

**ALMA MATER STUDIORUM  
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA**

---

---

**DOTTORATO DI RICERCA  
IN SCIENZE CHIMICHE**

CICLO XXII

*Settore scientifico disciplinare CHIM/01*

**SVILUPPO DI IMPIANTI CERAMICI BIOMIMETICI A  
POROSITA' CONTROLLATA PER LA  
RIGENERAZIONE DEL TESSUTO OSSEO**

Presentata da: **Federica Valentini**

Coordinatore

**Prof. Giuliano Longoni**

Relatore:

**Pof.ssa Domenica Tonelli**

Co-relatore:

**Dott.ssa Elena Landi**

**Esame Finale**

---

**Anno 2010**

---



---

## Indice

<b>1. INTRODUZIONE</b>	<b>1</b>
1.1 L'osso	1
1.1.1 La composizione	2
1.1.2 La gerarchia dell'osso	2
1.1.3 Le cellule del tessuto osseo	3
1.1.4 Il processo riparativo dell'osso	6
1.1.5 Biomineralizzazione: meccanismo di calcificazione	8
1.2 Classificazione dei sostituti ossei	12
1.2.1. Sostituti ossei naturali	12
1.2.2. Sostituti ossei sintetici	13
1.3 Biomimetico	17
1.3.1 Biomimesi per l'ingegneria tissutale dell'osso	18
1.4 L'idrossiapatite	20
1.4.1 L'idrossiapatite stechiometrica: struttura e chimica	20
1.4.2 Solubilità dell'idrossiapatite	21
1.4.3 L'idrossiapatite biologica	24
1.5 Esigenze di un materiale porosi come sostituti ossei	27
1.6 Le tecniche per la produzione di scaffold ceramici	29
1.6.1 Il freeze casting	35
1.6.2 Il foaming	48
1.7 Sistemi per il rilascio controllato di farmaci	55
1.7.1 La funzione degli antibiotici aminoglicosidici	55
1.7.2 Antibiotici caricati sul ricoprimento dell'impianto	58
1.7.3 Antibiotici caricati su film biorassorbibili	60
<b>Riferimenti bibliografici</b>	<b>63</b>
<b>2. SCOPO DELLA TESI</b>	<b>67</b>
<b>3. TECNICHE ANALITICHE</b>	<b>69</b>
3.1 Microscopia a scansione elettronica	69
3.1.1 Principi teorici	69
3.1.2 Preparazione del campione	72

3.2	Microsonda elettronica a dispersione di energia (EDS)	73
3.3	Plasma di Argon accoppiato induttivamente (ICP)	73
3.4	Spettroscopia IR	74
3.5	Analisi termica	79
2.5.1.	Metodi termo gravimetrici (TG)	79
2.5.2	Analisi termica differenziale (DTA)	80
3.6	Diffrazione dei raggi X	81
3.6.1	La tecnica	81
3.6.2	L'identificazione dei piani reticolari	83
3.6.3	La legge di Bragg	85
3.6.4	Il metodo delle polveri	86
3.6.5	Geometria per le polveri	88
3.7	Sospensioni e dispersioni colloidali	88
3.7.1	Controllo della stabilità della sospensione	91
3.7.2	Il potenziale zeta	92
3.7.3	Il punto isoelettrico	96
3.7.4	La spettroscopia elettroacustica	96
3.8	Determinazione dell'area di superficie specifica	98
3.9	Granulometria	99
3.10	Porosimetria	101
3.11	HPLC	103
3.12	Resistenza a compressione	106
<b>4.</b>	<b>APATITI POROSE</b>	<b>109</b>
4.1	Le polveri	109
4.1.1	Sintesi di polveri Stronzio sostituite	110
4.1.2	Caratterizzazione e discussione	111
4.2	Scaffold porosi realizzati mediante "freeze casting"	126
4.2.1	Procedura sperimentale	126
4.2.2	Caratterizzazioni e discussione	127
4.3	Scaffold porosi realizzati mediante "foaming"	143
4.3.1	Procedura sperimentale	143
4.3.2	Caratterizzazioni e discussione	144
4.3.3	Applicazioni	149

---

4.4 Conclusioni	150
<b>Riferimenti bibliografici</b>	
<b>5. COMPOSITI BIO-IBRIDI HA-GELATINA</b>	<b>153</b>
5.1 Scaffold porosi realizzati mediante freeze casting	153
5.1.1 Sintesi dei compositi	154
5.1.2 Caratterizzazione	155
5.2 Conclusioni	165
<b>Riferimenti bibliografici</b>	
<b>6. SISTEMI PER IL RILASCIO CONTROLLATO DI FARMACI</b>	<b>167</b>
6.1 Procedura sperimentale	168
6.1.1 Granulato CHA-tobramicina	168
6.1.2 Apatiti porose	168
6.1.3 Apatiti porose con tobramicina	168
6.2 Caratterizzazione	170
6.2.1 Granulato CHA-tobramina	170
6.2.2 Apatiti porose con gelatina	172
6.2.3 Apatiti porose con tobramicina con o senza coating di gelatina	172
6.3 Conclusioni	175
<b>Riferimenti bibliografici</b>	
<b>7. CONCLUSIONI</b>	<b>177</b>



## 1. INTRODUZIONE

### 1.1 L'osso

*“L'osso è stato utilizzato dal genere umano sin dai tempi preistorici, quando ossa umane ed animali venivano impiegate come utensili ed armi. La riproduzione della sua struttura, stimola oggi, nuovi approcci nel campo dell'ingegneria tissutale, ed ispira la produzione di strutture e materiali biomimetici, scrive Ian Salisbury”<sup>1</sup>.*

Nella progettazione e realizzazione di materiali biomimetici, si vogliono mimare quelle che sono la struttura e la composizione dei tessuti naturali e, nel caso specifico, quella del tessuto osseo. A tal fine risulta indispensabile una panoramica sulle funzioni e le caratteristiche fondamentali di questo tessuto e delle sue componenti. Il tessuto osseo è un materiale composito, appartenente alla classe dei tessuti connettivi, con funzione di sostegno meccanico del corpo umano e, unitamente al sistema muscolare, di regolazione motoria.

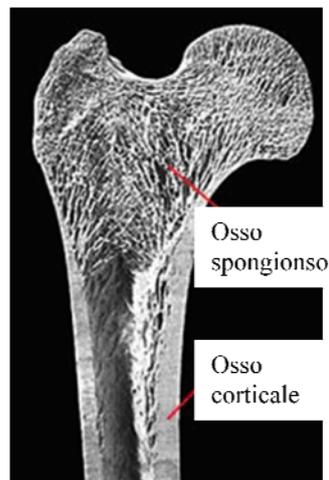


Figura 1- Sezione longitudinale di un'estremità femorale, che mostra la complessa struttura ossea

La sua particolare struttura (Figura 1) e composizione, lo rendono al tempo stesso rigido e tenace. Strutturalmente, è costituito da una miscela di collagene, soffice ma resistente, e di un materiale molto rigido, ma fragile (apatite). Nessuno dei due componenti sarebbe in grado di soddisfare da solo alla richiesta di una buona

rigidità, accoppiata ad una elevata tenacità, ma la disposizione delle fibre di collagene nella matrice di idrossiapatite, conferisce all'osso quelle straordinarie prestazioni meccaniche non riproducibili con alcun materiale omogeneo ed isotropo.

### **1.1.1 Composizione**

La matrice ossea è costituita per circa il 70% del suo peso, da sali inorganici di natura calciofosfatica, presenti sotto forma di cristalli di idrossiapatite. Questi, oltre a contribuire alla durezza del tessuto, rappresentano la principale fonte di deposito di una moltitudine di ioni inorganici (tra cui il  $\text{Ca}^{2+}$ ) a cui l'organismo può attingere in caso di necessità. Tale fase inorganica è, infatti, un fosfato di calcio basico assimilabile all'idrossiapatite  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , che, all'interno della sua struttura cristallina, incorpora una serie di ioni estranei presenti in tracce, tra cui  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Sr}^{2+}$ ,  $\text{Si}^{4+}$ ,  $\text{CO}_3^{2-}$

Questi ioni, presenti in qualità di droganti, determinano alterazioni dei parametri strutturali e chimico-fisici dell'apatite stessa, e sono responsabili di una serie di specifiche e importanti funzioni biologiche. Del rimanente 30% in peso, il 23% è costituito da fibre di collagene ed acqua ed il resto da cellule, proteoglicani e proteine non collageniche.

### **1.1.2 Gerarchia**

Non è tanto la composizione, quanto la complessa organizzazione strutturale a più livelli gerarchici (Figura 2), la principale responsabile delle straordinarie prestazioni meccaniche del tessuto osseo.

Naturalmente, considerando l'elevato grado di organizzazione a più livelli del collagene, è facile intuire che esso contribuisca notevolmente alla nascita di questa struttura gerarchica. La fase apatitica, infatti, come sarà approfondito successivamente, riguardante il meccanismo di biomineralizzazione, è distribuita in cavità inter- ed intra- fibrillari, quindi a strettissimo contatto con esso<sup>2</sup>.

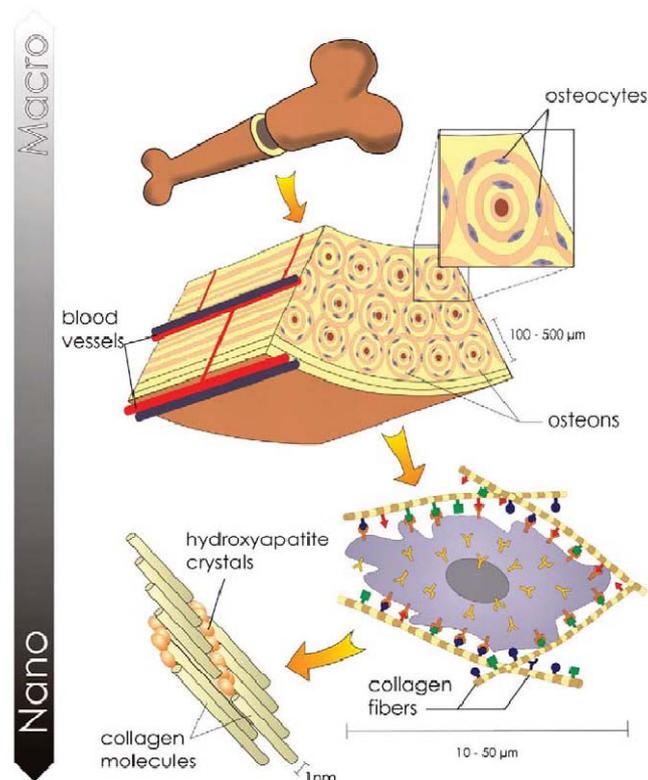


Figura 2- Struttura gerarchica dell'osso

### 1.1.3 Cellule del tessuto osseo

La componente cellulare del tessuto osseo è costituita da: cellule osteoprogenitrici, osteoblasti, osteociti e osteoclasti. Le cellule ossee regolano sinergicamente il continuo rimodellamento, la riparazione e la rigenerazione tissutale. Essenziale è anche il contributo delle cellule endoteliali nel provvedere, con l'angiogenesi, all'apporto di nutrienti e ossigeno necessari al metabolismo e all'allontanamento dei prodotti del catabolismo cellulare.

Le cellule osteoprogenitrici (preosteoblasti), gli osteoblasti e gli osteociti sono fasi funzionali consecutive dello stesso tipo di cellula, a sua volta derivato dal differenziamento in senso osteogenico della cellula mesenchimale pluripotente dei tessuti connettivi. Gli osteoclasti, invece, derivano da precursori (preosteoclasti) differenziati dalle cellule staminali del midollo osseo ematopoietico e migrati nel tessuto osseo dal sangue.

I preosteoblasti hanno forma piatta ed allungata, con citoplasma scarso e basofilo ed un nucleo eucromatico con un grande nucleolo. Tali cellule si collocano sulle superfici libere delle ossa, al livello dello strato più interno del periostio apposto all'osso, lo strato osteogenico di Ollier, riccamente vascolarizzato. Sono altresì localizzate al livello del tessuto connettivo lasso, che riveste le cavità interne dell'osso, chiamato endostio, in vicinanza dei capillari sanguigni. Le cellule osteoprogenitrici sono dotate di capacità proliferativa che si manifesta, in modo particolare, durante l'accrescimento corporeo, ma che si mantiene anche durante la vita adulta. Il differenziamento delle cellule preosteoblastiche in osteoblasti maturi avviene grazie allo stimolo di numerosi fattori, principalmente il paratormone (PTH), l'ormone della crescita (GH) e il transforming growth factor-beta (TGF- $\beta$ ). Gli osteoblasti sono le cellule responsabili della sintesi della matrice extracellulare (ECM) dell'osso e della sua mineralizzazione (figura 3). Hanno forma globosa o poliedrica e tendono a giustapporsi le une alle altre a formare lamine epitelioidi a ridosso delle superfici ossee in via di formazione. Gli osteoblasti hanno dimensioni rilevanti (circa 20  $\mu\text{m}$ ), un nucleo rotondeggiante eucromatico con un grande nucleolo ed un citoplasma abbondante e basofilo. Istochimicamente queste cellule si distinguono dalla positività alla reazione per l'enzima fosfatasi alcalina (ALP). Al microscopio elettronico presentano un ergastoplasma sviluppato e un grande apparato di Golgi. Nel citoplasma periferico possono essere presenti dei corpi, delimitati da membrana, detti globuli calcificanti, di 0,2-0,5  $\mu\text{m}$  di diametro, contenenti una matrice a medio arresto elettronico, in cui sono localizzati enzimi glicoproteici come l'ALP e la pirofosfatasi. Questi non vanno confusi con i calcifying globules, che si trovano nella matrice ossea mineralizzata, e che rappresentano i nuclei iniziali di aggregazione dei cristalli. Gli osteoblasti sono uniti tra loro e con gli osteociti limitrofi, tramite le giunzioni serrate (gap junctions), attraverso le quali scambiano molecole segnale per la coordinazione dell'attività metabolica e la deposizione di matrice ossea. Gli osteociti sono le cellule tipiche dell'osso maturo responsabili del suo mantenimento, ma anche capaci di 'innescare' il rimaneggiamento. Sono cellule terminali con un'autonomia di vita finita, regolata da meccanismi endocrini. L'osteocita è una cellula stellata, con un corpo cellulare a forma di

lente biconvessa, e con numerosi prolungamenti citoplasmatici. Alle estremità, i prolungamenti sono connessi con quelli degli osteociti vicini mediante giunzioni serrate, per mezzo delle quali avvengono gli scambi intercellulari di metaboliti e molecole segnale citoplasmatici. Tra la membrana plasmatica del corpo cellulare e dei prolungamenti, e la matrice mineralizzata rimane uno spazio sottile occupato da tessuto osseo che non mineralizza. Attraverso il tessuto osteoide delle lacune e dei canalicoli ossei, ampiamente comunicanti, l'acqua e le sostanze disciolte riescono a raggiungere anche gli osteociti più distanti dai vasi sanguigni. Quando l'osteocita giunge al termine del suo ciclo vitale, ritrae i propri prolungamenti e degenera.

Gli osteoclasti sono cellule preposte al riassorbimento osseo. Come già riportato non sono cellule autoctone del tessuto osseo, in quanto non appartengono alla linea che deriva dalle cellule osteoprogenitrici. I preosteoclasti, infatti, originano nel midollo osseo ematopoietico dalla stessa linea differenziativa dei monociti. I precursori sono trasportati dal torrente circolatorio fino alle sedi in cui avvengono i processi di riassorbimento osseo. Ivi giunti, migrano nel tessuto e si fondono insieme originando gli osteoclasti attivi; questi elementi sinciziali sono capaci di dissolvere la componente minerale dell'osso e di digerire enzimaticamente quella organica. Gli osteoclasti maturi sono cellule giganti (100-200  $\mu\text{m}$ ) e plurinucleate in quanto, appunto, originate dalla fusione di singoli precursori mononucleati. In una singola cellula possono essere presenti fino a 50 nuclei, con cromatina lassa e nucleolo ben evidente; il citoplasma è acidofilo. L'osteoclasto attivato aderisce alla matrice mineralizzata in via di riassorbimento ed è, solitamente, accolto in una cavità, detta lacuna di Howship, che si forma a seguito dell'azione erosiva della cellula sull'osso. Sul versante della cellula che si appone all'osso, è visibile il tipico orletto increspato (o a spazzola) che appare come un ispessimento della superficie cellulare con una sottile striatura perpendicolare alla superficie stessa. Con metodi istochimici, a livello dell'orletto si può rilevare la presenza dell'enzima anidridi carbonica e di pompe a protoni.

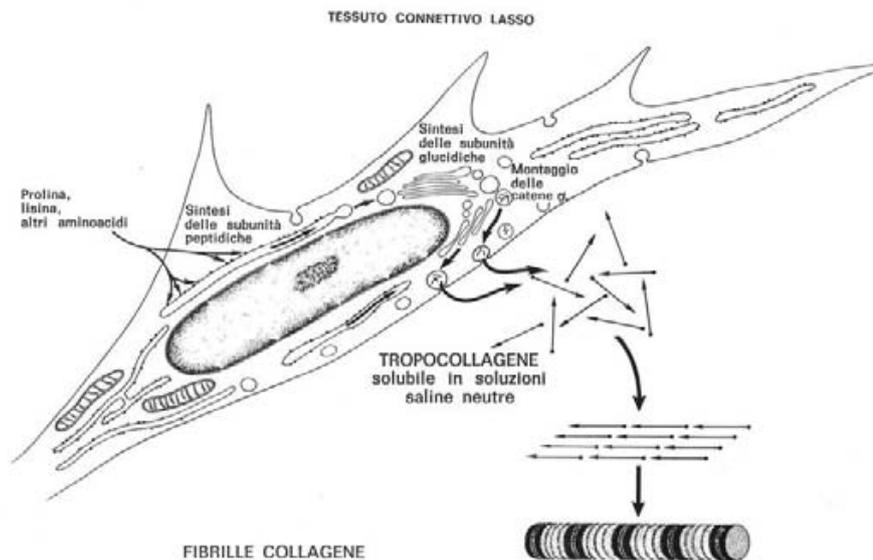


Figura 3- Schema di funzionamento di un osteoblasto.

#### 1.1.4 Il processo riparativo dell'osso

La riparazione endogena di lacune ossee è un evento fisiologico. Il tessuto osseo è in continuo rimodellamento: l'osteogenesi avviene durante la vita fetale dell'individuo e consiste, essenzialmente, nella trasformazione di parti primitivamente costituite da tessuto connettivo (ossificazione connettivale o membranosa) o da tessuto cartilagineo (ossificazione condrale). Nell'ossificazione membranosa si osserva, in corrispondenza del centro di ossificazione, un aumento della vascolarizzazione ed un accumulo di cellule mesenchimali in prossimità dei capillari. Da esse originano gli osteoblasti che, dopo aver secreto la matrice sui cui depositano sali di calcio, rimangono imprigionati nella sostanza fondamentale, trasformandosi in osteociti. Altre cellule mesenchimali evolvono in cellule del midollo osseo, che si differenziano durante la vita dell'individuo. L'ossificazione pericondrale è molto simile a quella connettivale e, spesso, i due fenomeni si verificano contemporaneamente in un segmento osseo in formazione. L'ossificazione endocondrale porta alla costruzione di tessuto osseo attorno a quello cartilagineo preesistente, come nei segmenti diafisari delle ossa lunghe. La cartilagine attorno alla quale si forma il nuovo tessuto osseo viene, poi, progressivamente disgregata ad opera di cellule dette condroclasti. Gli spazi

rimasti vuoti a seguito dell'erosione della cartilagine vengono successivamente occupati dalle cellule staminali che daranno origine al midollo osseo, dotato di attività ematopoietica. In seguito a questi processi si forma tessuto osseo fibroso a fibre intrecciate (non lamellare). L'osso fibroso viene progressivamente sostituito con tessuto osseo secondario, ottenuto mediante l'erosione di quello primario e la deposizione di nuovo materiale, grazie all'azione erosiva congiunta di osteoclasti ed osteoblasti. Tale processo continua anche nell'individuo adulto dove il rimodellamento porta ad un perfezionamento strutturale del tessuto in base alle tensioni ed ai carichi cui è sottoposto.

Nei processi riparativi si ripete la sequenza di eventi della normale istogenesi dell'osso. Nell'ossificazione intramembranosa si possono distinguere due fasi osteogeniche distinte: l'osteogenesi statica, diretta principalmente da fattori induttivi come l'endotelina I e l'*Epidermal Growth Factor* e l'osteogenesi dinamica, diretta soprattutto da segnali meccanici<sup>3</sup>. Quella statica è un processo meccanico-dipendente di neo-osteogenesi che avviene o in un tessuto di natura mesenchimale o in un callo fibroso, privo di osso preesistente e, quindi, di osteociti che possano fungere da meccanorecettori. L'osteogenesi dinamica, invece, ha luogo su superfici ossee preesistenti, dove fattori meccanici innescano ed influenzano la deposizione ossea da parte degli osteoblasti. Nell'osteogenesi meccanico-dipendente svolgono un ruolo fondamentale le citochine ed i fattori di crescita, di origine vascolare ed ematica.

Il processo di riparazione delle fratture è un modello guida utile per cercare di sviluppare una terapia razionale per la rigenerazione dell'osso. La riparazione di una frattura avviene, inizialmente, con la formazione di un ematoma, conseguente al trauma, dovuto alla rottura dei vasi. Successivamente si formano nuovi vasi a partire da quelli preesistenti (angiogenesi) e vengono reclutate cellule dell'infiammazione, fibroblasti e cellule staminali. Le cellule infiammatorie liberano fattori di crescita e citochine che svolgono un ruolo importante nella riparazione<sup>4</sup>. Si forma così tessuto di granulazione, gradualmente rimpiazzato da fibrocartilagine, e un callo esterno, mediante ossificazione intramembranosa; solo in seguito viene mineralizzato il callo interno. Infine, come nel rimodellamento osseo fisiologico, il callo dovuto alla frattura è rimpiazzato con osso secondario

lamellare ed il supporto vascolare ritorna normale. Il ruolo dell'ematoma è fondamentale per la riparazione ossea poiché permette l'innesco della rigenerazione, dall'esterno dell'osso verso la zona midollare<sup>5</sup>. E' stato, infatti, osservato come la rimozione dell'ematoma diminuisca significativamente la riparazione, mentre il suo trapianto accelera la deposizione di osso nuovo.

### 1.1.5 Biomineralizzazione: meccanismo di calcificazione

I tessuti duri degli organismi (ossa, denti, conchiglie,... e simili) sono composti da una fase minerale in stretta associazione con una fase organica polimerica, ragione per cui vengono definiti biocompositi.

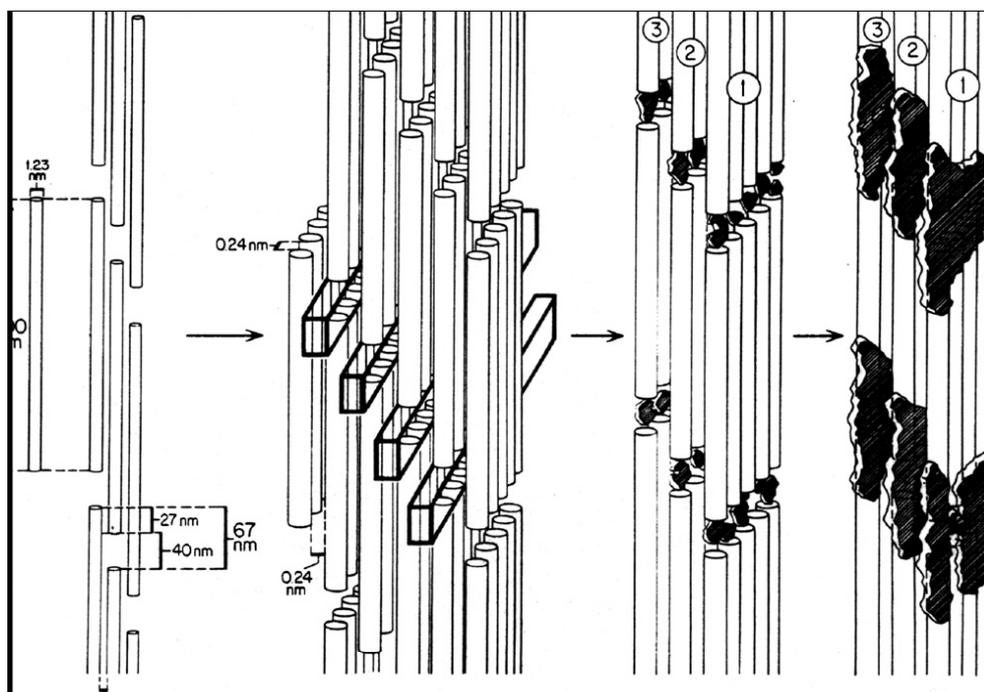


Figura 4- Schema rappresentativo del processo di biomineralizzazione.

I cristalli di fase minerale, formati dagli organismi, spesso hanno forme anche molto differenti da quelli solitamente ottenuti attraverso processi puramente inorganici (figura 4). Essi vengono modellati in complesse strutture in funzione dell'ambiente in cui si formano, soggetti a controlli di dimensione, forma e assemblamento delle particelle, e orientamento dei cristalli. I controlli avvengono

per opera di specifiche proteine in grado di riconoscere le superfici dei cristalli durante la loro fase di crescita, controllo basato sulla complementarità della proteina con piani definiti della struttura del cristallo.

La complessa struttura gerarchica dei biocompositi è responsabile delle loro ottime proprietà meccaniche e della lunga durata.

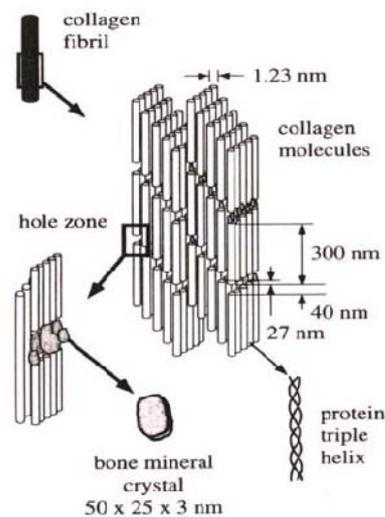


Figura 5- Schematizzazione della disposizione ordinata delle molecole di collagene all'interno di una fibrilla. In evidenza la fase minerale in una zona di bassa densità

Volendo realizzare materiali con proprietà avanzate, prendendo spunto da ciò che è in grado di realizzare la natura, risulta indispensabile la comprensione, per quanto possibile, di questi processi. In dettaglio, è stato studiato il processo di mineralizzazione del collagene nella formazione del tessuto osseo (figura 5).

Dal punto di vista chimico fisico, il processo di formazione della fase solida apatitica a base di Ca-P nell'osso, rappresenta una trasformazione di fase che avviene con l'attiva partecipazione di una componente organica, che ha funzione di sito di nucleazione della fase minerale. Gli studi condotti al riguardo mostrano chiaramente che la calcificazione delle fibrille di collagene, avviene attraverso un processo estremamente intimo e altamente organizzato. La formazione dei cristalli apatitici sulle fibrille di collagene (figura 5), inizia in corrispondenza delle regioni in cui la fibrilla presenta una minor densità (Hole zone); i cristalli crescono con

l'asse *c* orientato parallelamente all'asse della fibrilla di collagene, all'interno della quale sono collocati.

Il processo di calcificazione, inteso anche come processo di maturazione del tessuto osseo, inizia contemporaneamente in più siti di nucleazione distinti portando ad una distribuzione di più cristalli, formati in più zone a minor densità all'interno di fibrille singole, separate tra loro da regioni non mineralizzate. Ciò significa che ogni fibrilla singola e unidirezionale, rappresenta un sito di nucleazione indipendente. Il fenomeno della progressiva calcificazione delle fibrille di collagene e, quindi, del tessuto, è caratterizzato principalmente dalla presenza di un progressivo aumento del numero di siti di nucleazione indipendenti all'interno di un numero crescente di regioni, a bassa densità, delle fibrille del collagene. L'aumento progressivo della massa di fase inorganica, che si verifica durante il processo di mineralizzazione, è il risultato della moltiplicazione dei cristalli attraverso nucleazioni secondarie nelle singole zone a bassa densità. I cristalli, nel tempo, subiscono solo un piccolo aumento della cristallinità (intesa come dimensione dei singoli cristalli), quindi l'aumento di massa della fase minerale è dovuto principalmente all'aumento del numero dei cristalli e non della loro dimensione. I cristalli all'interno delle fibre di collagene crescono in numero e, in piccola parte, anche in dimensione, estendendosi nelle zone a maggiore densità (overlap) o pori<sup>7</sup> (Figura 5), in modo che ogni spazio libero all'interno della struttura della fibrilla, risulti occupato dai cristalli di fase minerale.

Il risultato del processo è una fibrilla di collagene mineralizzata, che rappresenta l'elemento costruttivo base dell'osso. Le fibrille, allineate sia assialmente che azimutalmente in uno spazio di alcuni micron, costituiscono una struttura tridimensionale estesa, altamente ordinata, in cui il collagene ed i cristalli, formano un composito stratificato.

Microscopicamente parlando, con il procedere del processo di mineralizzazione, l'osso immaturo, cambia da, materiale soffice e flessibile, a solido denso, duro e tenace, con proprietà meccaniche comparabili ai metalli.

Le dimensioni estremamente piccole dei cristalli di fase minerale, lunghi e larghi alcune centinaia di Angstroms (Å), ed alti appena poche decine (probabilmente i

crystalli più piccoli conosciuti, originati da processi biologici) creano non pochi problemi allo studio della struttura submicronica dell'osso.

## **1.2 Classificazione dei sostituti ossei**

Problemi infiammatori e degenerativi all'osso e alle articolazioni riguardano milioni di persone del mondo intero. Infatti, circa la metà delle persone, con età superiore ai 50 anni, presenta disagi cronici di questo tipo. Inoltre si prevede che la percentuale di persone fino ai 50 anni, colpite da disagi ossei, duplicherà entro il 2020. Queste malattie spesso richiedono interventi che riguardano la sostituzione totale della cartilagine, nel caso di deterioramento di quella naturale; anche numerose fratture ossee, elevati dolori alla schiena, osteoporosi ed altri problemi muscolo-scheletrici necessitano di essere risolti mediante sistemi permanenti, temporanei o biodegradabili. Perciò i biomateriali ortopedici devono essere impiantati nel corpo umano come costituenti di sistemi che sono designati per svolgere determinate funzioni biologiche, mediante sostituzione e riparo di differenti tessuti come l'osso, la cartilagine, i legamenti, i tendini o la ricostruzione dei tessuti ossei, quando necessario<sup>8</sup>.

Per le sostituzioni ossee è possibile utilizzare sostituti di origine naturale oppure sintetica.

### **1.2.1 Sostituti ossei naturali**

I diversi metodi disponibili per la ricostruzione di difetti ossei utilizzano principalmente sostituti autologhi, omologhi ed eterologhi. Il miglior sostituto osseo sia per la zona corticale che per quella spongiosa è rappresentata dall'osso autologo, che presenta ottime proprietà osteogeniche, osteoconduttive ed osteoinduttive. La cresta iliaca è spesso scelta come sito donatore, in quanto provvede a fornire osso spongioso di buona qualità ed in elevata quantità. L'osso autologo come scorta, ottenuto dalla cresta iliaca, ha comunque diversi svantaggi, in quanto allunga tutta la procedura chirurgica e comporta spesso dolore residuo e svantaggi estetici. Inoltre esso può fallire nella pratica clinica se gli elementi cellulari non sopravvivono nell'impianto. Inoltre questa pratica non può essere applicata a pazienti anziani o troppo giovani ed a pazienti con malattie tumorali. In aggiunta, l'utilizzo dell'osso autologo può causare spesso l'8.5-20% di complicazioni come ematomi, perdite di sangue, ferite ai nervi, formazione di

ernie, ferite alle arterie, fratture, difetti estetici, trapianto di tumori, e talvolta disagi cronici dal sito donatore.

I sostituti omologhi e eterologhi, a seconda della porzione di osso, sono espianati da altri umani o da animali e riguardano una seconda opzione di intervento. Il loro uso è aumentato di circa 15 volte negli ultimi dieci anni e circa un terzo di questi materiali è prodotto negli Stati Uniti. Il corrente aumento di disponibilità del tessuto ha reso possibile la realizzazione di diversi tipi di forma di tessuto. L'osso omologo presenta molte limitazioni nelle caratteristiche descritte precedentemente e porta a risultati clinici molto più variabili. Inoltre, i sistemi omologhi presentano anche il rischio di portare infezioni virali. I trattamenti al tessuto abbassano, comunque, questi rischi ma, allo stesso tempo, possono significativamente indebolire le proprietà biologiche e meccaniche dell'impianto.

### **1.2.2 Sostituti ossei sintetici**

Negli ultimi 20 anni, i materiali utilizzati per la realizzazione di impianti ossei erano gli stessi di quelli utilizzati per le applicazioni industriali. Difatti, i chirurghi disegnavano i loro impianti usando materiali già disponibili, che mostravano risultati incoraggianti nelle industrie di diversi settori, come ad esempio quello chimico, energetico, meccanico ed aerospaziale. Infatti, essendo il corpo umano un ambiente altamente corrosivo, sono richieste al materiale candidato proprietà molto stringenti.

Successivamente si è deciso di utilizzare materiali che fossero inerti, ovvero che non rilasciassero ioni nel sito dell'impianto e si è osservato che le proprietà meccaniche giocavano un ruolo molto importante nella scelta del materiale. In seguito è stato introdotto il concetto di biocompatibilità, con il fine di valutare il comportamento biologico dei materiali sintetici, eseguendo test in vitro ed in vivo. L'evoluzione della ricerca sui biomateriali e la loro disponibilità clinica durante gli ultimi 60 anni, hanno permesso di classificarli in tre differenti generazioni: materiali bioinerti (prima generazione), materiali bioattivi e biodegradabili (seconda generazione) e materiali realizzati per stimolare la risposta cellulare a livello molecolare (terza generazione).

Queste diverse generazioni devono essere interpretate dal punto di vista concettuale e non cronologico, quindi ciascuna di esse rappresenta una evoluzione alle richieste delle proprietà del materiale realizzato. Questo significa che allo stato attuale, la ricerca e lo sviluppo vanno ancora nella direzione di biomateriali che, in accordo con le loro proprietà, potrebbero essere considerati di prima o di seconda generazione.

I materiali che ciascuna generazione realizza non superano necessariamente l'utilizzo di quelli precedenti.

Le prospettive evolutive, all'interno delle tre generazioni, potrebbero fornire una idea più chiara di come realizzare e disegnare dei materiali innovativi per la risoluzione di problemi clinici ortopedici.

### **Prima generazione**

L'obiettivo di questi materiali è quello di raggiungere adeguate proprietà fisiche con una minima tossicità da parte dell'ospite<sup>9</sup>.

Essi sono di prima generazione, poiché considerati inerti in quanto riducono al minimo la risposta immunitaria e le reazioni del corpo esterno.

### **Seconda generazione**

I materiali di seconda generazione sono stati introdotti per la prima volta tra il 1980 ed il 2000 ed erano definiti materiali "bioattivi", ovvero materiali in grado di interagire con l'ambiente biologico e formare un legame sulla superficie del tessuto.

La bioattività si rivolge a ciascuna interazione o effetto che il materiale esercita sulle cellule con l'obiettivo di portarle o attivarle a fornire una specifica funzione biologica. Materiali bioattivi disegnati per il fissaggio dell'osso, il riparo e la rigenerazione portano alla deposizione in vivo di uno strato di HA sulla superficie del materiale. Dalla metà del 1980, questi materiali bioattivi sono stati utilizzati in ambito clinico, in una varietà di applicazioni dentali ed ortopediche, includendo vetri bioattivi, ceramici, vetri-ceramici e compositi.

**Terza generazione**

I biomateriali di terza generazione sono stati realizzati per stimolare la risposta cellulare a livello molecolare.

Per questi biomateriali, i concetti di bioattività e biodegradabilità sono combinati, cioè materiali biorisorbibili diventano bioattivi e viceversa. Tali materiali dovrebbero possedere proprietà in grado di stimolare e segnalare uno specifico comportamento ed attività cellulare. Teoricamente dovrebbero essere strutture porose tridimensionali che stimolino l'abitazione cellulare, l'attaccamento e la proliferazione, così come la funzionalizzazione superficiale e la sequenza peptidica, che mimino la componente extracellulare, così da scatenare una specifica risposta cellulare. Il rilascio di fattori di crescita e farmaci, così come il controllo del comportamento cellulare sono di notevole interesse. I materiali di terza generazione sembrano essere realizzati per l'ingegneria dei tessuti, che è una tecnologia emergente che propone delle soluzioni alternative al trapianto ed all'innesto del materiale. L'uso di sostituti di tipo autologo ed eterologo, infatti, presenta diverse limitazioni dovute alla scarsità dei donatori, ai problemi di rigetto, ai disagi del trasferimento ed agli elevati costi.<sup>10-12</sup>

L'ingegneria dei tessuti e la medicina rigenerativa esplorano diverse aree della ricerca su come riparare e rigenerare gli organi ed i tessuti utilizzando componenti come cellule staminali, fattori di crescita e sequenze di peptidi in combinazione fra di loro ed in combinazione con scaffold sintetici.<sup>13</sup>

Oltre alla combinazione dei tessuti di base ingegnerizzati (cellule e scaffold), ci sono altri processi come l'angiogenesi ed il rilascio di materiali nutrienti che sono cruciali per stimolare la rigenerazione dei tessuti. Sebbene l'ingegneria dei tessuti stia emergendo come un'alternativa brillante per superare i problemi legati all'utilizzo di osso autologo, eterologo e xenologo, l'impiantazione di un tessuto, come parte di un trattamento di routine per la sostituzione dell'osso, è ancora controversa. Attualmente i problemi di angiogenesi non sono ancora stati risolti. Inoltre, l'ingegneria dei tessuti richiede una manipolazione cellulare che, spesso, non dà risultati chiari e rappresenta il principale inconveniente in una pratica chirurgica per l'uso generalizzato di queste tecniche in ospedale. Nonostante ciò, l'ingegneria dei tessuti è una strategia molto promettente che fornisce numerose

possibilità per lo studio e la ricerca nel campo della medicina rigenerativa. L'ingegneria dei tessuti è interdisciplinare poiché coinvolge il contributo complementare dell'ingegnere, del chimico, del fisico e del biologo. I primi tre si occupano del miglioramento e dello sviluppo di nuovi materiali e delle tecnologie di processo utilizzate, di nuovi trattamenti superficiali, di nuove tecniche di caratterizzazione, di bioreattori e dell' introduzione di cellule. Dovranno, inoltre, essere sviluppate nuove biomolecole, come i fattori di crescita ed i peptidi che favoriscono il differenziamento cellulare, l'angiogenesi e la formazione dei tessuti.

### 1.3 Biomimetico

La natura è una fonte di ispirazione per la scienza dei materiali e le discipline ad essa associate come la chimica, la fisica, la biologia e l'ingegneria. In tutti gli organismi, dai più elementari ai molto complessi, si può osservare una molteplicità di esempi di materiali, architetture, sistemi e funzioni. L'approfondimento dello studio dei modelli naturali e i progressi in ambito scientifico hanno contribuito negli ultimi anni alla creazione di nuovi materiali, con svariate applicazioni che spaziano dall'alta tecnologia alla vita quotidiana. Alcuni esempi sono le note fibre sintetiche come il nylon, che ricorda la seta naturale, o il velcro, ispirato alla forma uncinata di semi vegetali; oppure i più recenti rivestimenti di superficie, già usati in ingegneria aerospaziale per ridurre l'attrito idrodinamico, la cui struttura imita quella dell'epidermide di grandi pesci<sup>14</sup>.

Le *performances* altamente sofisticate che caratterizzano i materiali biologici, sono il risultato di una stringente selezione, operata nel lungo corso dell'evoluzione, del materiale disponibile più adatto a svolgere una determinata funzione. La pressione evolutiva favorisce un numero limitato di componenti o principi in modo che, nello stesso organismo, pochi elementi possano ricoprire differenti ruoli. Un esempio è il collagene di tipo I, che presenta una diversa morfologia a seconda della funzione che svolge nei vari tessuti. Questa proteina, infatti, mostra la bassa rigidità e l'elevata deformazione tipica dell'elastomero nei tendini, esibisce proprietà ottiche come la trasparenza nella cornea e conferisce durezza e resistenza all'osso, dove è associato a cristalli di idrossiapatite. Sono stati anche dimostrati identici principi di organizzazione del self-assembly da fase liquida a cristallina, per una quantità di macromolecole diverse localizzate all'interno della cellula (acidi, proteine, polisaccaridi) o al di fuori di essa (matrice extracellulare). Su questo modello è stata sviluppata una recente tecnica chimica di cristallizzazione minerale in vitro, usando come templanti le fasi 'ordinate' di acidi nucleici e proteine. Le strutture biologiche sono complessi altamente integrati, dove i componenti vengono assemblati seguendo definiti pattern e in cui è stato raggiunto il giusto compromesso tra struttura e funzione. In molti

biosistemi tale alto livello di integrazione associa tre aspetti principali: la miniaturizzazione, cioè il massimo delle funzioni nel minimo volume, l'ibridazione, tra componenti organiche ed inorganiche ottimizzando funzioni e potenzialità, e una organizzazione di tipo gerarchico. La gerarchia strutturale, che si ripete identica dalla scala nanometrica a quella millimetrica, è una caratteristica delle strutture biologiche che offre la capacità di rispondere ad 'esigenze' chimiche e fisiche, ad ognuno di questi livelli. L'analisi dei modelli presenti in natura e l'applicazione delle più raffinate tecnologie odierne offrono la possibilità di ottenere materiali innovativi, a partire dai più disparati elementi a disposizione, ed il vantaggio di poterlo fare in breve tempo. Gli sforzi per meglio comprendere e controllare processi di autoassemblaggio, di separazione di fase e la chiralità nei sistemi complessi, possibilmente in relazione agli stimoli o all'ambiente esterno, resta una delle maggiori e più promettenti sfide per la creazione di materiali 'bio-ispirati'. La vera conquista richiede, però, l'approfondimento dei principi di base della costruzione degli elementi negli organismi viventi e lo studio delle proprietà fisiche e chimiche alle 'interfacce' per controllare la forma, la dimensione e la compattazione dei componenti. Sembra evidente che un approccio biomimetico alla scienza dei materiali non possa essere limitato solo al 'copiare' gli elementi della natura, ma che piuttosto debba decifrare il 'linguaggio della forma' (cioè la chimica della forma) della materia.

### **1.3.1 Biomimetica per l'ingegneria tissutale dell'osso**

Il consolidamento di un'interfaccia meccanicamente stabile, attraverso l'integrazione completa tra la superficie del dispositivo ed il tessuto osseo preesistente, è un passo essenziale per il successo di un impianto ortopedico<sup>15</sup>. Lo studio del meccanismo e l'identificazione dei fattori coinvolti nell'adesione cellulare ha assunto un ruolo centrale per lo sviluppo di biomateriali innovativi, su cui sperimentare modifiche di superficie che consentano una modulazione, a livello molecolare, del legame con le cellule. Una superficie modificata

(biomimetica) può rappresentare una sorta di matrice extracellulare artificiale in grado di fornire gli stimoli biologici adatti a guidare la formazione di nuovo tessuto: il segnale può favorire genericamente l'adesione, ma anche essere selettivo per alcuni tipi cellulari e quindi indurre una risposta specifica. Il *design* di superfici sempre più simili a quelle del microambiente fisiologico del tessuto osseo (osteomimetiche) mira ad aumentare l'osteconduttività di *scaffolds* per l'ingegneria tissutale dell'osso, sostenendo le fasi precoci della cascata di eventi che portano alla rigenerazione tissutale<sup>16</sup>. La neoformazione di osso è il risultato di una serie di azioni che ha inizio con il reclutamento delle cellule osteoprogenitrici. Nelle prime fasi di adesione al substrato le cellule osteogeniche secernono nell'ambiente circostante specifiche proteine (cruciali negli *steps* dell'adesione) che si aggregano in una specie di scaffold naturale, la matrice extracellulare. Aderendo a tale supporto le cellule proliferano, si differenziano e si organizzano per la formazione del neo-tessuto. La regolazione dei processi di proliferazione e differenziamento cellulare è mediata sia da segnali molecolari coinvolti nella comunicazione cellula-ECM e cellula-cellula, sia da fattori di crescita circolanti che interagiscono con i recettori di membrana<sup>17</sup>. I segnali chimici, fisici o meccanici, presenti nell'ambiente e trasmessi attraverso la membrana all'apparato trascrizionale, modulano l'espressione genica e si traducono in una determinata risposta della cellula allo stimolo esterno. È stato osservato che caratteristiche di una superficie, come la topografia e la composizione chimica, possono influenzare l'assorbimento e la conformazione della matrice extracellulare e quindi interagire nell'adesione<sup>18</sup>.

L'adesione cellulare è un processo che si compie in due fasi: nella prima, definita di *attachment*, si ha la formazione dei legami iniziali (legami ionici e forze di Van der Waals) tra cellule e substrato; in una successiva fase, di adesione vera e propria, vengono coinvolte le proteine della ECM e del citoscheletro. *In vitro* l'adesione cellula-substrato avviene al livello dei contatti focali. Tali molecole di adesione sono proteine trans-membrana e costituiscono un 'ponte' tra l'actina del citoscheletro e la ECM, per la trasmissione di segnali associati alla motilità cellulare.

## 1.4 L'idrossiapatite (HA)

Come già accennato, la fase minerale costituente lo scheletro dei vertebrati, è un fosfato di calcio basico che viene assimilato all'idrossiapatite; per tale ragione, vengono di seguito riportate le proprietà di questa componente inorganica.

### 1.4.1 L'idrossiapatite stechiometrica: struttura e chimica

Il nome “apatite”, deriva dal greco e significa “delusione” perché questo materiale veniva confuso con l'ametista e l'acqua marina. La formula chimica generale delle apatiti è  $M_{10}(XO_4)_6Z_2$ , dove:

- $M$  rappresenta un catione bivalente
- $XO_4$  rappresenta un anione trivalente
- $Z$  rappresenta un anione monovalente

In funzione delle differenti sostituzioni ioniche, è quindi possibile ottenere apatiti di varia natura, diverse in composizione e proprietà. La forma di apatite più comune è l'idrossiapatite (HA), un fosfato di calcio basico, di formula:



Il rapporto  $M/X$  è utilizzato per caratterizzare la stechiometria di un'apatite, nel caso dell'idrossiapatite questo corrisponderà al rapporto  $Ca/P$ , pari a 1.667. Calcio, fosforo e ione idrossido sono presenti in peso nelle seguenti percentuali:

Ione	wt%
$\text{Ca}^{2+}$	39.84%
$\text{PO}_4^{3-}$	56.77%
$\text{OH}^-$	3.39%

In figura 6 è rappresentata la disposizione degli atomi nella cella unitaria dell'idrossiapatite, in proiezione [010]. L'HA ha una struttura esagonale (dove gli assi  $a$  e  $b$  coincidono) con gruppi spaziali di tipo  $P6_3/m$ , ovvero con asse di simmetria senario, una tripla elica e un piano speculare, ed è caratterizzata dai seguenti parametri di cella:

asse  $a$  = asse  $b$ : 9,418 Å

asse  $c$  6,880: Å

La struttura dell'HA è costituita da tetraedri di ioni  $\text{PO}_4^{3-}$ , in cui due atomi di ossigeno sono sul piano orizzontale, mentre gli altri due si trovano sugli assi paralleli all'asse  $c$ . La disposizione dei tetraedri è tale per cui si vengono a creare due siti cationici cristallograficamente indipendenti. Gli atomi di Ca del sito I sono allineati in colonne parallele all'asse  $c$ , mentre gli atomi di Ca del sito II sono disposti ai vertici di triangoli equilateri, che delimitano dei canali paralleli all'asse  $c$  e rappresentano la via di accesso preferenziale per l'incorporazione di ioni estranei.

