile, biorisorbibile e bioattivo in ambiente biologico; la sua degradazione genera infatti dei

prodotti impiegati dagli osteoblasti per la deposizione di nuova matrice minerale e per la produzione di nuovo tessuto (osteoiduzione).

L'osteointegrazione del β -TCP è dovuta alla precipitazione di ioni calcio e fosfato derivati dal materiale e alla formazione di uno strato superficiale di apatite naturale; come sostituto osseo il fosfato tricalcico presenta anche buona biocompatibilità, non causa effetti tossici o citotossici per l'organismo ed è o antigenico [3].

Inoltre, mediante trattamenti termici ad elevata temperatura (sinterizzazione), è possibile rendere questo materiale molto più denso e compatto, migliorandone notevolmente le proprietà meccaniche e ottenendo così componenti con resistenza simile o addirittura maggiore di quella dell'osso naturale.

3.1.3 Effetto del tempo di esposizione

Il tempo di esposizione alla luce di ogni singolo layer (*exposure time*) è un fattore che influisce notevolmente sulla qualità della stampa e sulla coerenza dello stampato con il modello geometrico. Per le prime prove di stampa le topologie sono state inizialmente tutte ottenute con tempo di esposizione pari a quattro secondi; successivamente, questo parametro è stato gradualmente ridotto per studiarne l'effetto sulla microstruttura dei campioni verdi. Il tempo di esposizione minimo raggiunto è stato di due secondi per layer, oltre questo valore sono insorti difetti e delaminazioni della struttura che in alcuni casi rendevano impossibile la stampa.

Sono stati confrontati i dati di porosità aperta prima e dopo la sinterizzazione a due tempi di esposizione diversi (4 e 2 secondi) e i provini sono stati osservati anche al microscopio ottico. Nel grafico in *Figura 3.7* sono riportati i valori di porosità aperta dei provini dei cinque modelli misurati prima e dopo il trattamento termico con tempo di esposizione di quattro e due secondi.

Come si nota dall'istogramma, la porosità aperta dei campioni aumenta significativamente riducendo il tempo di esposizione da 4 a 2 secondi: riducendo il tempo di esposizione si evita il rischio dell'*overcuring* che comporta la polimerizzazione di più resina per ogni layer. In questo caso, se i provini stampati sono di piccole dimensioni oppure hanno una geometria complessa, si riduce notevolmente la precisione della stampa, i pori appaiono chiusi o poco aperti, i layer sono irregolari e rimangono dei residui di resina sulla struttura. Questi fattori compromettono la porosità del verde e per questo il tempo di esposizione è un parametro che deve essere accuratamente selezionato per ottenere uno stampato il più fedele possibile al modello geometrico.

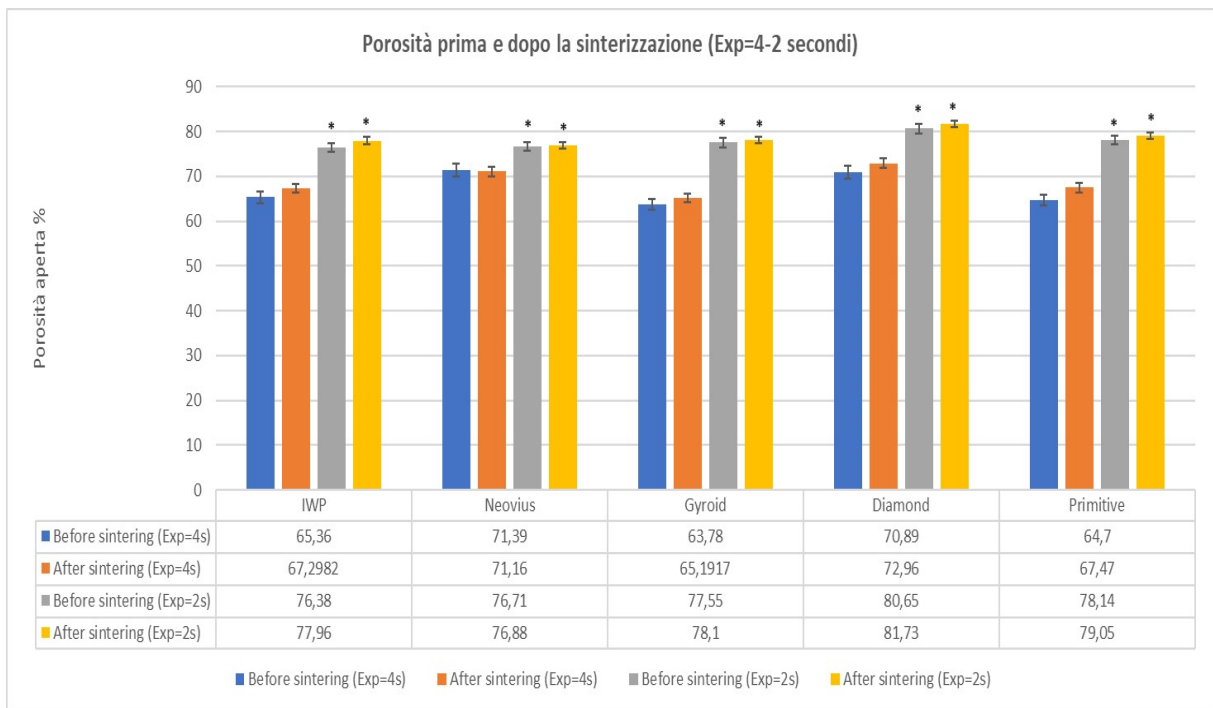


Figura 3.7 Nell'istogramma sono riportate le porosità aperte medie delle cinque topologie stampate prima e dopo la sinterizzazione e a due diversi tempi di esposizione (4 e 2 secondi). I dati sono riportati anche nella tabella sotto il grafico. I valori sono riportati come media \pm deviazione standard percentuale. Gli asterischi (*) indicano un p -value $< 0,05$.

In Figura 3.8; 3.9 e 3.10 sono invece riportate delle fotografie scattate al microscopio ottico con diversi ingrandimenti in cui si apprezza anche visivamente la differenza tra i campioni stampati con tempo di esposizione di quattro e due secondi.

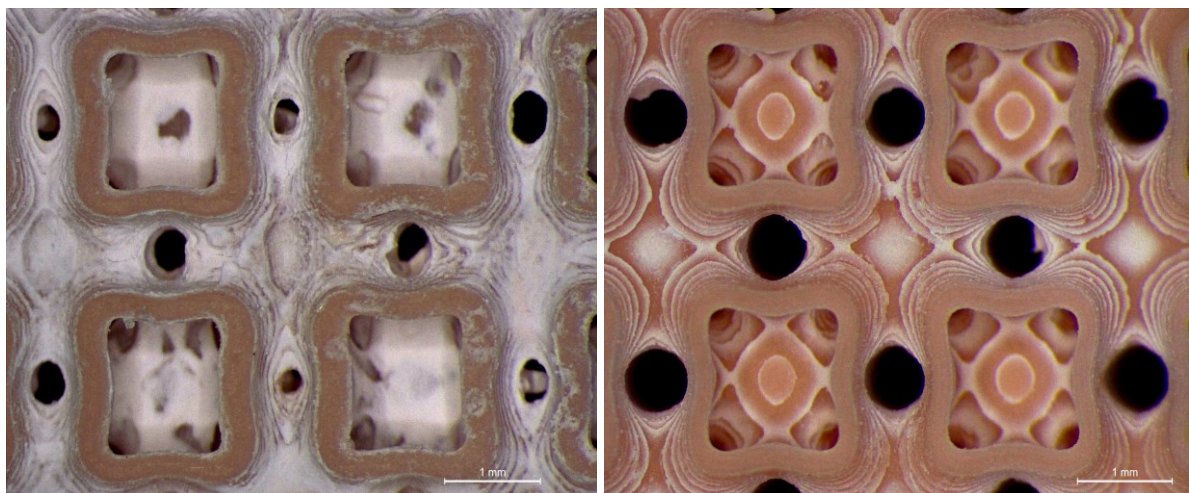


Figura 3.8 Immagine al microscopio ottico di due provini con topologia IWP stampati con polveri 100% β -TCP e con tempo di esposizione di 4 (sinistra) e 2 secondi (destra) con particolare delle celle unitarie allo stesso ingrandimento. Si notano chiaramente la diversa apertura dei pori, la precisione e l'omogeneità dei layer e la presenza di impurità e residui di resina nel campione di sinistra.

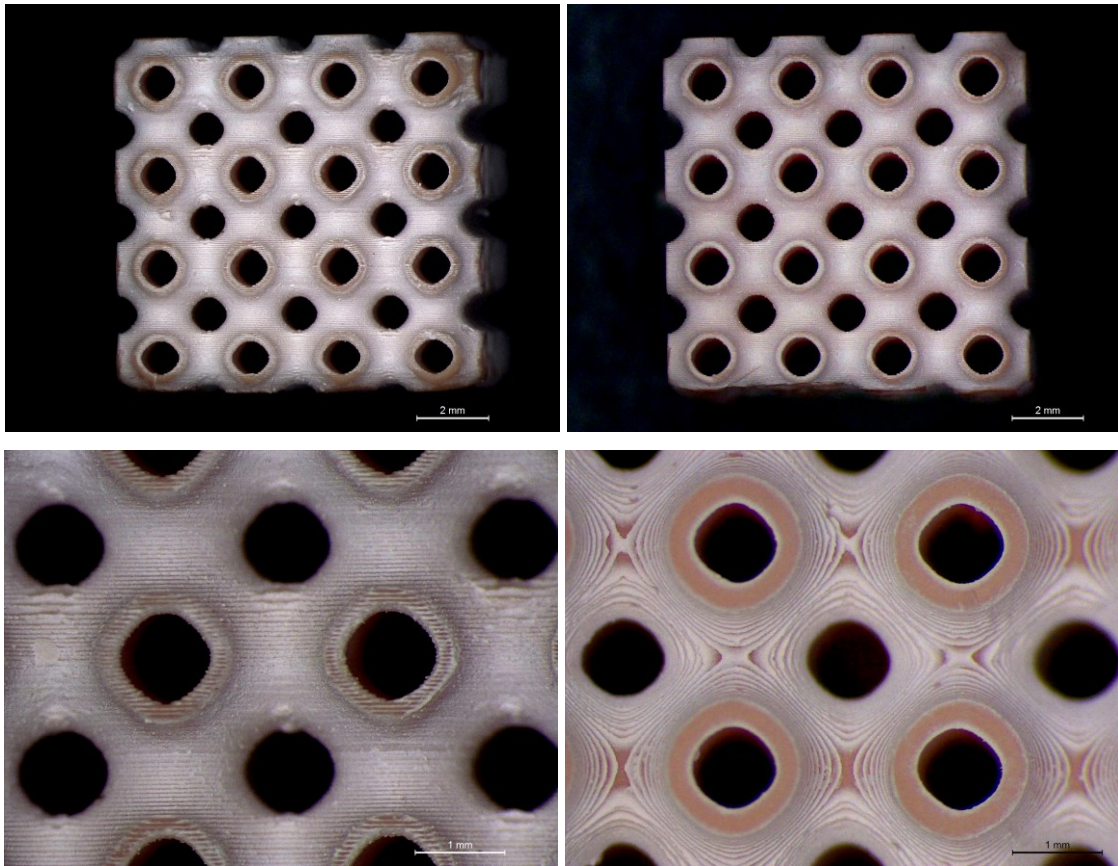


Figura 3.9 Immagini al microscopio ottico di campioni con topologia Primitive (100% TCP) stampati con tempo di esposizione di 4 secondi (sinistra) e 2 secondi (destra), a due diversi ingrandimenti (sopra e sotto).