Come mostrato in figura 6, nel sito Ca(I), sono presenti sei atomi di ossigeno legati al metallo centrale, distanti in media 2,429 Å, in una struttura prismatica trigonale distorta. Gli altri tre atomi di ossigeno, invece, presentano distanze di legame pari a 2,805 Å. Nel sito Ca(II) il metallo è fortemente coordinato a quattro atomi di ossigeno arrangiati in un tetraedro distorto, con una distanza media di 2,357 Å. Ve ne sono, poi, altri due dalla stessa parte, con legami che misurano 2,512 Å e un terzo dalla parte opposta, a una distanza di 2,705 Å dal metallo centrale.

#### **1.4.2 Solubilità dell'idrossiapatite**

I fenomeni associati alla dissoluzione dell'HA, rivestono un ruolo molto significativo, poiché il loro studio permette di comprendere la fisiologia dell'osso e dei denti, in termini di calcificazione e riassorbimento. Per esempio, le principali considerazioni sull'insorgenza delle carie dentali e sull'azione di profilassi del fluoro, si basano sulla solubilità dell'HA. Molti studi hanno trattato la solubilità dell'idrossiapatite in soluzioni acquose e sono stati riportati un gran numero di costanti di solubilità, variabili nell'intervallo di  $10^{-49}$  e  $10^{-59}$ .

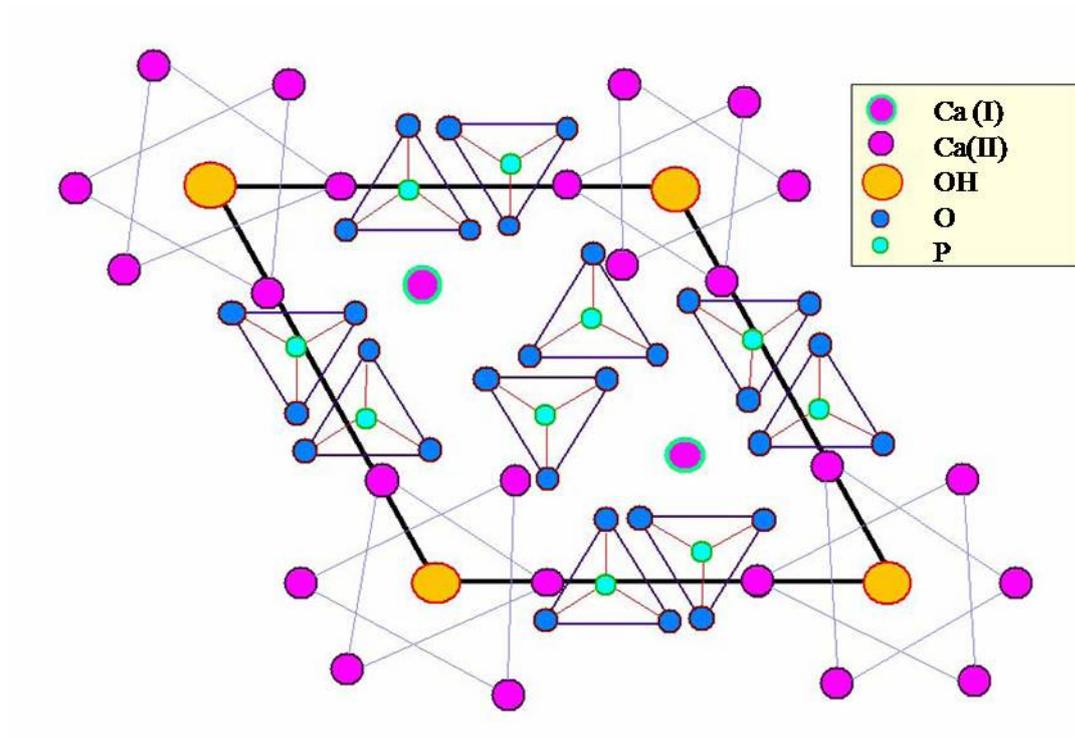


Figura 6- Visione lungo l'asse c dei dintorni degli ioni Ca (I) e Ca(II).

Diversi meccanismi sono stati proposti per chiarire il comportamento di dissoluzione dell'idrossiapatite:

1. Variazioni di solubilità possono essere attribuite alle differenze nella velocità di formazione e dissoluzione di una fase solida intermedia sulla superficie come  $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (brushite) e  $\text{CaHPO}_4$  (monetite).
2. La solubilità dell'idrossiapatite è influenzata dal rapporto tra il peso della polvere e il volume del liquido per via della variazione della composizione ionica che si verifica quando un solido è immerso in un liquido. Durante gli esperimenti di valutazione della costante di solubilità, la dissoluzione e la riprecipitazione possono causare un arricchimento o una perdita di ioni che cambia la solubilità. Il cambiamento di composizione sul piano superficiale, che influenza la misura della costante di solubilità, può essere minimizzato aumentando il rapporto solido soluzione.
3. La solubilità dell'idrossiapatite aumenta con il decrescere del pH.

4. Gli ioni superficiali sono mantenuti meno di quelli interni e quindi possono essere più facilmente solubilizzati. Quando l'area specifica è elevata, l'idrossiapatite ha una solubilità maggiore rispetto a quando la superficie specifica è più bassa.

5. I difetti cristallini, come impurità o vacanze, possono influenzare il fenomeno della dissoluzione. La reattività chimica dei solidi varia inversamente con la loro perfezione cristallina e la dimensione dei cristalli.

6. Molti anioni abbassano la solubilità dell'idrossiapatite a un moderato pH. La sostituzione di ioni  $\text{OH}^-$  con  $\text{F}^-$  abbassa la solubilità. L'inserimento di ioni  $\text{Na}^+$  e  $\text{CO}_3^{2-}$

aumenta fortemente la solubilità dell'apatite biologica.

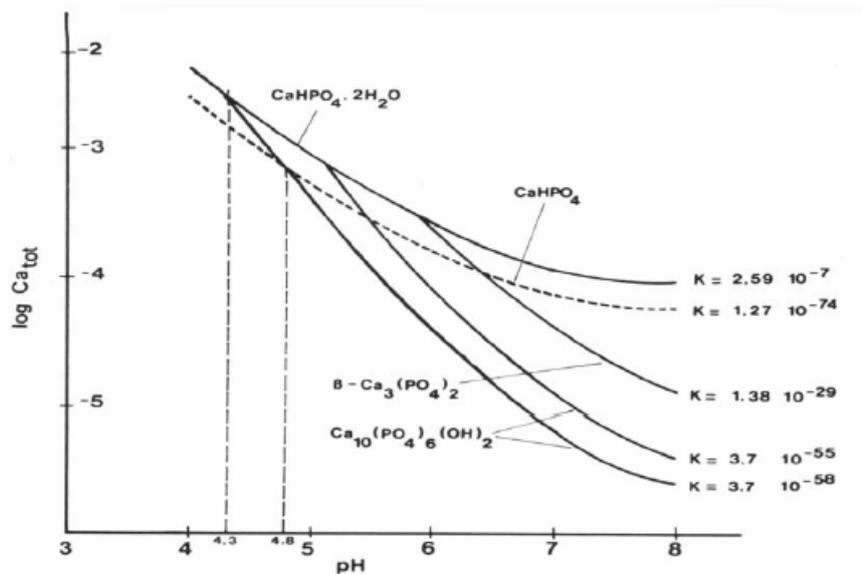


Figura 7- Isoterme di solubilità di varie fasi, nel sistema  $\text{CaO-P}_2\text{O}_5\text{-H}_2\text{O}$  a  $25^\circ\text{C}$

Per illustrare alcuni dei meccanismi sopra citati, sono riportati due esempi:

a) si è trovato che l'idrossiapatite è il più stabile calcio fosfato sopra un pH di 4.8 a  $25^\circ\text{C}$ . Sotto tale valore di pH, la monetite ( $\text{CaHPO}_4$ ) è la meno solubile. In figura 7 sono riportate le isoterme di solubilità di diversi calcio fosfati. Sebbene la monetite sia molto stabile, la formazione della brushite  $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  è cineticamente più favorita. Il punto d'intersezione dell'isoterma dell'idrossiapatite con quella della brushite si trova ad un pH di 4.3. Tuttavia, se il prodotto di

solubilità dell'apatite si sposta su alti valori, l'intersezione delle isoterme di solubilità dell'apatite e brushite si sposterà ad un alto valore di pH.

b) Il secondo esempio è quello del minerale negli smalti, che appare essere molto solubile rispetto all'idrossiapatite preparata sinteticamente. Una possibile spiegazione è la presenza di impurità nello smalto che possono cambiare la solubilità. Si è trovato che fluoro, cloro e stronzio possono essere incorporati nel reticolo del minerale dell'idrossiapatite di ossa e denti. Potrebbe essere una ragione plausibile la presenza d'idrossiapatite amorfa con una grande reattività.

### **1.4.3 L'idrossiapatite biologica**

Vi sono differenze sostanziali fra le caratteristiche dell'idrossiapatite stechiometrica e quelle dell'idrossiapatite biologica. Sebbene la struttura sopra descritta dell'HA sia stata usata per molto tempo come modello idealizzato anche per quella biologica, fra le due vi sono differenze significative a livello di cristallografia e composizione. Mentre l'HA stechiometrica è costituita unicamente da ioni  $\text{Ca}$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$  e  $\text{OH}^-$ , nelle proporzioni già citate, quella biologica contiene anche quantità variabili di altri ioni<sup>19</sup>, i quali possono entrare a far parte della struttura cristallina a seguito di sostituzioni ioniche o, più semplicemente, venire adsorbiti sulla sua superficie. L'incorporazione di ioni estranei nella struttura dell'HA, può alterare una serie di parametri strutturali e chimico-fisici dell'apatite stessa, quali: costanti reticolari, morfologia e dimensioni dei cristalliti, cristallinità, stabilità termica e solubilità, senza però modificare significativamente la struttura cristallina.

L'idrossiapatite biologica non è un materiale inerte: rientra nel complesso metabolismo osseo ed è quindi, un materiale in continuo rimodellamento. L'HA biologica è scarsamente cristallizzata ed è in grado di modificare la propria configurazione cristallina in relazione alla variazione di stimoli interni ed esterni. In condizioni fisiologiche, infatti, il suo grado di cristallizzazione aumenta con l'età e, parallelamente, aumenta il rapporto Ca/P. Un'ulteriore causa della variazione di questo rapporto, è dovuta alla presenza di ioni carbonato, del quale le apatiti biologiche, sono considerevolmente arricchite. Maggiore è la sua percentuale, più alta è l'attività metabolica del tessuto: ad esempio il suo

contenuto è basso nello smalto (un materiale praticamente inerte), mentre è maggiore nella dentina (un materiale molto attivo). Gli ioni carbonato possono essere sia adsorbiti come cristalli a livello superficiale, che incorporati nella struttura in due diversi siti cristallografici. Nel caso in cui venga sostituito lo ione idrossido, si parla di carbonato-apatiti di tipo A; nel caso di sostituzione dello ione fosfato, si parla di carbonato-apatiti di tipo B. Le carbonato-apatiti (CHA) di tipo A e B possono essere distinte sulla base di analisi del parametro reticolare  $a$  e attraverso l'analisi degli spettri FTIR. La sostituzione nel sito A comporta un'espansione del parametro  $a$ , a causa delle maggiori dimensioni del gruppo  $\text{CO}_3^{2-}$  rispetto all'ossidrile, mentre quella nel sito B, provoca una contrazione dell'asse  $a$  e una dilatazione dell'asse  $c$ . L'interpretazione degli spettri FTIR delle CHA non è sempre facile, tuttavia sono state identificate le principali bande di assorbimento per i due tipi di CHA.

Si è osservato, grazie all'esecuzione di test in vivo, che la presenza di carbonatazione in sito B, causando una diminuzione della cristallinità, porta ad un aumento della solubilità. Nell'osso, che è fra tutti il tessuto più attivo, il contenuto percentuale di carbonato è compreso tra il 3-8% in peso, variabile in funzione dell'età dell'individuo.

Il cambiamento non è limitato solo al contenuto complessivo, ma anche alla posizione in cui il gruppo carbonato entra nella struttura cristallina. Infatti è possibile osservare un maggior contenuto di carbonatazione di tipo B rispetto al tipo A nell'osso giovane, in accordo con l'associazione maggiore reattività-minore cristallinità<sup>20</sup> Le carbonatazioni sintetiche sono, quindi, da effettuarsi preferenzialmente nel sito B perché, contrariamente alla carbonatazione di tipo A che si riflette in una minore affinità dell'apatite per le cellule osteoblastiche, cui consegue una minore adesione cellulare e una ridotta produzione di collagene, rispetto all'HA non sostituita, la carbonatazione in sito B, non altera la polarità di superficie dell'apatite, non riducendone l'affinità cellulare. È quindi vantaggioso riuscire a dirigere la carbonatazione dell'HA specificamente nel solo sito B.<sup>21,22</sup>

Anche il *magnesio*, in virtù della sua presenza relativamente elevata nei tessuti mineralizzati, gioca un ruolo fondamentale nell'attività dell'apatite biologica. In particolare, la presenza di ioni  $\text{Mg}^{2+}$  in sostituzione di ioni  $\text{Ca}^{2+}$ , accelera la cinetica

di nucleazione dell'HA, ma ne inibisce la cristallizzazione in soluzione, provocando una riduzione del rapporto molare Ca/P e delle dimensioni dei cristalliti. L'incorporazione di ioni  $Mg^{2+}$ , può modificare morfologia e solubilità del biominerale e, in quanto principale inibitore della crescita dei cristalli di apatite, ne influenza dimensioni e reattività. Sperimentalmente è stata osservata la presenza di ioni  $Mg^{2+}$  all'inizio dei processi di ossificazione; il suo contenuto è elevato nelle cartilagini e nell'osso giovane, quindi nelle prime fasi dell'osteogenesi, mentre tende a scomparire nell'osso maturo, quindi, all'aumentare dell'età dell'individuo<sup>23</sup>.

Carenze di magnesio hanno importanti effetti in molte fasi del metabolismo osseo, potendo causare l'arresto della crescita, la diminuzione dell'attività di osteoblasti e osteoclasti e fragilità ossea. Di conseguenza, l'incorporazione di ioni magnesio all'interno della struttura dell'idrossiapatite, è di grande interesse per lo sviluppo di sostituti ossei.<sup>24</sup>

A causa della piccola dimensione dei cristalliti (circa  $2 \times 20 \times 40 \text{nm}$ ), i picchi di diffrazione ai raggi X dell'HA naturale, appaiono notevolmente allargati, rendendo piuttosto difficoltosa l'individuazione di altre fasi. Le conoscenze acquisite sulla composizione e la struttura dell'apatite biologica possono, quindi, essere utilizzate proficuamente per la sintesi di fosfati con particolari proprietà osteoconduttrici e biorassorbibili. Il tipo di fosfato, le eventuali sostituzioni ioniche, l'aggiunta di additivi organici o i trattamenti a cui può essere sottoposto, sono fattori che possono influenzare la velocità di riassorbimento, la velocità di neoformazione ossea, le proprietà meccaniche dell'impianto e, quindi, l'adattabilità o meno del materiale ad una specifica applicazione chirurgica. Nei prossimi capitoli saranno illustrati i metodi analitici utilizzati e le metodologie di sintesi di apatiti stechiometriche e non stechiometriche, in particolare della magnesiocarbonato- idrossiapatite (MCHA) e i risultati a cui hanno portato le caratterizzazioni delle polveri prodotte.

### **1.5 Esigenze di un materiale poroso come sostituto osseo**

Le caratteristiche fisiche che devono essere tenute in considerazione quando ci si accinge alla realizzazione di scaffold porosi riguardano la porosità totale, la distribuzione dimensionale, la morfologia e l'orientazione e l'interconnessione dei pori.<sup>25-28</sup>

Le caratteristiche dei pori sono di notevole importanza in quanto determinano il grado di crescita del tessuto osseo. In particolare, la porosità totale, la distribuzione dimensionale, la morfologia e l'orientazione ed il grado di interconnessione influenzano fortemente la penetrazione dell'impianto da parte del tessuto osseo, facendo sì che questo diventi osteointegrato. L'interconnessione dei pori permette la circolazione e lo scambio del fluido del corpo, la diffusione degli ioni, del contenuto nutrizionale, la penetrazione degli osteoblasti e la vascolarizzazione. Sulla base di ciò, quindi, le porosità chiuse non partecipano alla fisiologia del tessuto osseo a causa della mancanza di accessibilità in queste zone di corpo fluido e delle cellule.

Un ampio intervallo di porosità negli impianti porosi è necessario per far sì che si svolgano tutte le funzioni dell'osseointegrazione. I pori con diametro compreso fra i 20 ed i 50  $\mu\text{m}$  sono molto importanti per svolgere tutte quelle funzioni fisiologiche di scambio liquido, mentre pori con un diametro nel range 100-350  $\mu\text{m}$  sono adatti per la colonizzazione di cellule e la vascolarizzazione, che porta alla penetrazione del tessuto osseo all'interno della struttura ceramica.<sup>29</sup>

Perciò, oltre agli scaffold convenzionali, che presentano un'unica tipologia di porosità, sono stati sviluppati anche degli impianti con una distribuzione di pori bimodale o una porosità a gradiente che simula la struttura dell'osso naturale (corticale e spongioso).

E' stata dimostrata la dipendenza della crescita dell'osso dalle dimensioni dei pori<sup>30</sup>. Alcuni Autori riportano, comunque, che il livello di interconnessione dei pori potrebbe essere molto più critico che la dimensione dei pori stessi. Per materiali fortemente biodegradabili, il grado di interconnessione dei pori è molto più rilevante che la dimensione dei pori, mentre in materiali non degradabili l'interconnessione e la dimensione dei pori ha circa la stessa importanza.

*In vitro* gli osteoblasti riescono a passare all'interno di un diametro minimo di 20  $\mu\text{m}$ , anche se la dimensione favorevole per la penetrazione cellulare sarebbe superiore ai 40  $\mu\text{m}$ . *In vivo* la penetrazione cellulare e la formazione del tessuto cartilagineo, all'interno dei macropori, diventa possibile quando l'interconnessione dei pori è superiore ai 20  $\mu\text{m}$  mentre la formazione di osso mineralizzato avviene quando si superano i 50 $\mu\text{m}$ .

La densità apparente e la struttura influenzano le proprietà meccaniche dell'impianto finale. Una volta fissata l'interconnessione, gli impianti con pori dalle dimensioni più grandi hanno proprietà meccaniche inferiori a causa della diminuzione di densità. Richart<sup>31</sup> propone che lo spessore delle pareti dei pori sia responsabile della resistenza meccanica finale del pezzo. La resistenza a flessione ed il modulo di Young sono correlati alla porosità totale del pezzo in maniera esponenziale. La resistenza a frattura dell'impianto può essere collegata alla macropositività iniziale.

La resistenza a compressione dell'osso umano poroso varia fra 2-12 MPa per l'osso spongioso, mentre fra 100 e 230 MPa per l'osso corticale. Gli impianti artificiali porosi a base di idrossiapatite hanno una resistenza meccanica abbastanza bassa all'interno dell'intervallo 1.3-16 MPa<sup>32</sup>, ma la crescita dell'osso porta ad un'insufficiente resistenza a compressione dell'impianto poroso. Anche per basse densità di impianto questa osservazione è molto più sentita. La resistenza a compressione dei porosi a base di idrossiapatite aumenta da 2 a 20 MPa dopo 3 mesi dall'impianto. Porosi a base di fosfati di calcio con densità più bassa mostrano una maggior capacità di osteointegrazione, che si traduce anche con un miglioramento delle proprietà meccaniche. Si dovrebbe raggiungere un miglior bilanciamento fra porosità e resistenza, in modo tale che l'impianto mantenga le sue caratteristiche nel corso dell'operazione e nella fase iniziale del sito dell'impianto.

## 1.6 Le tecniche per la produzione di scaffold ceramici

Le principali tecniche di formatura, utilizzate per la produzione di schiume ceramiche, si possono riassumere in tre principali categorie, nel seguito brevemente descritte.

### Replica

La tecnica consiste nel ricoprire una schiuma poliuretanicca con una sospensione ceramica; a seguito di processi termici controllati, la preforma organica viene eliminata, generando un componente poroso che riproduce perfettamente la morfologia della tessitura sacrificale. La figura 8 schematizza la tecnica<sup>33</sup>.

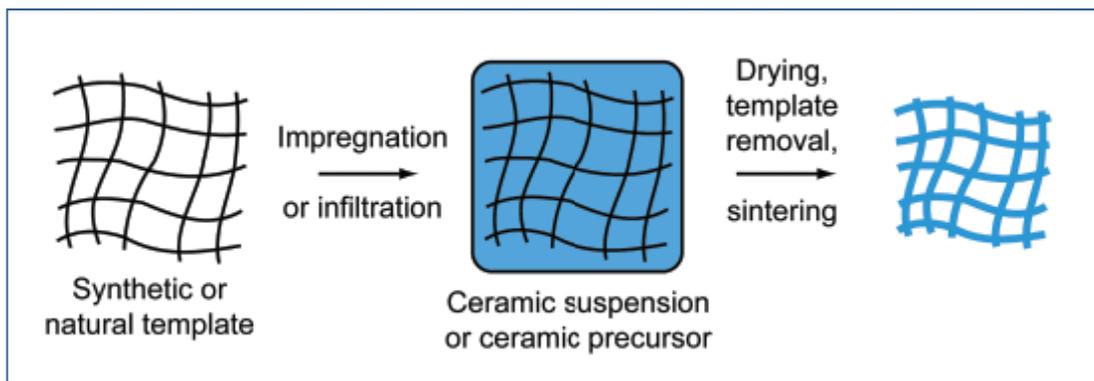


Figura 8- Schema del processo per la realizzazione di un poroso ceramico mediante un template (tecnica di replica).

L'ottimizzazione del processo prevede che la sospensione ceramica sia in grado di colmare omogeneamente tutti i vuoti presenti nella schiuma. La sospensione in eccesso viene, successivamente, rimossa attraverso processi di pressatura o laminazione, al fine di ottenere un sottile strato ceramico sulla superficie della struttura organica. La schiuma polimerica viene poi eliminata attraverso trattamenti termici, ottimizzati sulla base della sua natura chimico fisica, al fine di evitare fessurazioni o stress residui nella struttura ceramica. Una volta rimosso lo scheletro organico, la matrice ceramica è sinterizzata a medio-alta temperatura, generando strutture a porosità aperta. È necessario però sottolineare che tale

tecnica induce un'intrinseca difettualità, che si manifesta a seguito di decomposizione dello scheletro organico, come mostrato in figura 9.

Tali difetti, tipicamente di forma triangolare, sono i maggiori responsabili delle non eccellenti proprietà meccaniche che presentano i materiali porosi da replica. Una variante della tecnica consiste nel realizzare una pirolisi controllata di una schiuma polimerica o di un elemento ligneo impregnato con un pre-polimero ceramico, in modo da formare, in un primo momento, uno scheletro di carbonio e, successivamente una struttura in ossicarburo o ossinitruro di silicio.

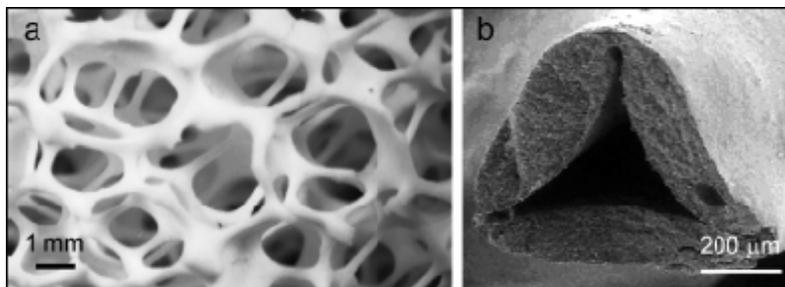


Figura 9- Microstruttura e macrostruttura di un ceramico ottenuto mediante la tecnica di replica

Nel caso dell'uso del legno, i materiali sono caratterizzati da una forte anisotropia delle proprietà meccaniche.

#### Agente porogeno

Questa tecnologia prevede la preparazione di un componente bifasico, costituito da una matrice continua di particelle ceramiche (o loro precursori) ed una fase dispersa sacrificale, uniformemente distribuita nella matrice, tale da generare, attraverso meccanismi controllati la porosità voluta. La figura 10. schematizza gli stadi del processo, in cui si osserva che il componente poroso ottenuto riproduce in negativo la morfologia della struttura sacrificale. La preparazione del componente bifasico si avvale di diverse tecniche: ad esempio, la pressatura di polveri ceramiche ad agente porogeno premiscelato, oppure utilizzando metodi ad umido, quali il colaggio in uno stampo o su nastro di sospensioni bicomponenti, o, ancora, impregnando una preforma sacrificale con una sospensione ceramica o con un polimero preceramico.

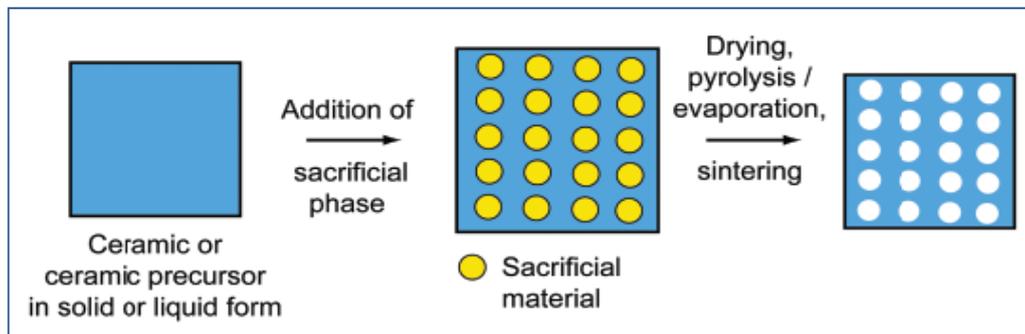


Figura 10- Schema del processo per la realizzazione di un poroso ceramico mediante scarificazione di un template.

Tra gli agenti porogeni, molto diffusi sono i componenti polimerici, tra cui le sfere di polietilene (PE) polistirene (PS) polivinilcloruro (PVC) o polimetilmetacrilato (PMMA); tuttavia trovano anche impiego le sostanze naturali (gelatina, fibre tessili quali cotone, semi di varia natura), sali inorganici ( $\text{NaCl}$ ,  $\text{BaSO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{SO}_4$ ) e particelle metalliche o ceramiche ( $\text{SiO}_2$ ,  $\text{ZnO}$ ).

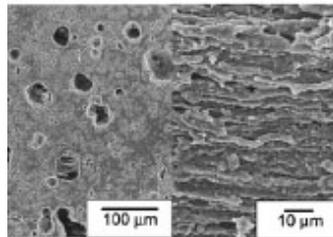


Figura 11- Microstruttura e macrostruttura di un ceramico ottenuto mediante la tecnica di scarificazione di un template.

I composti organici di origine naturale o sintetica sono rimossi, essenzialmente, mediante i processi di decomposizione termica o di pirolisi, mentre gli agenti inorganici (sali, composti ceramici o metallici) sono, in genere, estratti mediante processi chimici. Ad esempio la rimozione di sali avviene mediante ripetuti lavaggi in acqua, mentre sono necessari solventi più aggressivi (soluzioni acide) per solubilizzare le particelle ceramiche o metalliche. Per quanto riguarda la matrice polimerica, il metodo è adattabile ad una varietà di composizioni: ad esempio sono stati ottenuti con successo i ceramici porosi a base di allumina, zirconia, idrossiapatite, tricalciofosfato, titania, silice, mullite, ecc.. Una volta

rimossa la componente porogena, la matrice ceramica è sottoposta a trattamenti termici a medio-alta temperatura per sinterizzare le particelle ceramiche ottenendo il consolidamento del materiale in una struttura porosa.

La figura 11 mostra la microstruttura di un tipico componente poroso, ottenuto attraverso questa tecnica; mediante l'analisi micro strutturale è possibile notare una struttura densa e priva di difetti delle pareti, contrariamente ai porosi ottenuti per replica.

### Agente schiumogeno

Questa tecnica consiste nell'incorporare una fase gassosa, sotto forma di bolle, in una sospensione ceramica, impiegando agenti schiumogeni. La fase gassosa può essere direttamente addizionata alla barbotina ceramica oppure ottenuta attraverso la reazione chimica di opportune miscele in soluzione. I primi agenti schiumogeni che hanno trovato impiego per questa tecnica sono il carburo di calcio, l'idrossido di calcio, il solfato di alluminio ed il perossido di idrogeno. Una semplificazione del processo ha previsto la produzione in situ di una spugna poliuretanic, attraverso la reazione chimica nella sospensione ceramica dei suoi precursori. Lo sviluppo di anidride carbonica, conseguente a tale reazione induce la formazione della schiuma.

Negli ultimi anni la tecnica è stata implementata attraverso semplice agitazione meccanica.

In tutti i casi la formazione di bolle gassose procede attraverso meccanismi di nucleazione, coalescenza e crescita: tuttavia per un controllo ottimale della distribuzione della dimensione dei pori, la coalescenza delle bolle deve essere limitata, quanto più possibile, attraverso l'utilizzo di agenti in grado di stabilizzare la schiuma. Per questa finalità, il panorama della letteratura scientifica si pone due possibilità: la stabilizzazione attraverso un componente organico (processo gel casting), o inorganico (processo sol-gel).

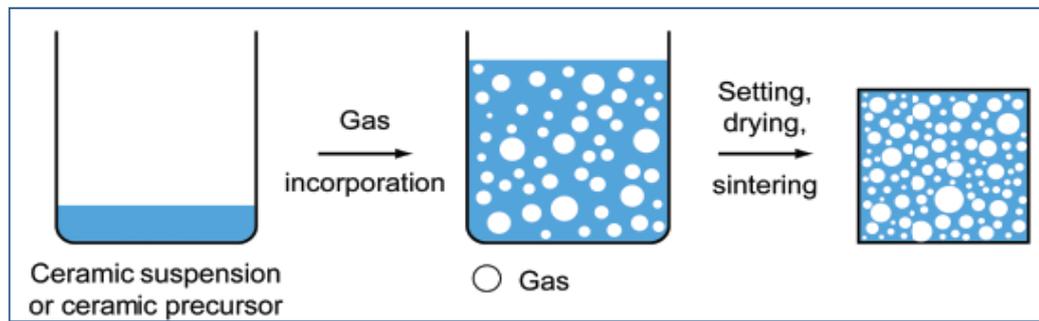


Figura 12- Schema del processo per la realizzazione di un poroso ceramico mediante foaming diretto.

Inoltre è necessario ricordare l'utilizzo diffuso di tensioattivi, oppure di particelle solide per stabilizzare una schiuma, che vengono addizionati allo scopo di diminuire l'alta area superficiale gas-liquido delle bolle, sfavorendone la crescita e la coalescenza. La figura mostra una tipica struttura ottenibile mediante questa tecnica. La struttura delle struts è densa e priva di importanti difettualità, analogamente a quanto avviene impiegando un agente porogeno.

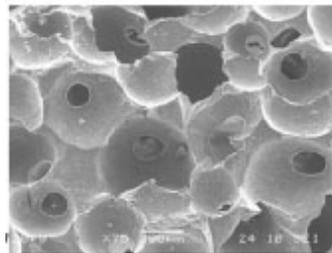


Figura 13- Macrostruttura di un campione ottenuto mediante la tecnica di foaming.

A seconda del metodo di formatura scelto, la sospensione deve presentare specifiche caratteristiche. Infatti nel metodo della replica è molto importante il parametro della viscosità, in quanto la sospensione deve essere in grado in un primo momento di impregnare completamente la spugna polimerica con una facile rimozione dell'eccesso. Per quanto riguarda, invece, la tecnica dell'agente schiumogeno, il parametro fondamentale è la stabilità della schiuma e della sospensione, in modo che le bolle d'aria prodotte non subiscano fenomeni di coalescenza, facendo variare la distribuzione porosimetrica del componente finale. Non ci sono, invece, requisiti necessari per l'impiego dell'agente porogeno, se

non a livello della densità della polvere ceramica sospesa nel mezzo di dispersione, che non deve differire in maniera significativa da quella della fase sacrificale.

### **1.6.1 Freeze casting**

La tecnica del freeze casting si realizza congelando una sospensione (acquosa o non), sublimando poi la fase solidificata ed, infine, sinterizzando il materiale allo scopo di consolidarne la struttura. La porosità ottenuta è costituita da canali unidirezionali, nel caso di un congelamento unidirezionale, dove i pori sono la replica dei cristalli del solvente. La tecnica si presenta piuttosto versatile e presenta diversi vantaggi, in particolare quando si utilizza acqua come solvente.

#### **Principi di processo**

La tecnica del freeze casting, inizialmente, era stata utilizzata per la realizzazione di “near net shape forming technique”, per la realizzazione di materiali densi. Ciascun cristallo di ghiaccio si trasformava in porosità durante il processo, introducendo difetti indesiderati in campioni teoricamente densi. Solamente più tardi è stato possibile capire che la formazione e la crescita dei cristalli poteva sostanzialmente essere un vantaggio, se opportunamente controllata, in quanto sarebbe stato possibile ottenere materiali ceramici con una specifica porosità<sup>34</sup>.

Nel freeze casting, le particelle in sospensione sono respinte dal fronte in movimento di solidificazione e si impilano le une sulle altre, permettendo la crescita dei cristalli del solvente. I diversi materiali ceramici hanno dimostrato che la tecnica è fortemente influenzata dalle interazioni di tipo fisico che si instaurano fra le particelle ceramiche e, quindi, materiali differenti non influenzano fortemente il processo<sup>35</sup>.

Il processo può essere suddiviso in quattro stadi di seguito riportati.

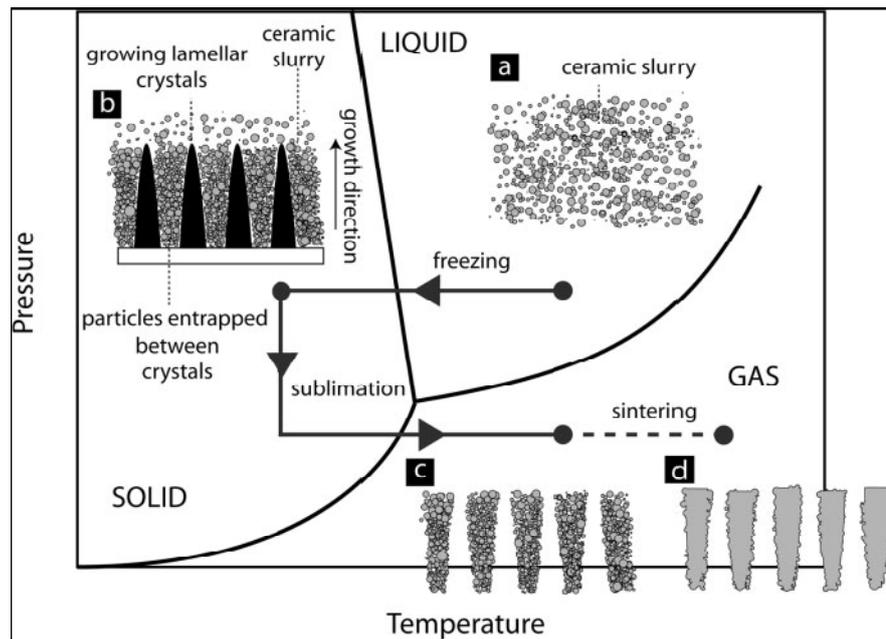


Figura 14 - I quattro step del processo di freeze-casting : la preparazione di una sospensione, la solidificazione, la sublimazione e il sintering.

### La preparazione della sospensione

La sospensione ceramica utilizzata per il freeze casting è molto simile a quella utilizzata per lo slip-casting. La polvere ceramica deve essere correttamente dispersa in un liquido (il solvente) insieme al disperdente ed al plastificante. La temperatura della sospensione deve essere mantenuta nell'intervallo in cui il solvente è liquido, ad esempio per l'acqua deve essere mantenuta a  $t$  ambiente mentre per il camfene a  $60^\circ$ .

La quantità di solido caricata può variare dal 10 al 40% (in volume) ed influenza la porosità finale del campione. La stabilità della sospensione deve essere opportunamente valutata in modo da evitare fenomeni di aggregazione durante lo stadio del congelamento. Infine la presenza del legante è fondamentale a garantire una certa maneggiabilità al corpo ceramico dopo la sublimazione.

### Solidificazione della sospensione

Questo stadio è quello critico del processo, in quanto determina la struttura e le caratteristiche finali della porosità nel campione. Durante questo stadio, i cristalli di solvente nucleano e, in determinate condizioni, si accrescono all'interno della sospensione. Le particelle ceramiche in sospensione sono respinte dal fronte di solidificazione, concentrate ed intrappolate fra i cristalli. Per indurre questo fenomeno di segregazione, la sospensione è posta all'interno di uno stampo in cui la trasmissione del freddo è controllata.

Diversi strumenti, utilizzati anche sui polimeri, sono stati realizzati in modo da fornire diverse condizioni di solidificazione. Temperature inferiori a 0°C sono richieste quando si utilizza acqua, mentre con il camfene si può utilizzare la temperatura ambiente..

Lo stampo deve anche tenere in considerazione le variazioni di volume ( $\Delta V$ ) dovute al processo di solidificazione del solvente; negativo nel caso del camfene, positivo nel caso dell'acqua. Le condizioni di congelamento sono strettamente collegate alla struttura e alle caratteristiche della porosità finale del materiale

#### Sublimazione del solvente

Completata la solidificazione, vengono mantenute le stesse condizioni di bassa temperatura e si riduce la pressione, sulla base delle caratteristiche del solvente. In queste nuove condizioni il solvente comincia a sublimare, ovvero a passare dalla fase solida a quella di gas. La porosità è creata in corrispondenza dei cristalli di solvente e quindi la struttura porosa del corpo in verde è la replica della struttura creata dal solvente. Nel caso in cui si utilizzi acqua si può semplicemente utilizzare un liofilizzatore. Nel caso del camfene, invece, non sono necessarie delle particolari apparecchiature.

#### Sinterizzazione e consolidamento del corpo in verde

Una volta che tutto il solvente è stato eliminato, il corpo in verde può essere sinterizzato con un convenzionale ciclo di sintering. La scarsa resistenza del corpo in verde previene l'uso di un trattamento di sintering sotto pressione. La scarsa presenza di residuo organico non comporta cicli particolari di debonding. Durante il processo di sintering la microporosità può essere eliminata, mentre la macroporosità creata dal solvente è mantenuta.

## Strutture e proprietà

### Strutture

#### Macroporosità

La porosità dei materiali sinterizzati è replica dei cristalli originali del solvente. Si possono ottenere diverse morfologie dei pori, a seconda della scelta del solvente, della formulazione della sospensione e delle condizioni di solidificazione. Infatti, la solidificazione è spesso direzionata, in quanto i canali porosi crescono, nei campioni, dal basso verso l'alto. Un congelamento omogeneo, che si realizza con una omogenea nucleazione dei cristalli di ghiaccio, porta ad un'architettura lamellare porosa. Dopo sintering, le pareti ceramiche possono essere completamente densificate senza una porosità residua, a seconda dalle condizioni in cui si è eseguito il sintering. Nel caso particolare in cui si utilizzi acqua come solvente, la struttura è tipo lamellare, con la presenza di canali fra le pareti ceramiche. Questa particolare morfologia può essere compresa facendo riferimento a basi di cristallografia e caratteristiche di crescita dei cristalli.

#### Orientazione della macroporosità

I canali porosi possono essere orientati, a seconda delle condizioni di solidificazione. In molti casi, lo stampo in cui è posta la sospensione è a contatto nella parte inferiore con una superficie fredda. I cristalli di solvente sono perciò portati a crescere verticalmente, lungo la direzione imposta dal gradiente termico. Comunque, la differenza di gradiente termico può essere controllata, in modo da indurre una differente morfologia-anisotropia nella struttura finale.

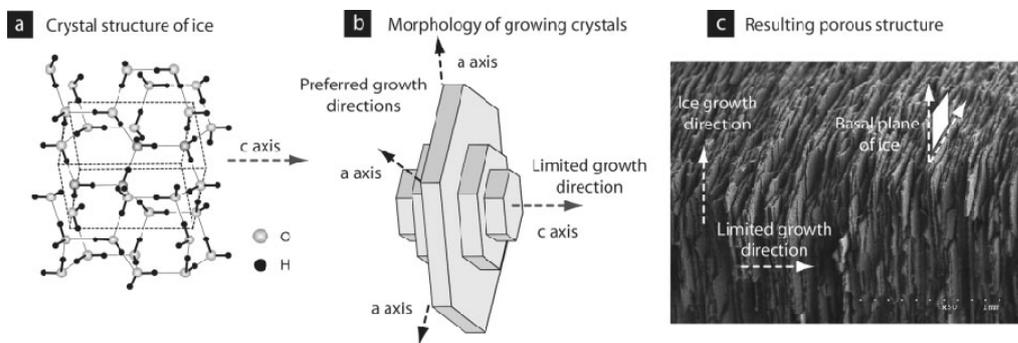


Figura 15- Struttura dei cristalli di ghiaccio dove (a) rappresenta la crescita anisotropa dei cristalli, (b) la struttura lamellare dei cristalli e (c) la risultante struttura porosa.

### Rugosità superficiale delle pareti

La superficie delle lamelle mostra una particolare topografia, con strutture dendritiche che corrono nella direzione di solidificazione. Queste caratteristiche sono omogenee nella forma e nella distribuzione, ma variano in dimensione a seconda delle condizioni di congelamento e della natura del solvente, delle caratteristiche della polvere di partenza e delle condizioni di sintering.

### Ponti ceramici

Un'altra caratteristica di queste strutture è la presenza di ponti ceramici trans-lamellari che possono essere di due tipi differenti. Il primo corrisponde all'accrescimento di strutture dendritiche che, eventualmente, collegano come ponti due lamelle adiacenti. Il secondo tipo riguarda, invece, i campioni in cui la sospensione di partenza è molto concentrata. La morfologia di queste strutture è spesso abbastanza differente, così che i dendriti ricoprono interamente le lamelle ceramiche, suggerendo altri meccanismi di formazione. È stato suggerito che potrebbero essere causati da condizioni specifiche che si verificano durante il congelamento lento di sospensioni altamente concentrate.

A seconda della grandezza della punta di separazione e di come vengono intrappolate le particelle ceramiche, queste potrebbero non collegare direttamente due ponti adiacenti. Questo fenomeno appare essere dipendente dalla natura del solvente e dalla morfologia di accrescimento dei dendriti.

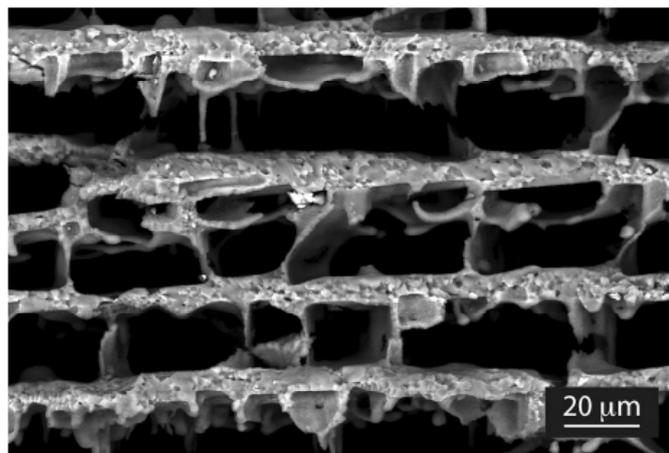


Figura 16- Ponti ceramici in campioni porosi di allumina.

### Proprietà

Sono state investigate diverse proprietà e la maggior parte dell'attenzione è stata posta al controllo della struttura e delle condizioni di processo. Molti articoli riportano che il maggior difetto delle ceramiche cellulari è la resistenza a compressione. La resistenza a compressione è di particolare importanza, soprattutto nei ceramici, poiché essi sono materiali intrinsecamente fragili.

La struttura lamellare rende, quindi, il campione poroso anisotropo in compressione, caratteristica fondamentale che lo rende molto simile all'osso.

### **Formazione e controllo della struttura**

I parametri che possono influenzare la struttura finale del campione sono coinvolti in tutti gli stadi del processo: preparazione della sospensione (includendo quindi le caratteristiche della polvere di partenza), solidificazione e sinterizzazione. Alcuni parametri molto specifici sono legati al cuore del processo, come il congelamento della sospensione. Lo stadio di solidificazione è molto critico e determina la struttura porosa finale del campione; molte delle caratteristiche della porosità sono create durante questo stadio.

La formazione di strutture irregolari è una caratteristica comune degli innumerevoli processi di solidificazione. Il controllo della regolarità e della dimensione della struttura è, spesso, una chiave importante per la comprensione delle proprietà finali del materiale.

Molte delle caratteristiche del campione poroso ceramico, ottenuto per freeze-casting, possono essere comprese applicando i principi generali della solidificazione.

### Formazione della struttura: le interazioni fra il fronte di solidificazione e le particelle ceramiche

Al fine di ottenere campioni ceramici con una struttura porosa, devono essere soddisfatte due esigenze:

- 1) Le particelle ceramiche devono essere respinte dal fronte di avanzamento del ghiaccio ed intrappolate fra i cristalli di ghiaccio in crescita. Questo aspetto può essere compreso considerando le interazioni fra il fronte di avanzamento del solvente in solidificazione e le particelle in sospensione.

Si può utilizzare, come primo approccio, un semplice criterio termodinamico.

La condizione termodinamica perché una particella possa essere respinta dal fronte di solidificazione è che ci sia un aumento dell'energia superficiale quando le particelle non sono respinte dal solido

$$\Delta\sigma = \sigma_{sp} - (\sigma_{lp} + \sigma_{sl}) > 0 \quad (1)$$

dove  $\sigma_{sp}$ ,  $\sigma_{lp}$ ,  $\sigma_{sl}$  rappresentano le energie interfacciali associate, rispettivamente, alle interfacce solido-particella, liquido-particella e solido-liquido. Quando questo criterio è soddisfatto e le particelle sono respinte dal fronte di avanzamento, si dovrebbe formare un film di liquido fra il fronte di solidificazione e le particelle, in modo da mantenere il trasporto delle molecole attraverso l'accrescimento dei cristalli. Quando la velocità del fronte aumenta, lo spessore del film diminuisce. Esiste una velocità critica,  $v_c$ , per la quale lo spessore non è abbastanza elevato da permettere il flusso delle molecole che consente la crescita dei cristalli dietro ad esse, che restano, così, incapsulate all'interno del solido.

Una considerevole numero di lavori sperimentali e teorici ha riguardato questo problema e diversi andamenti dipendono dalla velocità critica delle particelle di materiale. Si sono trovate al riguardo poche referenze.

I principali parametri fisici che devono essere tenuti in considerazione sono: la viscosità della sospensione, la dimensione delle particelle, lo spessore del film e la variazione di energia libera espressa dall'equazione 1. Sebbene la complessità del sistema lascia ancora spazio alla discussione di altri tipi di modelli ed all'influenza di altri parametri fisici, la morfologia risultante dipende principalmente dalle interazioni liquido-solido.

- 2) Il fronte del ghiaccio deve avere una morfologia non-planare. Infatti, se il fronte è planare tutte le particelle sono raccolte su di un lato del campione e, quindi, il campione ottenuto non presenta una porosità omogenea. Questo è anche un fenomeno che avviene in natura nel processo di purificazione dall'inquinamento. Comunque, per realizzare strutture porose, si deve verificare la redistribuzione delle particelle, che devono essere respinte dai fronti di solidificazione e raccolte fra essi. La

morfologia dei fronti sarà poi dettata dall'architettura finale del materiale. All'inizio dello stadio di solidificazione, l'interfaccia è planare e deve mostrare una transizione da una morfologia irregolare ad una complessa morfologia dendritica.

#### Influenza dei processi e dei parametri fisici

##### Solvente

La scelta del solvente è cruciale, sia riguardo alle condizioni di processo che alle caratteristiche finali della struttura desiderata. Inizialmente si utilizzava solamente acqua, mentre ora sono in fase di sperimentazione anche altri tipi di solventi. Questi devono, comunque, presentare diverse caratteristiche: temperature di solidificazione facilmente raggiungibili, viscosità del liquido adeguata, limitate variazioni di volume, alta pressione di vapore allo stato solido per permettere la sublimazione sotto determinate condizioni di temperatura e pressione e buona compatibilità ambientale. Oltre all'acqua ed al camfene, principalmente utilizzati nelle applicazioni ceramiche, si può utilizzare, come solvente, anche l'anidride carbonica per i sistemi polimerici. La struttura ottenuta in presenza di anidride carbonica è simile a quella realizzata con il camfene, ma con strutture dendritiche molto più complesse.

##### Polvere ceramica

Le proprietà della polvere di partenza possono avere un effetto notevole sulle caratteristiche finali del campione, sebbene siano stati riportati ancora pochi risultati. Il cuore del processo è basato sulle interazioni fra le particelle e il fronte di solidificazione, per cui un elevato numero di parametri può modificare questo tipo di interazione, come ad esempio la dimensione delle particelle, la loro distribuzione, la forma, la rugosità e la tensione superficiale

##### Formulazione della sospensione

Come in ciascun processo ceramico, si deve ottimizzare la formulazione della sospensione. Per assicurare una struttura omogenea nel materiale sinterizzato, si devono evitare tutti gli effetti di segregazione. Inoltre la sospensione deve essere stabile durante l'intero processo di congelamento. La microstruttura può anche essere modificata variando la concentrazione della sospensione di partenza. Il solvente, inizialmente presente nella sospensione, è convertito dapprima a solido

ed in seguito è eliminato per formare la porosità. Mediante la tecnica del freeze-casting, si può ottenere un ampio range di porosità, approssimativamente dal 25 al 90%. La formulazione può essere modificata variando gli additivi, come ad esempio il polistirene ed il glicerolo, allo scopo di ottenere un certo effetto finale. Questi additivi influenzano la viscosità, la tensione superficiale e modificano le condizioni di sopra-congelamento.

#### Condizioni di solidificazione

La direzionalità della solidificazione è critica ai fini della direzionalità desiderata della porosità. Quando le sospensioni solidificano senza l'applicazione di nessun gradiente, i cristalli possono nucleare ovunque, senza avere un accrescimento preferenziale. Questa condizione fa sì che si ottenga una porosità con una struttura random. Quando, invece, le condizioni sperimentali permettono di imporre un gradiente di temperatura definito, i cristalli del solvente saranno forzati a crescere lungo una direzione preferenziale imposta da questo gradiente.

Dal momento che la temperatura è sempre strettamente controllata, i cristalli e, dunque, i canali porosi possono correre per l'intero campione, raggiungendo la dimensione di pochi centimetri.

Oltre alla direzionalità, possono essere importanti anche le condizioni di nucleazione. Se la sospensione è, rapidamente, parzialmente raffreddata ("quenched"), come, ad esempio, quando il campione è posto a contatto con l'anello raffreddante a temperatura negativa, il congelamento iniziale non è regolare. Sebbene le lamelle ed i canali vengano osservati nell'intero campione, la loro orientazione sopra la sezione parallela al fronte del ghiaccio è completamente casuale. Si osservano colonie di pori allineati localmente, ma non è stato trovato un ampio intervallo di ordine. Un congelamento omogeneo risulta in più centri di nucleazione omogenei, che portano a strutture orientate ed continue. architetture porose lamellari, con un ampio range di pori, sia in direzione parallela che perpendicolare al fronte del ghiaccio. Quando la cinetica di congelamento aumenta, la velocità del fronte di solidificazione aumenta e lo spessore dei canali e delle lamelle ne è fortemente influenzato. Una velocità di congelamento più elevata determina, invece, una struttura più fine.

### Sintering

Come per gli altri processi ceramici, lo stadio del sintering può essere ottimizzato per controllare la densità e la porosità finale del pezzo. Oltre alla densificazione delle pareti ceramiche, l'effetto del sintering non influenza molto la struttura e le caratteristiche del campione.

L'unica variazione riportata è la formazione di grani fibrosi allungati, durante il processo di sintering, nel caso di utilizzo del nitrato di silicio, che si crede sia dovuto ad alcune trasformazioni di fase vapore-solido.

### **Limiti**

#### Direzionalità della porosità

La direzionalità della porosità può essere controllata dalle condizioni di solidificazione, che portano a strutture unidirezionali similmente orientate. Nonostante, si devono mettere a punto particolari condizioni, come ad esempio la solidificazione in direzione radiale.

Si possono ottenere dei suggerimenti studiando come è stata applicata la tecnica del freeze-casting a campioni polimerici; in particolare è stato possibile ottenere delle morfologie a griglia. Alcuni di questi concetti possono essere estesi ai campioni ceramici.

#### Spessore delle pareti, dimensione dei pori e cinetica di solidificazione

Diversi studi evidenziano le relazioni fra la cinetica di solidificazione e la dimensione dei pori, nei porosi ceramici congelati. Esse sono state messe in luce nelle tecniche di processo basate sul congelamento direzionale, includendo materiali polimerici e metallici. Sono stati sviluppati diversi criteri al fine di predire gli spazi dendritici in funzione della cinetica di solidificazione e sono stati identificati diversi parametri sperimentali da cui dipende il processo. Come già detto, maggiore è la velocità di congelamento, più fine è la struttura finale. Nonostante ciò, i limiti che si incontrano nel caso di ceramici porosi, sono dovuti a due fenomeni principali: la solidificazione del solvente e le interazioni fra il solvente in congelamento e le particelle ceramiche.

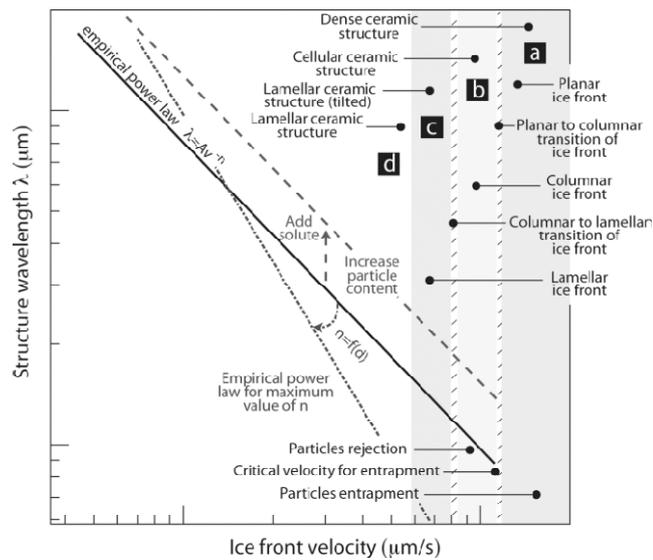


Figura 17- Strategie e limiti per controllare la struttura finale in un campione ottenuto mediante freeze-casting.

### Morfologia dei pori

La morfologia e le caratteristiche dei pori sono influenzate da diversi parametri indipendenti o interconnessi fra di loro, come visto in precedenza.

La variazione di tali parametri ha una ripercussione diretta sulla struttura dei materiali. In particolare è stato evidenziato che la morfologia dei pori è influenzata direttamente da tre parametri.

#### *Natura del solvente*

La natura del solvente è uno dei parametri più critici. Le proprietà cristallografiche del solvente allo stato solido definiscono la struttura del materiale finale, per esempio lamellare con acqua, dendritica con camfene e prismatica in presenza di alcool terz-butilico.

L'ottenimento di morfologie radicalmente differenti implica, quindi, una scelta del solvente con proprietà diverse, ma sarà limitato dalle esigenze illustrate precedentemente.

#### *Condizioni di congelamento*

Sia la cinetica che la direzionalità delle condizioni di congelamento può essere utilizzata per modificare la morfologia dei pori. Per le ragioni già esposte, le

condizioni di congelamento influenzano sia la dimensione che la morfologia dei pori, così che questi due parametri saranno considerati indipendenti.

#### *Dimensione delle particelle*

L'omogeneità della struttura porosa viene persa quando le particelle hanno dimensione troppo simile alla dimensione dei cristalli del solvente. Le caratteristiche morfologiche dei cristalli non possono correttamente replicare la struttura porosa finale se la dimensione delle particelle è dell'ordine delle dimensioni dendritiche.

Di conseguenza, la dimensione delle particelle deve essere mantenuta al di sotto della lunghezza della struttura desiderata. Ad esempio, particelle dell'ordine del micron non possono essere utilizzate per creare strutture nanometriche. Il freeze-casting sembra essere molto interessante per creare strutture porose con una dimensione dei pori inferiore a qualche centinaia di micron. In questo caso, per ottenere una struttura omogenea e ben definita, si devono utilizzare polveri dalle dimensioni inferiori al micron. Ovviamente deve essere tenuta in considerazione anche la distribuzione dimensionale delle particelle e l'eventuale presenza di agglomerati che può influenzare l'omogeneità del campione finale.

#### Tempo del processo e dimensioni del pezzo

Due stadi del processo sono considerati critici rispetto al tempo del processo totale ed alle dimensioni finali del pezzo: il congelamento e la sublimazione.

#### *Congelamento*

Il tempo di congelamento dipende, principalmente, da due parametri: la lunghezza di struttura desiderata e le dimensioni finali del pezzo. Riguardo alla struttura del pezzo desiderata, il freeze-casting sembra offrire opportunità univoche per dimensioni al di sotto dei 100 micron. Le cinetiche di congelamento richieste sono abbastanza rapide così che il tempo del processo rimane ragionevole. L'ottenimento di pori più piccoli implicherà congelamenti più rapidi, così che i tempi di congelamento saranno fortemente ridotti.

Anche le dimensioni finali del pezzo devono essere tenute in considerazione. I campioni riportati in letteratura presentano uno spessore compreso fra 1-3cm, e, quindi, si fa riferimento ad una scala da laboratorio. Il tempo di congelamento

sarà maggiore o minore in funzione dello spessore del campione, anche se per pezzi di grande dimensione è molto difficile riuscire a mantenere omogenei l'intervallo di temperatura e la cinetica di congelamento. Per la realizzazione di tali pezzi, è necessario assicurarsi che la sospensione sia stabile durante tutto il periodo del congelamento e che ci siano dei sistemi di accurato controllo delle condizioni sperimentali.

#### *Sublimazione*

Il tempo necessario alla sublimazione del solvente è direttamente dipendente dalle dimensioni del campione. Per campioni con uno spessore di qualche centimetro, la sublimazione può avvenire nel tempo di una notte. Anche questo stadio deve, comunque, essere opportunamente controllato per evitare la formazione di difetti durante la transizione di fase solido-gas e questo controllo può diventare problematico per pezzi di grande dimensione. Si devono comunque mettere a punto soluzioni tecniche per trattare pezzi di grande dimensione.

### 1.6.2 Foaming

Nei metodi di foaming diretto, i materiali porosi sono prodotti mediante l'incorporazione di bolle d'aria all'interno di una sospensione o di un mezzo liquido che è, successivamente, consolidato al fine di ottenere una struttura che mantenga inglobate le bolle d'aria. In molti casi, le strutture porose sono sinterizzate ad alta temperatura al fine di ottenere materiali ceramici porosi con elevata resistenza a compressione.

La porosità totale dei campioni ceramici derivanti da foaming è proporzionale alla quantità di gas incorporato nella sospensione o nel mezzo liquido. La dimensione dei pori è determinata dalla stabilità del poroso umido prima di essere consolidato. Le schiume allo stato umido sono sistemi termodinamicamente instabili che tendono a diminuire l'energia libera mediante coalescenza delle bolle. Questi processi di destabilizzazione aumentano significativamente la dimensione delle bolle incorporate, portando a pori più grandi nella microstruttura finale cellulare. Perciò, l'aspetto più critico nel foaming diretto è quello di trovare l'approccio ottimale per la stabilizzazione delle bolle d'aria, incorporate all'interno della sospensione o mezzo liquido. Di seguito vengono presentati i principali metodi utilizzati per la stabilizzazione delle schiume.

#### Stabilità di una sospensione

Le schiume liquide sono sistemi termodinamicamente instabili per la presenza dell'interfaccia liquido-gas. I principali meccanismi di destabilizzazione sono il *drenaggio*, la *coalescenza* (rottura del film) e la *disproporzione* (maturazione di Ostwald).

Il *drenaggio* rappresenta la separazione fisica fra la fase liquida e quella gassosa di una schiuma per effetto della gravità (figura 18A). Nelle schiume in cui avviene il fenomeno del drenaggio, le bolle di gas si muovono verso l'alto a formare uno spesso strato denso, mentre la fase più pesante si concentra nel fondo, come è illustrato nella figura 18<sup>33</sup>.

Le bolle accumulate nella parte superiore generalmente si riarrangiano e si deformano per formare un sistema altamente impacchettato con cellule poliedriche. La schiuma risultante mostra una microstruttura a tre dimensioni

caratterizzata da film sottili fra le facce delle bolle che si toccano e l'intersezione di tre film adiacenti, chiamati angolo di plateau.

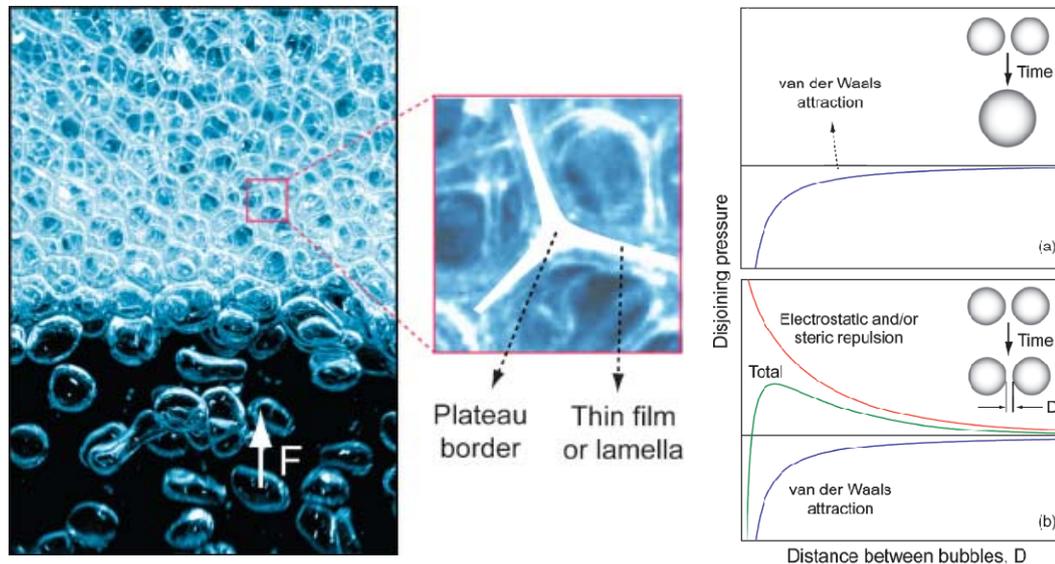


Figura 18-A\_ Fenomeno di drenaggio in una schiuma ; B\_ Bilancio delle forze attrattive e repulsive di Van Der Waals, fra due bolle alla distanza  $D$ . il fenomeno della coalescenza è favorito dalle forze di di Van der Waals

La *coalescenza* avviene quando un film sottile, formato dopo drenaggio di un sistema, non è abbastanza stabile nella zona di contatto, e, quindi, ne deriva l'associazione di due bolle adiacenti. La stabilità del film sottile è determinata dalle interazioni attrattive e repulsive come schematicamente rappresentato in figura 18B, dove le forze di Van der Waals attrattive tendono a spingere le bolle le une contro le altre e rappresentano, perciò, la spinta principale a far collassare il materiale. La coalescenza può essere anche ostacolata dalle forze elettrostatiche e/o repulsive di tipo sterico, sufficientemente forti da superare le forze attrattive di Van Der Waals. Tensioattivi e biomolecole adsorbite all'interfaccia gas-liquido possono limitare questo processo, diminuendo l'energia interfacciale .

Le schiume possono essere adattate efficientemente per prevenire i processi di drenaggio e di collasso ma, raramente, per prevenire la *disproporzione*. Questo meccanismo di destabilizzazione è dovuto alla differenza di pressione di Laplace fra bolle di dimensioni differenti. La pressione di Laplace all'interno di una bolla

di gas dipende dalla curvatura dell'interfaccia aria-acqua. Per bolle sferiche di raggio  $R$  ed energia all'interfaccia gas-liquido  $\gamma$ , la pressione di Laplace è data da:

$$\Delta P = 2\gamma/R.$$

L'azione combinata di questi processi fisici può far collassare le schiume in pochi secondi dopo l'incorporazione dell'aria. Il tempo di vita di una schiuma può essere aumentato da pochi minuti a diverse ore mediante l'adsorbimento di tensioattivi a lunga catena idrofobia o di particelle all'interfaccia aria-acqua.

#### Stabilizzazione mediante tensioattivi

Diverse molecole anfifiliche a catena lunga e biomolecole come lipidi e proteine possono essere usate come agenti attivanti di superficie per stabilizzare le schiume acquose. Queste molecole rallentano la coalescenza e la disproporzione delle bolle d'aria adsorbendosi sulla superficie delle bolle d'aria e riducendo l'energia interfacciale aria-acqua<sup>33</sup>.

Comunque, dal momento che i tensioattivi adsorbono solo in parte l'energia all'interfaccia gas-liquido, lunghe catene di tensioattivi e biomolecole non possono prevenire la destabilizzazione a lungo termine. Schiume stabilizzate mediante tensioattivi a catena lunga, collassano in pochi minuti dopo foaming, mentre quelle stabilizzate mediante proteine mostrano disproporzione in poche ore.

Perciò il foaming diretto si basa su tensioattivi che richiedono degli agenti di setting, ovvero agenti che stabilizzano la schiuma secondo reazioni di polimerizzazione, per consolidare la microstruttura della schiuma prima di un'eccessiva coalescenza delle bolle ed una disproporzione elevata. La dimensione finale dei pori di un poroso ceramico dipende dal bilanciamento fra la cinetica di disproporzione delle bolle e la velocità di settaggio di una sospensione liquida. Pori di dimensione estremamente piccola ( $\sim 50 \mu\text{m}$ ) possono essere ottenuti usando diversi tensioattivi e dopo rapido consolidamento della schiuma umida.

La porosità totale dei campioni, che si può ottenere mediante questa tecnica, varia dal 40 al 97%. I pori ottenuti sono tipicamente sferici e possono essere indipendenti gli uni dagli altri generando, quindi, una porosità chiusa, oppure essere collegati nelle aree di coalescenza delle bolle.

Porosità chiuse sono raggiunte quando le particelle sono distribuite uniformemente attorno alle bolle di gas fino al consolidamento. Porosità aperte, che mostrano interconnessione, sono ottenute quando le particelle vengono confinate in angoli, a causa della disproporzione delle bolle.

Queste condizioni possono essere controllate ottimizzando la stabilità della schiuma, il contenuto di aria, la concentrazione delle particelle ed il tempo di settaggio<sup>33</sup>.

La tecnica del foaming genera strutture dense, dopo sinterizzazione, che portano ad incrementare la resistenza meccanica dei campioni ceramici porosi, rispetto alle tecniche di replica.

Per porosità più elevate del 90%, le pareti cellulari sono estremamente sottili e portano ad una resistenza meccanica inferiore a quella teorica stimata per le strutture cellulari. Comunque, la diminuzione della porosità genera strutture con pori chiusi, che aumentano la resistenza meccanica in quanto descritte da modelli a porosità cellulare.

#### Stabilizzazione con particelle

Le particelle con adeguata chimica superficiale presentano una efficiente stabilizzazione delle bolle di gas. Infatti le particelle adsorbite all'interfaccia gas-liquido possono rallentare i meccanismi di disproporzione e di coalescenza delle schiume per diversi giorni, rispetto alle poche ore tipiche della stabilizzazione dovuta all'aggiunta di tensioattivi.

Sulla base di questa stabilità a lungo termine, la tecnica di foaming diretto, che utilizza particelle colloidali, può essere utilizzata per produrre schiume ceramiche macropose con dimensioni dei pori più piccole di quelle ottenute con i tensioattivi. In questo metodo, l'adesione delle particelle colloidali all'interfaccia aria-acqua è promossa dal cambiamento della bagnabilità delle particelle, fino all'adsorbimento di corte catene anfifiliche sulla superficie.

E' richiesta una concentrazione minima di molecole anfifiliche per impartire sufficiente idrofobicità alla superficie delle particelle ed indurre un loro posizionamento all'interfaccia aria-acqua. Per esempio, per particelle di allumina di dimensione submicrometrica, si utilizzano acidi grassi a catena corta a pH 4.75. Infatti quando queste sostanze vengono aggiunte in modo da superare la

concentrazione critica anfifilica (nel caso specifico pari a 50 mmol/L) le particelle idrofobiche si dispongono all'interfaccia aria-acqua. In queste condizioni, quindi, sono in grado di incorporare delle bolle d'aria all'interno della sospensione

Dopo aver realizzato queste modifiche superficiali, l'aria può essere facilmente incorporata mediante agitazione meccanica, introduzione di vapori di gas o come prodotto di reazioni chimiche.

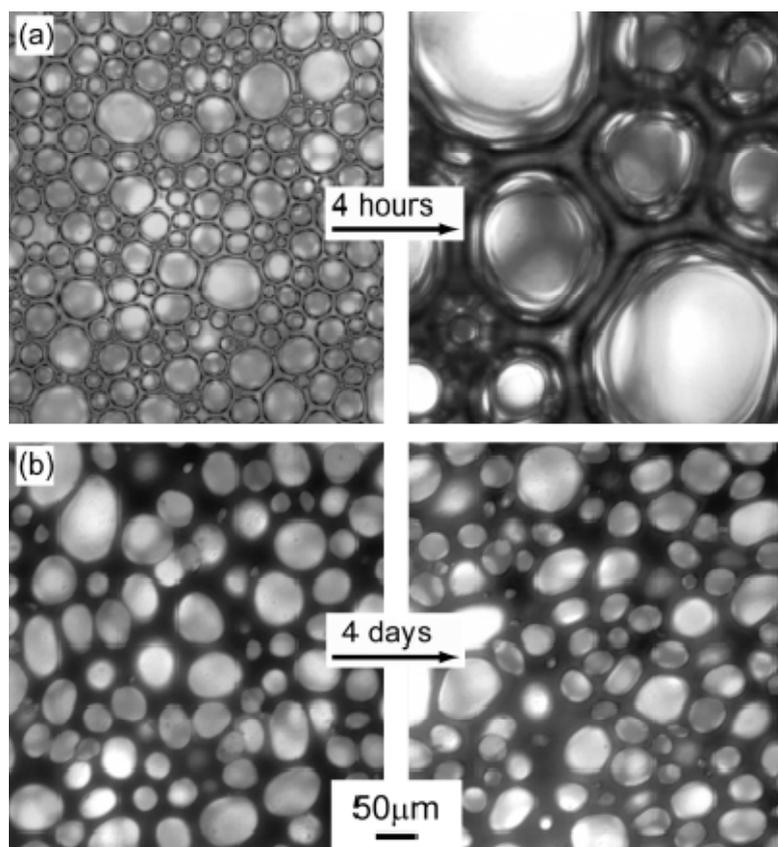


Figura 19- Confronto della stabilità di schiume stabilizzate mediante lunghe catene di tensioattivi rispetto a schiume stabilizzate mediante particelle colloidali.

Le proprietà delle schiume stabilizzate mediante particelle e di quelle stabilizzate mediante tensioattivi sono confrontate nella figura 20, da cui è possibile vedere che sono estremamente resistenti alla coalescenza ed alla disproportionazione. La schiuma stabilizzata con particelle è stabile al drenaggio, alla coalescenza e alla disproportionazione per più di 4 giorni, a differenza della schiuma stabilizzata con tensioattivi la cui stabilizzazione è di solo 4h<sup>34</sup>.

La stabilità raggiunta con questo nuovo foaming diretto è dovuta ad un adsorbimento irreversibile di particelle colloidali all'interfaccia aria-acqua delle bolle di gas, rispetto all'equilibrio di adsorbimento e desorbimento continuo delle molecole di tensioattivo nell'altro caso. Particelle adsorbite irreversibilmente all'interfaccia impediscono stericamente la coalescenza di bolle adiacenti e formano anche uno strato che limita il ritiro delle bolle così che l'espansione è fortemente limitata.

A causa di questa elevata stabilità, le schiume stabilizzate con particelle non richiedono necessariamente un agente per il consolidamento e possono, perciò, essere direttamente essiccate e sinterizzate al fine di ottenere una struttura ceramica macroporosa. In assenza di sistemi di consolidamento, le particelle riarrangiate all'interno delle schiume potrebbero ancora riarrangersi durante l'essiccamento, portando ad un ritiro volumetrico approssimativamente compreso fra il 3-5%. In alternativa, l'essiccamento può essere favorito utilizzando un agente che consolida, che previene un riarrangiamento significativo delle particelle durante l'evaporazione dell'acqua, permettendo velocità di essiccamento più rapide.

È comunque importante tenere in considerazione che l'aggiunta di additivi di gelificazione può richiedere delle variazioni nella composizione di foaming.

La porosità di una schiuma prodotta mediante questa tecnica può variare fra il 40 ed il 93% e la dimensione dei pori da 10 a 300 $\mu\text{m}$ . Dal momento che le bolle d'aria possono essere completamente ricoperte con uno strato di particelle modificate superficialmente, i porosi ceramici, con porosità chiusa, possono essere preparati secondo questo metodo.

La resistenza a compressione si presenta estremamente alta per campioni con elevati livelli di porosità (87-90%) e piccole dimensioni dei pori (ad esempio 30 $\mu\text{m}$ ). Questi elevati valori sono dovuti, comunque, anche alla presenza di una totale porosità chiusa. I campioni che, invece, mostrano una porosità aperta vengono preparati con questa tecnica semplicemente diminuendo la concentrazione delle particelle stabilizzate ed aggiungendo una minor quantità di fase sacrificante alla sospensione iniziale.

Usando questo metodo semplice, economico e pulito, sono stati sviluppati diversi porosi ceramici con diversi intervalli di porosità e con diverse composizioni chimiche. È importante notare che innumerevoli altre condizioni possono essere investigate per la fabbricazioni di porosi ceramici con adeguate microstrutture e composizioni chimiche.

## **1.7 Sistemi per il rilascio controllato di farmaci**

La possibilità di rilasciare un farmaco, direttamente nel sito dell'impianto, rappresenta un notevole valore aggiunto per il sostituto osseo. A seconda delle indicazioni terapeutiche possono essere rilasciati in situ diversi tipi di farmaci. I farmaci utilizzati per questo tipo di applicazione possono essere molteplici, nel caso di infezioni ossee i più diffusi sono gli antibiotici; negli ultimi tempi si sta diffondendo l'uso dei fattori di crescita, soprattutto nella tecnica dell'ingegneria dei tessuti.

### **1.7.1 La funzione degli antibiotici aminoglicosidici**

La presenza di infezioni è spesso associata ad una grande varietà di eventi, da traumi superficiali e bruciature all'ulcera cronica, con complicazioni conseguenti all'intervento ed all'impianto. Se l'ambiente della ferita non è in grado di contrastare l'invasione di microrganismi, si ricorre spesso all'utilizzo di antibiotici mediante via sistemica in modo da realizzare una buona risposta immunitaria. In caso contrario, lo sviluppo di un'infezione può seriamente limitare il processo di guarigione e può interferire con una ferita chiusa. Comunque, si è evidenziato che la resistenza batterica è in aumento, così come le complicazioni associate alle infezioni rispetto all'aumento della popolazione. L'evidenza di aumentare la resistenza batterica è in aumento e le complicazioni associate alle infezioni sono in aumento rispetto all'aumento della popolazione. La diminuzione del rischio di infezioni è auspicabile non solo in termini di ridotta sofferenza da parte del paziente, ma anche di carico ridotto per la società. Per quanto concerne la cura della salute riguardo il rischio delle infezioni è giustificabile non solo in termini di aumento della sofferenza del paziente, ma anche il carico alla società. Il principale obiettivo del trattamento delle infezioni da ferita dovrebbe essere quello di ridurre la carica batterica al di sotto di un certo livello in modo che si possa arrivare alla guarigione. Sistemi di rilascio di antibiotico convenzionali sia per la prevenzione e per la cura presentano, spesso, gli inconvenienti di tossicità sistemica con complicate associazioni renali ed epatiche, scarsa penetrazione in ischemia e tipica necrosi tissutale sia post-traumatica che post-operatoria, e necessitano di essere monitorati in ospedale<sup>35,36</sup>. Alternativamente, un rilascio controllato di

antibiotico mediante somministrazione localizzata, o anche un sistema di rilascio locale, riduce gli svantaggi di un approccio sistemico mantenendo localmente alta la concentrazione di antibiotico locale per un ampio intervallo di tempo<sup>37</sup>. Gli antibiotici, generalmente incorporati nei sistemi a rilascio controllato, includono vancomicina, tobramicina, cefamandolo, cefalotina, carbenicillina, amoxicillina e gentamicina. L'efficacia di questi strumenti è fortemente dipendente dalla velocità e dal modo con cui il farmaco è rilasciato. Questi parametri sono determinati dalla matrice ospite all'interno della quale è caricato il farmaco e dalla cinetica di rilascio. Se il farmaco è rilasciato assai velocemente, tutto il farmaco caricato potrebbe essere rilasciato completamente prima che l'infezione sia risolta. Se il rilascio è troppo ritardato, l'infezione potrebbe ulteriormente espandersi, rendendo così difficile il controllo della ferita. Il rilascio di antibiotico al di sotto della concentrazione di inibizione (MIC) può evocare le resistenze batteriche al sito di rilascio ed intensificare le complicanze infettive<sup>38</sup>. Inoltre, certe specie batteriche sono in grado di attaccare la superficie dell'impianto e formare uno strato protettivo che è fortemente resistente sia al sistema immunitario che agli antibiotici. Questo strato è considerato una delle cause primarie delle infezioni associate all'impianto ed è stato provato che, per uccidere i batteri nel bio-film, a volte si richiede 1000 volte la dose di antibiotico necessaria per ottenere lo stesso risultato in una sospensione cellulare.

E' stato riscontrato che un periodo di circa 6 ore dopo l'impiantazione è decisivo per la prevenzione dell'adesione batterica all'interfaccia impianto-tessuto, da cui dipende la riuscita a lungo termine di un impianto<sup>39</sup>. Oltre questo periodo un impianto è particolarmente suscettibile alla colonizzazione superficiale.. Il profilo di un rilascio localizzato di antibiotico dovrebbe presentare un'alta velocità iniziale al fine di contenere l'elevato rischio di infezione, indotto dai batteri durante lo shock iniziale, seguito da un rilascio sostenuto di un livello efficace per inibire l'infezione latente. Nel caso di strumenti ortopedici è importante combattere i batteri che sono stati introdotti durante l'impiantazione e che possono essere, successivamente, introdotti anche per via sistemica. Perciò, nella seconda fase, è necessario un rilascio sostenuto. Nel caso di ferite con fasciatura, la velocità di rigenerazione dei tessuti, che dipende a sua volta dal paziente e da

innumerevoli altri parametri, influenza il processo di guarigione della ferita. Perciò è estremamente duro descrivere un profilo di rilascio ideale per i vari tipi di sistemi. I sistemi medici che eluiscono antibiotici includono composti biorassorbibili per applicazioni ortopediche, e fibre biorassorbibili per guarigione di ferite. Negli ultimi anni sono stati prodotti, mediante molteplici processi, diversi sistemi biodegradabili, a base di polimeri sintetici o naturali, da utilizzare come trasportatori di antibiotico.

I polimeri biodegradabili possono rilasciare una grande quantità di antibiotico e le loro proprietà di degradazione possono essere adattate a specifiche applicazioni, che influenzano innumerevoli altri processi come la crescita cellulare, la rigenerazione dei tessuti, il rilascio di farmaco ed il responso dell'ospite. Polimeri biodegradabili sintetici, adatti all'utilizzo per queste applicazioni, includono copolimero polilattico–glicilico, policaprolattone, polianidride<sup>40,41</sup>.

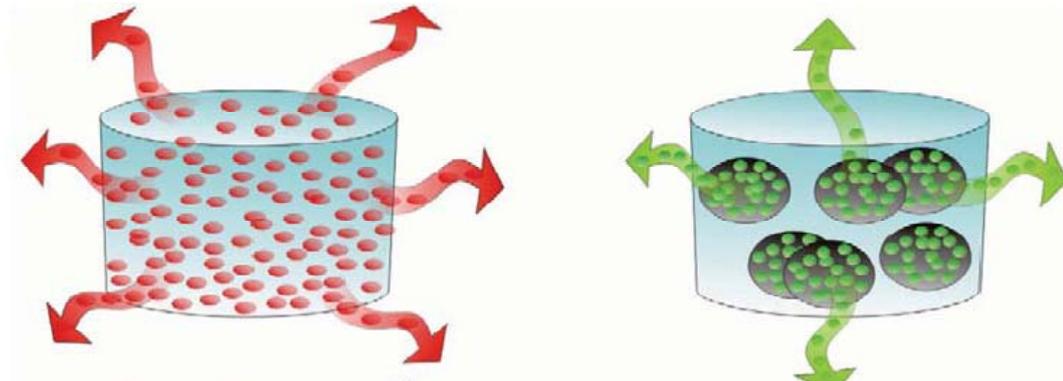


Figura 20- Differenti tipi di sistemi per il rilascio controllato di farmaci

Polimeri naturali come collagene e chitosano sono molto interessanti in quanto presentano una biocompatibilità più elevata e favoriscono la ricrescita cellulare<sup>42,43</sup>. Essi sono anche economici e facilmente utilizzabili. I farmaci, invece, che possono essere utilizzati per il rilascio sono innumerevoli. Quando si progetta un sistema di rilascio controllato, alcuni parametri come il peso molecolare, la solubilità in acqua ed in solvente organico, la temperatura di fusione ed il comportamento antibatterico devono essere tenuti tutti in considerazione.

### **1.7.2 Antibiotico caricato sul ricoprimento dell'impianto**

Gli antibiotici caricati sulla superficie dell'impianto rappresentano un semplice approccio per la prevenzione delle infezioni, associate ad un impianto. Essi possono fornire un immediata risposta al trattamento delle contaminazioni dell'impianto e non necessitano l'uso di altri agenti antibatterici, oltre che all'impianto stesso<sup>44</sup>. Questo è molto importante per procedure di impiantazione senza cemento, che hanno guadagnato una certa popolarità a causa dei migliori risultati in pazienti giovani, rispetto a quelli con le protesi cementate<sup>45</sup>. Le tecniche di coating passivo hanno come fine la riduzione dell'adesione batterica, alterando le proprietà fisico-chimiche del substrato in modo che le interazioni substrato batterio non siano favorite; le tecniche coating attivo sono realizzate per rilasciare contemporaneamente grandi quantità di agenti antibatterici, immediatamente dopo l'impiantazione. Dosaggi locali elevati di antibiotico contro specifiche azioni patogene possono, perciò, essere somministrati con miglior efficacia e minor resistenza batterica, senza raggiungere livelli di tossicità. Studi recenti hanno anche messo in luce la possibilità di incorporare fattori di crescita al fine di promuovere una risposta curativa del tessuto.

L'utilizzo di un coating bioattivo per il rilascio di antibiotico su materiali a base di idrossiapatite, calcio fosfati ed altri materiali osteoconduttivi, offre un valore aggiunto per l'ambiente chimico- fisico e la richiesta strutturale per l'integrazione dello scaffold. Il rilascio, in vitro, di antibiotico da impianti con coating a base di idrossiapatite è stato riportato per cloroexidina, vancomicina, gentamicina, tobramicina e diversi altri tipi di antibiotici, la cui efficacia batterica è stata dimostrata, in vitro, mediante il test con agar, per la formazione di una zona di inibizione<sup>46</sup>. La tecnica convenzionale di plasma spraying per realizzare coating a base di HA richiede elevate temperature e, perciò, non può essere utilizzata per l'incorporazione di antibiotici. Molti lavori riportano, perciò, l'infiltrazione di antibiotici su coating di HA plasma spray-dried. Stigter ed altri<sup>47</sup> hanno riportato l'incorporazione di tobramicina utilizzando un coating biomimeticco a basse temperature (37°C). In breve, una soluzione supersatura di calcio fosfati è stata co-precipitata in piatti di titanio, formando approssimativamente uno spessore di 40µm di carbonato-apatite.

E' stato poi dimostrato che gli antibiotici contenenti gruppi carbossilici hanno forti interazioni con il calcio, e questo comporta un'alta incorporazione nel coating calcio-fosfato. Purtroppo, in questi condizioni l'antibiotico viene rilasciato in circa tre giorni. Fino ad oggi, gli unici test in vivo con impianti che presentano un coating di HA, impiantati in conigli, evidenziano che la velocità di infezione è fortemente diminuita. Gli studi di coating biodegradabili polimerici da acido polilattico e sui copolimeri con l'acido glicolico sono, attualmente, in fase di studio. I profili di rilascio mostrano intervalli temporali che vanno da alcune ore a 12 giorni dall'esposizione<sup>48</sup>.

Tabella 1 Sono riportate le principali caratteristiche chimico fisiche di tre comuni antibiotici aminoglicosidici

Antibiotici aminoglicosidici	Peso molecolare (g/mol)	Solubilità in acqua (mg/ml)	pH indotto	Solubilità nei solventi organici	T. di fusione (°C)	Trattamento antibatterico
Gentamicina	477.6	Elevata (100mg/ml )	Basico	DMF, MeOH, EtOH, etere etilico, CHCl <sub>3</sub> , acetone. Scarsa solubilità in DMSO	102-108	Larga attività – trattamento contro i batteri gram-positivi e gram negativi
Tobramicina	467.5	Elevata (538 mg/ml)	Basico	Bassa in etanolo	168	
Amicacina	585.6	Elevata (185 mg/ml)	Basico	Insolubile	220-230	

I promettenti risultati di questo materiale nel modello animale, per questo tipo di coating, sono stati incoraggianti ed il loro primo uso negli esseri umani è stato sperimentato nella tibia con un impianto contenente gentamicina<sup>49</sup>. Tale antibiotico non è stata ritrovato nel siero del paziente e non sono state osservate reazioni collaterali entro il primo anno di terapia. Negli ultimi anni sono stati anche studiati polimeri naturali, come la rosina ed i polioidrossialcanoti.

### 1.7.3 Antibiotici caricati su film biorisorbibili

Come detto precedentemente, l'adesione batterica al biomateriale e l'abilità dei microrganismi di formare un bio-film sul corpo dell'impianto sono principalmente dovute all'azione degli agenti patogeni associati all'impianto stesso. I più importanti problemi nel trattamento delle osteomieliti includono una scarsa distribuzione degli agenti antimicrobici nel sito dell'infezione ed una limitata circolazione di sangue nel tessuto scheletrale, e quindi all'incapacità di spostare la formazione di questo film in un altro punto del materiale.

Un rilascio controllato di sistemi antimicrobici all'interno dell'impianto ortopedico, rappresenta un'alternativa valida alla convenzionale terapia sistemica. Ad esempio, è stato messo a punto un film biorisorbibile, caricato con gentamicina, che può essere legato all'impianto ortopedico e prevenire l'infezione batterica, mediante un rilascio controllato dell'antibiotico per almeno un mese. Questi sistemi forniscono il profilo di rilascio desiderato e non richiedono impianti addizionali<sup>50</sup>.

Film a base di acido polilattico ed acido polilattico-glicolico sono stati preparati mediante processi in soluzione accompagnati da un trattamento isoterma a caldo. Nel processo di preparazione del film, la velocità di evaporazione del solvente la cinetica di rilascio del farmaco e la solidificazione del polimero e, di conseguenza, la dispersione del farmaco nel film. Il risultante rilascio di farmaco è, perciò, determinato dalla struttura del film.

In generale, due tipi di film polimero/antibiotico sono stati realizzati e studiati per tutte le matrici polimeriche:

- a) Un film polimerico con particelle di farmaco caricate sulla superficie. Questa struttura, che deriva da soluzioni diluite, è stata ottenuta utilizzando una lenta velocità di evaporazione del solvente che porta alla nucleazione del farmaco ed alla crescita del polimero sulla superficie. Questo fenomeno superficiale è accompagnato dalla formazione/solidificazione del cuore del polimero.
- b) Un film polimerico in cui le particelle di farmaco sono distribuite all'interno del bulk. Questa struttura che deriva da soluzioni concentrate, è stata ottenuta mediante una rapida evaporazione del solvente e porta alla

nucleazione del farmaco ed alla segregazione di questo all'interno del polimero. La gentamicina è un farmaco solubile in acqua che, praticamente, non è solubile in cloroformio. Alcune molecole, perciò, diffondono verso la superficie durante il processo di evaporazione del solvente, facendo sì che la concentrazione di farmaco sulla superficie sia sicuramente più alta di quella del bulk.

Le diverse condizioni di processo utilizzate per la realizzazione del dispositivo influenzano il profilo di rilascio del materiale. Perciò, soluzioni diluite e lenta velocità di evaporazione portano a film di tipo a, in cui il farmaco è concentrato sulla superficie.

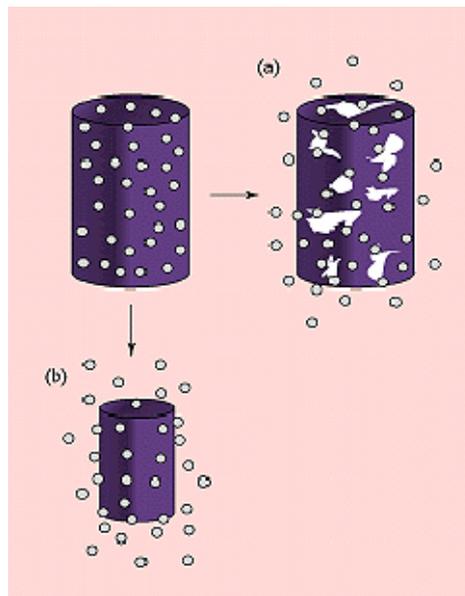


Figura 21- Esempi di scaffold utilizzati nella cinetica di rilascio

Questi film presentano un rilascio iniziale di farmaco relativamente alto e, via via, una velocità minore. Dall'altra parte, soluzioni concentrate e rapide velocità di evaporazione portano a film di tipo B, in cui la maggior parte del farmaco è localizzata nel film polimerico e solo una piccola frazione si trova sulla superficie<sup>51</sup>. Questi film presentano un rilascio di farmaco più graduale, anche se ovviamente più elevato all'inizio. In sostanza, quindi, è possibile osservare che il profilo di rilascio dei sistemi è determinato dal polimero di cui è costituito l'impianto, dal suo peso molecolare, dalle condizioni di processo che influenzano

la dispersione del farmaco nel film ed, in misura minore, dal caricamento del farmaco.

**Riferimenti bibliografici**

1. I. Salusbury “Bone in contention” *Materials World* - April 2005.
2. Matthew J. Olszta et al., Bone structure and formation: A new perspective *Materials Science and Engineering R* 58 (2007) 77–116.
3. Marotti G. Static and dynamic osteogenesis in the process of bone repair. *Giornale Italiano di Ortopedia e Traumatologia*, 2004; XXX (1):S1-S5
4. Grundnes O, Reikeras O. The importance of the hematoma for fracture healing in rats. *Acta Orthop Scand*, 1993; 64:340-342.).
5. Mizuno K, Mineo K, Tachibana T, Sumi M, Matsubara T, Hirohata K. The osteogenic potential of fracture hematoma. *J Bone Joint Surg*, 1990;72:822-29.;
6. J. Rho, L. Kuhn-Spearing, P. Zioupos “Mechanical properties and the hierarchical structure of bone” *Medical Engineering & Physics* (1998) 20.
7. M.J. Glimcher “Composition, structure, and organization of bone and other mineralized tissues and the mechanism of calcification” *American Physiology Society, Washington D.C., Handbook of Physiology*, (1976) 7.
8. M Navarro, A Michiardi, O Castaño and J.A Planell, *Biomaterials in orthopaedics, J. R. Soc. Interface* 2008 5, 1137-1158
9. Hench, L. L. 1980 *Biomaterials. Science* 208, 826–831.(doi:10.1126/science.6246576
10. Fernyhough, J. C., Schimandle, J. J., Weigel, M. C., Edwards, C. C. & Levine, A. M. 1992 Chronic donor site pain complicating bone graft harvest from the posterior iliac crest for spinal fusion. *Spine* 17, 1474–1480.
11. Banwart, J. C., Asher, M. A. & Hassanein, R. S. 1995 Iliac crest bone graft harvest donor site morbidity. A statistical evaluation. *Spine* 20, 1055–1060. (doi:10.1097/00007632- 199505000-00012)
12. Goulet, J. A., Senunas, L. E., DeSilva, G. L. & Greengield, M. L. V. H. 1997 Autogenous iliac crest bone graft. Complications and functional assessment. *Clin. Orthop.* 339, 76–81. (doi:10.1097/00003086-199706000-00011)
13. Hardouin, P., Anselme, K., Flautre, B., Bianchi, F., Bascouleguet, G. & Bouxin, B. 2000 Tissue engineering and skeletal diseases. *Joint Bone Spine* 67, 419–424.