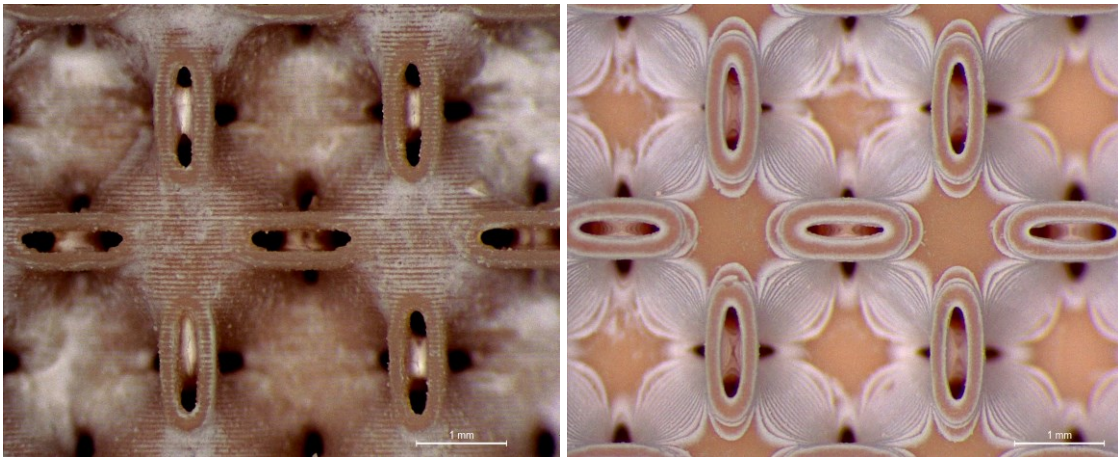


Figura 3.10 Immagini al microscopio ottico con particolare della cella unitaria di campioni con topologia Neovius (polveri 100% β -TCP), stampati con tempo di esposizione di 4 secondi (sinistra) e 2 secondi (destra)

Nelle fotografie sopra riportate si nota chiaramente l'effetto dell'*overcuring* sulle caratteristiche microstrutturali dei provini stampati: la superficie è meno definita e irregolare con evidente presenza di difetti e impurità dovute alla solidificazione di una quantità eccessiva di inchiostro.

Come ultimo parametro è stata considerata la resistenza apparente a flessione dei provini stampati e sottoposti a trattamento termico con i due diversi tempi di esposizione. Nel grafico in *Figura 3.11* sono rappresentati i valori di resistenza media (in MPa) del *bulk material* ottenuti dall'equazione di Gibson-Ashby.

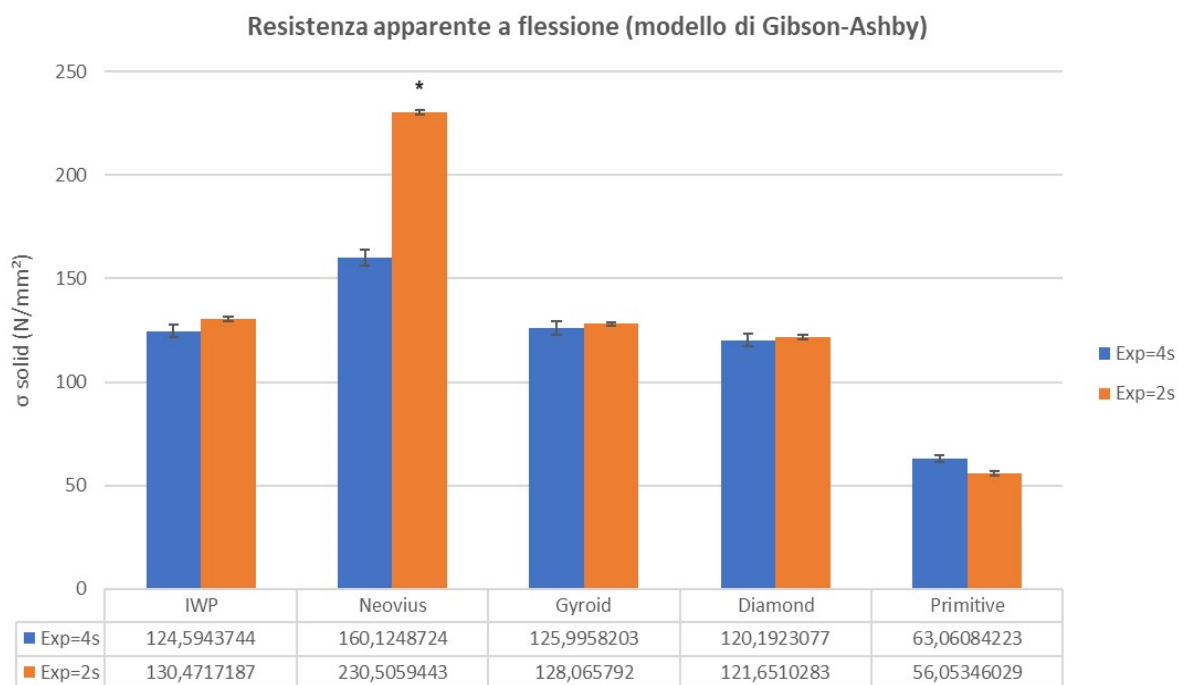


Figura 3.11 Resistenze medie apparenti a flessione del solido ottenute dall'equazione di Gibson-Ashby per le varie strutture stampate con due diversi tempi di esposizione. I risultati sono riportati come media \pm deviazione standard percentuale. L'asterisco (*) indica un p -value $< 0,05$.

Le resistenze medie delle strutture misurate con i due diversi tempi di esposizione sono statisticamente equivalenti (test *T-Student* a due code); l'unica eccezione si osserva con la topologia Neovius: il dato rilevato con tempo di esposizione di due secondi supera quasi del 44% quello corrispondente a quattro secondi. In questo caso si può affermare che il tempo di esposizione alla luce UV durante il processo di stampa influisce sulle proprietà meccaniche della topologia Neovius mentre, in generale, l'effetto della variazione di questo parametro sulla resistenza apparente è diverso a seconda della struttura stampata. La qualità della stampa dipende anche dalla capacità di risoluzione della stampante, quella utilizzata in questa tesi ha una risoluzione massima di $50\mu\text{m}$; questo valore va tenuto in considerazione nella progettazione dello spessore delle superfici stampate per evitare la chiusura della struttura. Considerando questi risultati e quelli relativi alla porosità aperta, nel proseguo di questo progetto di tesi i campioni, quando possibile, sono stati stampati tutti con tempo di esposizione per ogni layer di due secondi.

3.1.4 Conformità al modello geometrico

La porosità aperta della struttura è una caratteristica di fondamentale importanza nella progettazione di scaffold e impianti per la rigenerazione ossea. La porosità deve infatti essere tale da permettere la formazione e la crescita dei vasi sanguigni, la migrazione e la proliferazione delle cellule all'interno della struttura [40].

Diversi studi hanno dimostrato che un elevato livello di porosità (>50 %) nell'innesto osseo è essenziale per l'osteconduzione. La ricerca in questo settore evidenzia l'importanza di entrambe micro e macroporosità nell'osteointegrazione dei fosfati di calcio che compongono gli scaffold con il tessuto osseo naturale: i micropori (dimensioni dei pori <10 μ m) consentono l'adesione di cellule e proteine, mentre i macropori (dimensioni dei pori >10 μ m) sono essenziali per la rivascularizzazione, la proliferazione e la colonizzazione dell'impianto da parte delle cellule ossee. Oltre a questo, la presenza di pori e interconnessioni è essenziale per il flusso dei fluidi corporei, dei fattori di crescita e delle sostanze nutritive [40].

Le dimensioni ottimali dei pori e la loro interconnessione è un argomento ancora molto dibattuto: Karagorgiou et al. sostengono che la dimensione dei macropori deve essere superiore ai 300 μ m mentre, confrontando dimensioni dei pori di 500-600, 750-900 e 1050-1200 μ m, Li et al hanno dimostrato che pori con diametro compreso tra 750 e 900 μ m mostrano una maggiore produzione di nuovo tessuto osseo e una maggiore rivascularizzazione in scaffold di idrossiapatite [40].

Anche la forma dei pori influisce notevolmente sulla migrazione e sulla proliferazione delle cellule nell'impianto: numerosi gruppi di ricerca hanno dimostrato che l'adesione e la crescita cellulari hanno entità maggiori all'interno di scaffold con porosità sferica piuttosto che poligonale (pori quadrangolari, triangolari o esagonali). Altri studi hanno confermato che le superfici concave favoriscono maggiormente la nuova formazione dei tessuti rispetto a superfici convesse e piatte [40].

In questo progetto di tesi le cinque topologie TPMS selezionate sono state inizialmente stampate con una porosità aperta del modello geometrico dell'85%; successivamente questo valore è stato modificato per valutarne l'effetto sulle proprietà meccaniche dei campioni. I valori di porosità ottenuti prima e dopo la sinterizzazione delle varie strutture sono stati confrontati per studiare la coerenza dei dati misurati con i modelli teorici generati con il software di modellazione.

In *Figura 3.12* sono riportati i valori medi di porosità aperta calcolati per le cinque topologie prima e dopo il trattamento termico; in rosso è stato evidenziato invece il valore teorico di porosità dei modelli (85%).

Per questo confronto sono stati considerati i provini stampati con tempo di esposizione alla luce UV di due secondi visto che questo parametro permette di ottenere valori di porosità maggiori come dimostrato nel paragrafo precedente.

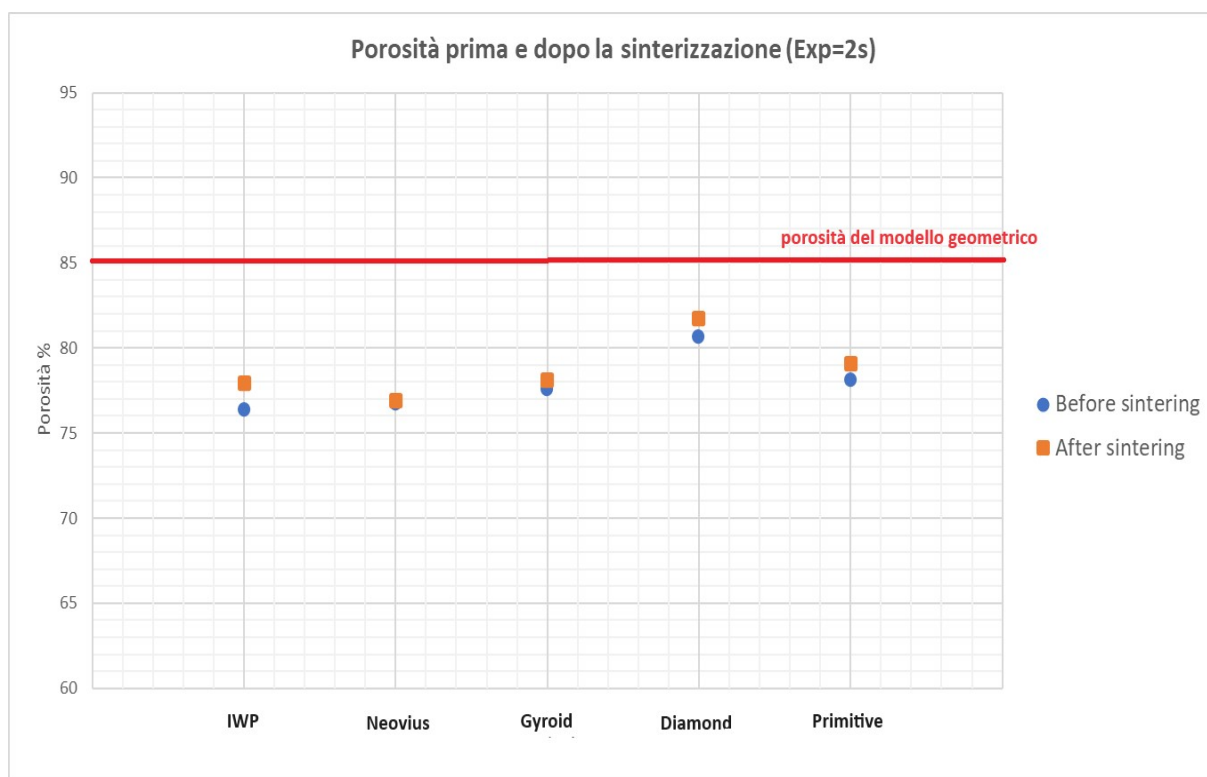


Figura 3.12 Porosità aperta media delle varie strutture stampate con polvere 100% β -TCP prima e dopo il trattamento termico a confronto con il valore dei modelli geometrici.

Dal grafico si può vedere che tutti campioni analizzati presentano porosità compresa tra il 75 e l'82%, nessuno riesce a raggiungere il valore di modello anche se la topologia Diamond riesce a raggiungere dopo la sinterizzazione l'82% di porosità aperta. Questo dato può essere dovuto alle caratteristiche strutturali e topologiche della Diamond Surface che appare molto più aperta e regolare delle altre.

In generale i risultati ottenuti sono molto omogenei tra loro, con variabilità molto ridotta (deviazione standard compresa tra 0,5 e 1,2). Non è invece stata riscontrata una differenza significativa tra la porosità misurata prima e dopo il trattamento termico (test *T-Student* a due code), anche se i campioni sinterizzati risultano essere leggermente più porosi dei verdi.

Come sarà approfondito nei prossimi paragrafi, questi dati dipendono fortemente dalle caratteristiche geometriche della struttura come la forma, le dimensioni e l'interconnessione dei pori, ma soprattutto dalla dimensione delle celle unitarie (in questa prima fase le celle cubiche unitarie avevano lato di 2,5 mm).

3.1.5 Shrinkage

Durante il trattamento termico i campioni realizzati con polveri ceramiche sono soggetti a ritiro volumetrico (*shrinkage*). Questo ridimensionamento degli *scaffold* è dovuto ad entrambe le fasi del trattamento termico: nella prima, quella di *debinding*, viene rimossa la componente organica dell'inchiostro (resina polimerica), mantenendo solamente la componente ceramica; nella seconda, quella di sinterizzazione vera e propria, le polveri ceramiche vengono compattate e parzialmente fuse tra di loro, riducendo il volume complessivo del solido. Questo parametro è estremamente importante e va tenuto in considerazione nella progettazione di componenti con forme e caratteristiche strutturali specifiche perché ne può compromettere l'efficacia e le proprietà meccaniche [41].

Lo shrinkage dei provini sottoposti a trattamento termico è stato calcolato come differenza percentuale tra il volume del verde e quello del campione sinterizzato. In *Figura 3.13* sono riportati i ritiri volumetrici medi dei provini realizzati con le diverse polveri: come emerge dai risultati le strutture in beta fosfato-tricalcico subiscono una riduzione di volume doppia rispetto a quelle in idrossiapatite mentre la composizione mista presenta un ritiro intermedio che dipende dalla percentuale in peso dei componenti.

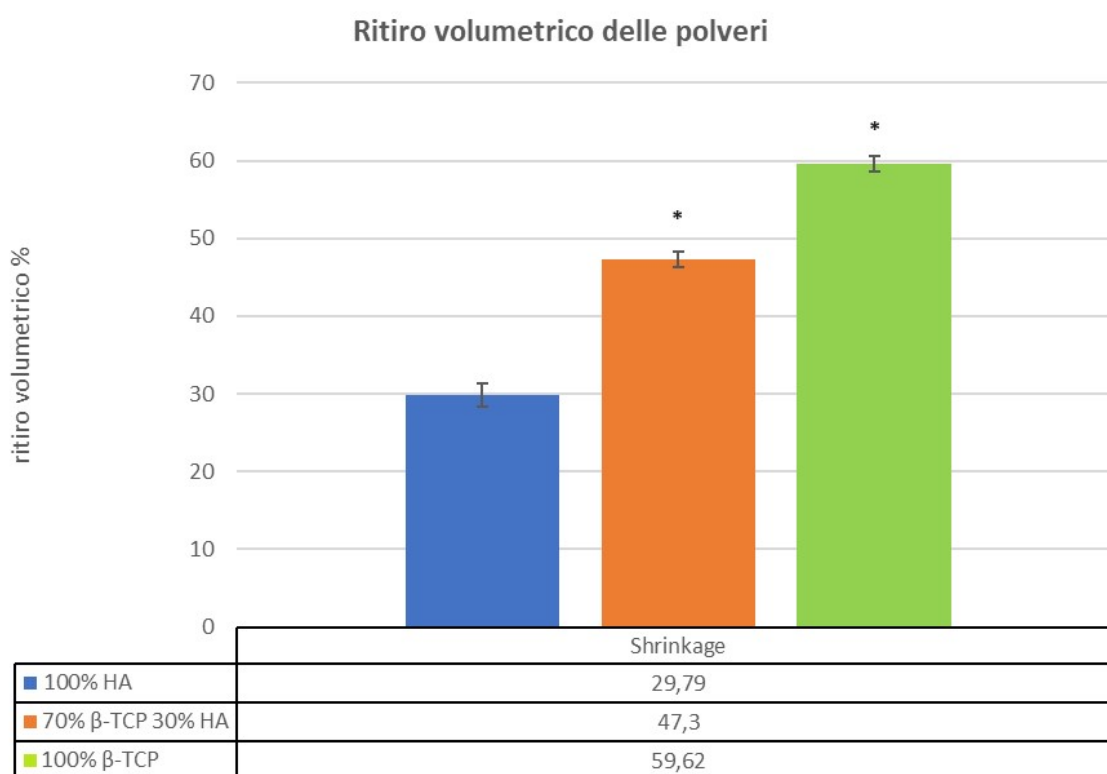


Figura 3.13 Ritiro volumetrico percentuale dei campioni realizzati con le tre diverse polveri ceramiche (100% HA, 70% β -TCP 30% HA e 100% β -TCP). I risultati sono riportati come media \pm deviazione standard percentuale; gli asterischi (*) indicano un p -value < 0,05 (test T-Student).

La differenza tra i risultati ottenuti è dovuta alla minore compattezza delle polveri di HA dopo la sinterizzazione e alla presenza di una microporosità residua apprezzabile delle immagini SEM dei campioni. Questo processo di densificazione microstrutturale è molto più marcato ed evidente nei campioni realizzati con polvere 100% β -TCP in cui i grani del materiale sono molto più compatti e coesi dopo il trattamento termico.

Successivamente sono stati confrontati i ritiri volumetrici dei campioni sinterizzati delle cinque topologie stampati con polveri di solo fosfato tricalcico (100% wt β -TCP) e con due diversi tempi di esposizione (quattro e due secondi).

In *Figura 3.14* sono rappresentati i risultati della misurazione: né il tempo di esposizione, né la diversa topologia dei campioni sembra influenzare lo shrinkage; i valori sono estremamente omogenei e statisticamente equivalenti (shrinkage medio complessivo ~60%).

Alla luce di questi risultati si può affermare che il ritiro volumetrico degli scaffold sottoposti allo stesso trattamento termico (1200°C) dipende esclusivamente dal materiale in cui sono realizzati e dalla composizione in peso delle polveri di partenza.