14. Sanchez C, Arribart H, Giraud Guille MM. Biomimetism and bioinspiration as tools for the design of innovative materials and systems. *Nat Mater*, 2005; 4:277-88
15. Anselme K, Osteoblast adhesion on biomaterials. *Biomaterials* 2000, 21:667-682
16. Heungsoo S, Seongbong J, Antonios G, Mikos AG. Biomimetic materials for tissue engineering. *Biomaterials* 2003, 24: 4353-4364.
17. Lanza RP, Langer R, Chick WL. *Principles of Tissue Engineering*. Academic Press, San Diego, CA, USA, 1997
18. Boyan BD: Surface roughness modulates the local production of growth factors and cytokines by osteoblast-like MG-63 cells. *J Biomed Mater Res* 1996, 32(1):55-63.
19. R.Z. Le Geros “Calcium phosphates in oral biology and medicine” Editor: H. Myers, *Monographs in oral science*, Basel: Karger AG Publishers; (1991) 15, 82-128.
20. C. Rey, V. Renugopalakrishnan, B. Collins, M. Glimcher “Fourier transform infrared spectroscopic study of the carbonate ions in bone mineral during aging” *Calcif Tissue Int* (1991) 49, 251-258.
21. Y. Doi, T. Koda, N. Wakamatsu, T. Goto, H. Kamemizu, Y. Moriwaki, M. Adachi, Y. Suwa “Influence of carbonate on sintering of apatites” *J Dent Res* (1993) 72, 1279-1284.
22. L.G. Ellies, D.G.A. Nelson, J.D.B. Featherstone “Crystallographic structure and surface morphology of sintered carbonate apatites” *J Biomed Mater Res* (1988) 22, 541-553.
23. A. Bigi, E. Foresti, R. Gregoriani, A. Ripamonti, N. Roveri, J.S. Shah “The role of magnesium on the structure of biological apatite” *Calcif Tissue Int* (1992) 50, 439-444.
24. M. Percival “Bone health and osteoporosis” *Appl. Nutr. Sci. Rep.* (1999) 5, 1-5.
25. W. Frieb, J. Warner, in: F. Schuth, K.S.W. Sing, J. Weitkamp (Eds.), *Handbook of Porous Solids*, Wiley-VCH, Weinheim, 2002, 2923pp.

26. A. Krajewski, A. Ravaglioli, E. Roncari, P. Pinasco, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 12 (2000) 763
27. A. Tampieri, G. Celotti, S. Sprio, A. Delcogliano, S. Franzese, *Biomaterials* 22 (2001) 1365
28. H. Yokozeke, T. Hayashi, T. Nakagawa, H. Kurosawa, K. Shibuya, K. Ioku, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 9 (1998) 381
29. A. Ravaglioli, A. Krajewski, *Mater. Sci. Forum* 250 (1997) 221.
30. R.E. Holmes, *Plast. Reconstr. Surg.* 63 (1979) 626.
31. O. Richart, M. Descamps, A. Liebetrau, *Key Eng. Mater.* 218–220(2002) 9.
32. I. Sopyan, N.S. Sulaiman, D. Gustiono, N. Herdianto, *BioMEMS.Nanotechnol. II (SPIE)* 6036 (2006) C1.
33. Andre´ R. Studart, w Urs T. Gonzenbach, Elena Tervoort, and Ludwig J. Gauckler *Processing Routes to Macroporous Ceramics: A Review J. Am. Ceram. Soc.*, 89 [6] 1771–1789 (2006).
34. H. Lu, Z. Qu, Y. C. Zhou, *J. Mater. Sci.* 1998, 9, 583.
35. By Sylvain Deville, *Freeze-Casting of Porous Ceramics: A Review of Current Achievements and Issues \* Advance engineering material* (2008) 10, 3.
37. R. J. Pugh, “Foams and Foaming”; pp. 23–43 in *Handbook of Applied Surface and Colloid Chemistry, Vol. 2.* Edited by K. Holmberg. John Wiley & Sons Ltd, West Sussex, 2001
38. J.S. Price, et al., *Controlled release of antibiotics from coated orthopedic implants, J. Biomed. Mater. Res.* 30 (3) (1996) 281–286.
39. Z. Ruszczak, W. Friess, *Collagen as a carrier for on-site delivery of antibacterial drugs, Adv. Drug Deliv. Rev.* 55 (12) (2003) 1679–1698.
40. A.G. Gristina, *Biomaterial-centered infection: microbial adhesion versus tissue integration, Science* 237 (4822) (1987) 1588–1595.
41. H.S. Gold, R.C. Moellering Jr., *Antimicrobial-drug resistance, N. Engl. J. Med.* 335 (19) (1996) 1445–1453.
42. E.M. Hetrick, M.H. Schoenfisch, *Reducing implant-related infections: active release strategies, Chem. Soc. Rev.* 35 (9) (2006) 780–789.

43. F. Turesin, I. Gursel, V. Hasirci, Biodegradable polyhydroxyalkanoate implants for osteomyelitis therapy: in vitro antibiotic release, *J. Biomater. Sci., Polym. Ed.* 12 (2) (2001) 195–207.
44. S. Rossi, A.O. Azghani, A. Omri, Antimicrobial efficacy of a new antibiotic-loaded poly(hydroxybutyric-co-hydroxyvaleric acid) controlled release system, *J. Antimicrob Chemother.* 54 (6) (2004) 1013–1018.
45. S. Aoyagi, H. Onishi, Y. Machida, Novel chitosan wound dressing loaded with minocycline for the treatment of severe burn wounds, *Int. J. Pharm.* 330 (1–2) (2007) 138–145.
46. F.L. Mi, et al., Control of wound infections using a bilayer chitosan wound dressing with sustainable antibiotic delivery, *J. Biomed. Mater. Res.* 59 (3) (2002) 438–449.
47. M.J. Raschke, G. Schmidmaier, Biological coating of implants in trauma and orthopedic surgery, *Unfall. chirurg.* 107 (8) (2004) 653–663.
48. B. Wildemann, et al., Short term in vivo biocompatibility testing of biodegradable poly(D,L-lactide)-growth factor coating for orthopaedic implants, *Biomaterials* 26 (18) (2005) 4035–4040.
49. M. Teller, et al., Release of gentamicin from bone regenerative materials: an in vitro study, *J. Biomed. Mater. Res. B, Appl. Biomater.* 81 (1) (2007) 23–29.
50. B.D. Springer, et al., Systemic safety of high-dose antibiotic-loaded cement spacers after resection of an infected total knee arthroplasty, *Clin. Orthop. Relat. Res.* (427) (2004) 47–51.
51. H. Gollwitzer, et al., Antibacterial poly(D,L-lactic acid) coating of medical implants using a biodegradable drug delivery technology, *J. Antimicrob. Chemother.* 51 (3) (2003) 585–591.

## 2. SCOPO

La presente ricerca si inquadra nell'ambito della risoluzione dei problemi legati alla chirurgia ossea, per la cura e la sostituzione di parti di osso in seguito a fratture, lesioni gravi, malformazioni e patologie quali osteoporosi, tumori, ecc...

Vi è un numero elevatissimo di casi nel mondo in cui si rende necessaria la sostituzione di porzioni di tessuto osseo e questo numero è sempre crescente a causa dell' aumento di fratture dovuto al progressivo invecchiamento della popolazione, legato ad un miglioramento della qualità della vita, e, al numero sempre maggiore di persone che praticano attività sportiva. Questo tipo di intervento è spesso molto invasivo e traumatizzante per il paziente, soprattutto nei casi in cui sono coinvolte le ossa principali degli arti o del cranio. Spesso il chirurgo deve intervenire nuovamente a distanza di mesi o di anni, con tutti i traumi legati a simili interventi chirurgici, comportando perciò una sensibile riduzione della qualità della vita del paziente.

Attualmente la progettazione di impianti per le sostituzioni/rigenerazioni ossee richiede che i materiali sviluppati siano in grado di "mimare" la *composizione* e la *morfologia* dei tessuti naturali, in modo da generare le specifiche interazioni chimiche esistenti nei tessuti dell'organismo con cui vengono a contatto e, quindi, di biointegrarsi e/o rigenerare l'osso mancante nel miglior modo possibile, in termini qualitativi e quantitativi.

Dal punto di vista compositivo, l'osso risulta costituito per circa il 70% da una fase inorganica di tipo calcio fosfatico e per circa il 23% da una fase organica di tipo proteico: il collagene di tipo I.

La fase inorganica, denominata idrossiapatite (HA), è caratterizzata dalla presenza, all'interno della cella cristallina, di ioni droganti di carattere sia cationico che anionico; fisiologico anche quando presenti in tracce hanno tutti una specifica funzione sul metabolismo osseo. Dal punto di vista morfologico l'osso trabecolare presenta una struttura tridimensionale orientata ed interconnessa, con porosità di tipo aperto che porta ad una struttura solida cellulare. I pori che costituiscono il materiale hanno dimensioni fino ad 1 mm, mentre lo spessore delle trabecole è di circa un ordine di grandezza più piccolo.

Un sostituto osseo sintetico deve necessariamente presentare, per essere integrato nel tessuto naturale, porosità con dimensioni  $\geq 80-100 \mu\text{m}$  adeguate per l'abitazione cellulare, ma al tempo stesso anche micropori ( $<10\mu\text{m}$ ) che possano consentire la permeazione del dispositivo 3D da parte dei fluidi fisiologici e la vascolarizzazione. Deve, quindi, possedere una porosità multidimensionale e fortemente interconnessa. Allo stesso tempo deve soddisfare i requisiti di resistenza meccanica, anche se diversificati in funzione del sito dell'impianto.

Per questo motivo sono stati sperimentate due tecnologie innovative per lo sviluppo di sostituti ossei porosi. Da un lato, si è cercato di sviluppare una struttura con porosità globulare (multidimensionale interconnessa) con morfologie più simili all'osso trabecolare, ma con proprietà meccaniche superiori rispetto i materiali finora sviluppati. Dall'altro, si è favorito lo sviluppo di strutture che presentino potenziali cammini guida per le cellule ossee ed, al tempo stesso, accrescano le proprietà meccaniche in specifiche direzioni. Per simulare sempre di più la composizione del tessuto osseo e per indurre specifiche proprietà funzionali, è stata utilizzata la gelatina come fase proteica con cui rivestire/impregnare dispositivi porosi 3D a base di apatite, o con cui miscelare direttamente la fase inorganica calcio-fosfatica per realizzare materiali bio-ibridi in cui le due fasi siano intimamente interagenti. Inoltre, al fine di ridurre gli innumerevoli problemi legati alle infezioni ossee, alcuni dei materiali sviluppati sono stati caricati con un antibiotico e sono state valutate le cinetiche di rilascio. In tal modo, nel sito dell'impianto si è cercato di associare le funzioni di trasporto e di rilascio di farmaco, a quelle di sostituzione/rigenerazione ossee.

### 3. TECNICHE ANALITICHE

#### 3.1 Microscopia elettronica a scansione (SEM)

##### 3.1.1 Principi teorici

La caratteristica essenziale del microscopio elettronico a scansione è di fornire un'immagine ingrandita della superficie del campione con una risoluzione ed una profondità di campo molto alta, superiori a quelle fornite dal microscopio ottico.

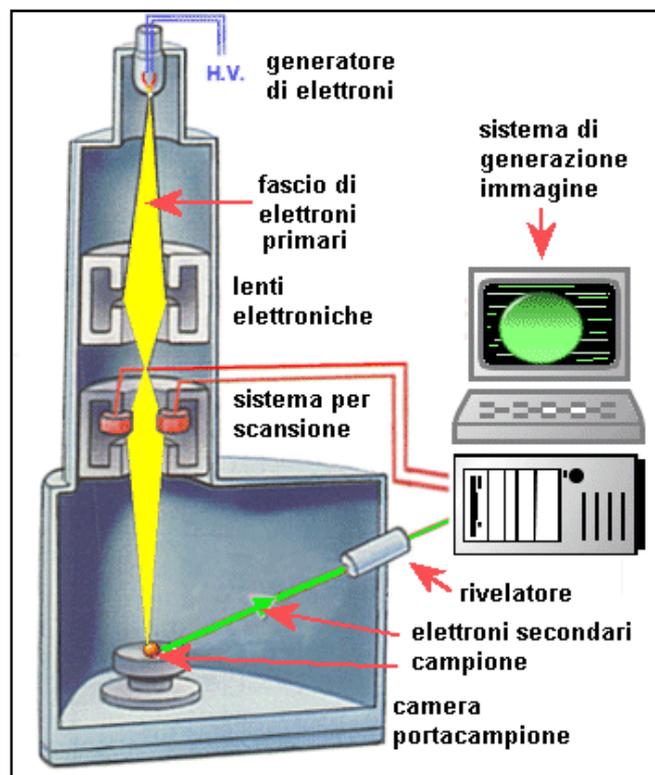


Figura 1- Schema del microscopio elettronico a scansione

L'immagine è generata facendo compiere ad un sottile pennello elettronico, ottenuto mediante un emettitore di elettroni (un catodo a tungsteno) ed a piastre collimatrici polarizzate, un movimento di esplorazione (scansione) della superficie del campione. Un rivelatore registra l'intensità di emissione del campione in

funzione della posizione permettendo quindi di osservare un'immagine della sua superficie (vedi figura 1).

Le qualità peculiari di questo strumento sono:

- ✓ la facilità di preparazione dei provini;
- ✓ la semplicità di osservazione di superfici massive irregolari;
- ✓ la profondità elevata di campo (ingrandimenti oltre circa 100.000X);
- ✓ la capacità di scegliere il meccanismo di formazione dell'immagine;
- ✓ la possibilità di determinare, tramite ad esempio microsonde elettroniche, la composizione chimica della zona esplorata.

Una schematica descrizione dei principali processi che avvengono quando un fascio di elettroni, con energia di qualche decina di KeV, colpisce la superficie di un materiale, è riassunta in figura 2.

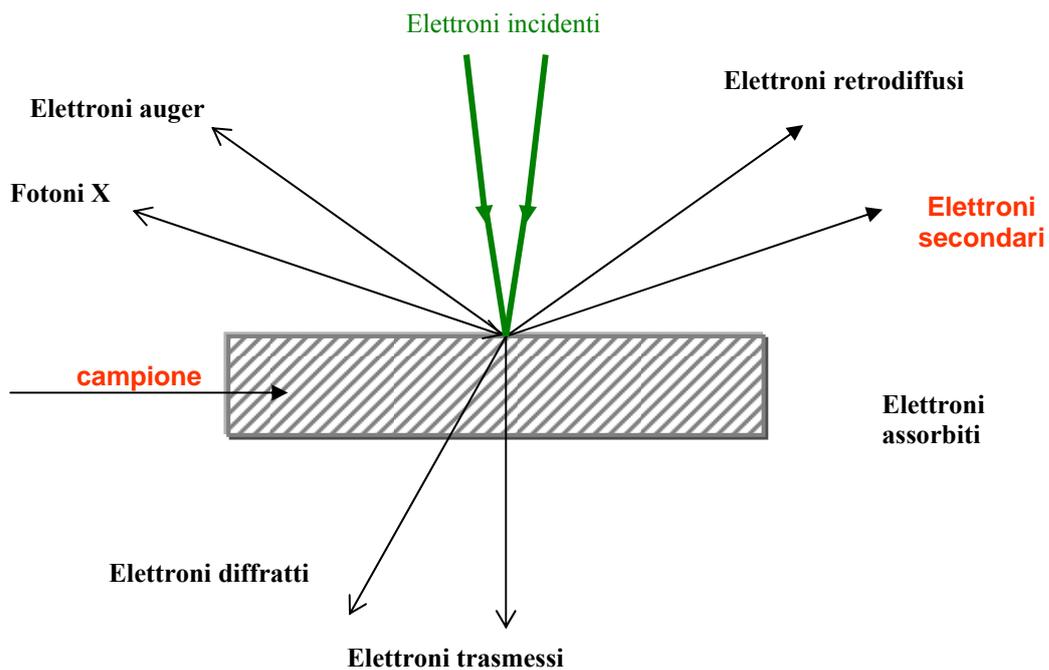


Figura 2- Schema dei processi che avvengono quando un fascio di elettroni colpisce il materiale

Una parte degli elettroni incidenti, detti anche elettroni *primari*, sono riflessi mantenendo l'energia iniziale: essi prendono il nome di elettroni *retrodifusi*. Gli elettroni primari non riflessi perdono la loro energia trasferendola agli elettroni del solido; questi ultimi possono ora diffondere verso la superficie ed una frazione di essi sfuggirà all'esterno; questi elettroni, di energia molto bassa (qualche decina di eV), sono detti elettroni *secondari*. Convenzionalmente sono indicati come elettroni secondari quelli con energia minore di 50 eV che costituiscono quasi la totalità degli elettroni di bassa energia. Inoltre gli elettroni incidenti, quando possiedono energia sufficientemente elevata, sono in grado di ionizzare i livelli energetici più interni degli atomi del materiale; questi atomi tornano allo stato fondamentale mediante l'emissione di un fotone X od anche di un elettrone. Il primo processo è detto *fluorescenza RX*, mentre il secondo è noto come *emissione di elettroni Auger*. Entrambi possiedono energie caratteristiche degli atomi da cui provengono possono quindi essere utilizzati per ottenere informazioni sulla composizione chimica del campione. Infine se il campione è sufficientemente sottile, gli elettroni sono in grado di attraversarlo ed è possibile quindi avere anche degli elettroni *trasmessi*. Ognuna di queste radiazioni emesse può essere captata da opportuni rivelatori ed utilizzata per ricavare informazioni circa differenti qualità specifiche del campione.

Nel SEM i diversi punti del campione sono esplorati in successione mediante un sottile fascio elettronico primario: l'interazione degli elettroni con il campione genera elettroni *secondari* e *retrodifusi*. Gli elettroni *secondari* (SE) sono quelli di norma rilevati ed elaborati per ottenere una immagine della superficie del campione sulla base di variazioni di intensità di emissione legate alla morfologia esterna ed al particolare angolo di incidenza formato con il fascio. Il contrasto dell'immagine dipende dall'efficienza di raccolta, in quanto questi seguono traiettorie rettilinee e sono rivelati solo se il punto di produzione è in linea di collegamento ottico con il rivelatore. L'immagine ottenuta è formata da ombre molto nette e si presta ad evidenziare piccole rugosità della superficie. Per gli elettroni *retrodifusi* (BSE) esiste invece una notevole dipendenza del rendimento di produzione di questi dal numero atomico dell'elemento interessato: al contrasto

contribuisce così non solo la morfologia, ma principalmente la composizione del campione. Utilizzando questa analisi su campioni policristallini è possibile distinguere le varie fasi che hanno una diversa gradazione di chiaro scuro a seconda della loro densità elettronica.

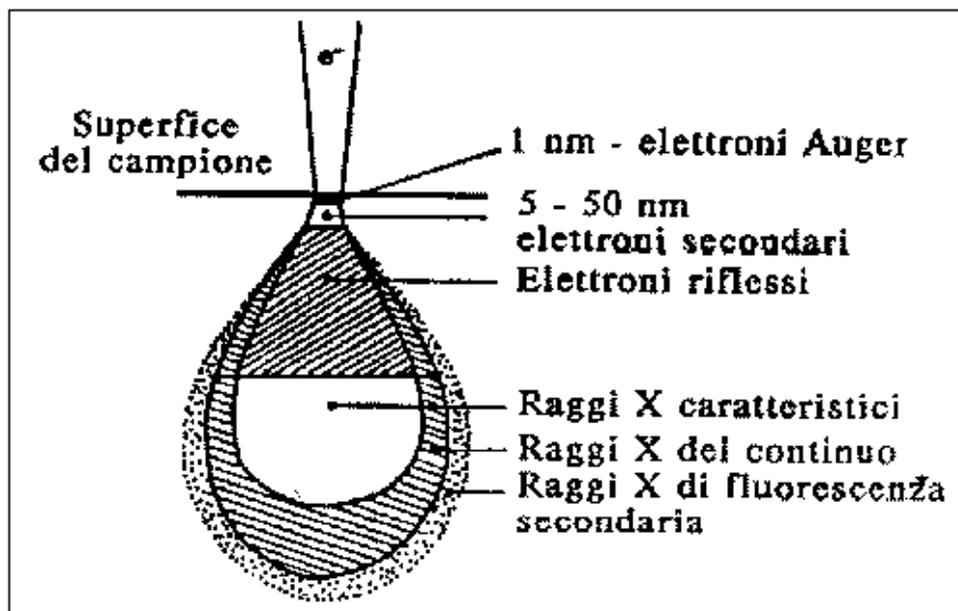


Figura 3- Profondità di penetrazione del materiale

### 3.1.2 Preparazione del campione

Il campione isolante (come i fosfati di calcio) deve essere reso conduttore, infatti i campioni che conducono elettricità sono più semplici da studiare, poiché il flusso degli elettroni a massa non è ostacolato e vengono quindi ridotti al minimo gli inconvenienti derivanti dall'accumulo di cariche. Inoltre i campioni che sono buoni conduttori di elettricità sono anche buoni conduttori di calore, il che minimizza la probabilità di degradazione termica. Si utilizza quindi una tecnica che consiste nel rivestire la superficie del campione con un sottile film metallico prodotto per evaporazione sotto vuoto. È importante realizzare un delicato equilibrio tra il rivestimento più sottile ed uniforme possibile ed un rivestimento eccessivamente spesso che mascheri i dettagli della superficie. Normalmente sulla superficie del campione, precedentemente bloccato su un porta campione di Al

con pasta di grafite, si deposita tramite una camera al plasma di Ar uno strato di oro (Au). Sia la grafite, l'alluminio e l'oro sono buoni conduttori, così che la conduttività elettronica risulta garantita anche all'interno del campione. Quest'ultimo, una volta metallizzato viene immesso nella camera di analisi in cui è opportuno avere il vuoto.

### **3.2 Microsonda elettronica a dispersione di energia (EDS)**

Le apparecchiature adoperate per l'analisi qualitativa degli elementi che compongono il materiale metallico usano come radiazione incidente sempre un fascio di elettroni primari. Come segnali emessi dal materiale esaminato sono utilizzati i raggi X che sono radiazioni caratteristiche degli elementi che compongono il materiale, ma che, essendo proporzionali alla tensione ed alla corrente degli elettroni primari, necessitano di sistemi di rilevazione non legati alle condizioni di focalizzazione ed estremamente efficienti, poiché la quantità di emissione secondaria è molto bassa e quindi statisticamente inadatta per l'analisi. La microsonda elettronica è essenzialmente uguale nel principio di funzionamento al microscopio a scansione e può essere ad esso accoppiata per utilizzare i raggi X emessi dal provino.

Il vantaggio più rilevante delle microsonde EDS consiste nella velocità e nella simultaneità di raccolta di tutto lo spettro. Uno svantaggio invece, difficilmente eliminabile, del sistema EDS risiede nella sua sensibilità: oltre ai segnali provenienti dal punto d'impatto del fascio primario, influiscono anche quelli generati indirettamente da zone circostanti al punto interessato; il rivelatore ed il preamplificatore sono mantenuti costantemente sotto vuoto.

### **3.3 Plasma di argon accoppiato induttivamente (ICP)**

La spettroscopia al plasma induttivamente accoppiato (ICP) è un metodo spettroscopico in emissione in cui l'eccitazione degli atomi viene ottenuta impiegando una sorgente di energia termica ad elevata temperatura: un plasma.

Si definisce plasma una miscela gassosa conduttrice di elettricità contenente concentrazioni significative di cationi ed elettroni, ma tali che la carica netta si

avvicina a zero. Nel plasma di argon, impiegato per le analisi di emissione, le principali specie conduttrici sono gli ioni argon e gli elettroni. Gli ioni argon, una volta formati nel plasma, sono in grado di assorbire da un alimentatore esterno la potenza sufficiente per mantenere la temperatura ad un livello elevato. Infatti mentre la temperatura di una fiamma tradizionale raggiunge valori massimi intorno ai 3000 K, con il plasma si possono raggiungere temperature fino ai 10000 K: per questo motivo l'atomizzazione risulta più completa e si hanno minori problemi per quanto riguarda le interferenze chimiche. Inoltre la sorgente al plasma presenta altri vantaggi infatti l'atomizzazione avviene in ambiente chimicamente inerte e questo tende ad accrescere la vita media dell'analita perché impedisce la formazione di ossidi. Infine la temperatura della sezione trasversale del plasma è relativamente uniforme e quindi non si riscontrano fenomeni di autoassorbimento ed autoinversione.

La soluzione da determinare viene infatti nebulizzata ed introdotta nel plasma; gli atomi e gli ioni, contenuti in esso, vengono poi eccitati e portati ad emettere luce (fotoni). La radiazione emessa raggiunge l'ottica dello spettrometro attraverso una fibra ottica e quindi dispersa nei suoi componenti spettrali. L'intensità della radiazione, proporzionale alla concentrazione dell'elemento presente nel campione, è elaborata internamente da una serie di curve di calibrazione memorizzate nello strumento.

### **3.4 Spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier (FTIR)**

La radiazione infrarossa IR dello spettro comprende radiazioni con numeri d'onda che vanno da circa 12800 a  $10\text{ cm}^{-1}$ . La maggioranza delle applicazioni analitiche è tuttavia ristretta principalmente alla porzione dello spettro riferita al medio infrarosso cioè compresa tra i 4000 e i  $400\text{ cm}^{-1}$ .

Lo strumento utilizza la *trasformata di Fourier* per la decodifica del segnale; esso ha un rapporto segnale/rumore che è più di un ordine di grandezza migliore di quello degli strumenti a dispersione di classe elevata. Inoltre un vantaggio teorico degli strumenti a trasformata di Fourier è che la loro ottica permette di avere una energia passante molto maggiore di quella degli strumenti a dispersione: questo

potenziale vantaggio, tuttavia, è parzialmente eliminato dalla più bassa sensibilità dei rivelatori a risposta veloce che sono necessari per gli strumenti interferometrici.

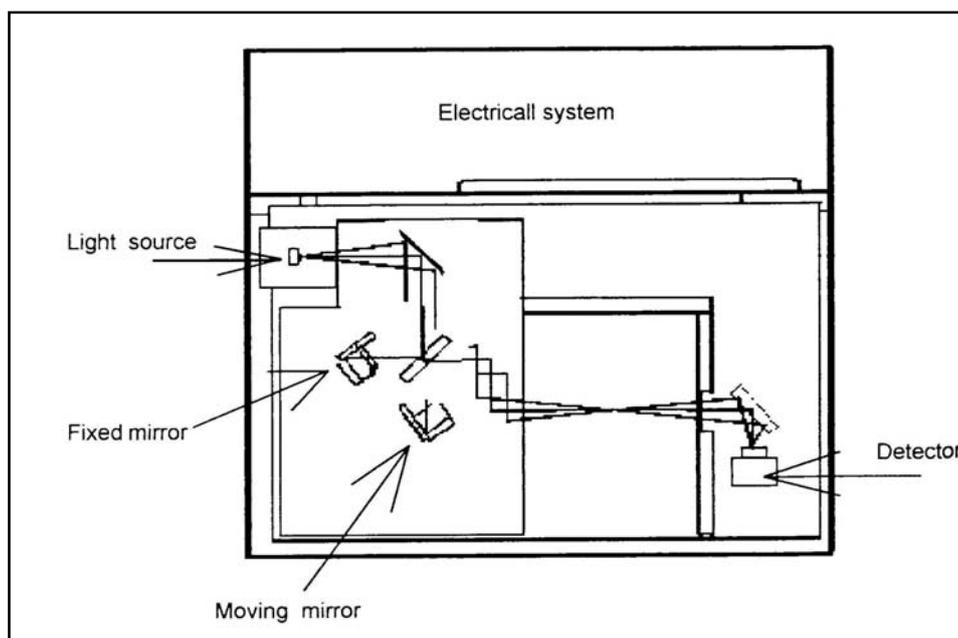


Figura 4- Schema di uno spettrometro IR.

La spettroscopia infrarossa ha estese applicazioni sia in analisi qualitative che in quelle quantitative, tuttavia, il suo utilizzo più importante e caratteristico è quello riferito all'identificazione dei composti: infatti l'insieme delle vibrazioni indotte dalle radiazioni infrarosse è caratteristico di ogni molecola, la quale fornisce una impronta digitale univoca che è facilmente distinguibile dagli assorbimenti di tutti gli altri composti.

E' pertanto possibile fare un'approssimazione di gruppo che si basa sul fatto che una molecola complessa può essere considerata come un insieme di determinati gruppi funzionali che vibrano in maniera del tutto indipendente l'uno dall'altro.

L'identificazione di un composto avviene infatti mediante due operazioni successive:

1. per prima cosa si individuano i gruppi funzionali presumibilmente presenti esaminando la zona delle *frequenze di gruppo*, che è all'incirca compresa tra  $3600$  e  $1200\text{ cm}^{-1}$  ;
2. in secondo luogo si mette a confronto lo spettro della sostanza sconosciuta con quello di un composto puro che contenga tutti i gruppi funzionali precedentemente trovati. A questo punto la zona delle *impronte digitali*, compresa tra  $1200$  e  $600\text{ cm}^{-1}$ , è particolarmente utile perché piccole variazioni nella struttura provocano una notevole variazione della forma e distribuzione delle bande di assorbimento di questa zona.

La tabella 1 riporta il valore dei numeri d'onda relativi ai picchi di assorbimento dei gruppi caratteristici dell'idrossiapatite.

L'assorbimento di una radiazione IR è limitato a specie molecolari che presentano piccole differenze di energia tra diversi stati vibrazionali e rotazionali non avendo energia sufficiente per causare tipi di transizioni elettroniche ad energia superiore. Inoltre per assorbire una radiazione IR una molecola deve subire un netto cambiamento del momento dipolare in seguito ad un moto vibrazionale o rotazionale, infatti solo a questa condizione il campo elettrico alternato della radiazione può interagire con la molecola e causare cambiamenti dell'ampiezza di uno dei suoi moti. Il momento dipolare è determinato dal valore della differenza di carica e dalla distanza tra i due centri di carica.

L'energia richiesta per causare un cambiamento di livello *rotazionale* è piccola e corrisponde a radiazioni di  $100\text{ cm}^{-1}$  o meno. Essendo i livelli rotazionali quantizzati l'assorbimento dovrebbe essere caratterizzato da righe discrete e ben definite (come accade nei gas), mentre nei solidi ed anche nei liquidi le collisioni intermolecolari e le interazioni causano l'allargamento delle righe fino ad un continuo.

Anche i livelli *vibrazionali* sono quantizzati ed anche in questo caso l'assorbimento dovrebbe essere caratterizzato da una serie di linee molto ravvicinate, poiché esistono molti stati energetici rotazionali per uno stato energetico vibrazionale (come ancora una volta accade nei gas). Nei solidi, però,

le rotazioni sono praticamente impedito e quindi le righe rotazionali/vibrazionali discrete scompaiono e si hanno solo picchi vibrazionali piuttosto allargati.

Tabella 1 Picchi di assorbimento relativi all'HA

Numero d'onda (cm <sup>-1</sup> )	Gruppo caratteristico
3450	H-O str.
2350	C-O str.
1630	H <sub>2</sub> O occlusa
1540-1460	CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> str. sito A
1460-1430	CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> str. sito B
1050	P-O str.
960	P-O str.
880	CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> bend. sito A
873	CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> bend. sito B
600	H-O bend.
570	O-P-O bend. (PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> )

La teoria delle vibrazioni ammette che un legame chimico tra due atomi possa essere, in prima approssimazione, paragonato ad un modello meccanico costituito da due masse collegate mediante una molla. Se la massa viene spostata ad una distanza  $y$  dalla sua posizione di equilibrio, in seguito all'applicazione di una forza lungo l'asse di legame, la forza di richiamo ( $F$ ) è proporzionale allo spostamento ed è descrivibile attraverso la legge di Hooke:

$$F = -ky$$

dove  $k$  è la costante di forza che dipende dalla rigidità della molla e il segno negativo indica che la forza è di richiamo, cioè che agisce nella direzione opposta allo spostamento.

Considerando una molecola formata da  $N$  atomi si stabilisce che possiede  $3N$  gradi di libertà avendo ciascun atomo 3 gradi di libertà corrispondenti al possibile movimento nelle tre direzioni  $x$ ,  $y$ ,  $z$  dello spazio. Di questi  $3N$  gradi di libertà

della molecola tre spettano al movimento dell'intera molecola nello spazio, cioè alla traslazione, tre al movimento rotazionale della molecola intorno al suo centro di gravità, restano quindi  $3N-6$  gradi di libertà ( $3N-5$  se la molecola è lineare perché la rotazione intorno all'asse di legame non è significativa) che descrivono la vibrazione.

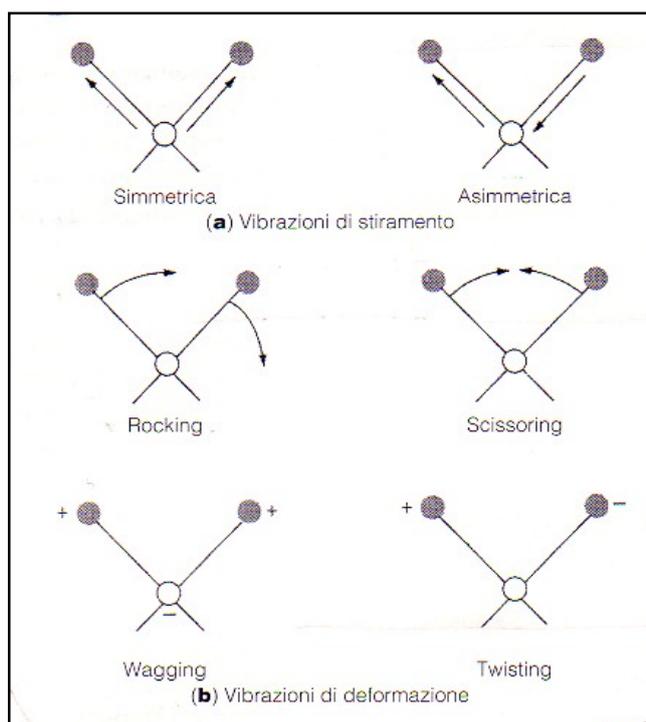


Figura 5- Tipi di vibrazioni molecolari: (+) movimento verso il lettore (-) movimento opposto

Il numero teorico delle vibrazioni fondamentali sarà raramente osservato, in quanto gli overtones (multipli di una data frequenza) e le combinazioni di toni (somma di due vibrazioni) aumenta il numero delle bande, mentre altri fenomeni come la debole intensità e la forte vicinanza lo riducono.

Le vibrazioni possono essere suddivise in due categorie fondamentali: stiramento (stretching) e deformazione (bending). Una vibrazione di stiramento comporta il continuo cambiamento della distanza interatomica lungo l'asse di legame tra i due atomi e può essere di tipo simmetrico oppure asimmetrico.

Le vibrazioni di deformazione sono invece caratterizzate da una variazione dell'angolo tra due legami e sono di quattro tipologie differenti: a forbice nel piano (scissoring), oscillazione nel piano (rocking), ondeggiamento fuori dal piano (wagging), torsione fuori dal piano (twisting).

### 3.5 Analisi termica

L'Analisi Termica comprende un insieme di metodi che consentono di determinare le proprietà chimico-fisiche di una sostanza e/o di un composto di reazione. Si misurano tali proprietà in funzione della temperatura o del tempo. Il campione viene sottoposto ad un programma controllato di temperatura che può avere fasi di riscaldamento, raffreddamento e mantenimento di una temperatura costante (isoterma) o una combinazione di esse.

Due sono i metodi che prenderemo in esame e che forniscono principalmente informazioni chimiche, piuttosto che fisiche, riguardo ai campioni in questione. Questi metodi sono: la Termogravimetria (TG) e l'Analisi Termica Differenziale (DTA).

#### 3.5.1 Metodi termogravimetrici (TG)

In un'analisi termogravimetrica si effettua la registrazione continua della massa di un campione in atmosfera controllata in funzione della temperatura o del tempo, quando la temperatura del campione viene aumentata (generalmente in modo lineare nel tempo). La strumentazione per un'analisi termogravimetrica è solitamente costituita da: 1) una bilancia analitica sensibile, 2) un forno, 3) un sistema di gas di spurgo che assicura un'atmosfera inerte, 4) un microprocessore per il controllo dello strumento, l'acquisizione e la visualizzazione dei dati.

Il campione quindi viene posto in un contenitore inerte di allumina ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) che si trova sospeso al braccio della bilancia interno al forno. Le variazioni di peso del campione possono essere misurate sia direttamente che misurando la forza necessaria a riportare la bilancia in posizione di equilibrio. Quest'ultima soluzione è quella più frequentemente adottata dai moderni strumenti commerciali. La deviazione della bilancia dalla posizione di equilibrio viene rilevata da un

opportuno sensore e il segnale, da questo generato, viene utilizzato per ripristinare la posizione di equilibrio. La misurazione della temperatura del campione viene effettuata con una piccola termocoppia posizionata il più vicino possibile al contenitore del campione; queste temperature risultano quindi di poco superiori o inferiori alla temperatura effettiva del campione. Il campo di temperatura per la maggior parte dei forni per termogravimetria va da temperatura ambiente a circa 1500°C, mentre la selezione della velocità di riscaldamento può essere variata da poco più di zero fino a 200°C/min.

Le informazioni ottenibili con i metodi termogravimetrici possono però definirsi alquanto limitate, poiché per ottenere soddisfacenti informazioni occorre che alla variazione di temperatura sia assolutamente associato un cambiamento della massa del campione.

### **3.5.2 Analisi termica differenziale (DTA)**

L'analisi termica differenziale è una tecnica in cui viene misurata la differenza di temperatura tra una sostanza ed un materiale inerte di riferimento (nel nostro caso la scelta è caduta su  $\text{Al}_2\text{O}_3$  in funzione del range di temperatura di analisi) durante un programma controllato di temperatura. Generalmente tale programma consiste in un riscaldamento del campione e del materiale di riferimento condotto in modo tale che la temperatura del campione aumenti linearmente nel tempo. In questo caso sono utilizzati ovviamente due crogiuoli (uno per il campione ed uno per il riferimento) e viene misurata la temperatura del campione. Si registra quindi la differenza  $\Delta T$  tra la temperatura del campione e quella del riferimento che viene poi valutata e riportata in grafico. I picchi di analisi termica differenziale che si originano derivano sia da variazioni fisiche che da reazioni chimiche che necessitano o emanano calore producendo appunto delle variazioni di temperatura del campione rispetto al valore fornito. Infatti le leggi di variazione delle temperature del campione e del riferimento, in precedenza identiche, diventano diverse e si genera, tra i due, una differenza di temperatura (negativa nel caso di una reazione endotermica, positiva nel caso invece di una esotermica). Il sistema, originariamente in equilibrio termico, reagisce tuttavia all'instaurarsi di questa

differenza di temperatura opponendovisi e fornendo al campione, che si trova a temperatura più bassa, un surplus di energia termica tanto maggiore quanto è maggiore la differenza di temperatura. Questa, dunque, aumenta fino a che l'energia assorbita dalla trasformazione in atto nel campione non risulta esattamente compensata dalla extra energia fornita al campione a seguito di un  $\Delta T$  negativo.

### 3.6 Diffrazione dei raggi X (XRD)

#### 3.6.1 La tecnica

La diffrazione di raggi X (XRD), scoperta da Max von Laue nel 1912, è una tecnica analitica versatile e non distruttiva che permette di studiare le caratteristiche strutturali della materia, cristallina o amorfa. Si basa sull'interazione elastica di una radiazione X monocromatica con il reticolo atomico della sostanza investigata (legge di Bragg).

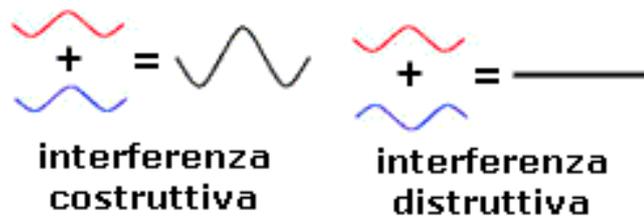


Figura 6- Interferenza costruttiva e distruttiva

Il fenomeno della *diffrazione* avviene tutte le volte che un'onda incontra ostacoli o aperture (con fenditura di dimensioni confrontabile con la lunghezza d'onda), capaci di deviarla in direzioni diverse da quella originaria. La diffrazione è il risultato delle correlazioni che si stabiliscono tra le onde, in uscita, dopo essere scatterate dagli ostacoli. Un risultato vantaggioso si raggiunge quando la differenza di lunghezza di percorso è un numero intero di lunghezze d'onda; solo

in questo caso le onde scattate sono in fase (interferiscono costruttivamente) e l'ampiezza si somma (figura 6).

Questa tecnica permette la determinazione del tipo di atomi presenti, la loro distribuzione e le distanze tra i piani atomici. Tali proprietà, essendo uniche e caratteristiche per ogni sostanza, ne consentono l'esatta identificazione.

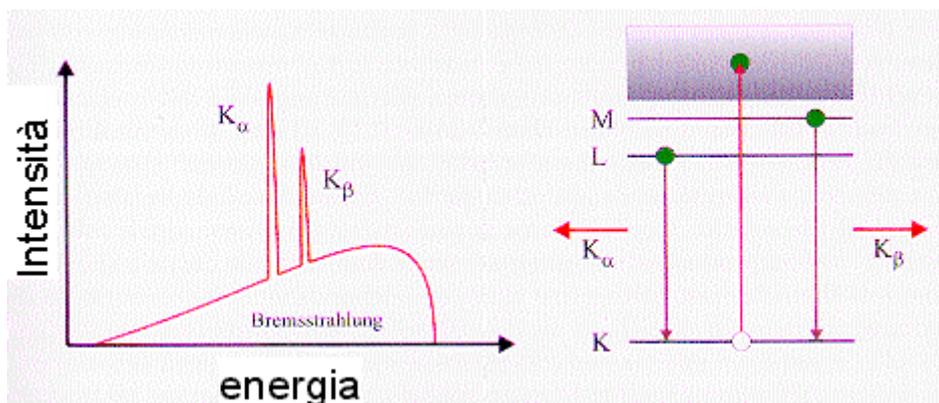


Figura 7- Schema relativo alla tecnica raggi X

Nei materiali policristallini, per differenti distanze interplanari  $d$ , le condizioni di Bragg sono rispettate al variare dell'angolo  $2\theta$  ( $2\theta$ ).

I raggi X, che sono una radiazione elettromagnetica di lunghezza d'onda da 20 a 1000 pm, si possono produrre bombardando un bersaglio metallico con elettroni ad alta energia. Affondando nel metallo gli elettroni decelerano, generando una radiazione caratterizzata da un campo di lunghezze d'onda continuo, detto Bremsstrahlung (dal tedesco *Bremse* "freno", *Strahlung* "raggio").

Sovrapposti a tale continuo si osservano alcuni picchi acuti di intensità elevata.

Tali picchi scaturiscono dagli urti fra gli elettroni incidenti e quelli che appartengono agli strati interni degli atomi metallici. Ogni urto espelle un elettrone da uno strato interno, e nella lacuna aperta si cade un elettrone di energia maggiore, emettendo l'energia eccedente sotto forma di fotone X.

I raggi X sono prodotti da generatori capaci di sopportare tensioni da 20 a 60 kV applicate fra un catodo ed un anodo metallici mantenuti entrambi sottovuoto.

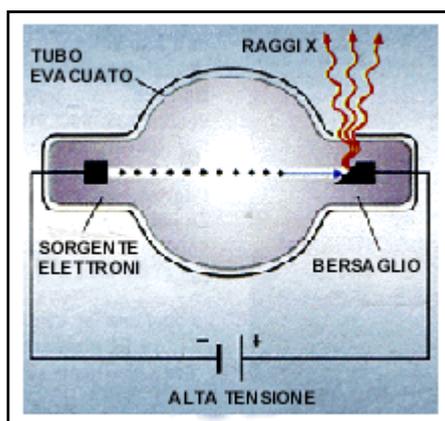


Figura 8- Generatore di raggi X

Il filamento del catodo in tungsteno, allorché è riscaldato a causa del passaggio di corrente, emette elettroni che sono accelerati, nel vuoto, dalla differenza di potenziale fra catodo ed anodo guadagnando energia cinetica. Quando gli elettroni urtano contro un bersaglio metallico sono emessi i raggi X. La gran parte dell'energia cinetica (~98%) è convertita in calore, perciò il bersaglio metallico deve essere costantemente raffreddato. Il berillio, essendo trasparente ai raggi X (grazie al piccolo numero di elettroni presenti nel suo atomo), viene utilizzato per le finestre.

### 3.6.2 L'identificazione dei piani reticolari

La distanza tra i punti reticolari di un cristallo costituisce un aspetto quantitativo importante della struttura e del suo studio mediante le tecniche di diffrazione. Esistono, però, molti insiemi di piani diversi che occorre poter contraddistinguere.

Per indicare le direzioni cristallografiche occorre definire un insieme di numeri, chiamati indici, per specificare non solo una singola direzione, ma anche tutte le direzioni ad essa parallela.

#### ➤ GLI INDICI DI MILLER

Gli indici di Miller forniscono un sistema utile per indicare i piani di un cristallo o di un reticolo spaziale specificandone le orientazioni senza che si debbano utilizzare le coordinate spaziali. Questi indici si basano sulle intercette del piano con tre assi cristallini (cioè coincidenti con i tre lati della cella unitaria). Le intercette sono misurate in rapporto alle dimensioni della cella unitaria.

Per calcolare gli indici di Miller di un piano si procede nel seguente modo:

- determinare le intercette su tre assi esprimendole in termini di frazioni o multipli dei lati della cella unitaria;
- fare i reciproci di questi numeri;
- ridurre i reciproci ai tre numeri più piccoli che stanno fra di loro nello stesso rapporto dei reciproci;
- indicare questi tre numeri tra parentesi tonde, ad es. (h k l).

Gli indici di Miller sono utilissimi per esprimere la distanza tra i piani successivi. In figura 9 sono mostrati alcuni piani con i loro indici di Miller.

Se  $m_i = \infty$  il corrispondente indice di Miller è 0.

Un simbolo (hkl) viene usato per definire un numero infinito di piani paralleli equidistanti. Esiste una interpretazione semplice degli indici di Miller h, k e l. I piani della famiglia (hkl) dividono i lati della cella elementare: a in h parti uguali, b in k parti uguali e c in l parti uguali. L'equazione della famiglia di piani è:

$$h(x/a) + k(y/b) + l(z/c) = n.$$

Gli indici di Miller (hkl) specificano l'orientazione del piano ed **n** la sua posizione rispetto all'origine.