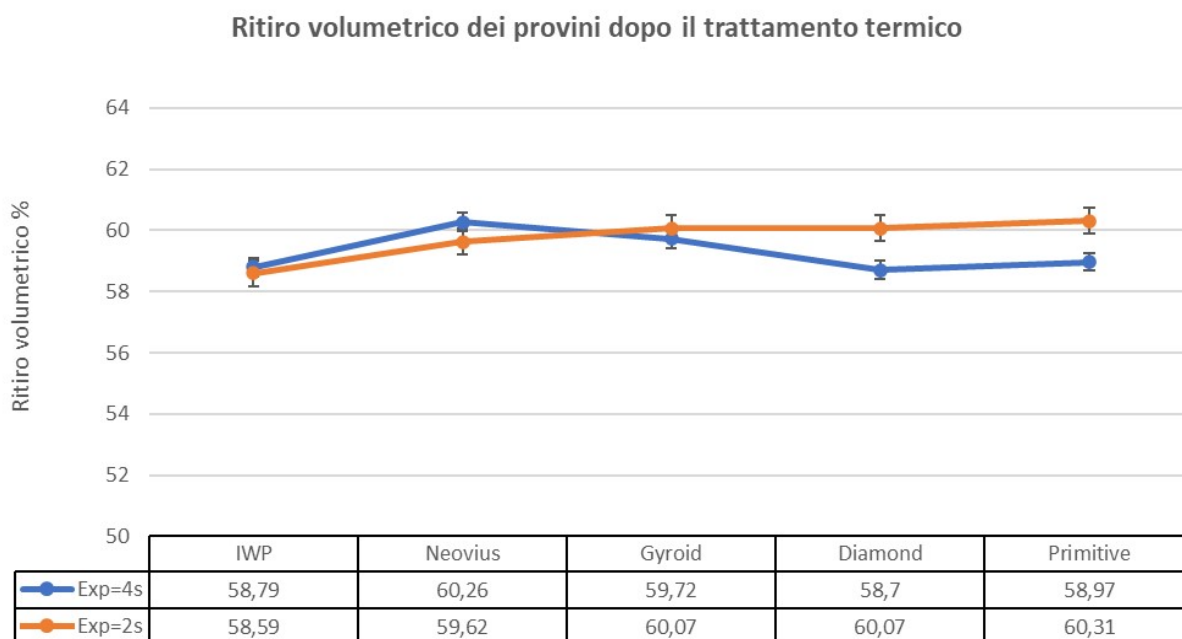


Figura 3.14 Ritiro volumetrico medio percentuale delle cinque topologie stampate con polvere di β -TCP a due diversi tempi di esposizione (4 e 2 secondi). I valori sono riportati come media \pm deviazione standard percentuale.

3.2 EFFETTO DELLA POROSITA' E DELLE DIMENSIONI DELLA CELLA SULLE PROPRIETA' MECCANICHE

Nella seconda parte di questo progetto di tesi è stato approfondito l'effetto della variazione delle caratteristiche topologiche, e in particolare la porosità aperta e le dimensioni della cella unitaria, sulle proprietà meccaniche della topologia più performante tra le cinque considerate. Una volta selezionata la struttura più resistente, sono stati creati dei nuovi modelli geometrici in cui sono stati modificati i valori di densità relativa e le dimensioni della cella cubica unitaria. Successivamente sono stati stampati i nuovi campioni cercando di ridurre e uniformare il più possibile il tempo di esposizione, anche se in alcuni casi non è stato possibile a causa della complessità del modello e della risoluzione massima della stampante. Per la stampa è stata utilizzata esclusivamente polvere di beta fosfato-tricalcico e i campioni verdi sono stati sottoposti allo stesso trattamento termico in modo da ottenere risultati ripetibili e confrontabili. Infine, i nuovi provini sono stati caratterizzati mediante microscopio ottico e analisi SEM; sono state eseguite le misure di densità e sono stati sottoposti a prove meccaniche di compressione per valutarne la resistenza meccanica.

3.2.1 *Neovius Surface*

La *Neovius Surface* è una particolare TPMS creata dal matematico finlandese Edvard Rudolf Neovius, studente di Hermann Amandus Schwarz, nel 1883. Questa superficie è stata derivata dalla *P Surface* di Schwarz, della quale ne conserva le simmetrie e le linee rette, anche se le maniglie che la compongono sono molto più complesse [42].

La conformazione e le caratteristiche geometriche di questa superficie le conferiscono eccezionale resistenza a compressione mentre la specifica forma, l'interconnessione dei pori e la presenza di numerose concavità superficiali sembra favoriscano l'adesione, la migrazione e la proliferazione cellulari in vitro [29]

Tra le cinque topologie considerate in questo progetto di tesi la *Neovius Surface* presenta la maggiore resistenza apparente a flessione secondo il modello di Gibson-Ashby (~230 Mpa) e il maggior carico a rottura (*exposure time* di due secondi).

Queste proprietà hanno fatto sì che nella seconda parte della tesi la *Neovius Surface* fosse scelta per la realizzazione dei nuovi provini in cui sono state variate le dimensioni delle celle e la porosità aperta della struttura.

In *Figura 3.15* sono riportati i valori del carico a frattura e della resistenza apparente meccanica a flessione dei provini delle cinque topologie stampate con polvere di β -TCP dopo il trattamento termico: spicca il dato corrispondente alla *Neovius Surface*.

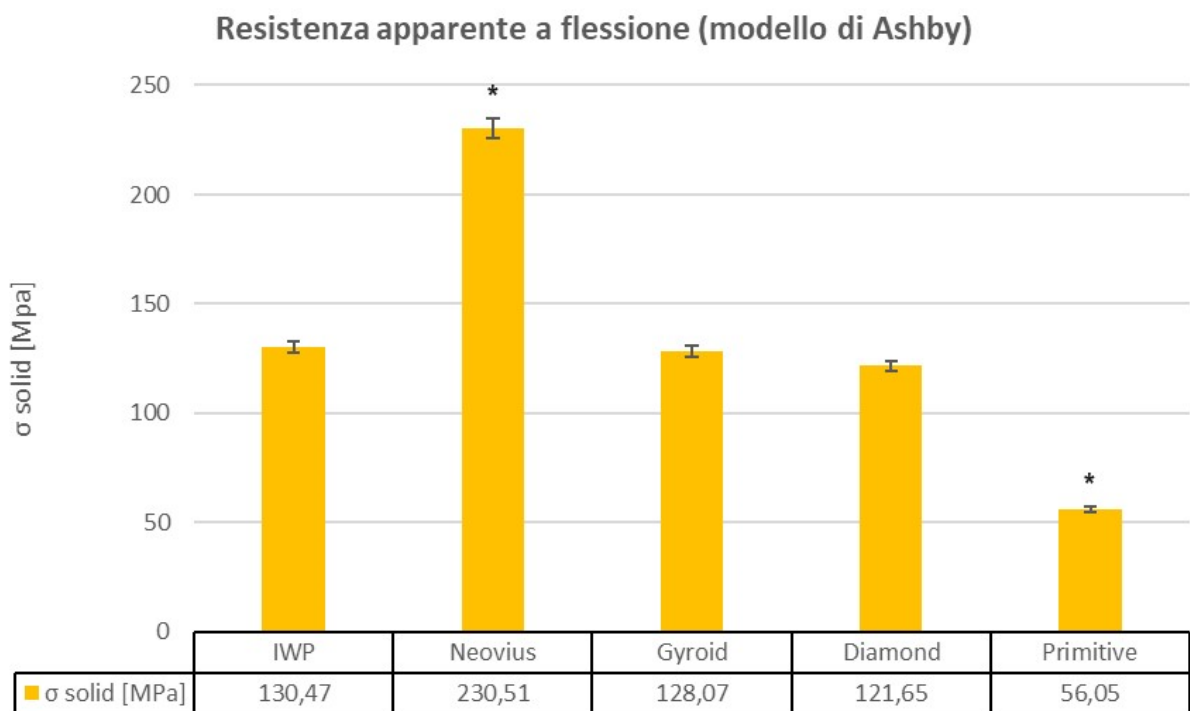
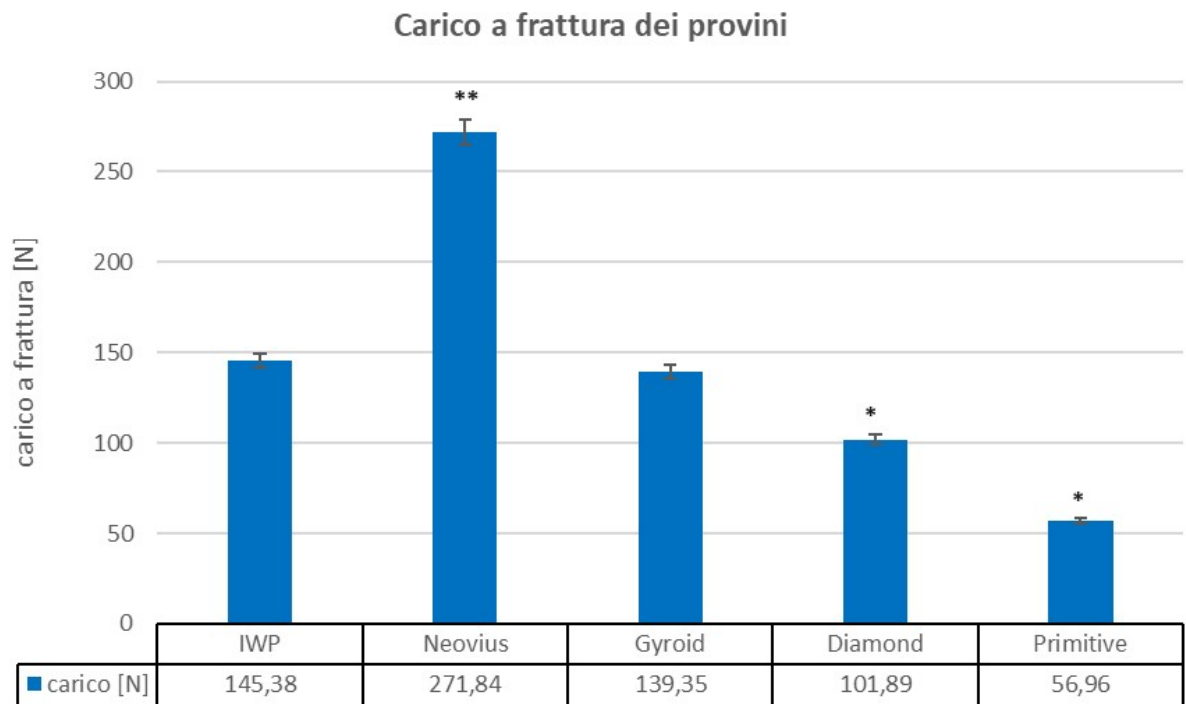


Figura 3.15 Istogrammi dei valori di carico a frattura e di resistenza apparente a flessione ottenuti dall'equazione di Gibson-Ashby per i cinque modelli. I valori sono riportati come media \pm deviazione standard percentuale. Gli asterischi (*) indicano un p -value $< 0,05$.

3.2.2 Prove di stampa

Una volta identificata la topologia *Neovius* come la più resistente, sono stati creati una serie di nuovi modelli geometrici di questa struttura in cui sono state variate la porosità e le dimensioni della cella per studiarne l'effetto sulle proprietà meccaniche.

I nuovi modelli stampati sono elencati di seguito:

- *Neovius Surface* con porosità dell'85% e dimensione della cella di 1,25 mm;
- *Neovius Surface* con porosità del 90% e dimensione della cella di 2,5 mm;
- *Neovius Surface* con porosità dell'80% e dimensione della cella di 2,5 mm;
- *Neovius Surface* con porosità dell'85% e dimensione della cella di 5 mm
- *Neovius Surface* con porosità dell'85% e dimensione della cella di 3,5 mm

Per ogni modello sono stati stampati dodici campioni con polvere di β -TCP. Per la selezione del tempo di esposizione si è partiti da quattro secondi per poi ridurre o aumentare questo valore a seconda dei casi.

In *Tabella 3.1* sono riportati i nuovi modelli e i tempi di esposizione a cui è stato possibile stamparli.

| Modelli | Exposure time (secondi) | | | | |
|-----------------------------|-------------------------|-----------|----|----|-----------|
| | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| <i>Neovius p85 10 1,25</i> | No | No | No | No | Si |
| <i>Neovius p90 10 2,5</i> | No | Si | Si | Si | Si |
| <i>Neovius p80 10 2,5</i> | Si | Si | Si | Si | Si |
| <i>Neovius p85 10 5</i> | Si | Si | Si | Si | Si |
| <i>Neovius p85 10,5 3,5</i> | Si | Si | Si | Si | Si |

Tabella 3.1 Tempi di esposizione per le prove di stampa. In grassetto sono evidenziati i valori minimi di questo parametro a cui è stato possibile stampare i provini.

Come si vede dalla tabella, non è stato possibile stampare tutti i modelli con tempo di esposizione di due secondi: le strutture più complesse come quelle con elevata porosità oppure con celle unitarie di piccole dimensioni richiedono tempi di esposizione alla luce UV maggiori per evitare il collasso della struttura e la comparsa di delaminazioni o difetti. Incrementando il tempo di esposizione aumenta di conseguenza il rischio di *overcuring* con riduzione della porosità aperta reale dei campioni stampati che appaiono molto più chiusi anche ad occhio nudo.

Di tutti i campioni stampati, cinque per ogni modello sono stati scelti come rappresentativi per le misure di densità e per le prove di resistenza meccanica a compressione.

I verdi sono stati successivamente sottoposti allo stesso trattamento termico dei provini precedenti (curva di riscaldamento fino a 1200°C e cottura per tre ore per permettere il *debinding* e la sinterizzazione delle polveri di β -TCP).

3.2.3 Misure di densità

Come già dimostrato nei paragrafi precedenti, il tempo di esposizione e le dimensioni della cella unitaria influenzano notevolmente la qualità della stampa.

Per stampare il modello con dimensione della cella di 1,25 mm è stato necessario incrementare il tempo di esposizione fino a sei secondi con conseguente *overcuring* del campione. Come emerge dal grafico seguente (*Figura 3.16*), la porosità aperta media dei campioni verdi è estremamente bassa (13,59%), questo a causa dello spessore delle pareti e del diametro dei pori che molto probabilmente sono stati inferiori al limite massimo di risoluzione della stampante utilizzata (50 μm). Il risultato è una struttura quasi completamente chiusa in cui i pori e le caratteristiche maglie della topologia *Neovius* sono appena distinguibili. La porosità misurata raddoppia dopo il trattamento termico, ma comunque rimane significativamente inferiore al valore teorico di 85%.

Negli altri casi i valori aumentano all'aumentare delle dimensioni della cella unitaria. Per quanto riguarda invece la coerenza con il modello geometrico, i migliori risultati si hanno con porosità dell'85%, oltre questo limite (90%) il dato misurato cala significativamente.

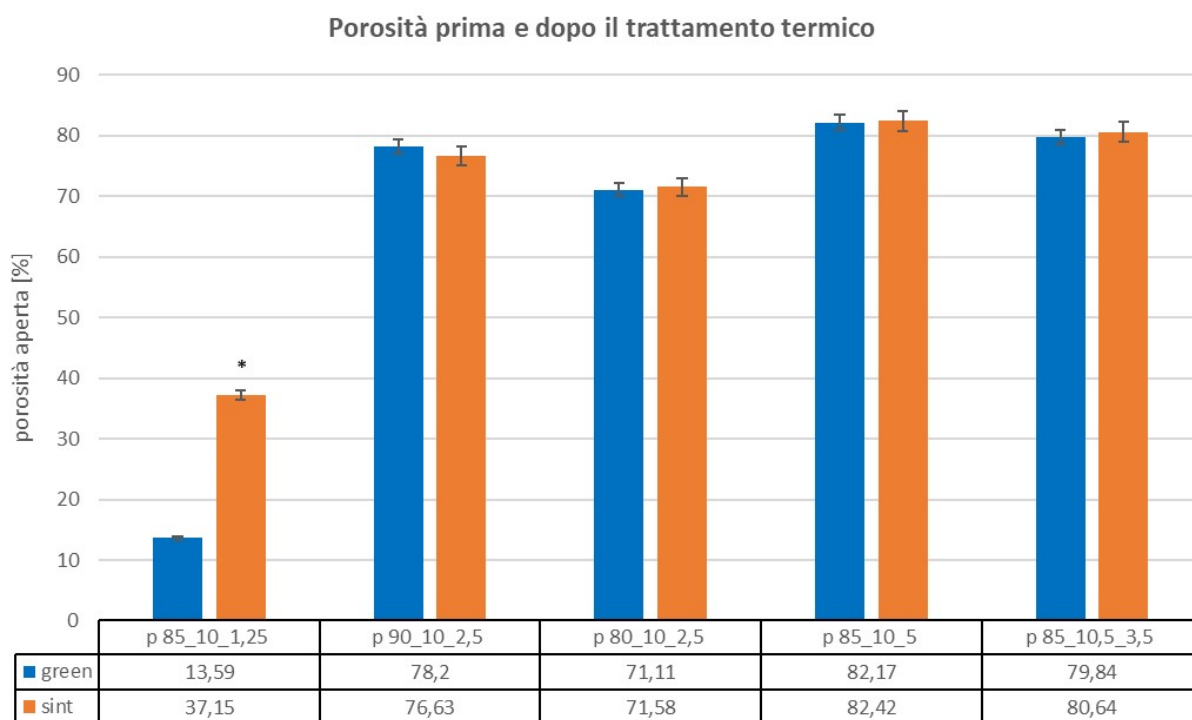


Figura 3.16 Porosità aperta media percentuale dei campioni *Neovius* con diversa porosità e dimensione della cella prima e dopo il trattamento termico. I dati sono riportati come media \pm deviazione standard percentuale. L'asterisco (*) indica un $p\text{-value} < 0,05$.

3.2.4 Proprietà meccaniche

I nuovi provini stampati sono stati sottoposti a prove di compressione per studiare gli effetti della variazione della porosità e quindi della densità relativa e delle dimensioni della cella unitaria sulla resistenza meccanica dei campioni.

In *Figura 3.17* sono rappresentati i valori di resistenza a compressione dei campioni Neovius stampati con porosità diversa e con stessa dimensione della cella unitaria (2,5 mm); in ascissa sono riportate le porosità aperte dei modelli (80,85,90%), maggiori rispetto ai valori misurati sperimentalmente. Coerentemente a quanto atteso, la resistenza diminuisce con l'aumentare della porosità aperta della struttura. In *Figura 3.18* è invece rappresentata la dipendenza della resistenza dalle dimensioni della cella unitaria: in questo caso all'aumentare della cella la resistenza del *bulk material* ottenuta dall'equazione di Gibson-Ashby si riduce notevolmente. Dai grafici è stato escluso il campione con porosità dell'85% e dimensione della cella di 1,25 mm poiché la struttura non rispettava i vincoli imposti dal modello di Ashby ($p > 70\%$; $\rho_{rel} < 0,3$).

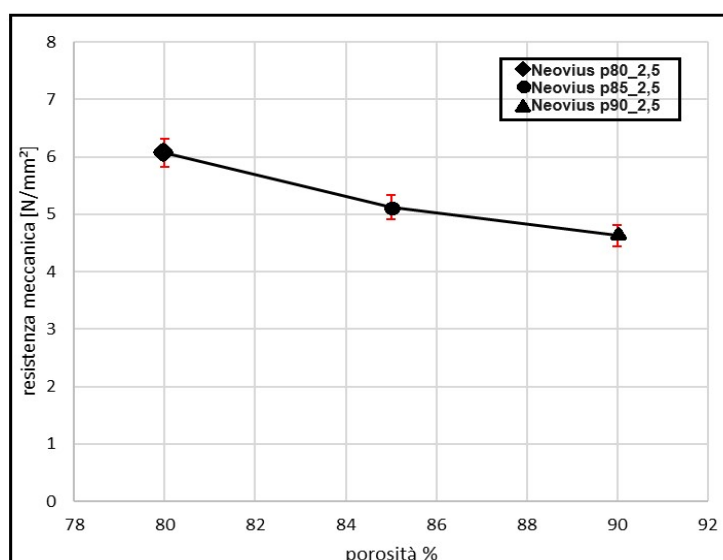


Figura 3.17 Resistenza a compressione media (misurata) dei provini all'aumentare della porosità aperta (80,85,90%). I risultati sono riportati come media \pm deviazione standard percentuale.

Dal confronto dei risultati emerge che i campioni con porosità ideale dell'85% risultano essere i più performanti sia in termini di coerenza con il modello geometrico che di resistenza meccanica con valori quasi doppi rispetto alla resistenza dell'osso naturale (~120 Mpa).

Il dato corrispondente invece ai campioni con porosità ideale del 90% probabilmente risente dell'effetto dell'overcuring: per permettere la stampa il tempo di esposizione è stato aumentato a tre secondi. Lo stesso si può dire per i dati corrispondenti all'80% di porosità: la struttura è visibilmente più chiusa con evidenza di residui di resina e difetti superficiali.