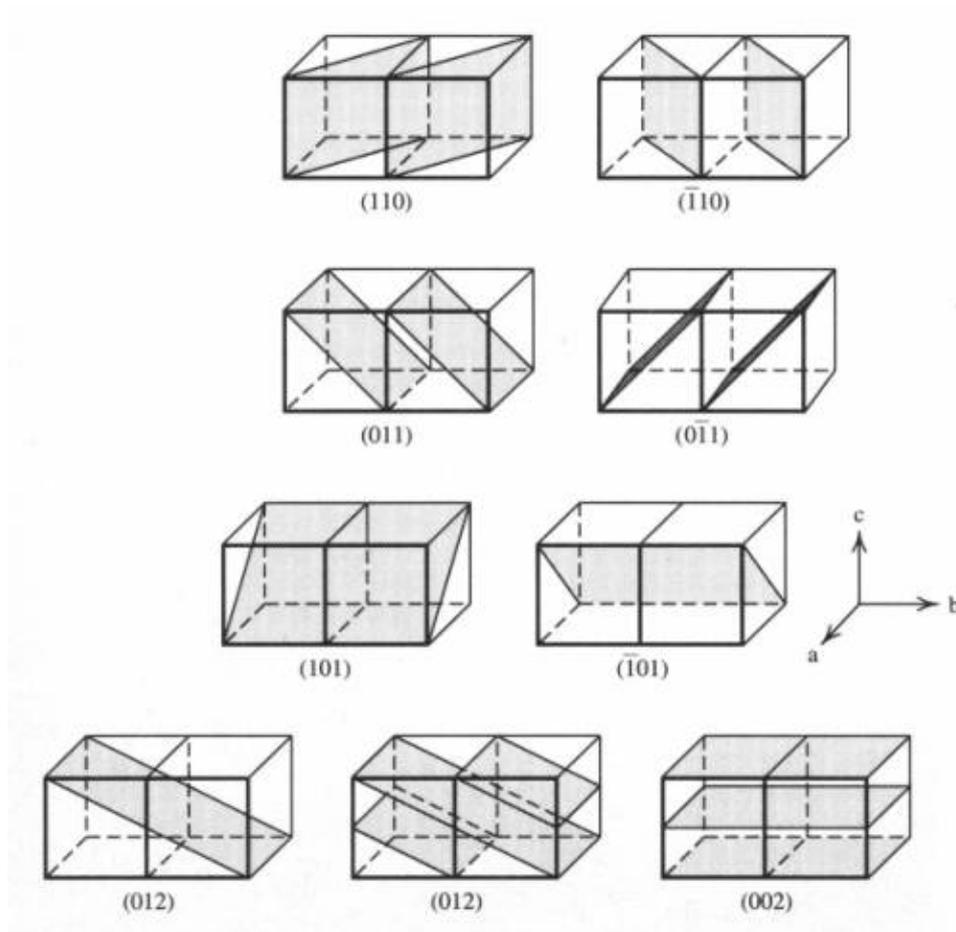


Figura 9- Identificazione dei piani attraverso gli indici di Miller

### 3.6.3 La legge di Bragg

Il criterio più antico di analisi della figura 9 di diffrazione cui danno luogo i cristalli consisteva nell'assimilare il piano reticolare ad uno specchio, immaginando il cristallo stesso costituito da pile di piani reticolari riflettenti posti ad una distanza  $d$ . Il modello facilita il calcolo dell'angolo che il cristallo deve formare con il raggio X incidente affinché si verifichi l'interferenza.

I raggi X, com'è noto, possiedono alte energie e brevi lunghezze d'onda che nei solidi equivale circa ad uno spazio atomico.

Si consideri una serie di piani atomici separati, in media, dalla distanza  $d$ . Si consideri inoltre un fascio di radiazioni monocromatica, di lunghezza d'onda  $\lambda$ , prossima a  $d$ , incidente su questi piani atomici.

Sia  $\theta$  l'angolo tra la direzione del fascio incidente ed i piani atomici. Perché vi sia interferenza costruttiva è necessario che la differenza di cammini effettuati dai fasci riflessi da due piani atomici successivi sia uguale ad un multiplo intero  $n$  della lunghezza d'onda  $\lambda$ . Se l'angolo di riflessione è uguale a quello di incidenza, questa differenza è uguale a:

$$2d \sin \theta$$

Se ne conclude che:

$$n\lambda = 2d \sin \theta$$

Questa è nota come legge di Bragg; legge fondamentale della diffrazione X da parte di materiali solidi cristallini. L'impiego principale di questa legge consiste nel determinare gli intervalli tra gli strati del reticolo, giacché, una volta stabilito l'angolo  $\theta$  corrispondente ad una riflessione, se ne può facilmente calcolare  $d$ .

#### 2.6.4 Il metodo delle polveri

Quando un cristallo viene polverizzato non perde le caratteristiche strutturali, ma riduce solamente le proprie dimensioni. Un campione di polveri consiste di un numero altissimo (idealmente infinito) di cristallini orientati statisticamente: questo comporta che per una specifica successione planare  $hkl$  l'equazione di Bragg risulta soddisfatta per tutti i cristallini la cui orientazione sia descrivibile come una rotazione intorno alla direzione dei raggi X incidenti. Se idealmente il numero di particelle cristalline in diffrazione è molto elevato e tutte le possibili orientazioni sono ugualmente rappresentate, allora ciascun nodo del reticolo reciproco sarà di fatto rappresentato da un insieme di linee contigue che formano la superficie di un cono di diffrazione. Il metodo diffrattometrico delle polveri fu sviluppato all'inizio del secolo da Hull negli Stati Uniti e indipendentemente da Debye e Scherrer che lo portarono avanti in Germania: da qui il metodo delle polveri viene anche chiamato metodo Hull-Debye-Scherrer.

In linea di principio ogni insieme di piani (hkl) dà origine ad un suo cono di diffrazione, in quanto alcuni dei cristallini, con il loro orientamento casuale, avranno l'angolo giusto per diffrangere il raggio incidente.

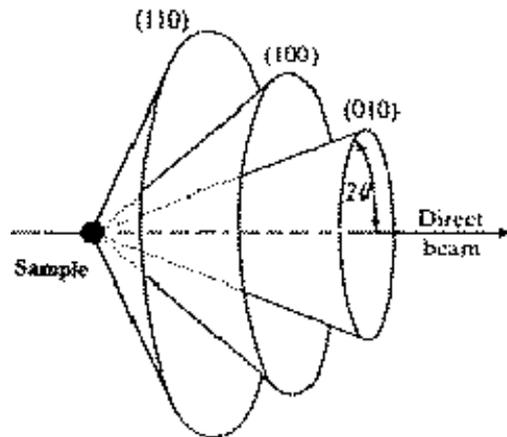


Figura 10- Coni di diffrazione associati ad alcuni nodi del reticolo reciproco, nelle ipotesi di distribuzione ideale delle orientazioni in un campione policristallino investito da un fascio di raggi X.

Le tecniche di diffrazione basate sulle polveri servono ad identificare i campioni di sostanza solida confrontandone la posizione delle righe diffratte e l'intensità con quelle di standard raccolti in una ricca banca dati. I dati di diffrazione sulle polveri servono anche a determinare i diagrammi di stato poiché le diverse fasi solide danno origine a diverse figure di diffrazione, nonché a stabilire la quantità relativa di ciascuna fase presente nella miscela. Infine la tecnica è utilizzata per effettuare la determinazione iniziale delle dimensioni e della simmetria delle celle elementari. Occorre però tenere presente anche alcune limitazioni che la tecnica possiede:

- l'applicabilità circoscritta allo stato solido;
- la risposta mediocre dei raggi X alla presenza degli atomi di idrogeno (dotati come sono di pochi elettroni diffondenti).

Tuttavia la sensibilità degli strumenti moderni è tale da aver fatto della rivelazione e degli atomi di idrogeno una tecnica in larga misura di routine.

### 3.6.5 Geometria per polveri

Il campione ruota con una velocità angolare  $w$ , al centro di un circolo sulla cui circonferenza si trovano sia la sorgente che il rivelatore di raggi X. La sorgente rimane fissa mentre il rivelatore viene fatto ruotare sulla circonferenza con una velocità angolare  $2w$ , in questo modo l'angolo tra il fascio primario e la normale alla superficie è mantenuto, in ogni istante, uguale all'angolo tra la normale alla superficie ed il contatore.

I pregi principali del metodo Debye-Scherrer sono:

- la piccola quantità di polvere richiesta per l'analisi (fino a 0.1 mg);
- la ricezione praticamente completa di tutte le riflessioni prodotte dal campione;
- la relativa semplicità dell'apparecchiatura e della tecnica richiesta.

#### Formula di Scherrer:

$$D = \frac{K\lambda}{\beta \cos\theta}$$

dove:

$D$  = dimensione media dei cristallini

$K$  = fattore di forma

$\lambda$  = lunghezza d'onda della radiazione incidente

$\beta$  = larghezza del picco corretta per l'allargamento strumentale

$\theta$  = angolo di diffrazione

### 3.7 Sospensioni e dispersioni colloidali

Molti processi di lavorazione tecnologica di ceramici tradizionali ed avanzati coinvolgono il trattamento di sospensioni (o dispersioni) di materiali solidi in un liquido.

Se le particelle, presenti all'interno delle sospensioni, hanno dimensioni superiori ad 1  $\mu\text{m}$ , queste saranno sottoposte alla sola forza di gravità e alla spinta idrostatica del liquido disperdente; esse tenderanno a sedimentare secondo la legge di Stokes.

La legge di Stokes correla la velocità di separazione delle molecole che costituiscono le due fasi con i parametri che definiscono lo stato fisico del sistema disperso. Da questa formula si deduce che il sistema sarà tanto più stabile quanto più le densità delle due fasi sono vicine tra loro e quanto maggiore è la viscosità della fase continua. In particolare, se  $d_i > d_e$ , il segno della equazione risulta negativo in quanto le particelle disperse sedimentando si muovono nel verso in cui l'asse delle  $z$  prende valori tendenti a zero; se invece  $d_i < d_e$ , il segno della equazione risulta positivo in quanto le particelle disperse affiorando si muovono nel verso in cui l'asse delle  $z$  prende valori crescenti.

$$v = \frac{2 R^2 (d_e - d_i) g}{9 \eta}$$

dove:

$v$  = velocità di sedimentazione;

$R$  = raggio delle particelle disperse;

$d_i$  = densità della fase interna;

$d_e$  = densità della fase esterna;

$g$  = accelerazione di gravità;

$\eta$  = viscosità della fase continua

Se invece le particelle sono più piccole, collocandosi nell'intervallo 0,001/1  $\mu\text{m}$  si ha a che fare con sospensioni o dispersioni colloidali.

Un sistema colloidale ideale è un sistema bifasico termodinamicamente instabile, in cui la fase dispersa solida tende a separarsi nel tempo dalla fase acquosa. Per questo sistema diviene irrilevante l'azione gravitazionale e prevalente: l'azione del moto Browniano, (moto casuale dovuto ad urti tra particelle), che tende a

sostenere le particelle nel mezzo disperdente in virtù della loro energia cinetica, e l'azione delle forze interparticellari.

Riassumendo le forze a cui le particelle sono sottoposte sono:

- moto browniano: si oppone alla sedimentazione, ma favorisce l'incontro tra le particelle;
- forze attrattive di Van der Waals: tendono a legare le particelle ogni volta che si avvicinano nel loro raggio di influenza;
- forze repulsive dovute al doppio strato: tendono ad allontanare le particelle e a rendere stabile la sospensione.

Fino a che le forze repulsive prevalgono su quelle attrattive, la sospensione è cineticamente stabile; quando le forze repulsive vengono ad essere ridotte, le forze di Van der Waals possono prevalere e provocare l'aggregazione. In figura 11 si riporta il profilo dell'energia potenziale in funzione della distanza interparticellare, calcolata dalla somma dell'energia delle forze repulsive ed attrattive delle particelle, sulla base della nota teoria DLVO.

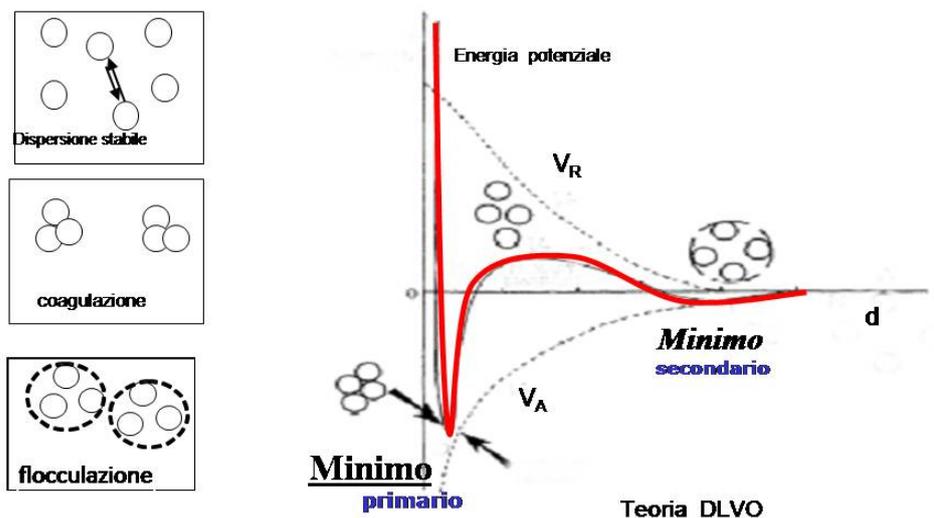


Figura 11- Andamento dell'energia potenziale in funzione della distanza interparticellare.

Come conseguenza diretta del prevalere delle forze attrattive o repulsive, si possono presentare tre differenti situazioni di stabilità:

- a metà distanza, la barriera elettrostatica repulsiva, creata dalla carica superficiale delle particelle, è abbastanza alta da prevenire l'aggregazione e dare origine ad una sospensione stabile di particelle che si respingono le une con le altre pur essendo tra loro vicine (dispersione);
- se l'energia cinetica delle particelle è più grande dell'energia della barriera repulsiva, queste entrano a contatto tra di loro, dando origine ad un'aggregazione irreversibile che corrisponde ad un minimo primario nel profilo dell'energia. Tale situazione è chiamata coagulazione;
- se l'energia potenziale di repulsione diminuisce rapidamente, all'allontanarsi delle particelle, queste possono incontrare un minimo secondario, meno profondo del minimo primario, in cui l'energia attrattiva prevale, mantenendo così le particelle ad una di equilibrio. Tale situazione origina degli addensamenti di particelle in particelle più grandi, dette flocculi, capaci di trattenere nel loro interno una parte di solvente. Questo tipo di aggregazione è di tipo reversibile in quanto le particelle possono poi essere facilmente disperse, variando il profilo dell'energia repulsiva, sfruttando l'agitazione del sistema o aumentando lo spessore del doppio strato elettrico. Tale fenomeno viene chiamato flocculazione.

Sulla base di tali considerazioni è possibile concludere che l'interazione particellare può essere controllata variando la carica superficiale e la risultante energia potenziale.

### **3.7.1 Controllo della stabilità della sospensione**

Le particelle disperse in soluzione esercitano sempre fra loro un'attrazione dovuta alle forze di Van der Waals, tuttavia sono stabili solo se si respingono con una forza repulsiva maggiore di quella di Van der Waals.

È possibile modificare la carica superficiale di una sospensione rendendola più o meno stabile agendo sulle forze repulsive che possono essere di tipo elettrostatico o di tipo sterico.

Le superfici e quindi le forze superficiali sono modificabili tramite l'impiego di tensioattivi, che ne modificano appunto, la carica superficiale.

È possibile avere diversi tipi di stabilizzazione:

a) stabilizzazione elettrostatica. All'interfase solido/liquido si ha una ridistribuzione di carica che può avvenire attraverso diversi meccanismi:

- adsorbimento selettivo alla superficie solida di uno degli ioni presenti nella soluzione o, in generale, adsorbimento di ioni di carica opposta;
- differente dissoluzione di ioni di carica opposta di un reticolo cristallino;
- dissociazione superficiale di gruppi ionici;
- reazione della superficie con il solvente (per esempio la reazione di idrolisi)

b) stabilizzazione sterica. Si parla di repulsione sterica quando le particelle si respingono in quanto sono state ricoperte, o per adsorbimento o per via chimica, da molecole, in genere a lunga catena idrocarburica che si ancorano alla superficie della particella ed estendono parte della catena nel mezzo disperdente in cui la catena stessa è solubile;

c) stabilizzazione elettrosterica. Le suddette particelle sono stabilizzate da polimeri o polielettroliti, attraverso l'azione combinata di fenomeni elettrostatici e sterici. L'assorbimento di molecole cariche sulla superficie delle particelle ceramiche ne modifica la carica superficiale e conseguentemente il Potenziale Zeta e crea un ingombro sterico che ne ostacola l'aggregazione.

### 3.7.2 Il potenziale zeta ( $\zeta$ )

#### **Definizione e significato fisico**

Il Potenziale Zeta viene definito come il potenziale calcolato sul piano di scorrimento (shear slipping plane) di una particella che si muove all'interno di una soluzione.

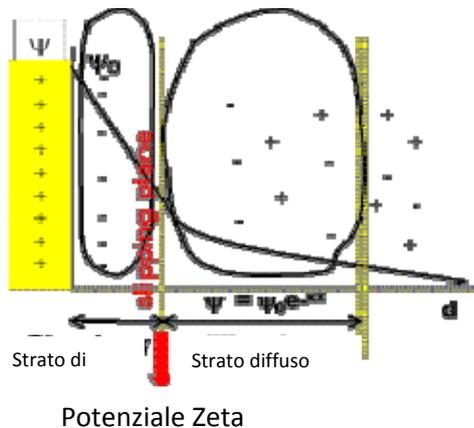


Figura 12- Rappresentazione schematica del doppio strato elettrico

A fronte di una carica superficiale delle particelle esisterà sempre in sospensione una carica uguale ed opposta per rispettare l'elettroneutralità: l'insieme delle due cariche costituisce il doppio strato elettrico (figura 12).

In particolare, il doppio strato elettrico è diviso in:

- una zona limitrofa alla superficie, dove vi è un'elevata concentrazione di contro ioni, ioni strettamente interagenti con essa;
- una zona in cui vi è una concentrazione molto inferiore di ioni liberi di muoversi con il resto della soluzione (strato diffuso).

All'interno dello strato diffuso gli ioni fluiscono insieme con il resto della soluzione pur conservando una configurazione stazionaria. Il profilo del potenziale superficiale  $\psi_0$ , all'interno del doppio strato elettrico, è quello di una brusca diminuzione all'interno dello strato di Stern e di una diminuzione di tipo esponenziale, dipendente solo dalla distanza rispetto alla superficie all'interno dello strato diffuso. Poiché l'interazione tra particelle, e quindi la stabilità della sospensione, è governata dalla parte diffusa del doppio strato, il potenziale  $\Psi_d$ , calcolato all'inizio dello strato diffuso, gioca un ruolo molto importante nella stabilizzazione elettrostatica del sistema colloidale e viene utilizzato nella teoria DLVO (Derjaguin, Landau, Verwey e Overbeek) per il calcolo dell'energia repulsiva.

La conoscenza della carica superficiale e quindi la misurazione del potenziale  $\Psi_d$  è molto difficile, pertanto si ricorre alla misurazione di potenziali che siano correlabili con  $\Psi_d$ . Un potenziale correlabile con  $\Psi_d$  è appunto il Potenziale Zeta. Il potenziale Zeta riflette l'effetto schermante che hanno le specie chimicamente adsorbite sulla carica superficiale.

Sulla base della teoria DLVO, una sospensione colloidale risulta stabile se il suo potenziale zeta è maggiore, in valore assoluto, di 30-40 mV.

### **Fattori da cui dipende il potenziale**

Dal momento che la particella si muove insieme con la sfera di ioni strettamente interagenti con essa, il potenziale zeta dipende dalla carica superficiale e dall'effetto di schermo generato dagli ioni limitrofi. Per questi motivi il potenziale zeta è influenzato:

- ✓ dall'aggiunta di determinati ioni, strettamente interagenti con la superficie, ovvero dalla concentrazione di ioni che possono far parte della superficie stessa o aver reagito chimicamente con essa, specie specificatamente adsorbite;
- ✓ dalla variazione di pH nella sospensione, specie modificatrici del potenziale;
- ✓ dalla forza ionica della soluzione. Sulla base di tale forza ionica, dipende lo spessore del doppio strato elettrico: una diminuzione della concentrazione di elettrolita porta ad una diminuzione del doppio strato con una conseguente variazione del potenziale. Tanto più è elevata la concentrazione degli ioni in soluzione, che non interagiscono strettamente con la superficie, tanto più compresso risulta il doppio strato elettrico, tanto più basso risulta il potenziale.

### **Misurazione**

Il potenziale  $\zeta$  viene anche definito potenziale elettrocinetico perché si ricava misurando gli effetti elettrocinetici generati dal movimento indotto di particelle

cariche in sospensione. Gli effetti elettrocinetici si differenziano per il modo in cui viene generato tale moto.

Per più di cent'anni, il potenziale zeta è stato misurato tramite l'uso dell'elettroforesi; nelle misure elettroforetiche si utilizza un dispositivo consistente in un cella cilindrica contenente il campione, all'estremità della quale sono ubicati i due elettrodi. Fra tali elettrodi viene mantenuta una differenza di potenziale. Le particelle cariche si muovono verso l'elettrodo appropriato, e la loro velocità, misurata ed espressa per intensità di campo, rappresenta la mobilità delle particelle. Tale tecnica presenta problemi di riproducibilità ed è applicabile solo a sospensioni relativamente diluite, con contenuto di solido inferiore allo 0,01 % vol.

Per le misure di mobilità in sospensioni molto concentrate è conosciuta una tecnica gravimetrica: la sospensione da esaminare viene collocata in una cella costituita da due compartimenti con un orifizio fra l'uno e l'altro. La cella è fatta in modo da consentire la rimozione di una porzione per la pesatura. Dopo che si è provveduto alla pesatura della sospensione nella parte in esame, prima della prova, la cella viene assemblata e fatta passare una corrente attraverso di essa. L'effetto che si ottiene è il passaggio attraverso l'orifizio delle particelle che presentano una certa mobilità elettroforetica. È così possibile determinare la massa di materiale passata attraverso l'orifizio e calcolare la mobilità elettroforetica.

La tecnica elettroacustica, invece, del tutto innovativa, impiegata dall'Acoustosizer, sfrutta la misurazione di uno degli effetti elettrocinetici, ovvero la generazione di un'onda acustica da parte del movimento di particelle cariche sottoposte ad un campo elettrico. L'ampiezza dell'onda (segnale ESA) dipende dall'entità delle cariche sulla superficie delle particelle, dalla concentrazione delle particelle e dall'ampiezza del campo elettrico. I segnali ESA sono utili per elevati livelli di contenuto di solido, fino al 10% vol e sono altamente riproducibili a parità di contenuto di solido, temperatura, condizioni di dispersione.

### **3.7.3 Il punto isoelettrico**

Il punto isoelettrico, IEP (isoelectric point), rappresenta un importante parametro che caratterizza le sospensioni ovvero quel valore di pH al quale il potenziale zeta si annulla, a tale valore di pH non vi sono forze repulsive e le particelle tenderanno a flocculare.

Esso è indipendente dalla concentrazione delle polveri, tuttavia dipende fortemente da fenomeni di adsorbimento superficiale; la regione di pH intorno al punto isoelettrico delimita quindi una zona in cui il potenziale è a valori lontani dalla stabilità colloidale.

### **3.7.4 La spettroscopia elettroacustica**

#### **La tecnica**

La spettroscopia elettroacustica è basata sull'interazione di onde ultrasoniche e campi elettrici con particelle colloidali cariche.

Con la misura elettroacustica, applicando un campo elettrico ad una sospensione ceramica, è possibile misurare la risultante risposta acustica ESA, (electronic sonic amplitude), mentre applicando un campo ultrasonico è possibile misurare la risultante risposta elettrica CVP, (colloid vibration potential); entrambi gli effetti sono rilevabili se il sistema è costituito da particelle cariche con densità diversa da quella del mezzo disperdente; tali risposte sono poi correlate al potenziale zeta tramite modelli matematici.

Il vantaggio principale della tecnica elettroacustica rispetto alle tecniche elettrocinetiche convenzionali, (tecniche che studiano i fenomeni elettrochimici sulle superfici di separazione di due fasi) è che consente di esaminare le proprietà colloidali di sospensioni acquose anche per sistemi dispersi concentrati opachi, per i quali non sono utilizzabili le convenzionali tecniche ottiche.

#### **L'Acoustosizer**

L'Acoustosizer è lo strumento che, sfruttando la teoria elettroacustica, consente di stimare la carica di particelle colloidali disperse in mezzo continuo, in un

intervallo di dimensioni compreso tra 0.1 e 10  $\mu\text{m}$  con concentrazioni volumetriche da 1 a 15/20 vol %.

L'Acoustosizer applica un campo elettrico alternato di 13 frequenze diverse comprese tra 0.3 e 15 Mhz e misura i risultanti segnali ESA, rappresentati da un set di 13 numeri complessi, uno per ciascuna frequenza applicata, che costituiscono lo spettro ESA.

La risposta ESA è generata dal movimento oscillante avanti e indietro delle particelle sottoposte al campo elettrico. In particolare il periodico sfasamento tra il movimento delle particelle e quello della nuvola ionica che le circonda, dovuto alla differenza di densità tra particelle e mezzo disperdente, genera l'onda ultrasonica chiamata appunto ESA, la cui pressione agli elettrodi è convertita da un trasduttore piezoelettrico in segnale elettrico.

È stato dimostrato che l'ampiezza del segnale piezoelettrico è proporzionale alla mobilità dinamica  $\mu_d$  delle particelle per una sospensione di qualsiasi concentrazione.

Dall'esame dello spettro ESA è pertanto possibile ricavare contemporaneamente informazioni sulla carica e sul diametro delle particelle in un intervallo tra 0.1 e 10  $\mu\text{m}$ . Al di sotto di questo limite l'inerzia delle particelle risulta trascurabile per cui l'unico dato che si può ricavare è il potenziale zeta di Smoluchowski, al di sopra di questo limite il moto delle particelle è troppo piccolo per essere misurato.

### **Descrizione dello strumento**

La cella di misura dell'Acoustosizer è fornita di tre probes, che misurano in situ:

- a) la temperatura;
- b) il pH;
- c) la conducibilità della sospensione;

inoltre è fornita di un software per la titolazione automatica che consente di misurare il potenziale  $\zeta$  e la distribuzione delle dimensioni delle particelle in funzione del pH o della quantità di un titolante aggiunto.

In questo modo è stato possibile ricavare alcune grandezze fondamentali per la caratterizzazione delle proprietà colloidali del sistema quali il punto isoelettrico o

la quantità minima di disperdente necessaria per stabilizzare la sospensione e studiare come queste grandezze dipendano dalle variabili sperimentali.

### **3.8 Determinazione dell'area di superficie specifica**

Tale misura viene effettuata con metodologia BET (Brunauer, Emmet e Teller). Poiché le particelle dei campioni sono, in generale molto irregolari, si utilizza un processo di adsorbimento fisico di un gas sulla superficie di ciascuna particella: si procede in modo da avere la formazione di uno strato monomolecolare dal quale si possa risalire alla superficie globale calcolando il numero di molecole adsorbite. Alle condizioni di equilibrio la quantità di gas che si adsorbe dipende dalla temperatura (T), dalla pressione (P) e dalle caratteristiche intrinseche sia dell'adsorbito che dell'adsorbente.

Se la temperatura è costante, vale la seguente uguaglianza:

$$V_a = b f(P)$$

Cioè il volume del gas adsorbito ( $V_a$ ) è funzione della sola pressione (isoterma di adsorbimento).

In una tipica procedura di analisi, la cella contenente il campione, dopo il raffreddamento successivo al trattamento termico, è soggetta alla misurazione. La cella contenente il campione viene immersa nel bagno refrigerante ad azoto liquido in modo da consentire il processo di adsorbimento. Questa operazione provoca una variazione di flusso di gas all'interno del sistema, che torna al valore ottimale dopo circa un minuto. Da questo momento in poi lo strumento inizia a registrare i dati. Rilevati i dati di adsorbimento, si può procedere al desorbimento; sostituendo, infatti, il bagno refrigerante con un bagno d'acqua a temperatura ambiente, l'azoto adsorbito viene liberato andando ad arricchire di nuovo la miscela di gas in uscita.

In condizioni ideali, il processo di desorbimento è quantitativamente uguale a quello di adsorbimento, ma di segno opposto.

Possono comunque sussistere delle variazioni tra i due processi anche se, operando sotto opportune condizioni, tali differenze possono essere ridotte a livelli trascurabili.

### 3.9 Granulometria

Il comportamento di caduta delle particelle per gravità in un fluido, normalmente acqua, è un principio molto utilizzato nella determinazione delle dimensioni delle particelle stesse, soprattutto perché è particolarmente idoneo per una vasta gamma di materie prime, perché è in grado di arrivare a dimensioni inferiori al micron.

Il caso più semplice è quello di particelle sferiche soggette a sedimentazione con moto laminare a velocità costante.

La relazione tra velocità di caduta e dimensioni è definita dalla legge di Stokes:

$$D^2 = \frac{18v\eta}{(\rho - \rho_0)g}$$

Dove:

**D** = diametro delle particelle sferiche (cm)

**v** = velocità di sedimentazione (cm/sec)

**$\eta$**  = viscosità del fluido (in poise =  $\text{g cm}^{-1} \text{sec}^{-1}$ )

**$\rho$**  = densità del materiale in fase di sedimentazione ( $\text{g/cm}^3$ )

**$\rho_0$**  = densità del fluido ( $\text{g/cm}^3$ )

**g** = accelerazione di gravità (=  $981 \text{ cm/sec}^2$ )

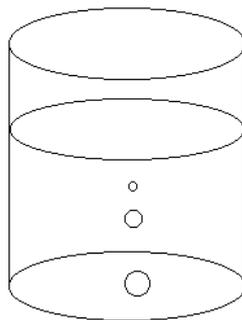


Figura 13- Sedimentazione di differenti particelle in un liquido

Per misurare la distribuzione granulometrica delle polveri di SrHA è stato impiegato il sedimentografo Sedigraph 5100 a raggi X della casa Micromeritics. L'analisi si basa sulla velocità di sedimentazione (Legge di Stokes) ipotizzando, naturalmente, che le particelle siano sferiche e che il loro tempo di sedimentazione sia funzione solo delle loro dimensioni.

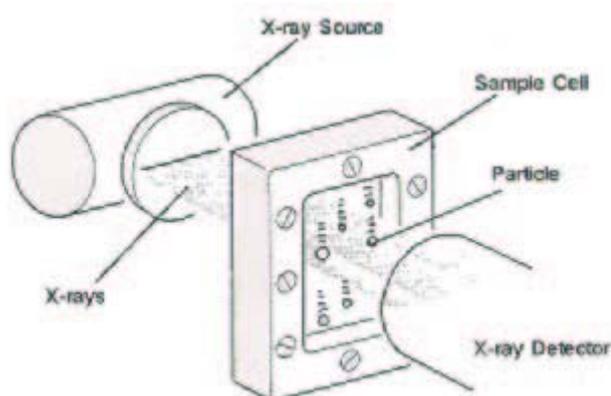


Figura 14- Particolare della cella di sedimentazione

La sospensione viene mantenuta in agitazione con agitatore magnetico ed immessa nella cella di analisi attraverso una pompa peristaltica che provvede ad un continuo ricambio della sospensione all'interno della cella stessa; tale ricambio termina nel momento in cui comincia la sedimentazione.

Il sedigraph utilizza un fascio di raggi X a posizione fissa per testare la trasparenza della sospensione contenuta nella cella di analisi (figura 14).

La procedura di analisi prevede la misurazione della concentrazione prima delle particelle più grosse e via via fino a quelle più fini.

Quindi all'inizio dell'analisi il fascio valuta la trasparenza della parte inferiore della cella, in seguito la cella subisce uno spostamento verso il basso in modo da diminuire i tempi necessari per la determinazione delle particelle più fini (lenta sedimentazione).

Tale tipologia di analisi presenta poche difficoltà strumentali, ma necessita di particolare attenzione la preparazione della sospensione che deve essere ben disaggregata.

Per le materie prime tradizionali generalmente è sufficiente trattare 80 minuti in bagno ad ultrasuoni la sospensione contenente una minima quantità di Calgon (polifosfato di sodio) per garantire uno stato dispersivo adeguato.

### **3.10 Porosimetria**

La porosità di un materiale è definita come il rapporto tra il volume dei suoi spazi vuoti ed il volume totale che esso occupa. Se la porosità è sotto forma di pori aperti, cioè interconnessi ed in comunicazione con la superficie, il materiale è permeabile ai fluidi e la forma e la dimensione dei pori influenzano la capacità di adsorbire e desorbire sostanze dall'ambiente esterno.

Il metodo della misurazione della grandezza dei pori mediante penetrazione di *mercurio* si basa sul comportamento nei capillari di liquidi non bagnanti.

L'affinità di un liquido rispetto ad una superficie solida viene normalmente descritta con il termine di bagnabilità.

Se il liquido si estende spontaneamente lungo una superficie solida si dice che esso bagna la superficie; se il liquido a forma di goccia rimane stazionario ed appare sferico, significa che non bagna.

Una misura della bagnabilità è l'angolo di contatto formato alla giunzione di un solido e un liquido in un particolare ambiente (figura 15).

In generale, se l'angolo di contatto  $\theta$  si trova tra  $0$  e  $90^\circ$  il sistema bagna la superficie, se l'angolo è tra  $90^\circ$  e  $180^\circ$  il sistema non bagna la superficie. Ovviamente un liquido totalmente bagnante presenterà  $\theta = 0^\circ$  mentre per uno totalmente non bagnante l'angolo  $\theta = 180^\circ$ .

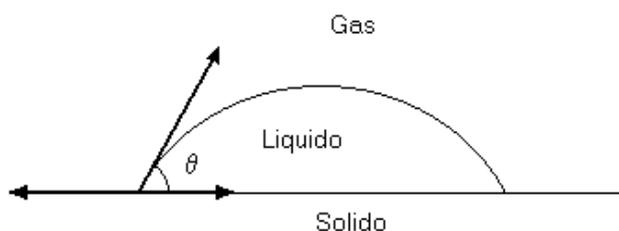


Figura 15- Angolo di contatto

In un piccolo foro non può esservi entrata spontanea di un liquido avente angolo di contatto maggiore di  $90^\circ$  e ciò a causa della tensione superficiale del liquido; questa forza può essere vinta dall'applicazione di una pressione esterna che è funzione inversa della grandezza del foro. Se il foro è circolare, in termini di sezione, l'equazione che correla il raggio del foro con la pressione necessaria per ottenere la penetrazione del liquido è la seguente:

$$P = -\frac{2\gamma}{r} \cos\theta$$

Dove:

$P$  = pressione assoluta applicata ( $\text{Kg}/\text{cm}^2$ )

$\gamma$  = tensione superficiale del liquido (mercurio)

$r$  = raggio del poro in  $\text{Å}$

$\theta$  = angolo di contatto o di bagnabilità

Dalla formula appare evidente che tra pressione applicata e raggio dei pori esiste una proporzionalità inversa; inoltre per liquidi non bagnanti, come il mercurio, ossia per  $\theta > 90^\circ$ ,  $\cos\theta$  assume un valore negativo e quindi risulta positiva la pressione che si deve applicare sul mercurio affinché entri nei pori.

Assumendo per il mercurio un angolo di contatto pari a  $141.3^\circ$  e nella supposizione di pori a forma cilindrica, si ottiene in pratica la seguente semplice relazione tra raggio del poro e pressione:

$$r = \frac{75000}{P}$$

La relazione suddetta ha naturalmente valore rigoroso solo per pori aventi sezioni circolari. Inoltre il valore assunto dall'angolo di contatto è in realtà funzione della natura delle sostanze porose in esame; quindi per misure porosimetriche accurate, il valore dell'angolo di contatto deve essere preventivamente misurato.

La tecnica sperimentale presuppone una fase di messa in vuoto del recipiente in cui si trova il campione, quindi si riempie la cella con mercurio e sulla stessa viene applicata una pressione linearmente crescente per forzare l'ingresso del mercurio all'interno dei pori.

Lo strumento registra in un diagramma il volume di mercurio entrato nei pori ed i corrispondenti valori di pressione.

I dati sperimentali possono essere ulteriormente elaborati per dare la distribuzione differenziale dei pori espressa in percentuale.

### **3.11 HPLC**

L'analisi cromatografica viene condotta sul sistema Bioscan (Metrohm) che include: una pompa alternativa a piston; una colonna anionica e un rivelatore elettrochimico.

#### **Colonna di separazione**

La colonna Metrosep Carb 1, con l'involucro fatto in PEEK, viene utilizzata per la separazione di polisaccaridi con una lunghezza fino a 30 unità glicosidiche. La fase stazionaria è costituita da particelle di stirene-divinilbenzene con un diametro di 5  $\mu\text{m}$ . La capacità della colonna (4x150 mm) è di circa 700  $\mu\text{mol Cl}^-$ .



Figura 16-: Comparto per la determinazione della tobramicina.

### **Rivelatore elettrochimico**

Il rivelatore elettrochimico ha elevata sensibilità, semplicità, convenienza ed ampio campo di applicazione. Questa ultima proprietà è dovuta al fatto che ben 16 gruppi funzionali organici sono rilevabili con tecniche amperometriche, voltammetriche o coulombometriche.

L'817 IC Detector (Metrohm) è costituito da una cella elettrochimica a flusso, in Teflon, avente un volume 1-5  $\mu\text{m}$ . La cella contiene tre elettrodi, lavoro (WE), riferimento (RE) e ausiliario (AE), collegati ad un potenziostato. L'elettrodo di lavoro, a cui avviene la reazione elettrochimica, è d'oro, mentre quello di riferimento e l'ausiliario sono, rispettivamente, di Ag/AgCl e di Pt.

Questa apparecchiatura permette di misurare l'intensità di corrente in tre diversi modi in funzione della modalità di applicazione del potenziale all'elettrodo di lavoro:

1. modalità DC (applicazione di un potenziale costante);
2. modalità Scan (variazione lineare del potenziale);
3. modalità ad Impulsi (applicazione ciclica di 3 potenziali diversi).

Le modalità più utilizzate sono le ultime due.

### **Modalità ad Impulsi (PAD, Pulsed Amperometric Detection)**

Nella reazione redox il prodotto di reazione, o gli intermedi, possono depositarsi sull'elettrodo di lavoro ed alterarne le proprietà superficiali. Per ovviare a questi inconvenienti, è possibile applicare ciclicamente 3 opportuni potenziali in modo da rigenerare costantemente la superficie dell'elettrodo. Il primo potenziale  $E_1$ , applicato per un tempo pari a  $t_1$ , permette la stabilizzazione del segnale cui segue la rilevazione della reazione di ossidazione, o di riduzione degli analiti. Successivamente al potenziale  $E_2$  avviene la rimozione ossidativa dei prodotti di reazione dalla superficie dell'elettrodo, ed a quello  $E_3$  la riduzione ad Au puro.

### **Modalità Scan**

Questa modalità permette la registrazione di un voltammogramma, scandito tra un valore di minimo ed uno massimo che comprendono i valori di ossido-riduzione degli analiti per ottimizzare il potenziale di misura utilizzato nel PAD. Ciò porta al:

- Miglioramento della sensibilità poiché è possibile determinare i potenziali con un elevato rapporto segnale disturbo;
- Aumento della selettività tra analiti ed interferenti.

Il voltammogramma viene ottenuto sciogliendo la sostanza da investigare nell'eluente, che viene portato con un flusso abbastanza lento (0.05-0.1 mL/min) direttamente nella cella a flusso non inserendo la colonna.

### **Parametri cromatografici**

Si utilizza una eluizione isocratica di sodio idrossido 100 mM, con un flusso di 1 mL/min. La separazione cromatografia è completata in meno di 10 minuti. I parametri del rivelatore elettrochimico, riportati in Tabella 2, sono stati ottimizzati per ottenere una buona determinazione dell'analita.

Tabella 2: Condizioni del rivelatore elettrochimico per la modalità da impulsi.

RIVELATORE ELETTROCHIMICO AD IMPULSI		
<b>Parametri impostati</b>	$t_1$ 0,00-0,40 (s)	$E_1$ 0,05 (V)
	$t_2$ 0,40-0,60 (s)	$E_2$ 0,55 (V)
	$t_3$ 0,60-1,00 (s)	$E_3$ - 0,4 (V)
<b>Periodo di integrazione</b>	0,30-0,40 (s)	
<b>Temperatura</b>	30°C	

### Metodo analitico

Ciascuna aliquota prelevata durante la cinetica di rilascio è diluita 1:10 ed iniettata in colonna. Prima dell'iniezione in colonna tutti i componenti sono filtrati attraverso una membrana inorganica di 0,2  $\mu\text{m}$  (Whatman International Ltd) per rimuovere ogni eventuale particolato.

Normalmente sono stati utilizzati 20  $\mu\text{L}$  di campione e tutte le misure sono condotte a 25°C ad un flusso di eluente pari ad 1 mL/min.

### 3.12 Resistenza a compressione

I materiali sono stati sottoposti al test a compressione utilizzando la Zwick/Roell Z050 machine (ULM, Germany).

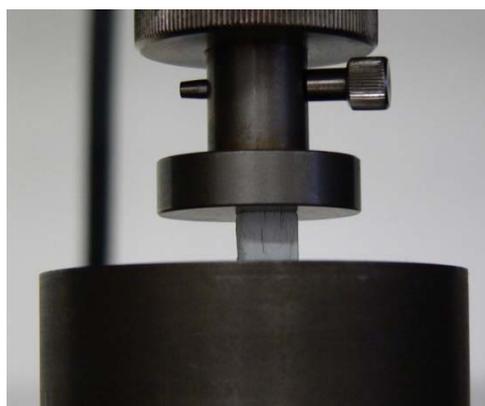


Figura 17-: Apparecchiatura utilizzata per il test a compressione

Per i materiali ceramici porosi il pezzo è stato eseguito su campioni cilindrici in cui il rapporto  $\Phi$ : h è stato 1:1, all'interno del range 8-15mm. I campioni sono

stati sottoposti a carico fino alla frattura. Per evitare la concentrazione degli stress in determinati punti del campione, dei fogli sottili di carta sono stati inseriti fra le superfici piane del materiale e le superfici piane della strumentazione. La resistenza a compressione ( $\sigma$ ) è stata calcolata secondo la seguente formula:

$$\sigma = \frac{P_{max}}{A}$$

dove  $P_{max}$  rappresenta il carico registrato durante la compressione ed A l'area di base .

Cinque pezzi sono stati testati per ciascun tipo di materiale.



## 4. APATITI POROSE

### 4.1 Le polveri

Numerose sono le reazioni che consentono di ottenere le apatiti, sia in funzione dell'ampia possibilità di scelta dei reattivi di partenza, che della possibilità di fare avvenire reazioni allo stato solido o umido.

Il metodo ad umido qui adottato, consente la preparazione di polveri apatitiche con relativa semplicità operativa e strumentale, è in grado di fornire prodotti puri e controllabili per quanto riguarda la cristallinità, agendo opportunamente sui parametri della sintesi (temperatura, tempi di reazione). La sintesi e precipitazione dell'idrossiapatite avviene attraverso una reazione di neutralizzazione acido-base, con resa quantitativa ben superiore rispetto ad altri metodi ad umido, tra reattivi a basso costo: idrossido di calcio e acido fosforico, nell'opportuno rapporto stechiometrico. L'utilizzo del  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ , insolubile anziché un sale solubile (es. Nitrato) consente inoltre di mantenere il pH autocontrollato ad alti valori, necessari per evitare la precipitazione di fasi calcio fosfatice diverse dall'apatite, eliminando l'aggiunta di reagenti chimici (ad es.  $\text{NH}_4\text{OH}$ ).

*Reazione di neutralizzazione:*



L'apparecchiatura (Figura 1) necessaria alla sintesi è piuttosto semplice e tale da consentire il controllo di: temperatura di reazione, aggiunta ed omogeneizzazione controllata dei reagenti e refrigerazione a riflusso, nel caso di sintesi ad alte temperature.

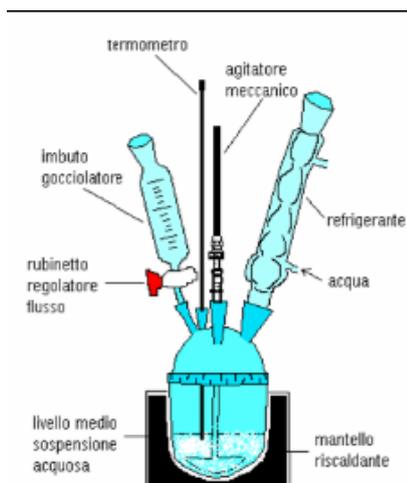


Figura 1- Schema dell'apparecchiatura utilizzata per le sintesi di apatite.

#### 4.1.1 Sintesi di polveri stronzio sostituite

##### Procedura sperimentale

In un pallone contenente 100g di  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  dispersi in 800ml di acqua sono state aggiunte per gocciolamento (1 goccia/sec per 4-5 h) due soluzioni:

1. 400 ml di  $\text{Sr}(\text{NO}_3)_2$  0.64 M.
2. 600 ml di  $\text{H}_3\text{PO}_4$  1.28 M.

Dai dati riportati si osserva come si sia utilizzato un rapporto molare Sr/Ca pari a 0.20.

Durante l'intero processo, il contenuto del pallone è stato mantenuto sotto agitazione (tramite agitatore a palette 300 giri/min) ad una temperatura pari a 40-45°C (mediante mantello riscaldante). In tali condizioni si sintetizzano apatiti a bassa cristallinità; l'influenza della temperatura a cui viene condotta la sintesi, nel determinare la cristallinità dell'apatite sintetizzata ad umido, è nota<sup>2</sup>.

Terminato il gocciolamento il sistema resta per due ore nelle stesse condizioni di agitazione e temperatura. Infine è lasciato a riposo per 24 ore.

Dopo l'eliminazione del liquido surnatante, il precipitato è stato sottoposto a lavaggio con 1000 ml di acqua, per tre volte, al fine di eliminare le impurezze eventualmente adsorbite sulla superficie delle particelle della polvere.

I precipitati, poi, sono stati posti in stufa (ad una temperatura di circa 80°C) ad asciugare. Infine le polveri sono state setacciate su maglie inferiori ai 150µm.

#### 4.1.2 Caratterizzazione e discussione

##### Analisi XRD

Le polveri HA e SrHA sono state caratterizzate sia dal punto di vista composizionale che cristallografico mediante diffrazione a raggi X (figure 2-5), prima e dopo trattamento di calcinazione, in quanto saranno utilizzate come tali per la realizzazione di scaffold porosi (paragrafo 4.2).