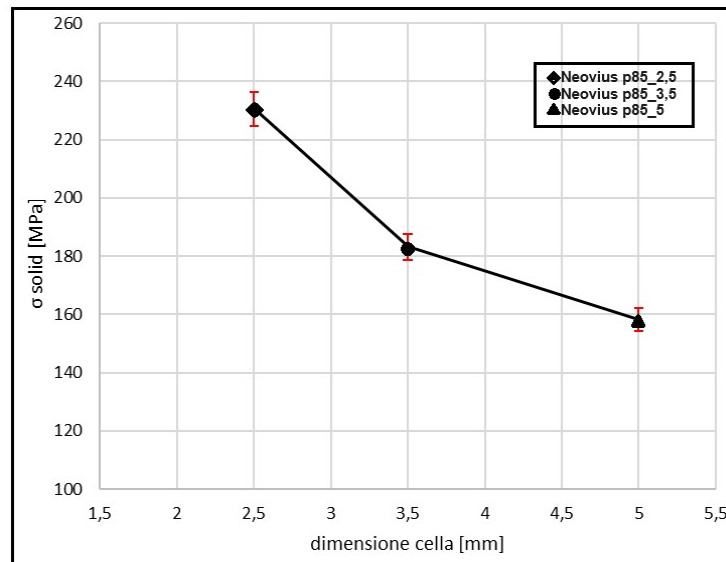


Figura 3.18 Andamento della resistenza apparente a flessione (modello di Gibson-Ashby) al variare delle dimensioni della cella unitaria. I valori sono riportati come media \pm deviazione standard percentuale.

Il modello di Gibson-Ashby permette di predire il comportamento meccanico di strutture con porosità superiore al 70%; coerentemente con questo modello, all'aumentare della dimensione della cella diminuisce la densità relativa della struttura che risulta meno densa e di conseguenza la resistenza del *bulk material* diminuisce (la dipendenza di σ_{solid} dal lato della cella cubica è quasi lineare).

3.2.5 Analisi SEM dei campioni

Le analisi SEM sono state eseguite sui campioni sottoposti a trattamento termico per visualizzarne la microstruttura e valutare il grado di sinterizzazione delle polveri ceramiche utilizzate. La sinterizzazione è un fenomeno che porta alla formazione di legami tra particelle di un solido in forma di polvere in una struttura solida coerente, attraverso scambi di materia che avvengono su scala atomica a seguito di opportuni trattamenti termici. Questo processo di densificazione è caratterizzato da fenomeni diffusivi e comporta la rimozione della porosità tra le particelle di partenza, la coalescenza e la formazione di legami forti fra particelle adiacenti.

Nella sinterizzazione allo stato solido, come in questo caso, le polveri del materiale vengono trattate termicamente ad una temperatura alla quale non si verificano fenomeni di fusione; pertanto, la formazione dei legami non necessita di fase liquida. La compattazione avviene tramite diffusione allo stato solido degli atomi attraverso il reticolo cristallino e i bordi di grano. Durante il processo si hanno anche dei fenomeni di crescita dei grani. Le particelle di polvere ceramica tendono quindi ad agglomerarsi per effetto diffusivo allo stato solido.

I legami che si formano durante la sinterizzazione si evidenziano come una crescita coesa di strutture denominate colli (“*neck*”) nei punti di contatto tra le particelle [43].

Come dimostrato dai risultati delle prove meccaniche, la formazione di questi legami tra le particelle di materiale ceramico comporta una maggiore resistenza della struttura coesa risultante e una minore energia di sistema.

Mediante analisi SEM sono stati osservati i provini *Neovius*, sottoposti a trattamento termico per permettere la sinterizzazione, realizzati con le polveri di HA, β -TCP e la miscela mista; successivamente sono stati confrontati i campioni con diversa porosità e dimensione della cella.

Come si può notare dalle fotografie in *Figura 3.19* la microstruttura dei campioni in idrossiapatite è estremamente porosa, la sinterizzazione delle polveri è stata solo parziale e i grani sono poco compatti e fusi tra loro.

Questa microporosità residua spiega i risultati ottenuti dalle misure di densità e dalle prove meccaniche: i campioni in HA erano estremamente porosi con un dato addirittura superiore al valore del modello geometrico (87,04%), mentre la resistenza meccanica ottenuta dall'equazione di Ashby era significativamente inferiore a quella degli altri materiali (66,44 MPa dell'idrossiapatite, 164 MPa della miscela e 230,5 MPa del fosfato tricalcico).

Il modello di Gibson-Ashby fornisce infatti una valutazione del grado di densità e compattezza della struttura considerata.

La rugosità superficiale è comunque una proprietà auspicabile e da tenere in considerazione nella progettazione di scaffold e innesti per rigenerazione ossea poiché favorisce l'ancoraggio e la migrazione delle cellule e permette l'osteointegrazione dell'impianto con il tessuto naturale.

Al contrario, i campioni in β -TCP presentano una microstruttura compatta e coesa con grani quasi completamente sinterizzati. Questa caratteristica microstrutturale spiega il valore estremamente alto di σ_{solid} ottenuto dalle prove di compressione, la struttura è infatti notevolmente più densa delle altre.

Come dimostrato dai risultati delle prove meccaniche, la formazione di questi legami tra le particelle di materiale ceramico comporta una maggiore resistenza della struttura coesa risultante e una minore energia di sistema.

Infine, la miscela 70% β -TCP e 30% HA presenta caratteristiche microstrutturali intermedie tra le due precedenti con zone in cui i grani appaiono più sinterizzati che in altre per la coesistenza delle due diverse polveri.

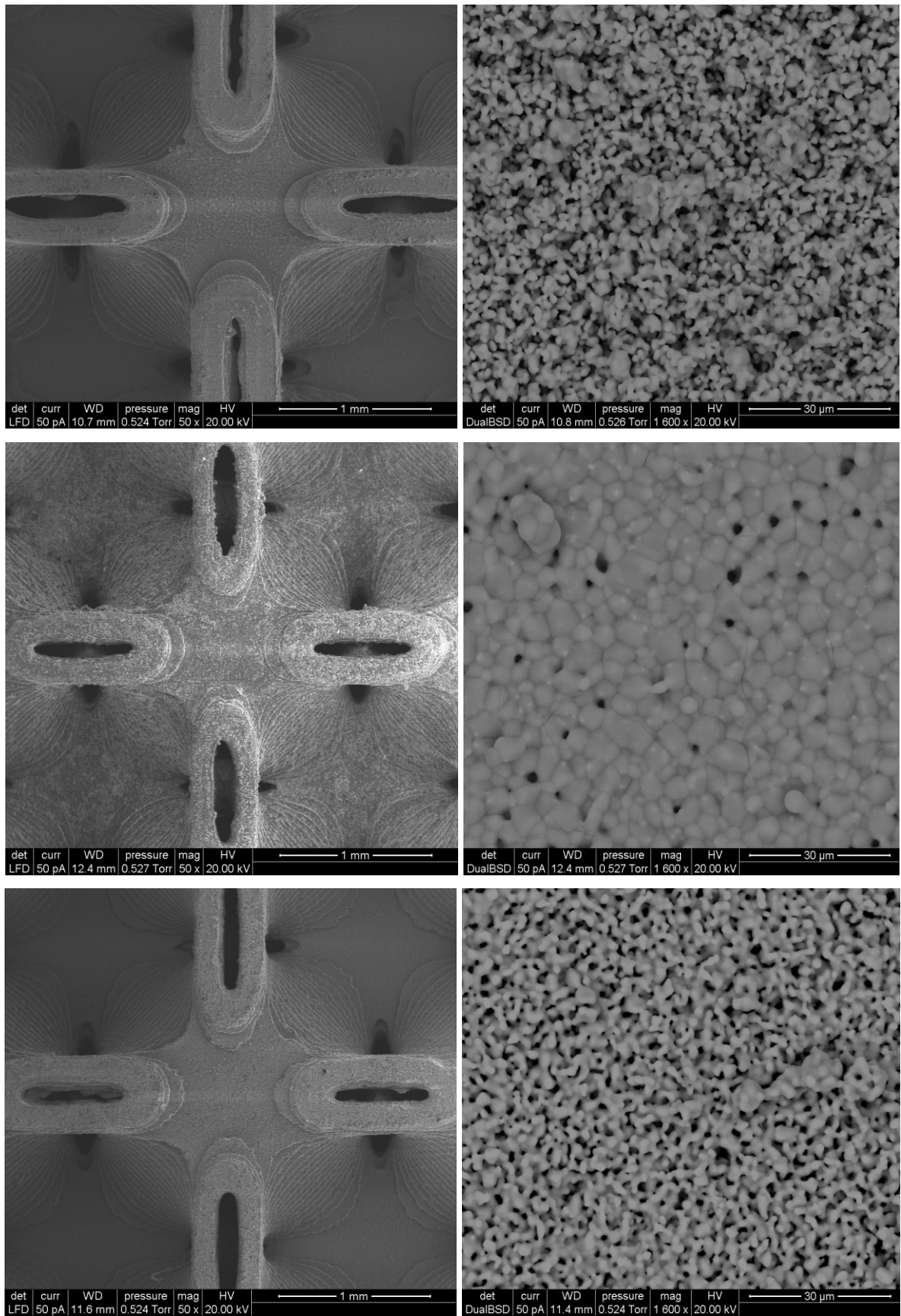


Figura 3.19 Immagini SEM a due diversi ingrandimenti della microstruttura dei campioni Neovius realizzati con polvere di idrossiapatite (sopra); beta fosfato-tricalcico (centro) e con la miscela 70% β -TCP 30% HA (basso).

Dalle immagini SEM si può apprezzare la qualità della stampa, soprattutto per i campioni del modello con porosità dell'85% e dimensione della cella di 2,5 mm. Questi parametri risultano essere i migliori: i layer sono regolari e ben visibili, i pori sono definiti e aperti, le superfici sono ben definite e la presenza di difetti e imprecisioni della stampa è minima.

Riducendo la porosità e le dimensioni della cella la risoluzione e la precisione diminuiscono notevolmente, la struttura è visibilmente più chiusa con irregolarità ed evidenti residui d'inchiostro (*Figura 3.20*).

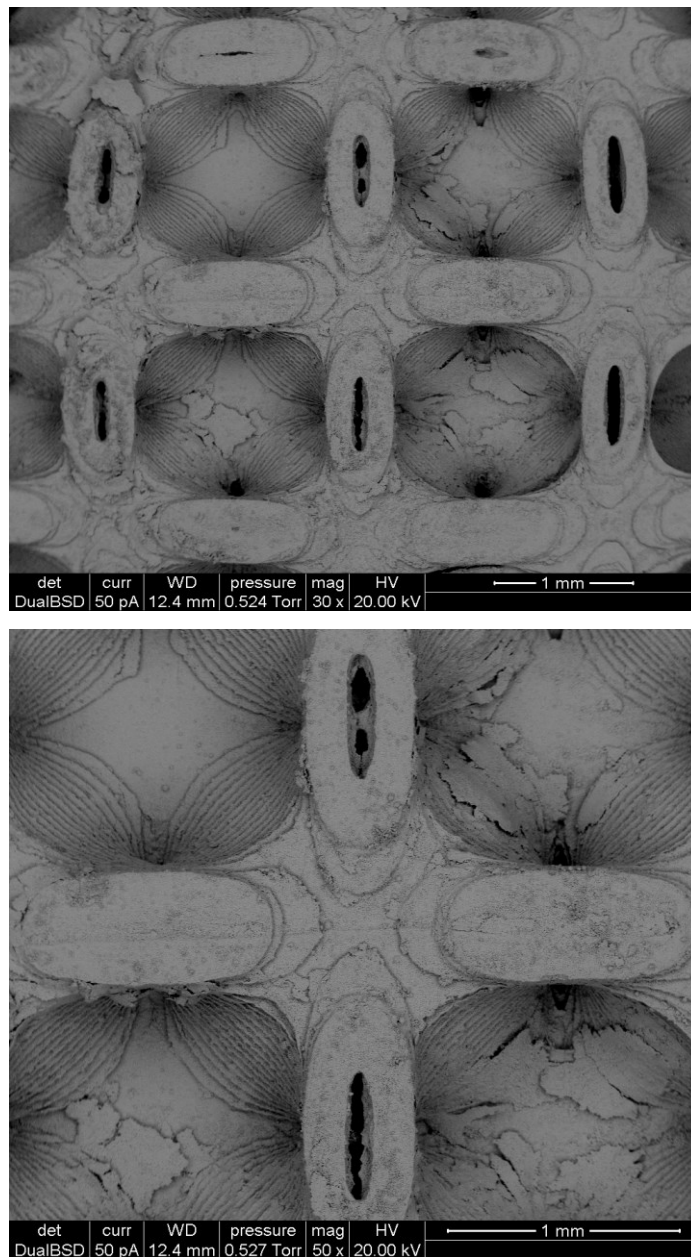


Figura 3.20 Immagine SEM del campione Neovius con porosità del modello dell'80%. La struttura appare chiusa, con evidenti residui superficiali di resina

4. CONCLUSIONI

Milioni di persone ogni anno soffrono di specifiche patologie o traumi del tessuto osseo, casi nei quali l'unico trattamento possibile è il trapianto. Per sopperire alla domanda crescente di questo tessuto negli ultimi anni sono stati sviluppati diversi sostituti sintetici che simulano, per composizione, struttura e porosità, l'osso naturale. Questi sostituti devono essere realizzati con materiali biocompatibili, biorassorbibili e bioattivi e devono avere caratteristiche strutturali e meccaniche che favoriscano la rigenerazione e la deposizione di nuovo tessuto osseo.

Le TPMS (*Triply Periodic Minimal Structure*) sono una classe di strutture reticolari che presentano una cella unitaria ripetuta nello spazio tridimensionale con curvatura media nulla in ogni punto locale. Queste particolari geometrie possiedono numerosi vantaggi: sono descritte da funzioni matematiche che possono quindi essere manipolate per modificarne la curvatura, le caratteristiche geometriche, come le dimensioni dei pori e lo spessore superficiale e le proprietà fisiche, come il rapporto superficie-volume e la densità; presentano eccellenti proprietà meccaniche e ottima resistenza alla fatica. Queste strutture possono essere impiegate nella progettazione di innesti e scaffold per la rigenerazione del tessuto osseo grazie ai progressi ottenuti negli ultimi anni nelle tecniche di stampa 3D. Le potenzialità e le possibili applicazioni delle tecniche di *additive manufacturing* sono infatti sconfinite. Fra queste, la stereolitografia è quella che garantisce le migliori performance dal punto di vista della risoluzione e dell'accuratezza della stampa.

Nell'ottica di una medicina sempre più paziente-specifica, cioè personalizzata sulle esigenze del singolo individuo, le tecniche di stampa 3D e la *tissue engineering* rappresentano un connubio vincente per la produzione di impianti e innesti. La possibilità di ottenere un modello di innesto totalmente su misura del paziente, basandosi sulle immagini tridimensionali raccolte con le comuni tecniche di *imaging* clinico e utilizzando un qualunque software di modellazione CAD, rappresenta un passo in avanti enorme in termini di riduzione dei costi e di aumento della precisione.

In questa tesi si è voluto stampare mediante *Digital Light Processing* cinque diverse topologie TPMS: *IWP*, *Neovius Surface*, *Gyroid*, *Diamond Surface* e *Primitive Surface*. Servendosi del software di modellazione Rhinoceros sono stati generati i modelli geometrici dei provini e i file sono poi stati processati (*slicing*) per ottenere un formato compatibile con la stampante utilizzata. Per migliorare la qualità della stampa è stato studiato l'effetto del tempo di esposizione di ogni layer alla luce UV. Il tempo di esposizione è un parametro di fondamentale importanza perché valori troppo elevati possono portare al fenomeno

dell'*overcuring*, ossia la polimerizzazione di una quantità eccessiva di resina che compromette la risoluzione e la precisione della stampa con evidenti difetti superficiali nella struttura. I migliori risultati in termini di porosità aperta reale e resistenza meccanica della struttura sono stati raggiunti con tempo di esposizione di due secondi. Inoltre, va sottolineato che la pulizia dei campioni verdi è essenziale per eliminare i residui di resina ed ottenere dei prodotti coerenti con il modello. Nell'inchiostro sono state usate polveri di idrossiapatite e β fosfato-tricalcico, materiali ceramici biocompatibili, biodegradabili e osteoinduttivi. I provini verdi ottenuti sono successivamente stati sottoposti a trattamento termico a 1200°C per permettere la sinterizzazione delle polveri. Per le prove di compressione sono stati selezionati cinque campioni per modello e i valori di resistenza meccanica a compressione sono stati rielaborati e analizzati con il modello di Gibson-Ashby per ottenere la resistenza apparente a flessione del *bulk material*. Le polveri ceramiche commerciali e sinterizzate sono state esaminate con diffrattometro a raggi X e gli spettri di intensità sono stati confrontati per studiare la stabilità termica dei materiali impiegati. I risultati delle analisi XRD hanno confermato che i biomateriali scelti sono stabili e che l'idrossiapatite non si è convertita in fosfato tricalcico durante il trattamento termico. La scomparsa di una parte dell'HA è stata osservata solo nella miscela 70% β -TCP 30% HA. I campioni realizzati in HA presentano valori di porosità aperta addirittura superiori al modello geometrico grazie alla microstruttura estremamente porosa e irregolare che però ne compromette al contempo le proprietà meccaniche; la resistenza misurata risulta infatti notevolmente inferiore a quella del β -TCP. Dalle analisi SEM si apprezza invece la microstruttura compatta e coesa del fosfato tricalcico con grani quasi completamente sinterizzati; la densità del materiale raggiunta dopo la sinterizzazione ne aumenta la resistenza apparente a flessione (~230 MPa).

Visti i risultati, nelle fasi successive del progetto sono stati stampati provini esclusivamente con polveri di β -TCP.

La selezione della topologia 'ottima' si è basata sul confronto dei valori di resistenza meccanica ricavati dalle prove di compressione: la struttura più performante è risultata essere la *Neovius Surface* grazie alle sue caratteristiche strutturali e geometriche che la rendono migliore anche della più conosciuta e studiata in letteratura struttura *Gyroid*.

Al fine di valutare l'effetto della variazione di porosità e dimensione della cella unitaria sulla resistenza della struttura, nella seconda parte della tesi sono stati creati una nuova serie di modelli in cui la porosità aperta è stata dell'80; 85 e 90%, mentre la dimensione della cella è stata di 1,25; 2,5; 3,5 e 5 mm. I risultati delle prove di compressione confermano che la

resistenza meccanica del campione diminuisce all'aumentare della porosità e delle dimensioni della cella.

Con questa tesi si è voluto dimostrare come, mediante l'ottimizzazione delle caratteristiche topologiche e geometriche e la selezione accurata dei parametri di stampa, è stato possibile produrre degli scaffold con struttura TPMS coerenti con il modello geometrico e con ottime proprietà meccaniche. Questi risultati, sebbene molto promettenti, possono essere ulteriormente migliorati grazie al progresso e alla continua innovazione nelle tecniche di *additive manufacturing* che permettono di aumentare considerevolmente la risoluzione della stampa e la complessità delle strutture stampate. Inoltre, altri parametri possono essere introdotti e perfezionati per migliorarne ulteriormente la performance meccanica.

In vista di un futuro impiego delle TPMS per la produzione di scaffold destinati all'ingegneria tissutale dell'osso, è di fondamentale importanza studiare l'interazione tra le cellule e queste strutture in vitro. Come dimostrano numerosi studi in letteratura, queste particolari topologie sono in grado di favorire e stimolare l'adesione, la migrazione e la proliferazione cellulari permettendo quindi, una volta inserite in ambiente biologico, la rigenerazione del tessuto osseo nel sito dell'impianto. Studi futuri in vitro e in vivo più approfonditi e dettagliati chiariranno completamente il comportamento e le caratteristiche di queste strutture e ne valuteranno l'eventuale applicazione sicura ed efficace sull'uomo.

Le prospettive future della bioingegneria nella rigenerazione del tessuto osseo sono rappresentate dal lavoro sinergico tra l'ingegneria dei materiali, le biotecnologie, la chimica e la medicina per migliorare e formulare soluzioni innovative che permettano, un giorno, di risolvere il problema della carenza di tessuto da donatore e che consentano la commercializzazione di sostituti ossei paziente-specifico più economici, veloci da produrre ed efficaci.