Per le polveri a base di HA si osservano tutti i picchi caratteristici (tabella 1) nel range selezionato.

Tabella 1 Picchi caratteristici dell'apatite

	(hkl)	(002)	(102)	(210)	(211)	(112)	(300)	(202)
<b>HA</b>	<b>d [Å]</b>	3.4556	3.1882	3.1004	2.8186	2.7914	2.7252	2.6350
<b>HA calc</b>	<b>d [Å]</b>	3.4401	3.1746	3.0951	2.8152	2.7809	2.7217	2.6313
<b>SrHA</b>	<b>d [Å]</b>	3.4460	3.2015	3.0931	2.8254	2.8064	2.7348	2.6460
<b>SrHA calc</b>	<b>d [Å]</b>	3.4615	3.1888	3.0976	3.8259	2.7943	2.7314	2.6437

Confrontando le polveri di HA con quelle di SrHA si osserva come tutti i riflessi, relativi ai vari piani cristallografici, risultino spostati, rispetto all'idrossiapatite stechiometrica, verso valori inferiori di 2-theta; la legge di Bragg prevede che la distanza tra i piani sia inversamente proporzionale all'angolo  $\theta$ . L'aumento quindi del raggio ionico, riferito allo ione Sr (raggio ionico = 0.113nm) rispetto allo ione Ca (raggio ionico=0.099nm), porta, come prevedibile, ad una diminuzione dell'angolo  $\theta$  (come si osserva nella tabella precedente) e dal confronto delle figure 2-4 e figure 3-5.

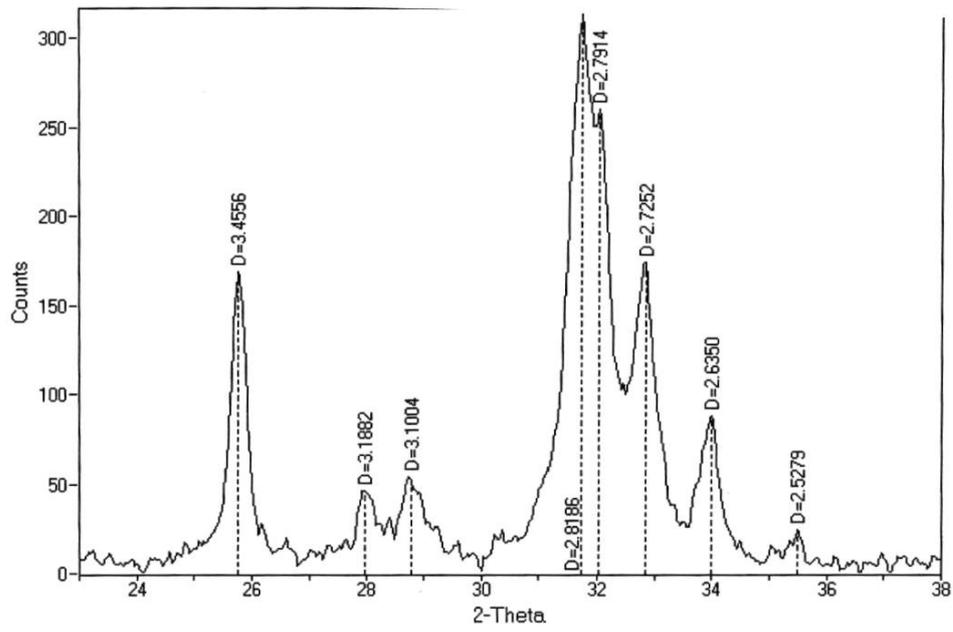


Figura 2 Spettro XRD per la polvere di HA

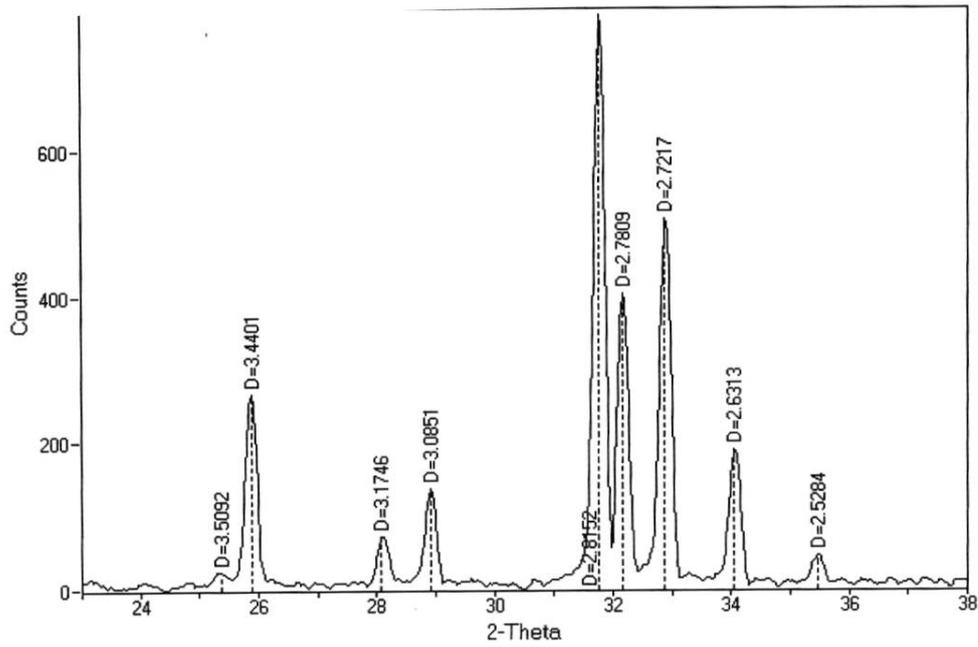


Figura 3 - Spettro XRD per la polvere di HA calcinata

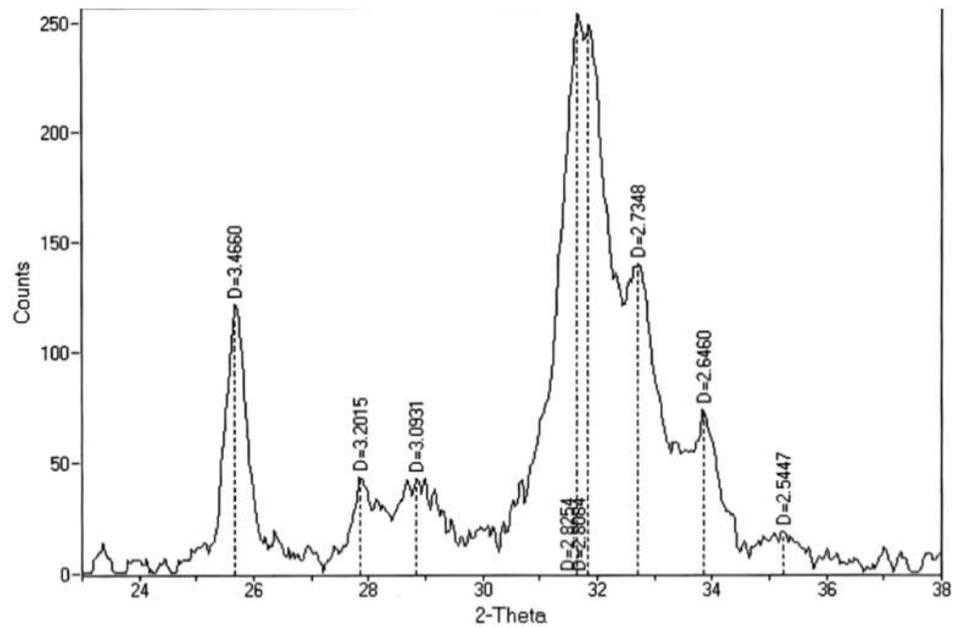


Figura 4 - Spettro XRD per la polvere di SrHA

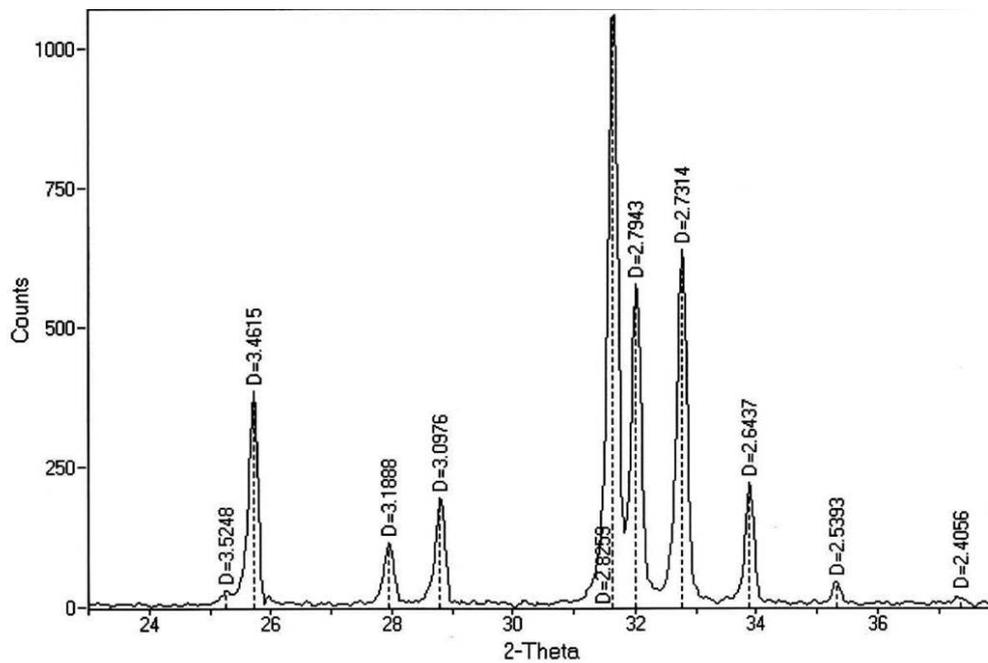


Figura 5 - Spettro XRD per la polvere di SrHA calcinata

Per stimare e confrontare la cristallinità delle polveri è stato utilizzato un metodo applicabile alle apatiti nano strutturate, sviluppate in ISTEK, che si basa sull'equazione :

$$X_c \% = (1 - X/Y) * 100$$

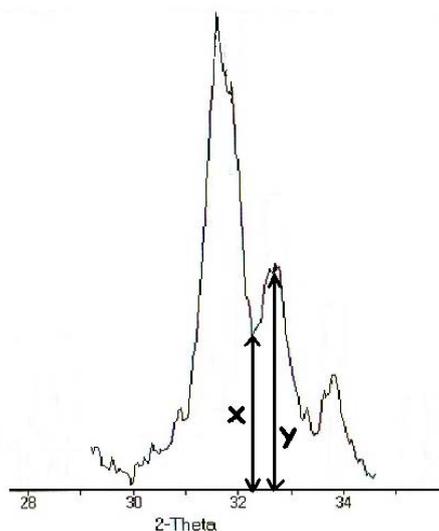


Figura 6- Particolare dello spettro XRD, per la valutazione della cristallinità delle polveri.

Utilizzando l'equazione precedente, si osserva come le polveri selezionate presentino il seguente grado di cristallinità:

Tabella 2 Valori calcolati di cristallinità per le differenti polveri

Polvere	% $X_c$
<i>SrHA</i>	12%
<i>SrHA calcinata</i>	77%
<i>HA</i>	42%
<i>HA calcinata</i>	96%

Le polveri sono state sintetizzate a bassa temperatura e questo ha favorito la produzione di una polvere a bassa cristallinità. La realizzazione di sostituzioni

ioniche nella struttura Ca-P apatite durante la nucleazione della fase stessa, aumenta lo stato difettivo della struttura, influenzando fortemente le proprietà chimico-fisiche della polvere sintetizzata e la sua reattività: in generale le sostituzioni ioniche inducono una diminuzione di stabilizzazione<sup>3</sup>. A seguito dei trattamenti di calcinazione a 1000°C, il grado di cristallinità è cresciuto fortemente sia per la polvere di SrHA che per quella di HA, ma in percentuale molto maggiore nel caso dell'apatite Sr-sostituita (circa 6 volte contro 2 volte dell'HA) pur attestandosi ad un valore più basso in termini assoluti.

La percentuale di stronzio introdotta nella cella, e quindi il valore di  $q$  nella formula dell'idrossiapatite sostituita con lo stronzio<sup>2</sup>:  $\text{Ca}_{10-q}\text{Sr}_q(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  è stimabile sulla base della seguente equazione:

$$q = -16290 \left( \frac{c}{a} \right)^2 + 24647 \frac{c}{a} - 9311.6$$

dove  $a$  e  $c$  sono i parametri di cella dell'HA, che sono influenzati dalle sostituzioni dello stronzio nei siti del calcio e sono calcolabili dalle equazioni sotto riportate.

$$a = b = 2\sqrt{3} \cdot D_{(300)} [\text{\AA}]$$

$$c = 2 * D_{(002)} [\text{\AA}]$$

dove  $D$  rappresenta la distanza interplanare.

Per quanto riguarda la polvere di SrHA, prima e dopo calcinazione, si ha un rapporto  $c/a$  pari a 0.7317. Questo rapporto corrisponde ad un valore di  $q$  pari a 1.19, da cui si ricava che il rapporto molare Sr/Ca è pari a 0.13.

### **Analisi dell'area di superficie specifica**

I valori di s.s.a (specific surface area) relativi alla superficie specifica della polvere di HA e di SrHA sono rispettivamente 69 e 81 m<sup>2</sup>/g.

Dopo trattamento di calcinazione i valori di s.s.a. risultano pari a 3.9 ed a 4.9 m<sup>2</sup>/g, vale a dire fortemente diminuiti, come previsto dall'effetto di accrescimento dei grani indotto dal trattamento termico.

### Analisi granulometrica

Sono state preparate due sospensioni acquose utilizzando calgon (polifosfato di sodio) come agente disperdente.

Dopo trattamento di miscelazione macinazione per 20h, al fine di simulare le condizioni granulometriche delle sospensioni che sono stati utilizzate per la preparazione dei corpi porosi (paragrafo 4.2.1), un trattamento ad ultrasuoni di circa 30min è stato applicato subito prima dell'analisi per facilitare la disaggregazione dei possibili agglomerati presenti.

Nelle figure 7 e 8 sono riportati i grafici relativi alla frequenza di massa in funzione del diametro delle particelle.

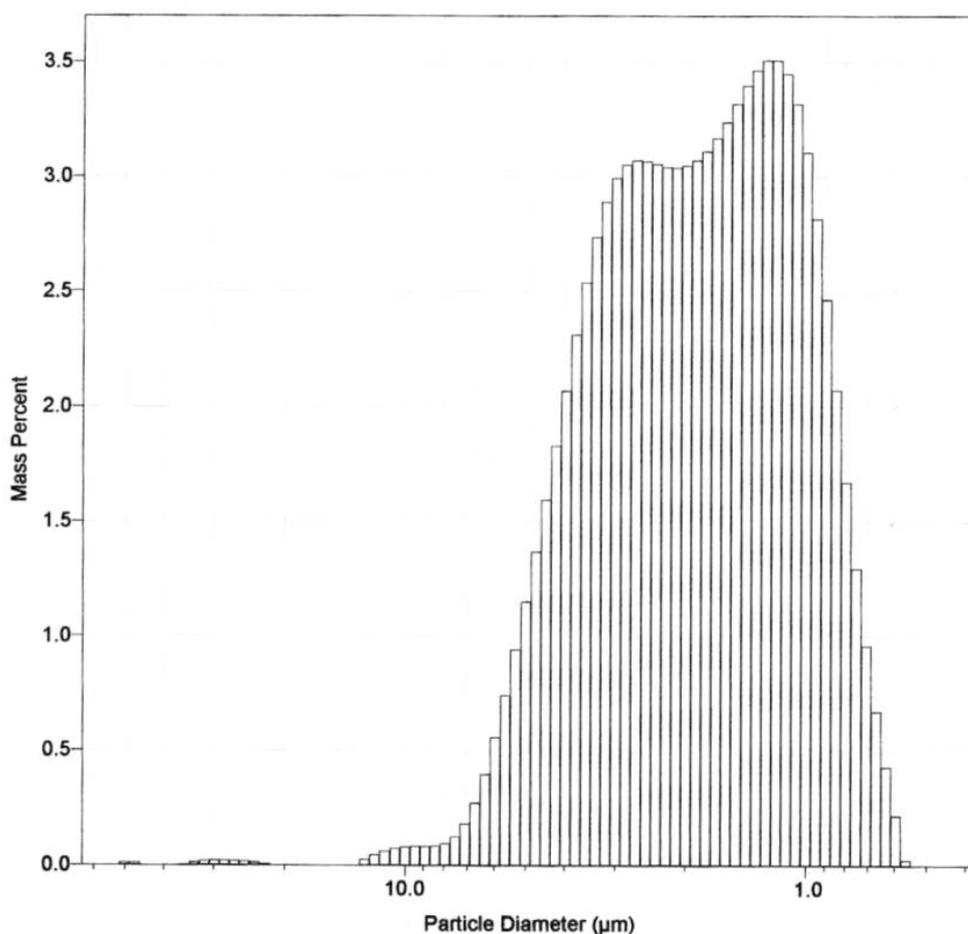


Figura 7- Grafico delle frequenze di massa in funzione dei diametri relativi per HA calcinata.

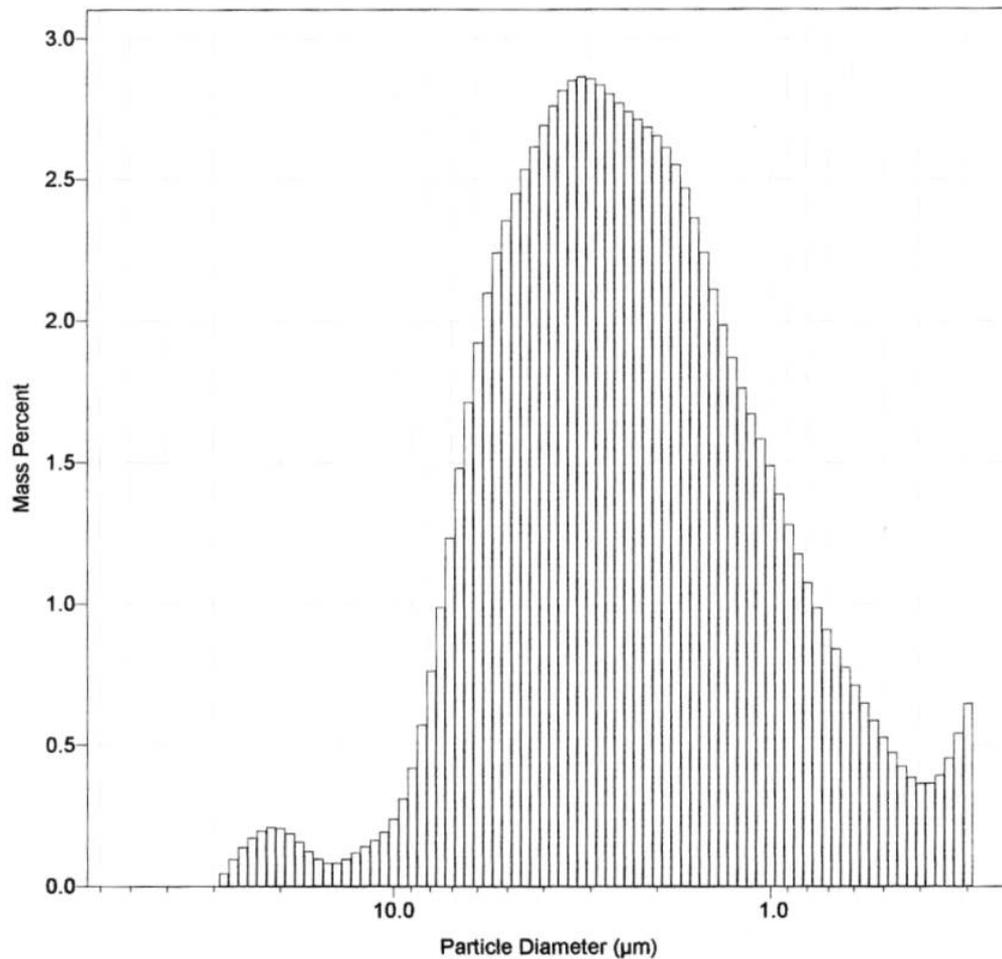


Figura 8- Grafico delle frequenze di massa in funzione dei diametri relativi per SrHA calcinata.

Tali grafici sono, in realtà, istogrammi integrati in cui ogni diametro è associato alla relativa frequenza.

Nonostante il trattamento in bagno ad ultrasuoni, le polveri di HA risultano composte da aggregati di particelle di dimensioni variabili nel range 0.6-11 μm, con due picchi di frequenza circa a 1.3 ed a 3.1 μm. Le polveri di SrHA presentano aggregati fra 0.4- 12 μm con un solo picco centrato a 3.0 μm.

### **Analisi termogravimetrica (TG-DSC)**

Questa analisi è stata effettuata per valutare la stabilità termica della polvere di SrHA, identificando processi di decomposizione in funzione della temperatura, utili per l'ottimizzazione del processo di sinterizzazione. La tecnica consente di ottenere, inoltre, indicazioni composizionali.

La curva TG, relativa alla polvere di SrHA, è stata ottenuta in flusso di aria con una velocità di riscaldamento pari a 10°C/min.

La curva mostra una parziale perdita in peso pari a circa il 5 % che è imputabile all'acqua ed alla CO<sub>2</sub> adsorbite fino ai 200°C,; successivamente si verifica il rilascio di acqua occlusa e la condensazione degli ioni HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup> rimasti eventualmente come impurezze.

Tra 600°C e 1100°C circa, si osserva la perdita in peso dovuta alla decarbonatazione dell'apatite (circa un 2% in peso) che avviene con liberazione di anidride carbonica e corrisponde ad un valore di carbonato in peso nell'apatite pari allo 3.33%, a cui si sovrappone un secondo stadio di deidrossilazione del gruppo OH strutturale.

### **Analisi FTIR**

Osservando lo spettro relativo alla polvere di HA (figura 9), si nota come accanto ai picchi caratteristici dei gruppi funzionali costituenti l'HA, siano presenti una banda allargata a 3425 cm<sup>-1</sup>, attribuibile all'acqua di solvatazione, una banda a 1638 cm<sup>-1</sup>, tipica dell'acqua occlusa ed i segnali del CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> sostituito in posizione B (ovvero nei siti del PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>: coppia di picchi 1430 cm<sup>-1</sup> e 1460 cm<sup>-1</sup> e picco a 873 cm<sup>-1</sup>). Si riportano i picchi caratteristici della polvere in tabella 2<sup>2</sup>.

Dopo il trattamento di calcinazione la polvere presenta una riduzione dei picchi dell'acqua occlusa (1630 cm<sup>-1</sup>) e della carbonatazione di tipo B, mentre risultano più risolti i picchi dell'OH strutturale.

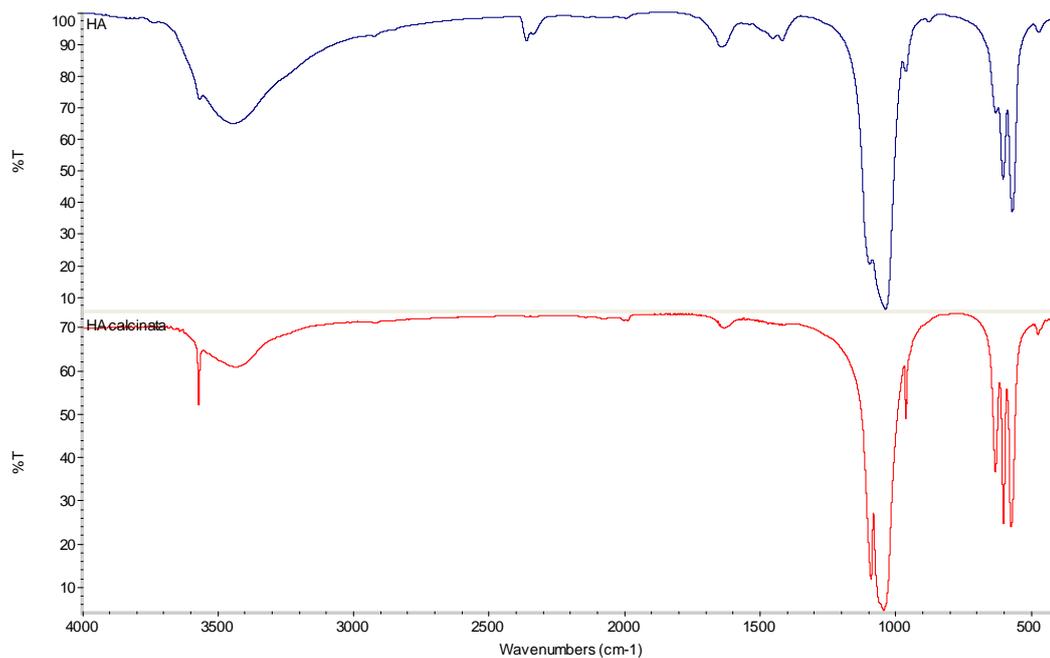


Figura 9- Spettro FTIR della polvere di HA (blu) e della polvere di HA calcinata (rosso).

Tabella 2: Frequenze caratteristiche delle apatiti

Numero d'onda (cm <sup>-1</sup> )	Gruppo caratteristico
3450	H-O str.
2350	C-O str.
1630	H <sub>2</sub> O occlusa
1540-1460	CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> str. sito A
1460-1430	CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> str. sito B
1050	P-O str.
960	P-O str.
880	CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> bend. sito A
873	CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> bend. sito B
600	H-O bend.
570	O-P-O bend. (PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> )

Le condizioni di sintesi hanno fatto sì che le polveri fossero leggermente B-carbonatate, ovvero il carbonato sostituisce parzialmente il fosfato nella struttura dell'apatite. È possibile risalire alla quantità effettiva dei carbonati dall'analisi termogravimetrica.

In aggiunta come già osservato per la HA, si osserva una riduzione dei picchi del  $\text{CO}_3^{2-}$ , accompagnata da una riduzione della quantità di acqua. Lo spettro denota un grado di disordine superiore rispetto all'HA, i picchi, infatti, sono meno definiti.

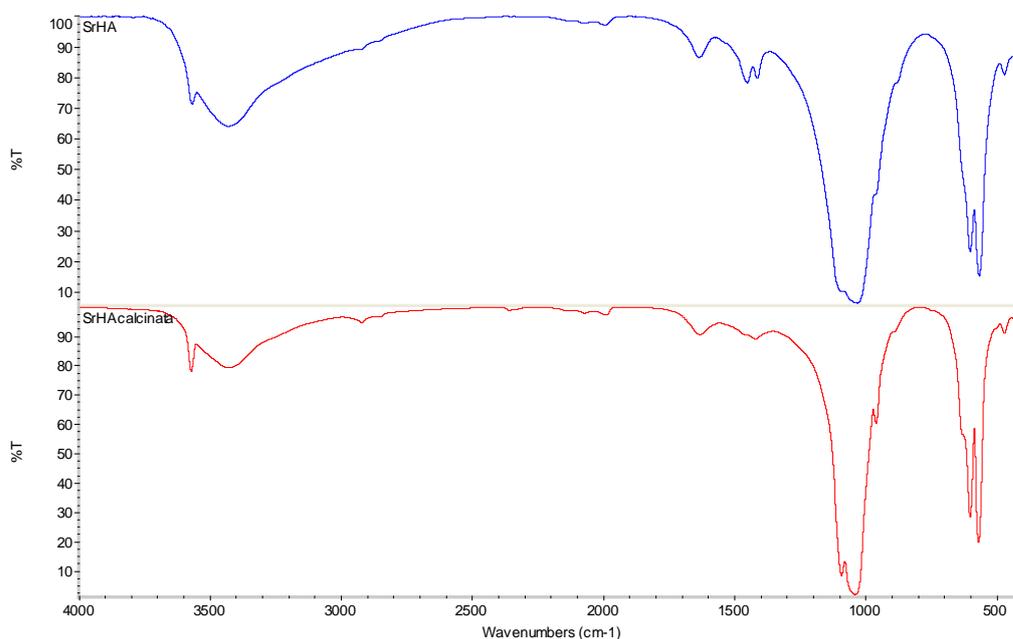


Figura 10- Spettri FTIR della polvere di SrHA (blu) e della polvere di SrHA calcinata (rosso).

### Analisi ICP

L'analisi all'ICP delle polveri ha consentito di calcolare la quantità di stronzio che effettivamente è andata ad occupare il sito del calcio, ed in particolare ha permesso di calcolare il rapporto molare Sr/Ca ed il rapporto (Ca+Sr)/P.

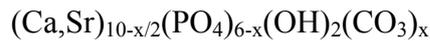
La tabella 3 riassume i risultati ottenuti:

Tabella 3 Risultati ICP-OES per le polveri a base di SrHA calcinate e non.

	Sr/Ca %	Ca/P	(Ca+Sr)/P
SrHA	0.080	1.573	1.70
SrHA calcinata	0.079	1.582	1.71

Come confermato anche dall'analisi XRD, dopo trattamento di calcinazione la polvere di SrHA mantiene costante il rapporto Sr/Ca. Inoltre, il confronto delle due serie di dati (XRD e ICP-OES) porta a concludere che tutto lo stronzio presente nelle polveri fa parte effettivamente della cella elementare dell'apatite.

Dal rapporto molare (Ca+Sr)/P è possibile anche risalire ai valori di carbonatazione di entrambe le polveri, tenendo conto della seguente formula:



Nel caso della SrHA si ottiene un valore di x pari a 0.17, mentre nel caso di SrHA calcinata si ottiene un valore di 0.21. Il valore di (Ca+Sr)/P relativo alla SrHA calcinata è quindi giustificabile sulla base di un residuo di carbonatazione in posizione fosfato come rilevato dallo FTIR, unitamente alla perdita di gruppi  $\text{HPO}_4^{2-}$ .

### Misure con spettroscopia elettroacustica

La preparazione dei campioni porosi comporta la preparazione di una sospensione sufficientemente stabile. La stabilità della sospensione è fortemente dipendente dalle interazioni elettrostatiche all'interfaccia di cui si può avere una buona stima mediante la misura del potenziale  $\zeta$ .

Al fine di determinare la reattività superficiale e la conducibilità, le polveri a base di HA e di SrHA sono state studiate mediante titolazione potenziometrica in spettroscopia elettroacustica.

Sospensioni acquose ceramiche, al 2% in volume, sono state preparate mediante miscelazione-macinazione per 2h utilizzando una soluzione  $10^{-2}$  M di KCl, per mantenere costante la forza ionica. Un sistema automatico di titolazione ha permesso di misurare la conducibilità in funzione del pH (sono stati utilizzati HCl

1M e KOH 1M per variare il pH). Il punto isoelettrico (IEP) è stato identificato come il pH in cui il potenziale  $\zeta$  assume valore uguale a 0.

### Conducibilità

La curva di conducibilità della polvere in sospensione acquosa può essere utilizzata per una valutazione indiretta della solubilità del materiale. Infatti i risultati ottenuti (figura 11) sono spesso confermati dai test di solubilità in soluzione fisiologica sintetica, dai test di culture cellulare e dai test in vivo. I valori di conducibilità per le polveri di SrHA e di HA in sospensione, in funzione del pH, sono riportati nella figura 11. Nel caso della SrHA i valori conducibilità mostrano un incremento maggiore rispetto all'HA, spostandosi verso pH acidi.

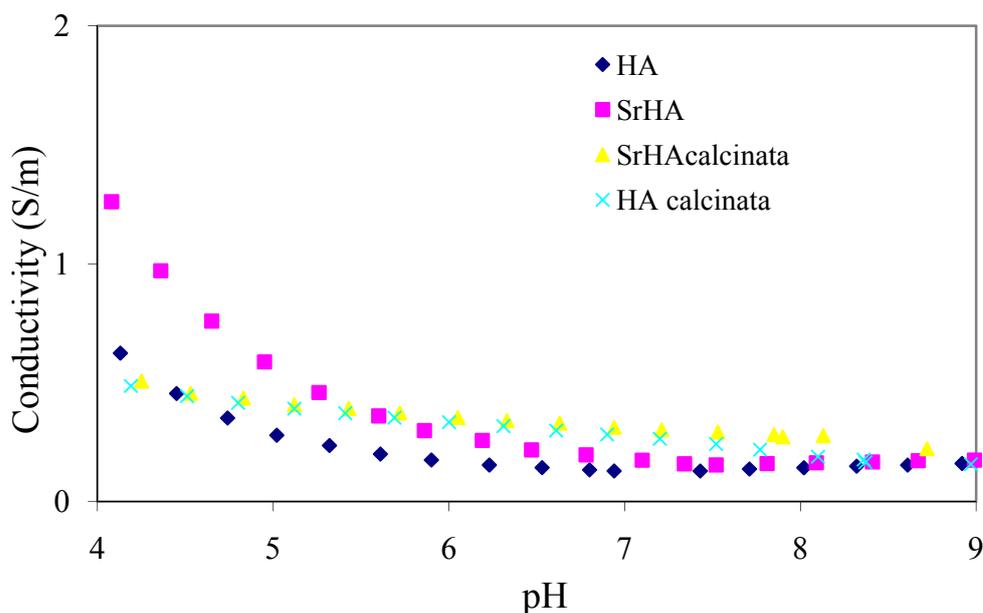


Figura 11: Spettroscopia elettroacustica eseguita sulle polveri di HA ed SrHA, prima e dopo calcinazione.

Nel grafico sono riportati anche i valori di conducibilità delle polveri dopo trattamento di calcinazione. A seguito di questo trattamento è ben visibile che le

polveri di SrHA presentano conducibilità inferiori ai bassi valori di pH, tipici dei siti post impianto.

La curva di conducibilità per le polveri calcinate è piuttosto costante quindi è ben visibile che la polvere calcinata presenta una reattività molto più bassa rispetto alla polvere non calcinata. Ciò è dovuto sia ad una diminuzione della s.s.a. sia alla composizione più vicina a quella stechiometrica, come conseguenza del trattamento termico.

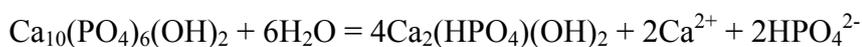
#### Potenziale zeta

Lo studio del comportamento delle apatiti in soluzione acquosa dà informazioni riguardo la reattività chimica nell'ambiente biologico, in quanto il sistema reale è principalmente costituito da sali in soluzione. Sono stati condotti molti studi sulla solubilità dell'apatite. La solubilità dell'HA stechiometrica è molto bassa ( $pK_{ps}=115$ ), mentre è più solubile l'apatite non-stechiometrica per la formazione di complessi sulla sua superficie legati ad equilibri metastabili.

Tabella 4 Valori del pH naturale e del  $pH_{IES}$  (pH del punto isoelettrico)

	$pH_{naturale}$	$pH_{IES}$
HA	7.4	7.0
HA calc	10.1	9.3
SrHA	7.5	9.4
SrHA calc	12.0	-

In particolare, è noto che sulla superficie si ha la formazione di complessi quali  $Ca_2(HPO_4)(OH)_2$ , dovuti al fenomeno di idrolisi dell'HA che controlla l'equilibrio di solubilità in accordo alle seguenti equazioni<sup>4</sup>:



Sulla base di queste equazioni, l'incremento del pH naturale per la polvere di HA (tabella 4) a seguito del trattamento di calcinazione, può essere dovuto al fatto che il trattamento termico porta alla formazioni di una polvere più stechiometrica, in quanto, come confermato anche dalla spettroscopia FTIR, si verifica una riduzione delle bande dei carbonati e dei gruppi  $\text{HPO}_4^{2-}$ .

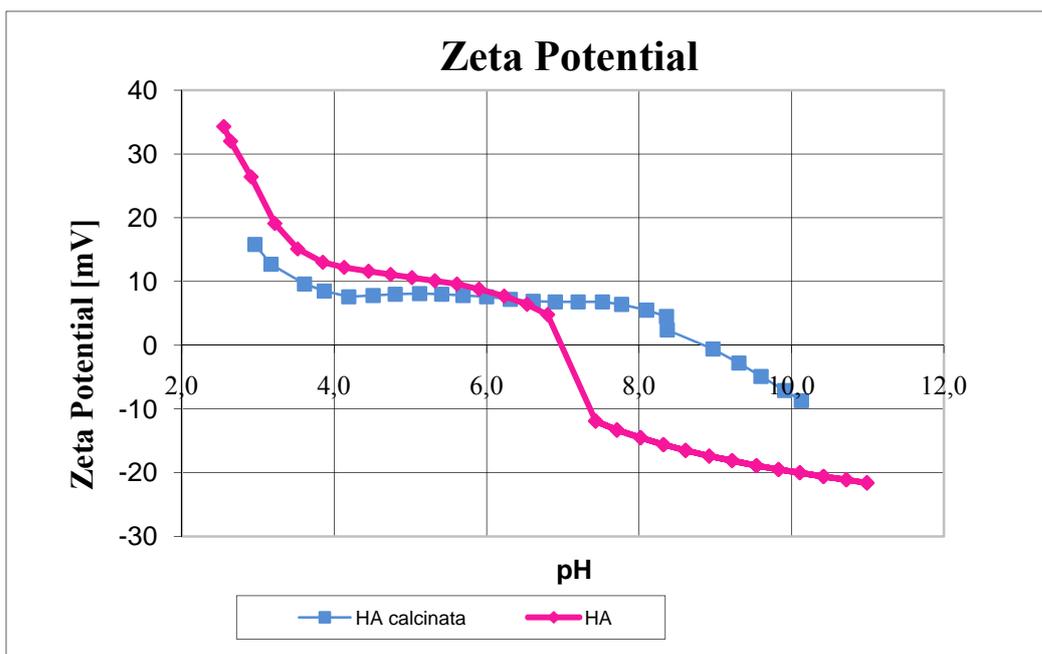


Figura- 12 Spettroscopia elettroacustica eseguita sulla polvere di HA commerciale.

Per questo motivo, entrambe le reazioni sopra riportate risultano spostate verso destra.

Lo stesso andamento è stato registrato per la polvere di SrHA. Lo shift del pH naturale (tabella 4) che si osserva a causa del trattamento di calcinazione è molto più evidente per la polvere a base di SrHA rispetto a quella di HA; probabilmente ciò è dovuto al fatto che, oltre all'effetto precedentemente esposto, la polvere di SrHA presenta una maggiore superficie specifica.

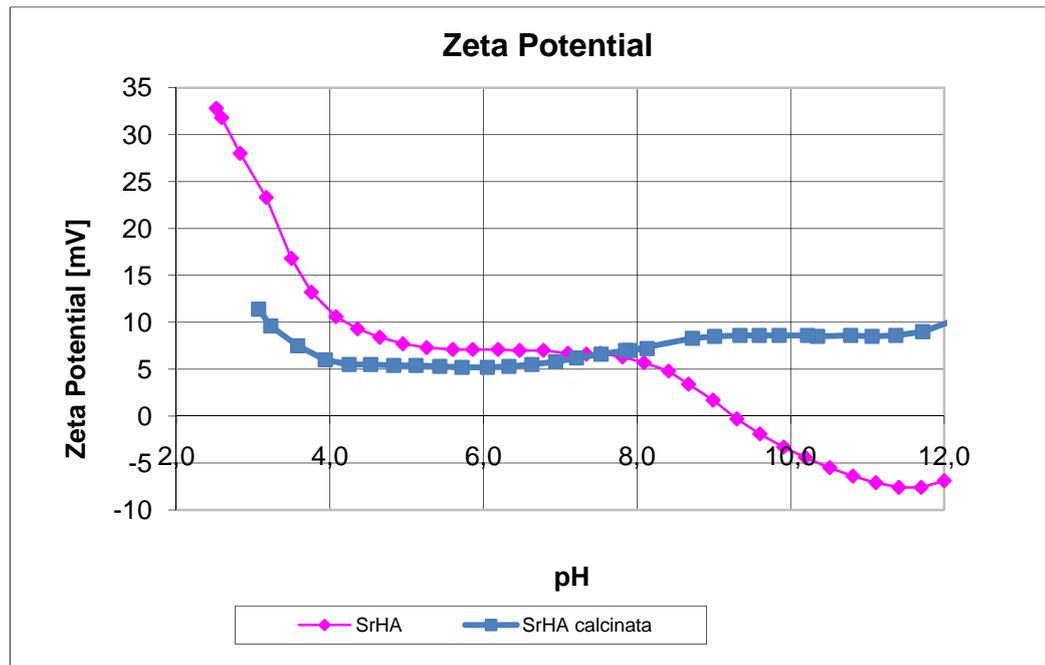


Figura 13- Spettroscopia elettroacustica eseguita sulla polvere di SrHA di sintesi.

Inoltre, confrontando la polvere di HA con la polvere di SrHA è possibile notare un incremento del  $pH_{IES}$ ; ciò può essere dovuto ad una maggior lisciviazione di cationi legata anch'essa alla maggiore superficie specifica di SrHA.

Inoltre sulla base dei grafici riportati nelle figure 12 e 13 è ben visibile l'effetto della riduzione in valore assoluto del potenziale  $\zeta^4$ , dopo calcinazione.

## 4.2 Scaffold porosi realizzati mediante “freeze-casting

Considerando le applicazioni biomedicali, uno scaffold deve presentare una struttura tale da permettere la crescita e la proliferazione cellulare. Sulla base di queste esigenze i pori dovrebbero avere una dimensione di almeno 80-100  $\mu\text{m}$ , ma, allo stesso tempo, lo scaffold deve presentare adeguate proprietà meccaniche al fine di essere utilizzabile anche in siti sottoposti a carico. Per la realizzazione di scaffold porosi possono essere utilizzate diverse tecniche.

In questo lavoro di ricerca ci si è dedicati allo studio della tecnica del freeze-casting<sup>5</sup>, che si basa sul congelamento e liofilizzazione di una sospensione ceramica acquosa.

### 4.2.1 Procedura sperimentale

Le polveri di apatite (HA e SrHA) sono state calcinate a 1000°C per 5h ed in seguito setacciate su maglie inferiori a 150  $\mu\text{m}$ . E' stata preparata una sospensione acquosa caricando la polvere di apatite nel range 15-40% in volume, utilizzando un disperdente anionico all' 1% in peso (Darvan C, R.T Vanderbilt, Norwalk, CT) e, come legante, una soluzione di alcool povinilico all'1% in peso.

Le sospensioni, dopo miscelazione con mezzi macinanti di zirconia per 20 h, sono state colate all'interno di stampi cilindrici, precedentemente raffreddati a differenti temperature. Sono stati utilizzati stampi di due diverse dimensioni (diametro/altezza: 16 mm/20 mm, identificato con b) e 10 mm/20 mm, identificato con s).

Il corpo in verde è stato poi sinterizzato a 1300°C per 2 h all'interno di un forno ad aria, utilizzando una rampa di salita di 50°C h<sup>-1</sup> fino a 700°C e di 100°C h<sup>-1</sup> fino alla temperatura di sinterizzazione.

Al fine di incrementare le proprietà meccaniche e l'adesione cellulare si sono preparati dei campioni compositi, mediante infiltrazione con una soluzione di gelatina al 10% in peso, degli scaffold ceramici deaerati

L'infiltrazione è stata realizzata ponendo il campione con le lamelle disposte in posizione verticale e la gelatina è stata fatta penetrare all'interno della porosità del

campione operando sotto vuoto. I campioni ottenuti sono stati lasciati essiccare in stufa ventilata a 30°C per 48h.

#### 4.2.2 Caratterizzazioni e discussione

##### Analisi XRD

L'analisi ai raggi X (figure 14 e 15) eseguita sui campioni porosi, dopo trattamento termico, ha evidenziato che non si sono formate fasi secondarie accanto all'apatite. Inoltre è ben visibile dagli spettri che la cristallinità di entrambi i materiali aumenta notevolmente con la sinterizzazione.

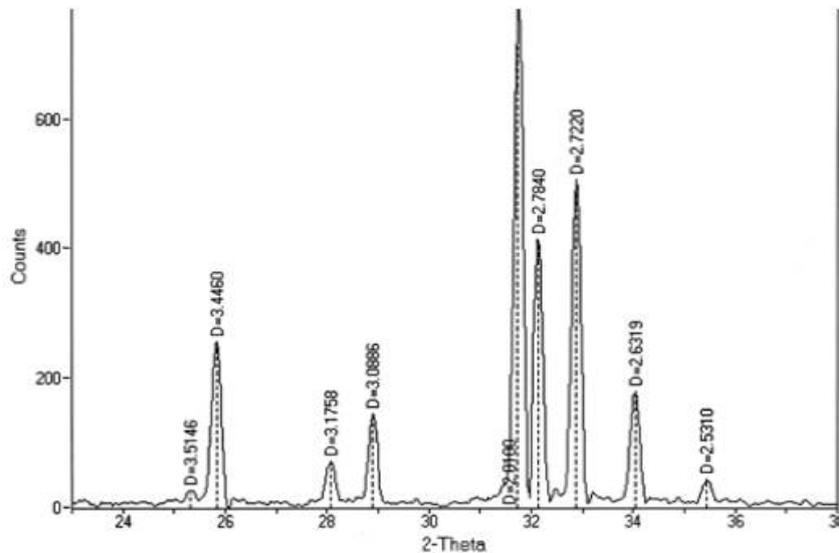


Figura 14- Analisi XRD degli scaffold a base di HA dopo trattamento di sintering a 1300°C per 2h.

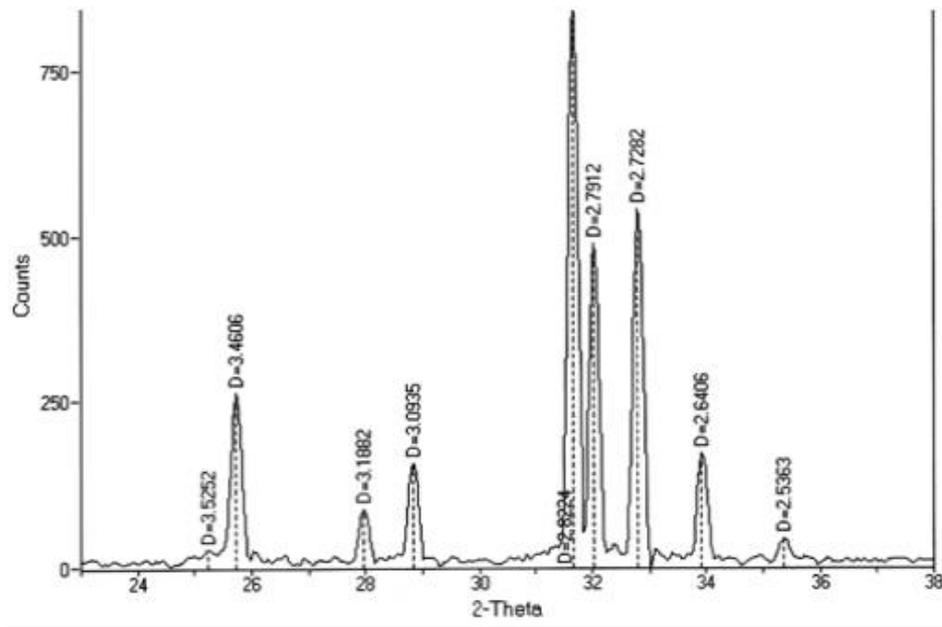


Figura 15- Analisi XRD degli scaffold a base di SrHA dopo trattamento di sintering a 1300°C per 2h.