BIBLIOGRAFIA E SITOGRAFIA

- [1] Dimitriou R, Jones E, McGonagle D, Giannoudis PV. Bone regeneration: current concepts and future directions. *BMC Med.* 2011 May 31; 9:66.
- [2] Isaacson N, Lopez-Ambrosio K, Chubb L, Waanders N, Hoffmann E, Witt C, James S, Prawel DA. Compressive properties and failure behavior of photocast hydroxyapatite gyroid scaffolds vary with porosity. *J Biomater Appl.* 2022 Jul; 37(1):55-76.
- [3] Carlo Di Bello, Andrea Bagno. *Biomateriali. Dalla scienza dei materiali alle applicazioni cliniche.* Pàtron Editore, 2016.
- [4] Hossein J, Bengi Y, Zafer E. A review of bioceramic porous scaffolds for hard tissue applications: Effects of structural features. *Ceramic International.* 2020 Jul; 46(10):15725-15739.
- [5] Rho JY, Kuhn-Spearing L, Zioupos P. Mechanical properties and the hierarchical structure of bone. *Med Eng Phys.* 1998 Mar; 20(2):92-102.
- [6] Hadjidakis DJ, Androulakis II. Bone remodeling. *Ann N Y Acad Sci.* 2006 Dec; 1092:385-96.
- [7] Panaroni C, Yee AJ, Raje NS. Myeloma and Bone Disease. *Curr Osteoporos Rep.* 2017 Oct; 15(5):483-498.
- [8] Guido G, Scaglione M, Fabbri L, Ceglia MJ. The "osteoporosis disease". *Clin Cases Miner Bone Metab.* 2009 May; 6(2):114-6.
- [9] Sheen JR, Mabrouk A, Garla VV. Fracture Healing Overview. 2023 Apr 8. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan.
- [10] Istituto Superiore di Sanità (ISS), Frattura ossea. <https://www.issalute.it/index.php/la-salute-dalla-a-alla-z-menu/f/frattura-ossea>. (consultato il 7 novembre 2023).
- [11] Ferguson JL, Turner SP. Bone Cancer: Diagnosis and Treatment Principles. *Am Fam Physician.* 2018 Aug 15; 98(4):205-213.
- [12] Morgan EF, Unnikrisnan GU, Hussein AI. Bone Mechanical Properties in Healthy and Diseased States. *Annu Rev Biomed Eng.* 2018 Jun 4; 20:119-143.
- [13] Oftadeh R, Perez-Viloria M, Villa-Camacho JC, Vaziri A, Nazarian A. Biomechanics and mechanobiology of trabecular bone: a review. *J Biomech Eng.* 2015 Jan; 137(1):0108021–01080215.
- [14] Baldwin P, Li DJ, Auston DA, Mir HS, Yoon RS, Koval KJ. Autograft, Allograft, and Bone Graft Substitutes: Clinical Evidence and Indications for Use in the Setting of Orthopaedic Trauma Surgery. *J Orthop Trauma.* 2019 Apr; 33(4):203-213.

- [15] Greenwald AS, Boden SD, Goldberg VM, Khan Y, Laurencin CT, Rosier RN; American Academy of Orthopaedic Surgeons. The Committee on Biological Implants. Bone-graft substitutes: facts, fictions, and applications. *J Bone Joint Surg Am.* 2001; 83-A Suppl 2 Pt 2:98-103.
- [16] Bal Z, Kaito T, Korkusuz F, Yoshikawa H. Bone regeneration with hydroxyapatite-based biomaterials. *Emergent Materials.* 2019 Dec 19; 3:521–544.
- [17] Grenoble DE, Katz JL, Dunn KL, Murty KL, Gilmore RS. The elastic properties of hard tissues and apatites. *J Biomed Mater Res.* 1972 May; 6(3):221-33.
- [18] Fiume E, Barberi J, Verné E, Baino F. Bioactive Glasses: From Parent 45S5 Composition to Scaffold-Assisted Tissue-Healing Therapies. *J Funct Biomater.* 2018 Mar 16; 9(1):24.
- [19] Battafarano G, Rossi M, De Martino V, Marampon F, Borro L, Secinaro A, Del Fattore A. Strategies for Bone Regeneration: From Graft to Tissue Engineering. *Int J Mol Sci.* 2021 Jan 23; 22(3):1128.
- [20] Holzapfel BM, Rudert M, Hutmacher DW. Gerüstträgerbasiertes Knochen-Tissue-Engineering [Scaffold-based Bone Tissue Engineering]. *Orthopade.* 2017 Aug; 46(8):701-710.
- [21] Savio G, Rosso S, Meneghello R, Concheri G. Geometric Modeling of Cellular Materials for Additive Manufacturing in Biomedical Field: A Review. *Appl Bionics Biomech.* 2018 Feb 1; 654-782.
- [22] Jiawei F, Fu J, Xinhua Y, Yong H. Triply periodic minimal surface (TPMS) porous structures: From multi-scale design, precise additive manufacturing to multidisciplinary applications. *Int. J. Extrem. Manuf.* 2022 March 9; 4(2):161-192.
- [23] Hayashi K, Kishida R, Tsuchiya A, Ishikawa K. Superiority of Triply Periodic Minimal Surface Gyroid Structure to Strut-Based Grid Structure in Both Strength and Bone Regeneration. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2023 Jul 26; 15(29):34570-34577.
- [24] Zhang L, Yang G, Johnson BN, Jia X. Three-dimensional (3D) printed scaffold and material selection for bone repair. *Acta Biomater.* 2019 Jan 15; 84:16-33.
- [25] Wubneh A, Tsekoura EK, Ayranci C, Uludağ H. Current state of fabrication technologies and materials for bone tissue engineering. *Acta Biomater.* 2018 Oct 15; 80:1-30.
- [26] Montroni D, Kobayashi T, Hao T, Lublin D, Yoshino T, Kisailus D. Direct Ink Write Printing of Chitin-Based Gel Fibers with Customizable Fibril Alignment, Porosity, and Mechanical Properties for Biomedical Applications. *J Funct Biomater.* 2022 Jun 16; 13(2):83.

- [27] Melchels FP, Feijen J, Grijpma DW. Adaptive Manufacturing: Reinventing Design and Manufacturing. *Biomaterials*. 2020 Apr 6; 31(24):6121-30.
- [28] Khalaf AT, Wei Y, Wan J, Zhu J, Peng Y, Abdul Kadir SY, Zainol J, Oglah Z, Cheng L, Shi Z. Bone Tissue Engineering through 3D Bioprinting of Bioceramic Scaffolds: A Review and Update. *Life (Basel)*. 2022 Jun 16; 12(6):903.
- [29] Poltue T, Karuna C, Khruaduangkham S, Seehanam S, Promoppatum P. Design exploration of 3D-printed triply periodic minimal surface scaffolds for bone implants. *International Journal of Mechanical Sciences*. 2021 Dec 1; 211:106762.
- [30] Melchels FP, Barradas AM, Van Blitterswijk CA, De Boer J, Feijen J, Grijpma DW. Effects of the architecture of tissue engineering scaffolds on cell seeding and culturing. *Acta Biomater*. 2010 Nov; 6(11):4208-4217.
- [31] Xu S, Zhang H, Li X, Zhang X, Liu H, Xiong Y, Gao R, Yu S. Fabrication and biological evaluation of porous β -TCP bioceramics produced using digital light processing. *Proc Inst Mech Eng H*. 2022 Feb; 236(2):286-294.
- [32] Huang J, Qin Q, Wang J. A Review of Stereolithography: Processes and Systems. *Processes*. 2020 Sep 11; 8(9):1138.
- [33] Original Prusa SL1S SPEED 3D Printer, Specifications: Technical Parameters and List of Features. <https://www.prusa3d.com/product/original-prusa-sl1s-speed-3d-printer/#specs>. (consultato il 24 ottobre 2023).
- [34] Bove A, Calignano F, Galati M, Iuliano L. Photopolymerization of Ceramic Resins by Stereolithography Process: A Review. *Appl. Sci*. 2022 Apr 1; 12(7):3591.
- [35] Sim JH, Koo BK, Jung M, Kim DS. Study on Debinding and Sintering Processes for Ceramics Fabricated Using Digital Light Processing (DLP) 3D Printing. *Processes*. 2022 Nov 21; 10(11):2467.
- [36] Maconachie T, Leary M, Lozanovski B, Zhang X, Qian M, Faruque O, Brandt M. SLM lattice structures: Properties, performance, applications and challenges. *Materials & Design*. 2019 Dec 5; 183:108137.
- [37] Ožóg P, Elsayed H, Grigolato L, Savio G, Kraxner J, Galusek D, Bernardo E. Engineering of silicone-based blends for the masked stereolithography of biosilicate/carbon composite scaffolds. *Journal of the European Ceramic Society*. 2022 Oct; 42(13):6192-6198.
- [38] Wongwitwichot P, Kaewsrichan J, Chua KH, Ruszymah BH. Comparison of TCP and TCP/HA Hybrid Scaffolds for Osteoconductive Activity. *Open Biomed Eng J*. 2010; 4:279-85.

- [39] He F, Qian G, Ren W, Li J, Fan P, Shi H, Shi X, Deng X, Wu S, Ye J. Fabrication of β -tricalcium phosphate composite ceramic sphere-based scaffolds with hierarchical pore structure for bone regeneration. *Biofabrication*. 2017 Apr 24; 9(2):025005.
- [40] Bouakaz I, Dehkord ES, Meille S, Schrijnemakers A, Boschini F, Preux N, Hocquet S, Geris L, Nolens G, Grossin D, Dupret-Bories A. 3D printed triply periodic minimal surfaces calcium phosphate bone substitute: The effect of porosity design on mechanical properties. *Ceramics International*. 2023 Oct 31 (published online).
- [41] Thangavel M, Elsen Selvam R. Review of Physical, Mechanical, and Biological Characteristics of 3D-Printed Bioceramic Scaffolds for Bone Tissue Engineering Applications. *ACS Biomater Sci Eng*. 2022 Dec 12; 8(12):5060-5093.
- [42] Weber M, Wolf M. About the cover: Early images of minimal surfaces. *Bulletin (New Series) of the American Mathematical Society*. 2011 Apr 11; 48(3):457-460.
- [43] German R. *"Sintering Theory and Practice"*. Wiley-Interscience Ed., 1996.
- [44] Liu Y, Shen Z, Dehydroxylation of hydroxyapatite in dense bulk ceramics sintered by spark plasma sintering, *J.Eur.Ceram.Soc.*32 (11), (2012), 2691–2696.