### Macrostrutture

Dal punto di vista macro strutturale, i campioni ottenuti possono essere suddivisi in due zone, di dimensione variabile, caratterizzate da differente forma e dimensione dei pori.

Come è osservabile in figura 16, la zona inferiore è costituita da una morfologia di tipo globulare, con pori la cui dimensione è compresa fra 40-70  $\mu\text{m}$ .

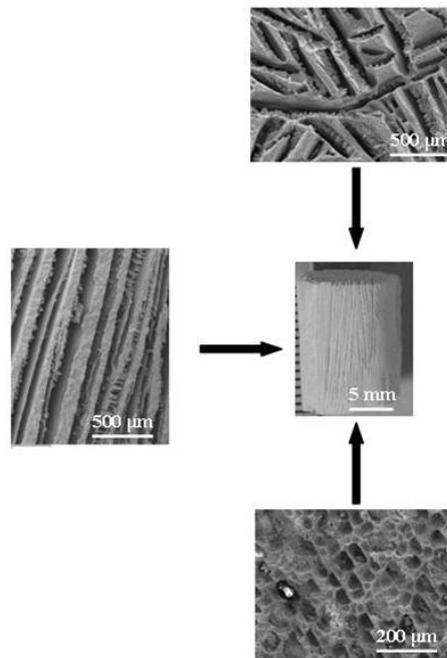


Figura 16- Macrostruttura del campione ottenuto.

La zona superiore del campione, di estensione maggiore, è caratterizzata da una morfologia di tipo lamellare con piatti piani di apatite, allineati lungo la direzione di avanzamento dei cristalli di ghiaccio. Lungo le pareti interne delle lamelle ceramiche sono presenti anche diversi dendriti ed, in alcuni casi, ponti ceramici che collegano apatite lamella adiacenti.

### **Porosità**

La porosità del materiale è principalmente determinata dal contenuto di acqua presente nella sospensione. Infatti, variando la concentrazione della polvere fra il 15 ed il 40% in volume e valutando la porosità totale sui campioni finiti, è stato possibile osservare che esiste una correlazione lineare fra questi 2 parametri (figura 17)<sup>5</sup>.

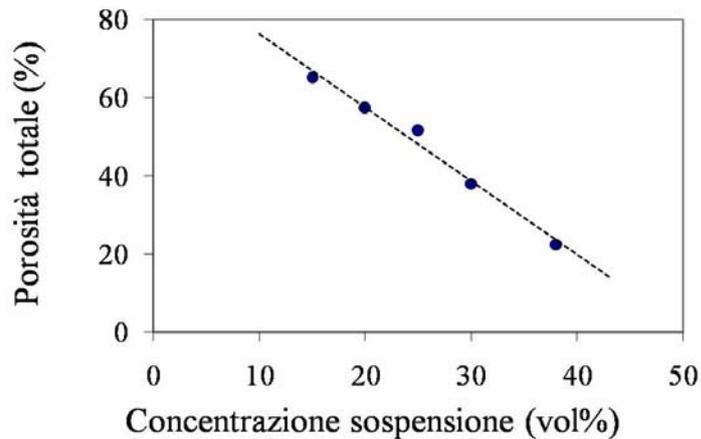


Figura 17- Correlazione tra concentrazione della sospensione e porosità totale dei campioni..

D'altra parte, variando la composizione della polvere o la dimensione dello stampo, la porosità totale del campione rimane praticamente inalterata. Infatti, partendo da sospensioni al 20% in volume, la porosità totale del campione varia solo dal 52 al 56 %, utilizzando stampi di dimensione differente.

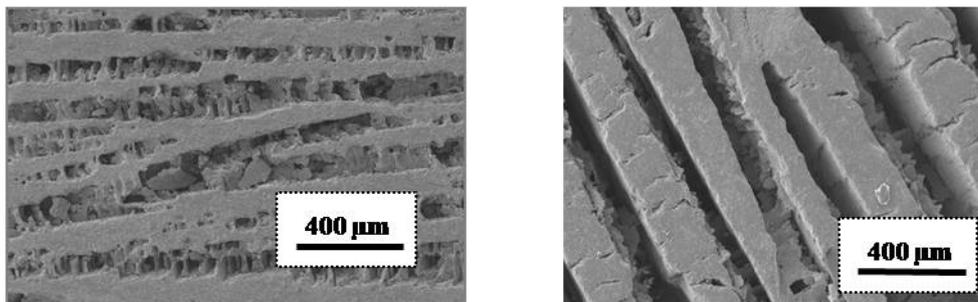


Figura 18- Sinistra: campione ottenuto da una sospensione al 20% in volume (HA20); destra: campione ottenuto da una sospensione al 40% in volume (HA40)

La concentrazione della sospensione influenza anche la dimensione dei pori. Come si può vedere dalla figura 18, per i campioni ottenuti utilizzando basse concentrazioni della sospensione, il rapporto spessore delle lamelle/spessore dei

pori è molto basso, mentre aumenta notevolmente per campioni ottenuti partendo da alte concentrazioni di solido nella sospensione, a parità di temperatura di congelamento utilizzata.

La porosimetria a mercurio è stata affiancata all'analisi morfologica mediante SEM, per meglio valutare la porosità dello scaffold sulla sezione lamellare dei campioni. Come si può vedere in figura 19, i risultati riportati sono in accordo con quelli ottenuti mediante l'analisi SEM. E' importante, comunque, notare che questa tecnica non è in grado di determinare e di quantificare gli ultramacropori che si formano fra una lamella e l'altra, presenti all'interno e sulla superficie laterale del campione.

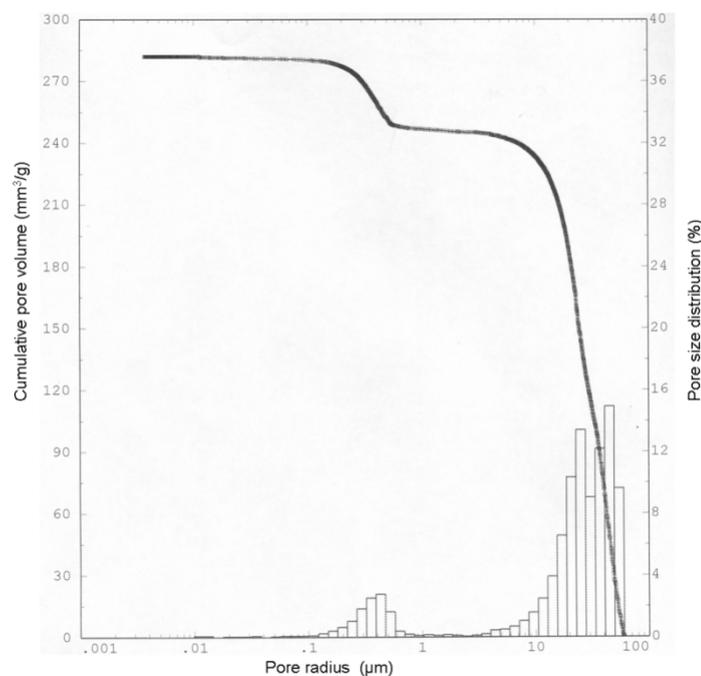


Figura 19- Porosimetria a mercurio lamellare del campione poroso di HA20.

L'alto grado di interconnessione fra i pori e, quindi, la capacità dello scaffold di essere permeato completamente e rapidamente dai fluidi fisiologici dopo l'impianto, sono stati verificati ponendo una faccia dello scaffold a contatto con pochi ml di soluzione colorata fisiologica e valutando il tempo che il fronte del liquido impiega a

raggiungere l'altra faccia del campione. Per i campioni ottenuti da sospensioni al 20% in volume, il fronte del liquido impiega meno di 10 secondi per risalire un'altezza di 20mm.

La morfologia e la dimensione dei pori è fortemente dipendente dal processo di congelamento. Durante questo stadio si crea all'interno del campione un gradiente di temperatura, in quanto la parte inferiore dello stampo, diversamente dalla parte superiore, è a contatto con una superficie congelata ( la piastra del liofilizzatore).

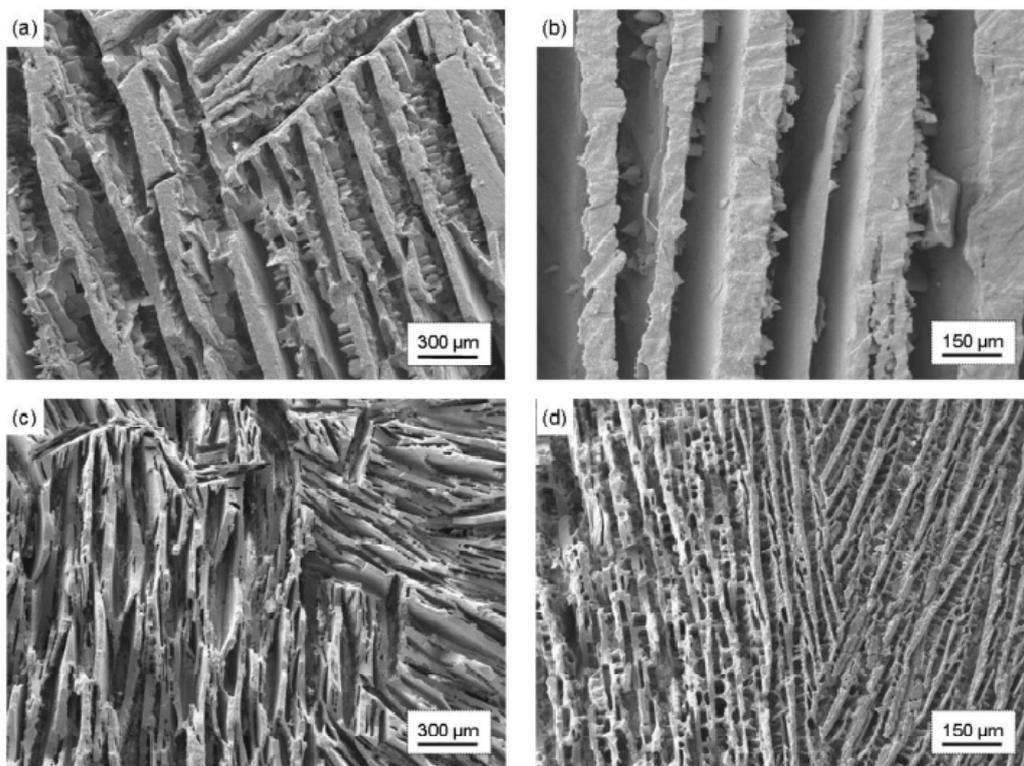


Figura 20- Sezioni trasversali (a) e sezioni longitudinali (b) di campioni ottenuti congelando HA20-b a  $-10^{\circ}\text{C}$ . Sezioni trasversali (c) e sezioni longitudinali (d) di campioni ottenuti congelando HA20-b a  $-10^{\circ}\text{C}$ .

Il gradiente termico induce la formazione di una morfologia di tipo lamellare all'interno del campione ed influenza la dimensione dei pori e delle lamelle. .

Essendo il materiale altamente anisotropico, i pori lamellari possono essere caratterizzati mediante due parametri dimensionali: l'asse lungo e l'asse corto, se si osserva una sezione trasversale del campione (diametro 10-16 mm).

Per congelamenti lenti (temperatura della piastra  $-10^{\circ}\text{C}$ ), la struttura finale del campione è caratterizzata da pori lamellari che presentano uno spessore di circa  $150\ \mu\text{m}$  ed una larghezza fino a  $2000\ \mu\text{m}$ . Per quanto riguarda invece i congelamenti rapidi (temperatura della piastra  $-30^{\circ}\text{C}$ ), si sono ottenute degli spessori e delle larghezze dei pori minori.

Effettuando un congelamento estremamente rapido mediante azoto liquido ( $-196^{\circ}\text{C}$ ), i campioni ottenuti presentano pori sempre di tipo lamellare, molto frequenti, ma con uno spessore di circa una decina di micron, quindi molto al di sotto della porosità richiesta per l'abitazione cellulare.

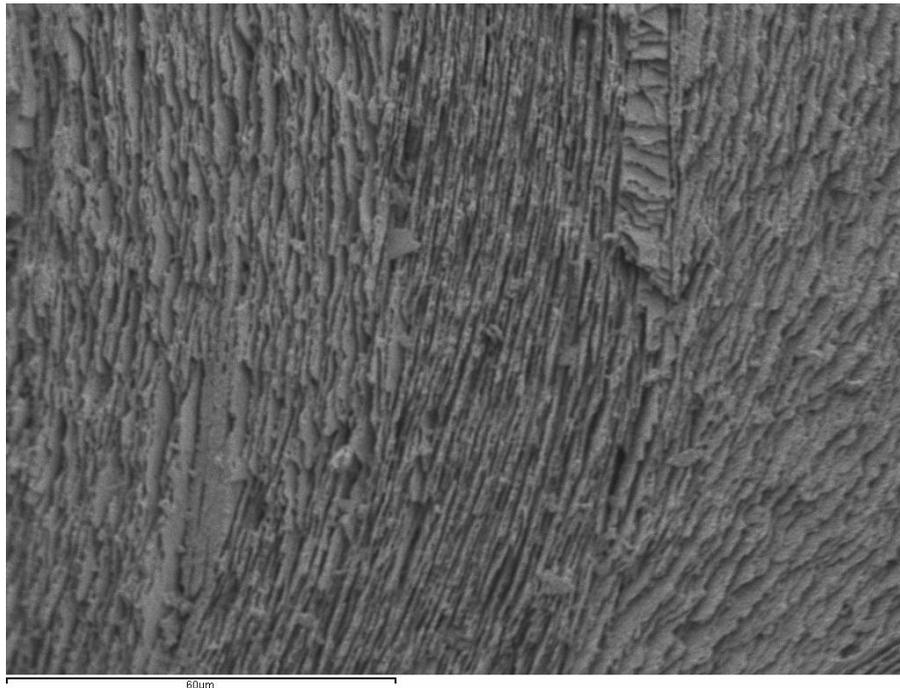


Figura 21- Morfologia ottenuta partendo da HA20 e congelando con azoto liquido.

La dimensione dei pori può essere modificata variando le dimensioni dello stampo del campione (figura 22). Utilizzando uno stampo più piccolo (s) si sono ottenuti

pori con una lunghezza compresa fra i 100-300  $\mu\text{m}$  ed uno spessore compreso fra i 30 e di 50  $\mu\text{m}$ . Viceversa, con uno stampo più grande (b) si sono ottenuti pori lunghi dai 600 ai 2000  $\mu\text{m}$  e spessi dai 100 ai 300  $\mu\text{m}$ .

Di nuovo, contenitori più piccoli sono caratterizzati da piatti di apatite più fini, a causa del fatto che in queste condizioni la trasmissione del freddo è aumentata.

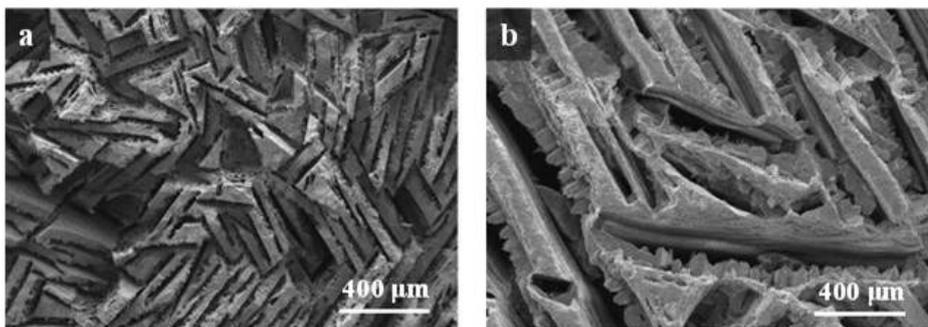


Figura 22- Morfologie ottenute partendo da HA20 e variando le dimensioni dello stampo: (a) stampo piccolo (s); (b) stampo grande (b).

La superficie delle lamelle non si presenta completamente liscia, ma mostra strutture dendritiche che corrono lungo la direzione del fronte di solidificazione. Queste strutture, che riguardano solamente una faccia della lamella, presentano una forma omogenea per tutto il campione, anche se è ben evidente che la loro morfologia cambia a seconda del tipo di polvere utilizzata (figura.23). La sezione longitudinale degli scaffold evidenzia queste diverse morfologie. Nel caso degli scaffold a base di HA, i “ponti” crescono perpendicolarmente alla superficie delle lamelle, mentre nel caso di SrHA si sviluppano protuberanze molto meno definite (figura 23).

Le differenti morfologie che sono state ottenute si possono imputare, ancora una volta, alle diverse cinetiche di congelamento osservate tra le sospensioni di HA e quelle di SrHA.

È stato dimostrato, infatti, che la velocità critica di congelamento per cui si ottengono strutture lamellari, è fortemente dipendente dalla dimensione delle particelle che costituiscono la sospensione<sup>6</sup>. Le aree di superficie specifica per la

polvere di HA e di SrHA sono, rispettivamente, 3.9 e 4.9 m<sup>2</sup>/g; questa differenza non sembra supportare sufficientemente le differenze morfologiche ottenute nei corrispondenti scaffolds. Infatti, i diametri delle particelle costitutive la polvere, calcolati applicando l'equazione

$$D = \frac{6}{(\rho * SSA)}$$

sono, rispettivamente, pari a 0.49 μm e 0.38 μm per HA e SrHA.

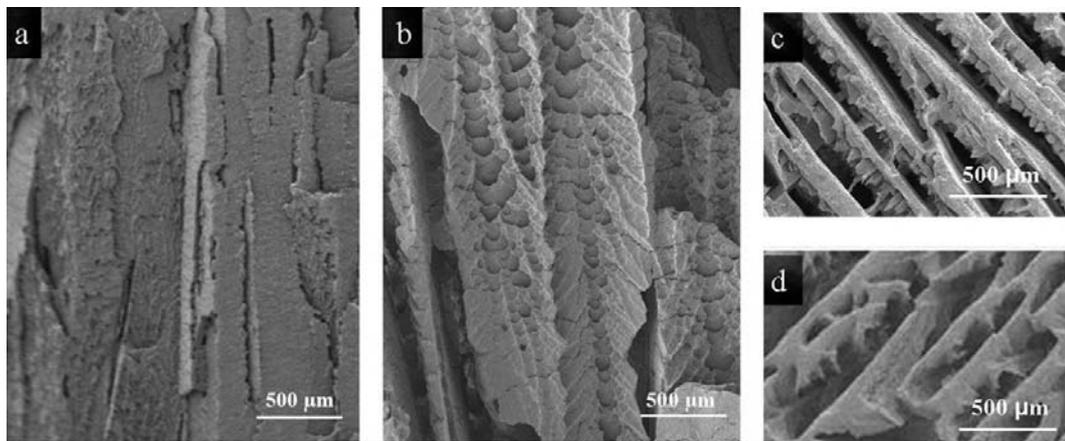


Figura 23- Morfologie ottenute variando la composizione della polvere: (a) sezione longitudinale e (c) sezione trasversale HA20-b; (b) sezione longitudinale e (d) sezione trasversale di SrHA20-b.

La diversa cinetica di congelamento è probabilmente imputabile alla diversa solubilità delle polveri di HA e SrHA<sup>3</sup>. Infatti, le sostituzioni ioniche nei siti cristallografici dell'idrossiapatite causano difetti e distorsioni nel reticolo, creando inclusioni che migliorano la solubilità delle apatiti sostituite rispetto a quelle stechiometriche. Perciò, essendo la SrHA più solubile rispetto alla HA, si suppone che la parziale dissoluzione del materiale ceramico, durante la preparazione della sospensione, possa causare un arricchimento di ioni nella matrice acquosa, abbassando la temperatura di congelamento della fase acquosa. Questo fenomeno agisce indirettamente rallentando il congelamento e la trasmissione del freddo,

all'interno della sospensione colata nello stampo, a parità di condizioni di processo.

### Compositi bioibridi

Compositi bio-ibridi apatite/gelatina sono stati ottenuti mediante infiltrazione dei scaffolds a base di apatite, aventi una porosità totale compresa nell'intervallo 45-55%. La gelatina aderisce alle pareti dei pori dello scaffold, come osservato mediante l'analisi SEM (figura 24), lasciando praticamente inalterata la porosità finale del campione<sup>7</sup>.

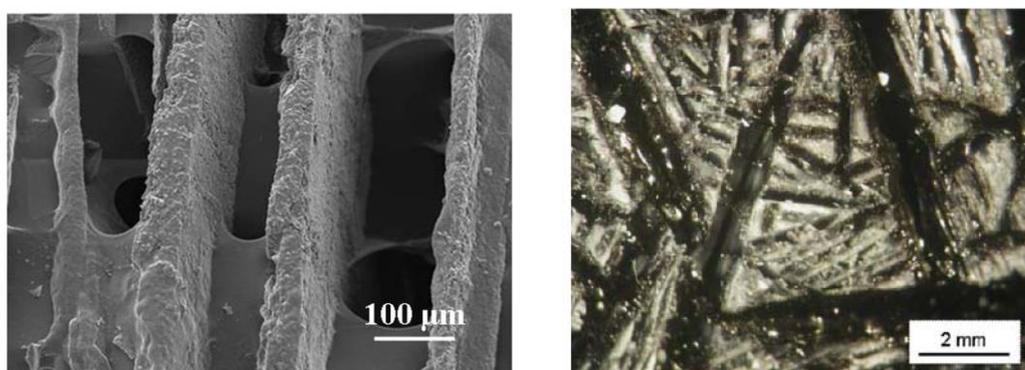


Figura 24- Sin: particolare dello scaffold a base di HA in cui la gelatina è stata reticolata mediante genipina. Dex: analisi SEM di uno scaffold di HA infiltrato con la gelatina

La quantità di gelatina infiltrata è stata determinata utilizzando un metodo termogravimetrico<sup>7</sup>. La frazione in peso della gelatina nei materiali compositi è indipendente dalla dimensione dello stampo a parità di sospensione ceramica; essa, infatti, ammonta al 5.2 ed al 5.5%, rispettivamente, per campioni ottenuti in stampi di piccole e grandi dimensioni. L'analisi SEM (figura 24) della superficie di frattura per il campione HA infiltrato con la gelatina, mette in risalto che la gelatina penetra bene nelle parti più interne del campione ed allo stesso tempo collega le lamelle ceramiche mediante ponti. Inoltre la gelatina presenta anche una buona adesione con il corpo ceramico. La distribuzione della fase proteica è molto

più omogenea nei campioni di grandi dimensioni, rispetto a quelli di dimensione più piccola, poiché le porosità minori ostacolano il processo di infiltrazione. Per gli scaffold a base di SrHA il processo di infiltrazione è molto meno efficiente (la quantità di gelatina infiltrata corrisponde a circa il 3% in peso dello scaffold di partenza) e meno omogeneo (come evidenziato dalla colorazione con genipina).

La diversa efficacia del processo di infiltrazione della gelatina negli scaffold di HA e di SrHA può essere imputata alle differenti morfologie delle lamelle che caratterizzano i due diversi tipi di scaffolds. Infatti le protuberanze, che crescono in modo meno ordinato sulle lamelle dello scaffold di SrHA, comportano una perdita di anisotropia (diminuzione del grado di unidirezionalità dei pori) e rendono lo scaffold molto più simile ad un campione a porosità cellulare cellulare isotropico (globulare).

### **Resistenza a compressione**

La resistenza a compressione è stata valutata per gli scaffold ottenuti mediante freeze-casting, a temperatura di  $-10^{\circ}\text{C}$ .

Per quanto riguarda gli scaffold a base di HA-b, quelli ottenuti da sospensioni al 25% in volume mostrano una bassa resistenza a compressione rispetto a quelli al 20 e al 30%; questo dato, probabilmente, può essere dovuto ad imprecisioni nella produzione. La resistenza meccanica dei campioni ottenuti da sospensioni al 20, 30 e 35% in volume è confrontabile, anche se i campioni presentano porosità differenti (56, 43, 31 vol %). Nell'ottica di selezionare uno scaffold con morfologia ottimale per l'abitazione cellulare e adeguate proprietà meccaniche, la scelta ricade su HA20b. Gli andamenti trovati possono spiegati considerando la morfologia peculiare dello scaffold lamellare ed investigando il meccanismo di frattura (lavoro in progress).

Variando le dimensioni dello stampo, i valori di resistenza a compressione si mantengono circa costanti, ma con deviazioni standard differenti.

Per gli scaffold a base di SrHA20-b il valore di resistenza a compressione medio è 1.76 MPa, molto minore di quello ottenuto per l'HA-b. Questo fatto è in disaccordo con i risultati ottenuti con scaffold a porosità isotropa in studi precedenti, secondo cui le resistenze a compressione di scaffold, preparati

mediante l'impregnazione delle spugne cellulosiche con sospensioni acquose, erano più alte per SrHA rispetto ad HA.

Tabella 5 Porosità totale e resistenza a compressione per gli scaffold ceramici e quelli compositi (\*test fatto solo su due campioni).

<b>Codice dello scaffold</b>	<b>Porosità totale (vol %)</b>	<b><math>\sigma \pm \Delta\sigma</math> (MPa)</b>
HA 15 b	65 ± 1	0.5 ± 0.2
HA 20 b	56 ± 2	4.3 ± 1.1
HA 25 b	48 ± 2	2.5 ± 0.5
HA 30 b	43 ± 2	3.9 ± 0.8
HA 35 b	31 ± 2	4.0 ± 0.6
HA 38 b	18	55*
HA20 s	52 ± 2	5.7 ± 3.5
SrHA20 b	55 ± 2	1.76 ± 0.7
HA20/GEL	56 ± 2	13.8 ± 3.7
HA 25/GEL	48 ± 2	11.5 ± 1.3
SrHA20 b/GEL	55 ± 2	2.01 ± 0.5
HA20 s/ GEL	52 ± 2	12.9 ± 2.8

Comunque, in via preliminare, gli andamenti trovati per i campioni ottenuti mediante freeze casting possono essere interpretati sulla base delle differenti microstrutture degli scaffold a base di SrHA ed HA, precedentemente riportate. Brevemente, le protuberanze sviluppate sulla superficie delle lamelle di SrHA diminuiscono il grado di allineamento del materiale e, perciò, l'abilità dello scaffold nel sopportare i carichi lungo una determinata direzione.

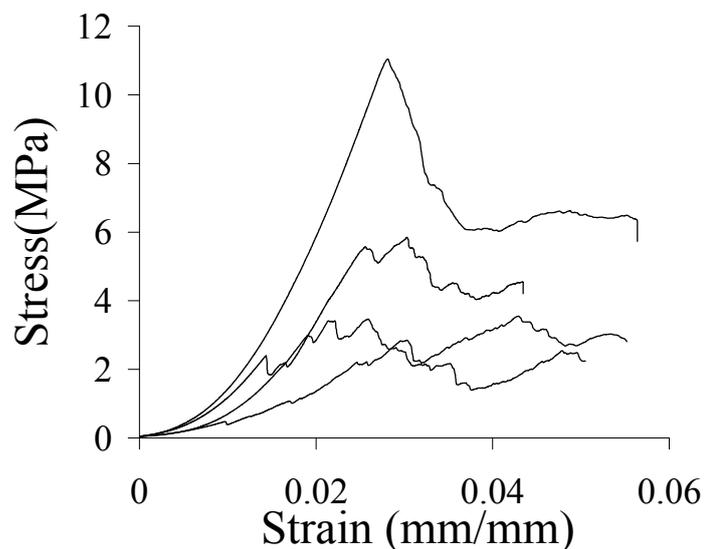
La perdita di direzionalità è stata osservata anche per i campioni compositi bio-ibridi. La resistenza a compressione degli scaffold ceramici aumenta dopo l'infiltrazione della gelatina. Il miglioramento relativo nel valore di  $\sigma_c$  che si ottiene per gli scaffold di HA, dopo infiltrazione con gelatina, è maggiore di

quello ottenuto per gli scaffold di SrHA, probabilmente a causa della migliore efficienza del processo di infiltrazione della gelatina, favorito dal più alto grado di allineamento dei pori. La minor anisotropia della porosità dello scaffold di SrHA rende il processo di infiltrazione della gelatina scarsamente efficiente e molto più simile a quello ottenuto per i campioni con porosità di tipo cellulare (globulare= isotropa).

Vale la pena notare che tutti gli scaffold preparati (eccetto HA15) presentano valori di resistenza a compressione (tabella 5) all'interno del range dei valori riportati per la tibia ( $7.27 \pm 3.04$  e  $5.33 \pm 2.93$ MPa)<sup>8</sup> e per il femore umano ( $7.36 \pm 4.00$  MPa)<sup>9</sup>.

In figura 25 sono riportate le curve sforzo-deformazione per gli scaffold ceramici preparati mediante freeze-casting, partendo da sospensioni al 20% in volume e variando le dimensioni dello stampo ed il tipo di polvere.

Tutti i tipi di scaffold presentano una deformazione lineare elastica fino alla frattura. Gli scaffold a base di idrossiapatite presentano uno sforzo a rottura, seguito da una rapida diminuzione e da un plateau.



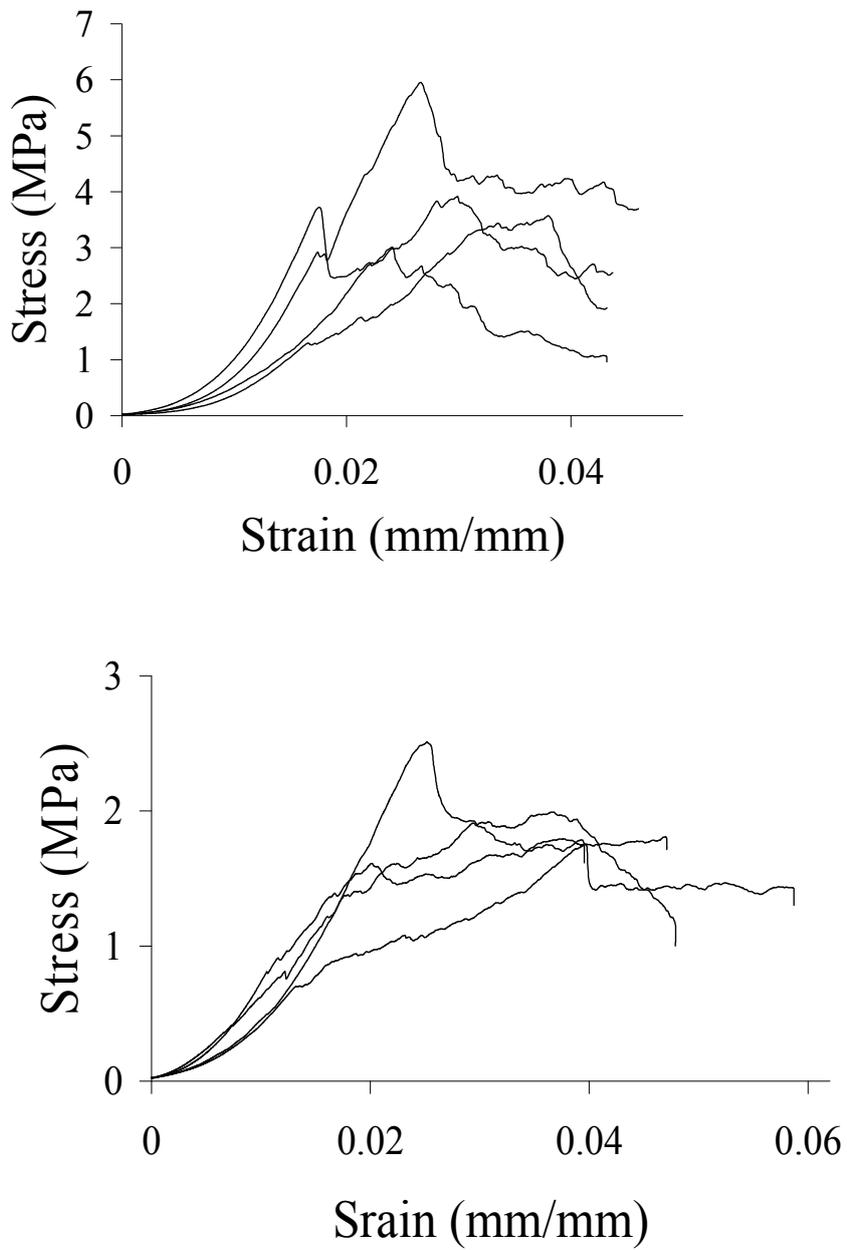


Figura 25- Curve sforzo-deformazione per gli scaffold .(a) HA20-s, (b) HA20-b, (c) SrHA20-(b).

### Modulo elastico

Il modulo elastico ( $E$ ) è stato calcolato considerando la porzione lineare della curva corrispondente al 45-60% dello sforzo a frattura<sup>10</sup>. Per HA20-b  $E_c$  è risultato intorno a 0.30-0.35 GPa, mentre per SrHA20 è risultato notevolmente inferiore.

Considerando i compositi bio-ibridi, gli scaffold a base di apatite di grandi dimensioni HA20-b consentono di ottenere il miglior incremento del modulo di Young, a seguito dell'infiltrazione con gelatina.

I dati sperimentali possono essere paragonati ai valori teorici di modulo elastico ( $E_{CG,th}$ ) mediante la regola della miscela:

$$E_{CG,th} = V_C E_C + V_G E_G$$

dove  $E_C$  è il modulo elastico riferito allo scaffold ceramico,  $E_G$  è il modulo elastico riferito alla gelatina,  $V_G$  and  $V_C$  sono, rispettivamente, le frazioni in volume della gelatina e del ceramico, ( $V_C + V_G = 1.0$ ).

$V_C$  e  $V_G$  sono state calcolate partendo dal rapporto di composizione dei compositi bio-ibridi ed utilizzando i valori dei densità dei materiali ceramici (3.16 per HA e 3.25 g/cm<sup>3</sup> per SrHA) e della gelatina (1.09 g/cm<sup>3</sup>) valutato da uno strato di gelatina colata ed essiccata al 10% in peso, secondo la procedura utilizzata per la preparazione dei compositi bio-ibridi.

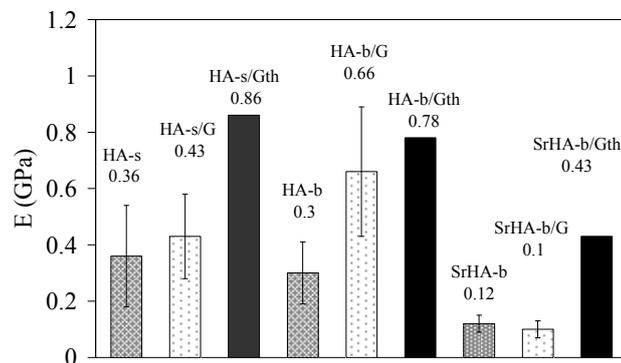


Figura 26- Valori del modulo di Young di campioni ottenuti da sospensioni al 20% a base di HA e di SrHA colate in stampi piccoli (s) ed in stampi grandi (b).

I valori sperimentali di  $E_{C,G}$  dei compositi bio-ibridi HA-s/G e di SrHA-b/G (figura 26) sono molto lontani dai valori teorici a causa della disomogeneità della distribuzione della gelatina, discussa precedentemente.

Per il campione di HA-b/G i valori del modulo elastico sperimentali e calcolati sono paragonabili, probabilmente a causa delle buone condizioni del processo di infiltrazione della gelatina.

È importante, infine, notare che i valori del modulo di Young per HA ed HA/G sono paragonabili a quelli riportati in letteratura per l'osso umano trabecolare in differenti siti, in particolare nelle vertebre (0.344-0.148GPa)<sup>9</sup>, nella tibia (1.09-0.634 GPa)<sup>9</sup> e nel femore (0.39-0.27GPa)<sup>9</sup>. Nel caso, invece, dei campioni a base di SrHA i valori si trovano al di fuori di questi range.

### 4.3 Scaffold porosi realizzati mediante “foaming”

Considerando le applicazioni biomedicali, uno scaffold deve presentare una struttura tale da permettere la crescita e la proliferazione cellulare. Sulla base di queste esigenze i pori dovrebbero avere una dimensione di almeno 80-100  $\mu\text{m}$ , ma, allo stesso tempo, lo scaffold deve presentare adeguate proprietà meccaniche al fine di essere utilizzabile anche in siti sottoposti a carico. Per la realizzazione di scaffold porosi possono essere utilizzate diverse tecniche.

In questa sezione ci si è dedicati alla tecnica di foaming, che si basa sull’incorporazione di gas all’interno di una sospensione ceramica. questa tecnica permette di ottenere una porosità di tipo anisotropo.

#### 4.3.1 Procedura sperimentale

La polvere di HA è stata calcinata a 1000°C per 5h e poi setacciata su maglie inferiori ai 150  $\mu\text{m}$ . E’ stata preparata una sospensione acquosa omogenea ponendo le quantità riportate in tabella 6 all’interno di un recipiente da 250ml ed effettuando una miscelazione gira-giare.

Tabella 6. Formulazione per la preparazione della sospensione destinata al “foaming”

	Quantità di sostanza (g)
Idrossiapatite	90
Dolapix CA	4.29
Dermocin C	2.0
Acqua	42
Mezzi macinanti sfere $\text{Al}_2\text{O}_3$	60

L’agente di foaming, ovvero il Dermocin C, è stato aggiunto alla sospensione per ultimo, una volta che questa si presentava ben miscelata. Le sospensioni sono state colate all’interno di stampi parallelepipedi ed è stato effettuato un essiccamento controllato in stufa ventilata, a 40°C per circa 48h.

I campioni essiccati, sono poi stati sinterizzati in forno secondo il ciclo di cottura riportato in tabella 7.

Tabella 7. Ciclo di sinterizzazione per i campioni ceramici

Temperatura	Tempo
20-700 °C	23 h
700-1250 °C	5 h 30min
1250 °C	2 h

Al fine di incrementare le proprietà meccaniche e l'adesione cellulare, campioni compositi sono stati ottenuti mediante infiltrazione degli scaffold ceramici con una soluzione di gelatina al 10%.

L'infiltrazione è stata realizzata sotto vuoto. I campioni ottenuti sono stati lasciati essiccare in stufa ventilata a 30°C.

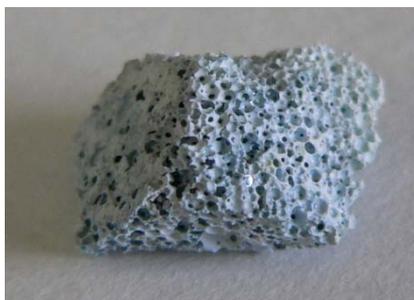


Figura 27- Immagine di un campione composito poroso ottenuto mediante la tecnica del foaming.

#### 4.3.2 Caratterizzazioni e discussione

##### Analisi XRD

L'analisi diffrattometrica a raggi X eseguita sui campioni porosi dopo trattamento termico ha evidenziato che il materiale è cristallo graficamente puro, non si sono formate fasi secondarie accanto all'apatite.

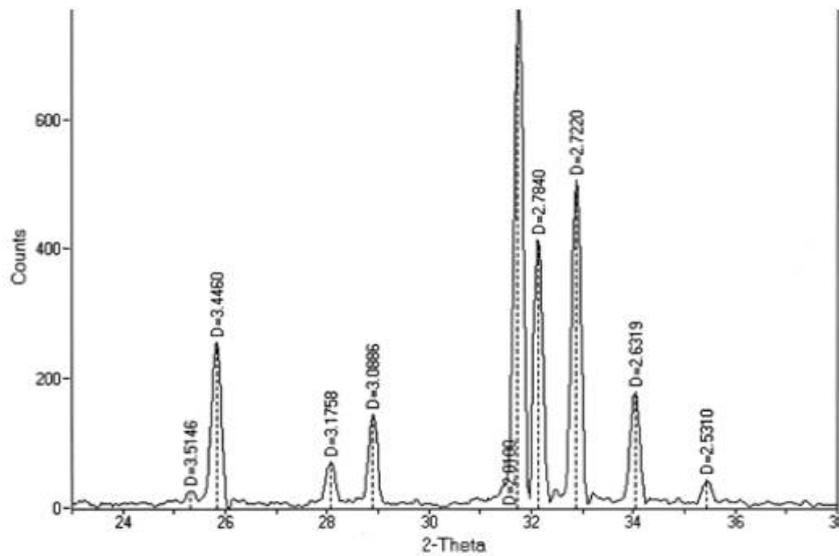


Figura 28- Analisi XRD degli scaffold a base di HA dopo trattamento di sintering.

### Porosità totale

La porosità totale del campione è strettamente dipendente dal volume libero all'interno della bottiglia, in quanto rappresenta l'aria che durante il processo di foaming viene inglobata all'interno della sospensione omogenea. La variazione controllata di questi parametri ha permesso di ottenere campioni finali con un range di porosità compreso fra il 50 e l'80% in volume.

### Macro-microstruttura

La porosità degli scaffold è di tipo globulare, ovvero i vuoti dei campioni sono costituiti da sfere di differente dimensione omogeneamente distribuite (figura 29).

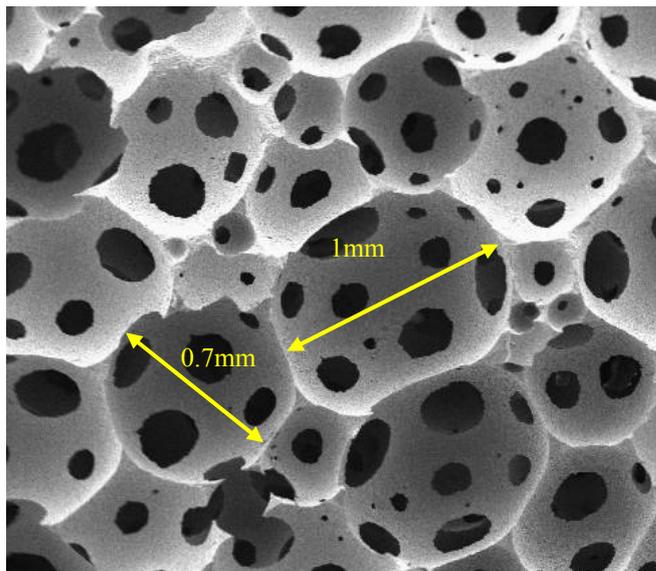


Figura 29- Campione ottenuto mediante foaming.

Sulle pareti dei macropori sono presenti dei pori dovuti alla coalescenza di due bolle di dimensione dell'ordine dei macropori. Queste cavità ( $>100\ \mu\text{m}$ ) risultano molto importanti, in quanto garantiscono l'interconnessione all'interno dello scaffold, favorendo quindi l'abitazione cellulare (figura 29).

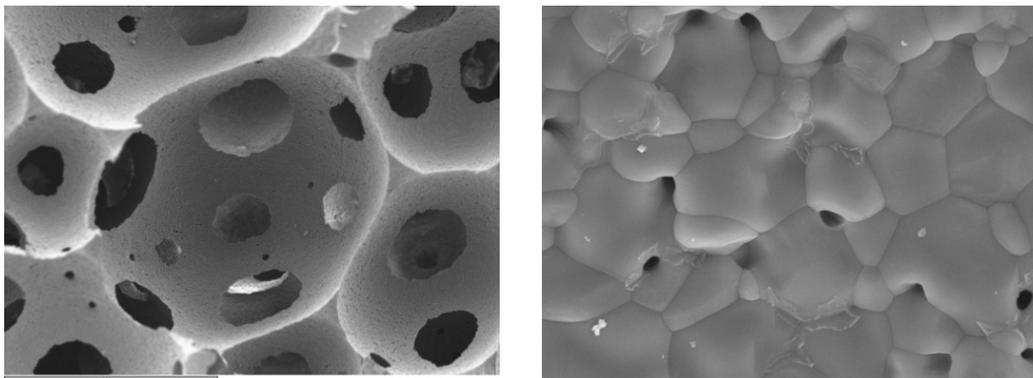


Figura 30- Campione ottenuto mediante foaming. Sin: Interconnessione dei pori; dex: microporosità.

I campioni sono caratterizzati anche da una microporosità, figura 30, necessaria per l'imbibizione del materiale da parte dei fluidi fisiologici e la vascolarizzazione. La presenza di questi micropori, e in generale dei pori nel

range <math><100\ \mu\text{m}</math>, è stata identificata anche mediante l'analisi al porosimetro a mercurio (figura 31).

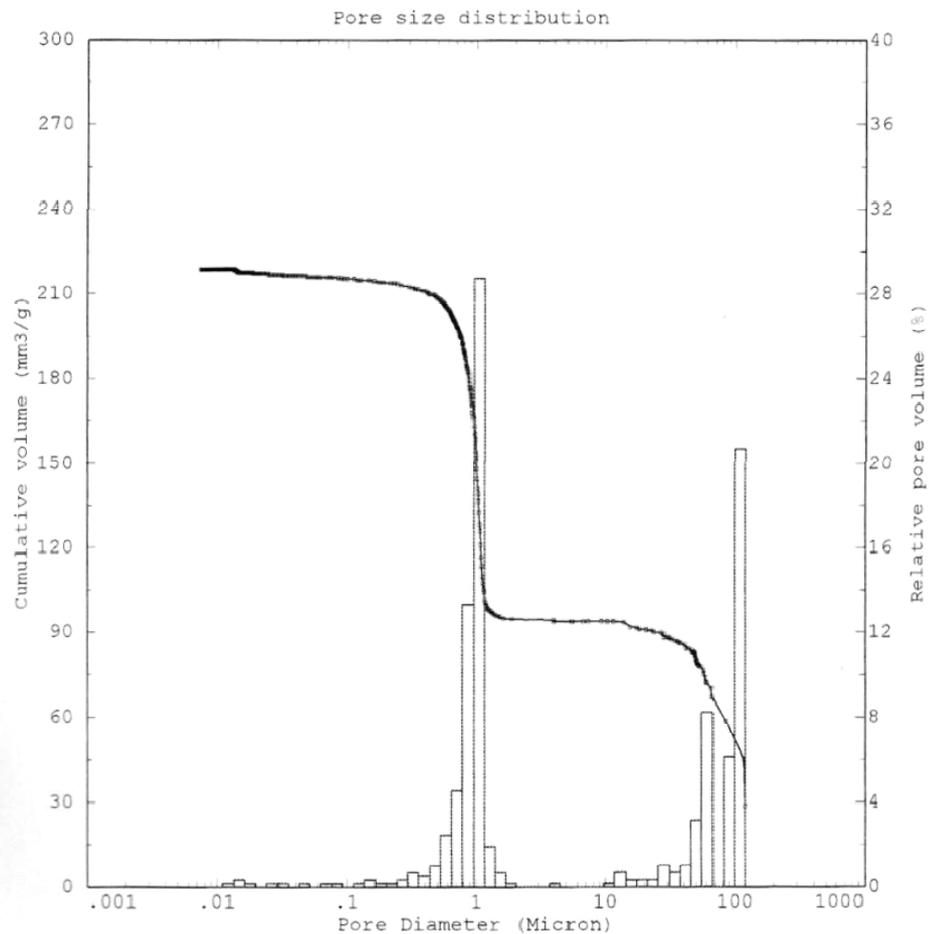


Figura 31- Porosimetria a mercurio nell'intervallo fra i 0.01-100 $\mu\text{m}$ .

### Resistenza a compressione

La resistenza a compressione è stata valutata su campioni a differente porosità finale. Passando da campioni con porosità intorno all'80 % in volume a campioni con porosità intorno al 70%, la resistenza a compressione raddoppia (tabella 8).

Tabella 8 Resistenze a compressione dei campioni e porosità totali dei campioni

Codice dello scaffold	Porosità totale (vol %)	$\sigma \pm \Delta\sigma$ (MPa)	% gelatina infiltrata
HA 70	70 $\pm$ 2	5.6 $\pm$ 1.5	
HA 70 -gel	72 $\pm$ 2	6.5 $\pm$ 1.6	4.4
HA 80	80 $\pm$ 1	2.5 $\pm$ 1.3	
HA 80-gel	77 $\pm$ 3	5.5 $\pm$ 0.7	8.3

Anche la quantità di gelatina infiltrata si presenta fortemente dipendente dalla porosità iniziale nel campione. Infatti, una più alta porosità consente l'infiltrazione di una quantità di gelatina superiore.

A seguito dell'infiltrazione con gelatina, la resistenza a compressione aumenta. Nel caso dei campioni HA70, l'incremento della resistenza a compressione è pari a circa il 20%, mentre nel caso dei campioni HA80 il coating con la gelatina fa sì che la resistenza a compressione aumenti del 120%, probabilmente a causa della maggior quantità di gelatina infiltrata nel campione.

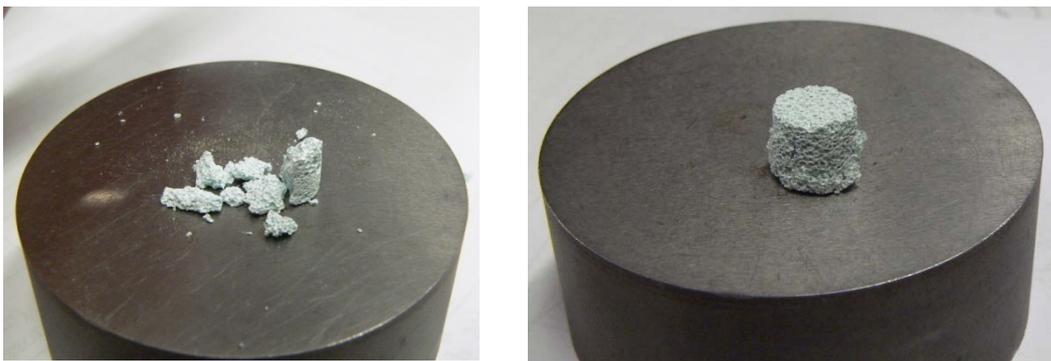


Figura 32- Campioni dopo test a compressione: sin: ceramico; dex: compositi.

È importante anche notare che, durante il test a compressione, i cilindri ceramici, una volta raggiunto il carico massimo, si frantumavano, mentre i compositi, una volta raggiunto il carico massimo, apparentemente mantenevano la loro integrità.

Un ulteriore effetto della fase proteica è mantenere la forma anche quando il campione si trova nelle condizioni di carico massimo (figura 32).

### 4.3.3 Applicazioni

#### **Progetto per la realizzazione di un condilo mandibolare in modello animale**

L'ingegneria dei tessuti è un'area interdisciplinare che mira alla realizzazione di sostituti ossei sempre migliori. Questa tecnologia richiede che uno scaffold sia posto in contatto con cellule isolate dal paziente (generalmente mesenchimali) e coltivate *in vitro*. Lo scaffold dovrebbe presentare una architettura porosa ottimizzata al fine di permettere l'abitazione cellulare. Il materiale può essere poi impiantato nel paziente al fine di sostituire il tessuto da rigenerare.

Le tecnologie assistite dal computer, immagini medicali e progettazione moderna, aprono nuove possibilità nell'ingegneria dei tessuti. Queste possibilità includono l'utilizzo di una micro-tomografia non invasiva, immagini a risonanza magnetica, tecniche per generare la visualizzazione dei tessuti in 3-D mediante modello anatomico e rappresentare l'assenza di tessuti prima e dopo le differenti condizioni cliniche.

Utilizzando le tecnologie CAD/CAM (progettazione e realizzazione mediante computer) e la prototipazione rapida, si può realizzare e sagomare un modello fisico per sostituire il tessuto osseo.

All'interno di questo progetto, è stato fatto uno studio pilota secondo cui un volume standard di HA porosa, ottenuta mediante foaming, è stato ridotto, mediante un processo 3-D automatizzato, ad un condilo mandibolare di un modello animale (pecora). L'esperimento pilota è stato condotto sulla pecora al fine di investigare le proprietà meccaniche dello scaffold nel sito mandibolare. La pecora è un animale erbivoro che mastica tutti i giorni per un tempo molto più lungo di quello degli uomini.

I risultati dello studio pilota hanno indicato che il materiale poroso a base di HA, da noi realizzato, può essere customizzato mediante il processo CAD/CAM e la riduzione del blocco può essere fatta mediante prototipazione rapida, senza generare fratture nel materiale.

Sono state utilizzate viti in titanio per fissare lo scaffold all'osso naturale. I primi risultati sono estremamente incoraggianti: il materiale presenta buone proprietà osteoconduttive e buona stabilità durante i movimenti funzionali della mandibola.



Figura 33- Sinistra: blocchetto di HA; Destra: condilo mandibolare ottenuto mediante lavorazione di prototipazione rapida.

#### 4.4 Conclusioni

Le condizioni di sintesi hanno permesso di ottenere apatiti pure, biomimetiche, stronzio sostituite con un rapporto molare Sr/Ca circa 0.1 ed un contenuto complessivo di Sr pari all'8% in peso circa. L'apatite si presenta adeguata per la realizzazione di scaffold ceramici in quanto mantiene la sostituzione e non genera fasi secondarie a seguito dei trattamenti termici.

La tecnica del freeze casting è stata utilizzata per sviluppare strutture porose completamente lamellari a base di apatite, la cui porosità è replica dei cristalli di ghiaccio che si sono accresciuti durante il congelamento, e che quindi è qualitativa e quantitativamente variabile in funzione dei molteplici parametri di processo (% fase acquosa, stechiometria polvere, velocità di congelamento, dimensione stampo,...). La dimensione dei pori e l'interconnessione ottenuta soddisfano le richieste per la penetrazione dei fluidi fisiologici e la crescita cellulare. L'elevata uni-direzionalità dei pori consente di realizzare cammini guida per la penetrazione delle cellule ed una rapida vascolarizzazione dell'impianto. Con la tecnologia del foaming è stato possibile realizzare materiali a porosità globulare (isotropa) di grandi dimensioni e ben omogenei. Tali materiali sono ottenibili con porosità % molto elevata (80% in volume) con proprietà meccaniche implementate, rispetto a quanto ottenibile con

tecnologie più classiche, tanto da essere lavorabili meccanicamente e personalizzabili sulla base della forma e dimensione del difetto osseo del paziente. La dimensione dei pori e l'interconnessione è risultata adeguata per la penetrazione dei fluidi fisiologici e delle cellule mesenchimali, nonché per la formazione di nuovo tessuto osseo, come è stato riscontrato dai risultati preliminari di impianto personalizzato come condilo mandibolare di pecora.

L'infiltrazione di gelatina degli scaffold ceramici di entrambi i tipi, oltre a migliorarne la biomimesi composizionale e la bioattività, ne aumenta le proprietà meccaniche mantenendone praticamente inalterata la porosità.

### **Riferimenti bibliografici**

1. Oh S, Oh N, Appleford M, Ong JL. Bioceramics for Tissue Engineering Application. *Am J of Biochem & Biotechnol* 2006;2:49-56.
2. E. Landi, S. Sprio, M. Sandri, G. Celotti, A. Tampieri Development of Sr and CO<sub>3</sub> co-substituted hydroxyapatites for biomedical applications, *Acta Biomaterialia* 4 (2008) 656–663.
3. E. Landi, A. Tampieri, G. Celotti, S. Sprio, M. Sandri, G. Logroscino, Sr-substituted hydroxyapatites for osteoporotic bone replacement *Acta Biomaterialia* 3 (2007) 961–969.
4. M. Pretto, A. L. Costa, E. Landi, A. Tampieri, C. Galassi, Dispersing Behavior of Hydroxyapatite Powders Produced by Wet-Chemical Synthesis, *J. Am. Ceram. Soc.*, 86 [9] 1534–39 (2003).
5. Deville S, Saiz E, Tomsia AP. Freeze casting of hydroxyapatite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* 2006;27:5480-5489
6. Deville S, Freeze-Casting of Porous Ceramics: A Review of Current Achievements and Issues *Advance Engineering Materials* 2008, 10 N3.
7. E. Landi, F. Valentini, A. Tampieri Porous hydroxyapatite/gelatine scaffolds with ice-designed channel-like porosity for biomedical applications *Acta Biomaterialia* 4 (2008) 1620–1626.
8. Keaveny TM. Cancellous bone. In: Black J, Hastings G, editors. *Handbook of Biomaterial Properties*. London: Chapman & Hall; 1998.

9. Morgan EF, Keaveny TM. Dependence of yield strain of human trabecular bone on anatomic site. *Journal of Biomechanics* 2001;34:569–77.
10. Sierpowska J, Hakulinen MA, Toyras J, Day JS, Weinans H, Jurvelin JS. Prediction of mechanical properties of human trabecular bone by electrical measurements. *Physiological Measurement* 2005;26:119–31.

## 5. COMPOSITI BIO-IBRIDI HA-GELATINA

### 5.1 Scaffold porosi realizzati mediante freeze casting

I materiali compositi sintetici a base di calcio-fosfati e gelatina sono di grande interesse per il riparo del tessuto osseo umano, poiché consentono di simulare il tessuto sia dal punto di vista compositivo che morfologico. Gli scaffold a base di sola gelatina presentano scarse proprietà meccaniche in soluzione fisiologica poiché si degradano molto facilmente a causa della loro elevata solubilità. D'altra parte, gli scaffold a base di idrossiapatite presentano un'elevata fragilità. La gelatina è molto adeguata per queste applicazioni poiché presenta un completo assorbimento *in vivo*, proprietà chimico/fisico variabili, è facilmente reticolabile<sup>1</sup> e consente di controllare il rilascio di farmaci o altri agenti biologici, eventualmente caricati sullo scaffold.

La sperimentazione della tecnologia del freeze-casting<sup>2-4</sup> è spinta dalla possibilità di creare dei canali guida per la penetrazione cellulare ed, allo stesso tempo, incrementare le proprietà meccaniche in specifiche direzioni.

Scaffold compositi con una struttura complessa possono essere ottenuti mediante freeze-casting di sospensioni o soluzioni acquose<sup>5</sup>. La morfologia finale degli scaffold è fortemente dipendente dalle proprietà chimico fisiche del materiale costitutivo e dalle condizioni di congelamento. Le condizioni di processo devono essere selezionate in maniera molto accurata al fine di ottenere distribuzioni adeguate delle dimensioni dei pori, per consentire la penetrazione delle cellule ossee e la vascolarizzazione.

Scaffold a base di gelatina aventi una porosità anisotropa ed a gradiente di mineralizzazione sono stati ottenuti mediante la tecnica del freeze-casting, partendo da soluzioni a diversa concentrazione di gelatina, caricate o meno con polvere di idrossiapatite.

Sono stati studiati due diversi aspetti volti a migliorare la stabilità degli scaffold a base di gelatina

1. . la reticolazione della gelatina con un agente reticolante naturale (genipina)<sup>1</sup>
2. . la mineralizzazione della fase proteica

La realizzazione di un gradiente di mineralizzazione 0-70% in peso consente di simulare il tessuto osseo naturale in siti articolari complessi, dove si passa da strati superficiali di sola cartilagine (allo strato profondo osseo (70% apatite e 30%collagene)).

### 5.1.1 Sintesi dei compositi

Per ottenere un sistema semplice, i compositi bioibridi HA-gelatina sviluppati sono caratterizzati da due strati: uno strato inferiore a base di HA-gelatina, ed uno superiore a base di sola gelatina (figura 1).

Per la realizzazione di strati di gelatina, soluzioni acquose a differente concentrazione di gelatina sono state preparate miscelando la gelatina (tipo A, Italgelatine) con acqua, a 40°C in bagno-maria, mediante agitazione magnetica. Le soluzioni sono state reticolate con una concentrazione di genipina allo 0.67% in peso per 24 h a temperatura ambiente, mantenendo costanti le condizioni di temperatura e di agitazione . La colorazione graduale della soluzione di gelatina che accompagna la reticolazione, consente di seguire la reazione.



Figura 1-: Immagine del composito bi-strato

Nella preparazione degli strati a base di idrossiapatite/gelatina, si sono preparate delle soluzioni acquose di gelatina a diversa concentrazione, reticolate e non con genipina, nelle stesse condizioni di cui sopra. Alla soluzione di gelatina è stata

aggiunta la polvere di idrossiapatite con un rapporto in peso HA/gelatina pari al 70/30. La sospensione viene omogeneizzata a caldo per circa 30 minuti sotto agitazione.

Il congelamento delle soluzioni – sospensioni è stato fatto avvenire in appositi stampi cilindrici, in cui le pareti laterali sono costituite di silicone, mentre la base, a contatto con la piastra refrigerata, è altamente conduttiva dal punto di vista termico. In sostanza la base dello stampo si trova a contatto con la piastra del liofilizzatore, precedentemente raffreddata a -10°C circa, mentre la parte superiore si trova a contatto con l'aria della camera del liofilizzatore, a circa 5°C. Per la realizzazione dei compositi bioibridi a gradiente di fase minerale si è proceduto in due step. Inizialmente, la sospensione a base di idrossiapatite/gelatina è stata colata all'interno dello stampo. Dopo circa 30 minuti, è stata aggiunta la soluzione di gelatina. Terminato il congelamento, i campioni sono stati liberati dagli stampi e poi liofilizzati con un ciclo di 48h.

### **5.1.2 Caratterizzazione chimica**

#### **Analisi XRD**

Lo spettro a raggi X della gelatina tal quale non mostra alcun segnale, come è caratteristico dei materiali amorfi.

I diffrattogrammi, eseguiti direttamente sui campioni HA/gelatina, confermano la presenza della fase apatitica

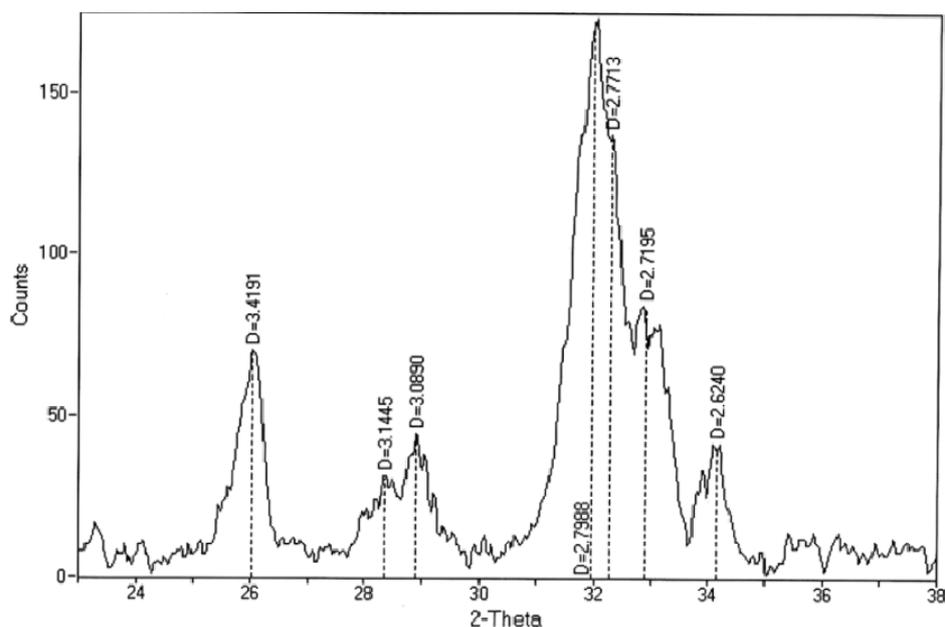


Figura 2- Spettro XRD del materiale HA/gelatina.

### Analisi FTIR

La presenza di idrossiapatite è stata confermata anche mediante l'analisi FTIR. La figura 3 mostra gli spettri infrarossi dell'idrossiapatite e della gelatina utilizzate come materiali di partenza per la realizzazione dei compositi .

La gelatina presenta uno spettro infrarosso piuttosto complicato, dovuto alla sua complessità molecolare, dove è possibile individuare i segnali caratteristici delle funzioni amminiche, carbossiliche, ossidriliche e dell'acqua di idratazione.

Per quanto riguarda l'idrossiapatite, le bande caratteristiche a 570 ed a 980-1090  $\text{cm}^{-1}$  sono dovute alle vibrazioni di bending e di stretching dei legami P-O del gruppo fosfato, mentre la banda allargata centrata a circa 3400 ed il picco a 1640  $\text{cm}^{-1}$  rivelano la presenza dell'acqua adsorbita ed occlusa nella polvere. Sono visibili anche i picchi di stretching a 1460 e 1430  $\text{cm}^{-1}$  ed il picco a 873  $\text{cm}^{-1}$  relativo al bending del carbonato, che indicano che l'apatite è parzialmente carbonatata in sito B (fosfatico).

Le bande a 1250, 1640 e 1560  $\text{cm}^{-1}$  nello spettro della gelatina sono dovute allo stretching C-N dei gruppi amminici primari e secondari<sup>6,7</sup>.

Lo spettro del materiale composito HA/gelatina (figura 4) è il risultato della somma dei segnali di entrambi le componenti; è possibile distinguere, oltre ai segnali della gelatina, anche quelli del  $\text{PO}_4^{3-}$  e dell' $\text{OH}^-$  dell'idrossiapatite.

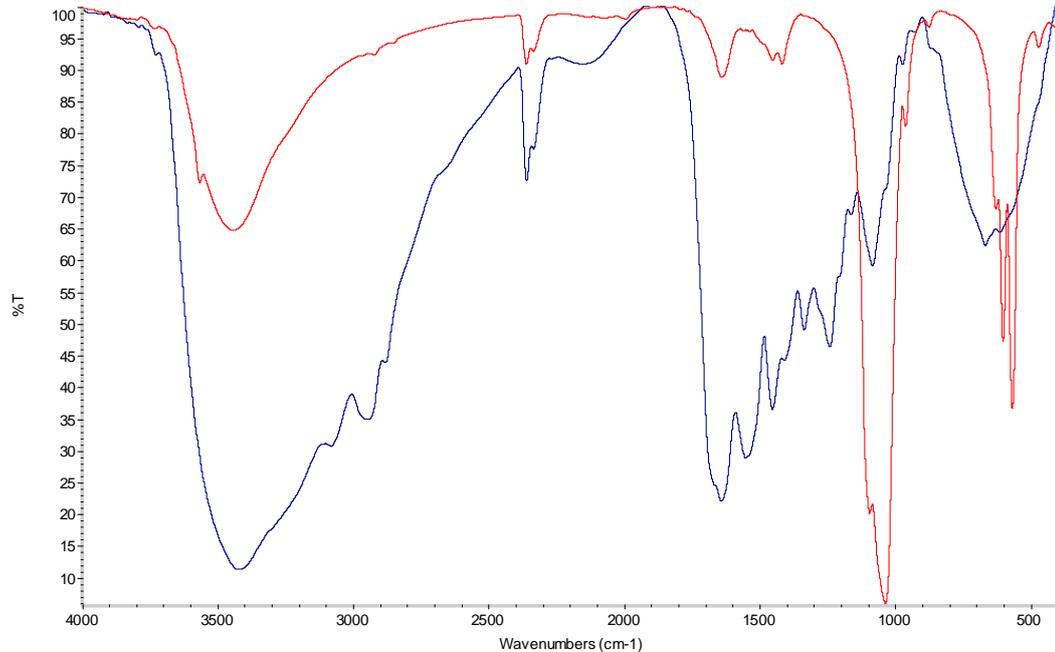


Figura 3- Spetti FTIR: gelatina (in blu) e di HA (in rosso).

Nella stessa figura è riportato anche lo spettro del campione HA/gelatina cross-linkato con genipina. L'effetto della reticolazione è indicato dallo spostamento della banda a  $1250\text{ cm}^{-1}$  a lunghezze d'onda più alte, poiché i gruppi amminici secondari della gelatina reagiscono con i gruppi carbonilici della genipina al fine di formare il legame covalente C-N (vedi figura 5 che riporta un ingrandimento di questa zona dello spettro FTIR).

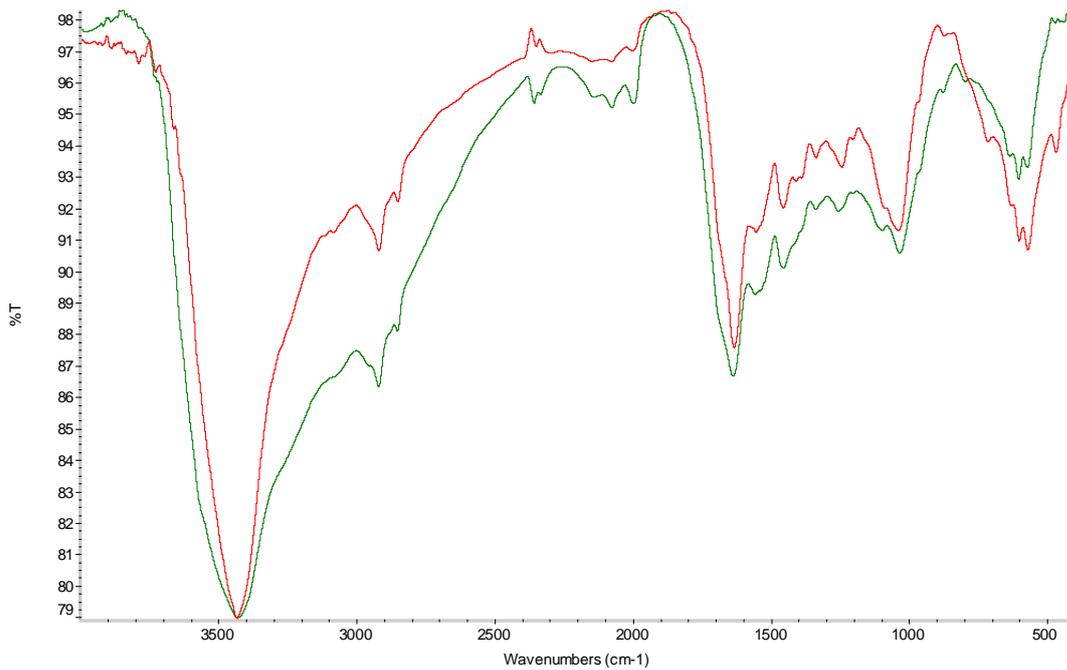


Figura 4- Spettri FTIR: HA/gelatina (in rosso) HA/gelatina/genipina (in verde).

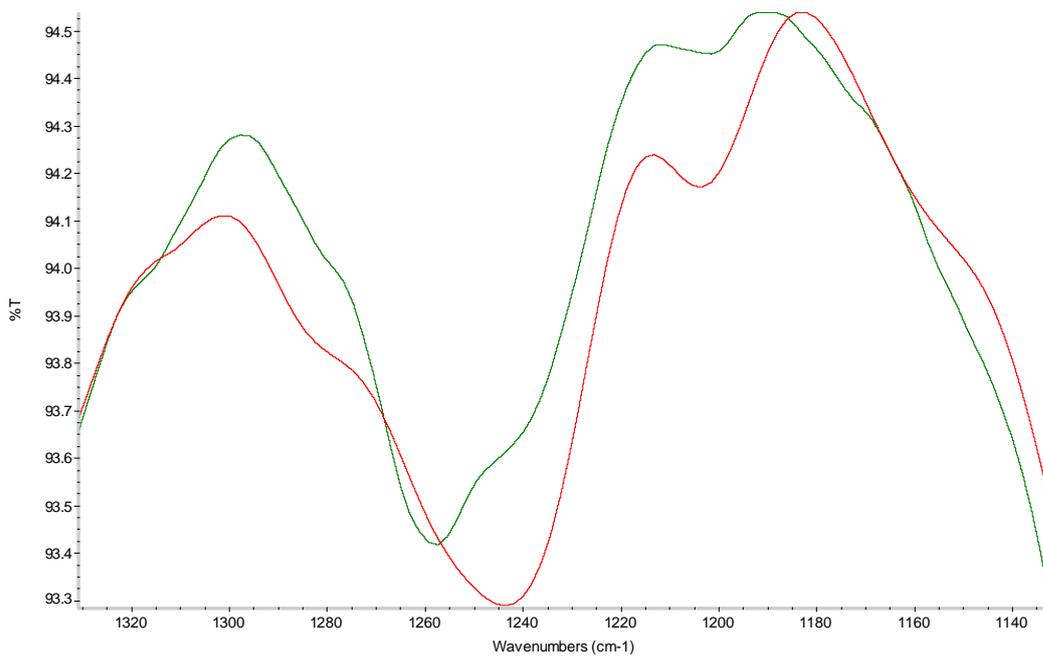
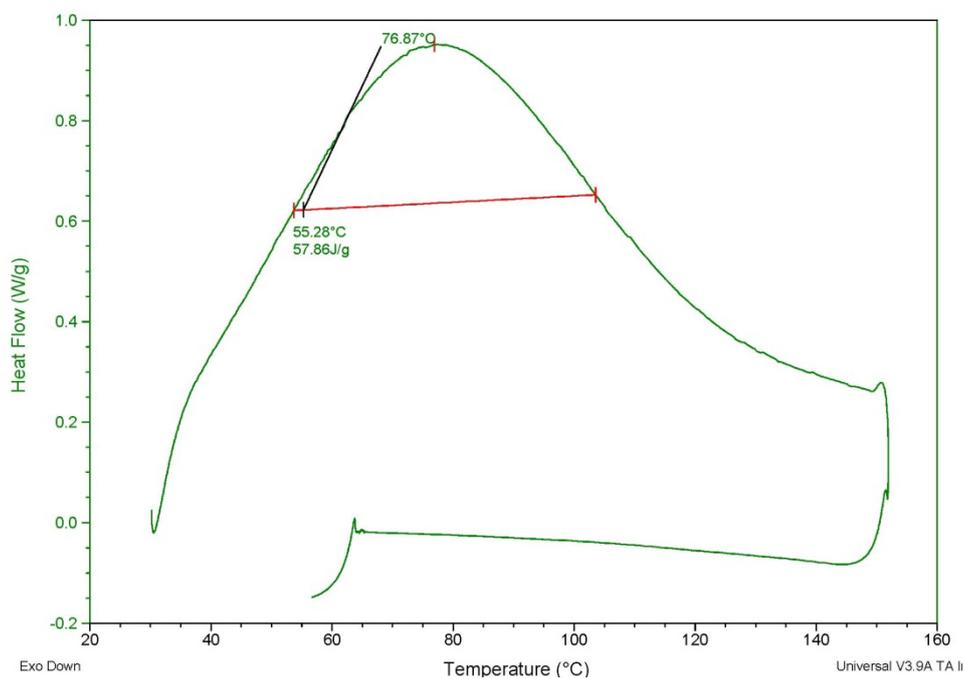


Figura 5- Spettri FTIR: HA/gelatina (in rosso) HA/gelatina/genipina (in verde).

D.S.C.

Un'altra conferma della avvenuta reticolazione è ottenibile dalla analisi calorimetrica a scansione differenziale.

La curva D.S.C dei materiali collagenici presenta un picco endotermico associato alla transizione della tripla elica del collagene (figura 6). Il valore dell'entalpia di denaturazione associata a questo picco è collegato alla quantità della struttura a tripla elica all'interno del campione, e, quindi, risulta significativamente più basso per la gelatina, rispetto al collagene. La reazione di denaturazione coinvolge sia legami di tipo idrogeno, la cui rottura è endotermica, che legami di tipo covalente, la cui rottura è esotermica.



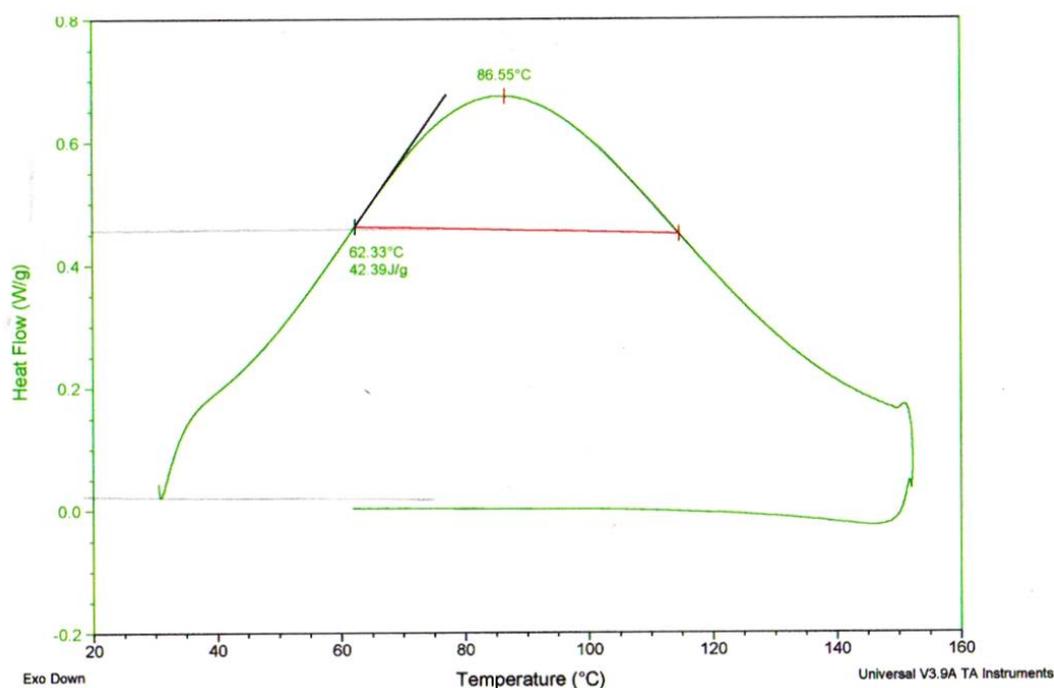


Figura 6- Analisi D.S.C della gelatina (curva superiore) e della gelatina reticolata (curva inferiore)

Generalmente la reticolazione induce una diminuzione della entalpia di denaturazione in quanto comporta sia una riduzione dei legami a idrogeno, la cui rottura si presenta endotermica, che un aumento dei legami covalenti, la cui rottura si presenta esotermica. In tabella 1 sono riportati i valori di entalpia di denaturazione, valutati mediante D.S.C. Si può notare la diminuzione nel materiale reticolato.

Tabella 1 Variazioni dell'entalpia di denaturazione per campioni reticolati e non, valutate mediante analisi D.S.C..

Campione	$\Delta T_D$	$\Delta H$ (J/g)
Gelatina	0°C	57.9
Gelatina reticolata con genipina	~10°C	42.4

La reticolazione induce anche stabilità termica, come evidenziato dall'aumento di temperatura di denaturazione.

Infatti la genipina può indurre reticolazioni intramolecolari ed intermolecolari, mediante la sua struttura ciclica. La reazione della genipina con gli amminogruppi liberi della gelatina porta alla formazione di ammine terziarie, molto più stabili delle basi di Schiff, ottenute nel caso di reticolazione di gelatina realizzate mediante glutaraldeide<sup>1</sup>. È stato infatti osservato che la reticolazione con genipina porta ad un incremento della denaturazione più elevato anche con un minor quantitativo di gruppi amminici reticolati<sup>1</sup>.

L'analisi D.S.C. dei campioni HA/gelatina risulta di più difficile interpretazione per la sovrapposizione di fenomeni dovuti alla fase minerale. Apparentemente si ottengono dati contrastanti con quanto trovato per i campioni di sola gelatina. Si rende, quindi, necessario uno studio sistematico più approfondito.

### Densità assoluta

La densità assoluta dei materiali è stata calcolata sulla base del peso e del volume degli scaffold.

I valori ottenuti sono riportati in tabella 2. E' possibile vedere che la densità assoluta del materiale è strettamente dipendente dal contenuto di acqua della soluzione di gelatina; il valore di densità dei singoli strati (gelatina pura e composti HA/gelatina), così come dei campioni bi-strato aumenta linearmente con l'aumentare della concentrazione della soluzione di gelatina utilizzata (da 2 a 3.5%).

Tabella 2 Densità assoluta degli scaffold di sola gelatina (G) e dei compositi (HG73) a diversa concentrazione (2 e 3.5%) reticolati o meno.

	HG73 2%	G 2%	HG73- G	HG73g 2%	Gg 2%	HG73g- Gg 2%	HG73g 3.5%	Gg 3.5%	HG73g- Gg 3.5%
<b>Densità (g/cm<sup>3</sup>)</b>	0.083	0.024	0.052	0.081	0.022	0.051	0.14	0.052	0.10

### Swelling

I campioni sono stati valutati anche dal punto di vista del rigonfiamento in soluzione ("swelling"). Essi sono stati immersi in soluzione fisiologica per diversi periodi di tempo. I campioni umidi sono stati tamponati con un filtro di carta per

rimuovere l'eccesso di liquido e sottoposti a pesata. La quantità di acqua assorbita è stata calcolata mediante la seguente formula:

$$W (\%) = 100 \frac{(W_w - W_d)}{W_d}$$

in cui  $W_w$  and  $W_d$  sono, rispettivamente, i pesi del campione umido e del campione asciutto. Dato che la gelatina è altamente solubile in soluzione acquosa, quando lo scaffold viene messo a contatto con una soluzione fisiologica, sono sufficienti pochi minuti per indurre un considerevole rigonfiamento.

La figura 7 mostra chiaramente che tanto il trattamento di reticolazione quanto la presenza di idrossiapatite riducono fortemente il grado di rigonfiamento dello scaffold.

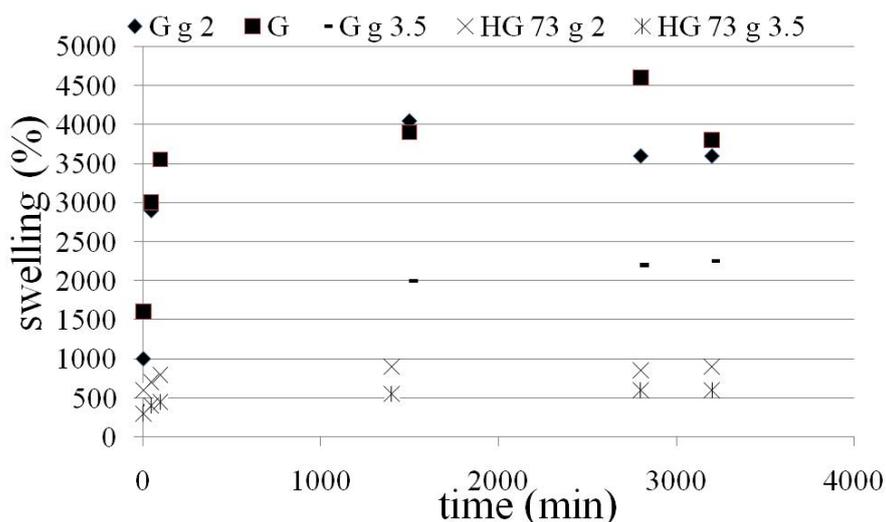


Figure 7- Curve di swelling per gli scaffold a base di gelatina (G) e per quelli a base di idrossiapatite-gelatina (HG) a diversa concentrazione, con o senza genipina

È importante osservare che dopo il test di swelling i due strati gelatinico e mineralizzato sono perfettamente adesi.

### Microscopia a scansione elettronica (SEM)

Nelle condizioni di processo selezionate, la porosità degli scaffold risulta aperta e principalmente unidirezionale, con pori allungati lungo la direzione del congelamento, portando ad una morfologia completamente lamellare.

Per quanto concerne gli scaffold a gradiente di fase minerale, lo strato inferiore composito bio-ibrido HG73 è costituito da nano particelle di idrossiapatite disperse nelle lamelle di gelatina, mentre lo strato superiore è caratterizzato da lamelle pure di gelatina. L'intero scaffold è caratterizzato da pori lunghi paralleli, allineati lungo la direzione del fronte di avanzamento del ghiaccio. Utilizzando particolari condizioni di congelamento, è stata eliminata una chiara separazione fra le due zone ed il materiale passa gradualmente da una zona a composizione totalmente organica a quella bio-ibrida, senza presentare discontinuità morfologiche. La reticolazione con la genipina permette di realizzare pori molto più definiti, che si trovano nel range adeguato per consentire la penetrazione degli osteoblasti (cellule ossee).

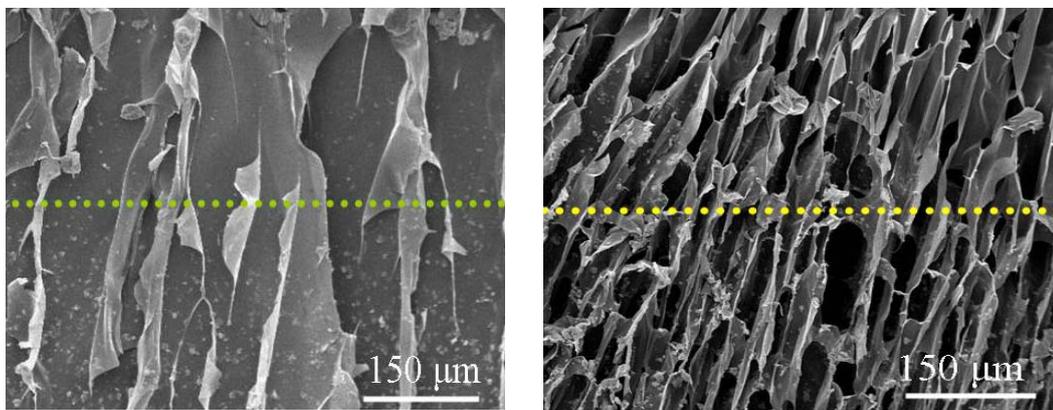


Figure 8- Immagine SEM che mostra la morfologia degli scaffold bi-strato ottenuti utilizzando condizioni di processo differenti

### Caratterizzazione meccanica

Sono state fatte valutazioni preliminari di resistenza a compressione. A causa della loro struttura lamellare, gli scaffold presentano un comportamento

anisotropo, quando sottoposti a compressione. I test sono stati interrotti a circa il 70% della deformazione.

La figura 9 riporta le curve di sforzo-deformazione per la porzione mineralizzata dello scaffold, testata in direzione parallela e perpendicolare alla direzione di accrescimento delle lamelle. L'aumento rapido della curva ad elevati valori di deformazione è dovuto alla compattazione del materiale che costituisce lo scaffold originale.

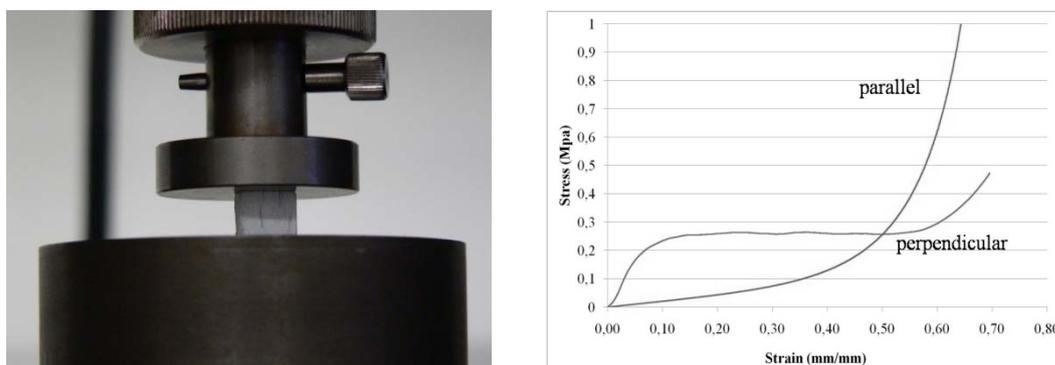


Figure 9- Sinistra: apparecchiatura utilizzata per il test a compressione Destra: curva sforzo deformazione ottenuta per HG73 2%.

Aumentando la concentrazione della soluzione di gelatina costituente la fase liquida della sospensione, si osserva un aumento sia della resistenza a compressione che del valore di deformazione corrispondente (figura 10). Questo incremento è in accordo con l'aumento della densità assoluta da 0.081 a 0.14  $\text{g/cm}^3$ , ottenuta rispettivamente per i campioni HG73g 2% ed HG73g 3.5%. Infatti a parità di volume dello scaffold, la frazione solida nel secondo caso è maggiore ed il volume dei pori risulta, quindi, inferiore. Si ricordi la peculiarità della tecnologia del freeze casting concernente l'andamento proporzionale della porosità % ottenibile nello scaffold con la frazione acquosa della sospensione di partenza<sup>4</sup>.

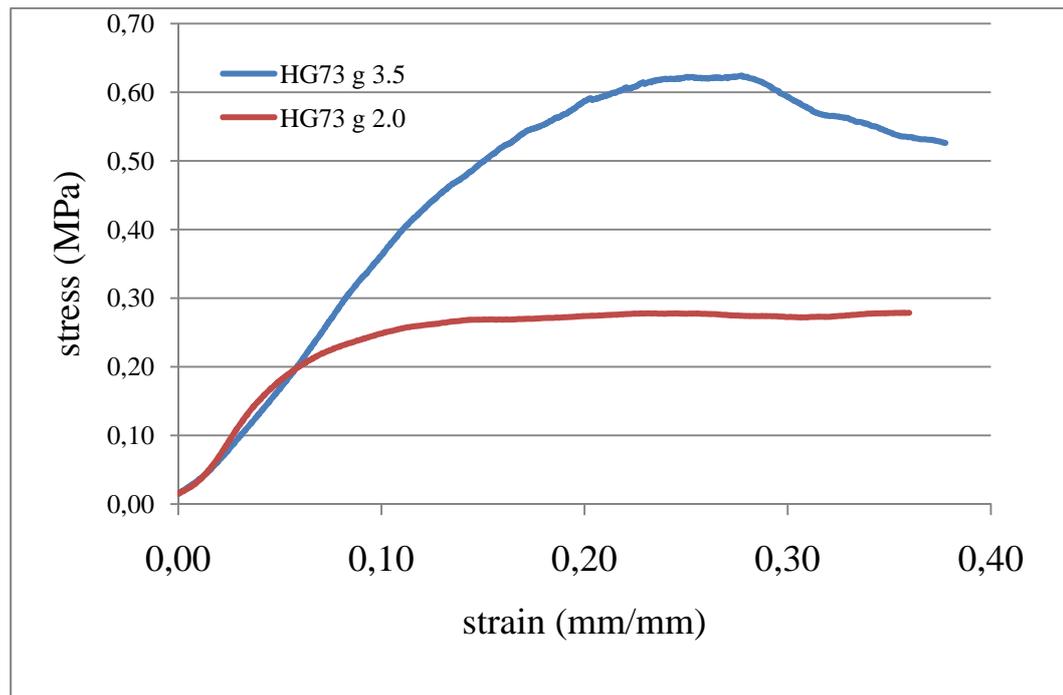


Figure 10-. Curve sforzo-deformazione ottenute per campioni bioibridi di HA-gelatina 70-30, ottenuti per freeze casting, utilizzando soluzioni di gelatina a diverse concentrazioni

## 5.2 Conclusioni

Il processo di freeze casting è stato utilizzato per sviluppare scaffold a porosità anisotropa a base di gelatina, la cui porosità replica quella dei cristalli di ghiaccio che si formano durante il congelamento. I canali dei pori sono preferenzialmente allineati nella direzione di avanzamento del fronte di ghiaccio e si presentano sufficientemente grandi per essere abitati dalle cellule del tessuto osseo ai fini della crescita cellulare e della produzione di matrice extra-cellulare. Funzionano, cioè, da cammini guida facilitando la penetrazione delle cellule nell'intero scaffold.

Per simulare il tessuto di un sito complesso come quello articolare, sono stati sviluppati dei campioni apatite/gelatina a gradiente di mineralizzazione (0-70%). L'utilizzo di un trattamento reticolante e la presenza della fase minerale migliorano la stabilità dello scaffold.

Il dispositivo ottenuto non presenta una discontinuità morfologica né compositiva al variare del contenuto della fase minerale: non è identificabile una netta

separazione fra porzione bio-ibrida ed esclusivamente proteica e l'adesione si mantiene anche dopo lo swelling.

Dal punto di vista meccanico è stato preliminarmente verificato che l'anisotropia morfologica genera una differenza nel sopportare carichi nelle diverse direzioni.

### **Riferimenti bibliografici**

1. Bigi A., Coiazzi G., Panzavolta S., Roveri N., Rubini K., Stabilization of gelatin films by cross-linking with genipin, *Biomaterials* 23 (2002) 4827-4832.
2. Deville S, Saiz E, Tomsia AP, Freeze Casting of Hydroxyapatite Scaffolds for Bone Tissue Engineering, *Biomaterials* 27 (2006) 5480-89.
3. H.W. Kang, Y. Tabata, Y. Ikada, Fabrication of porous gelatin scaffolds for tissue engineering, *Biomaterials* 20 (1999) 1339-1344
4. Landi E, Valentini F., Tampieri A. Porous hydroxyapatite/gelatine scaffolds with ice-designed channel-like porosity for biomedical applications *Acta Biomaterialia* 4 (2008) 1620-1626.
5. L. Qiang, F. Qing, Preparation of 3D regenerated fibroin scaffolds with freeze drying method and freeze-drying/foaming technique, *J. Material Sci: Mater Med* (2006) 17: 1349-1356.
6. V Chiomo, E. Pulieri, G. Vozzi, G. Ciardelli, A. Ahuwalia, P. Giusti, Genipin cross-linked chitosan/gelatin blends for biomedical applications, *J. Mater Sci: Mater Med* (2008) 19: 889-898.
7. F.L. Mi, S.S. Shyu, C.K. Peng, Characterization of Ring-Opening Polymerization of Genipin and pH-Dependent Cross-Linking Reactions Between Chitosan and Genipin, *J Polym Sci Part A: Polym Chem* 43: 1985–2000, 2005.
8. S. Panzavolta, M. Fini, A. Nicoletti, B. Bracci, K. Rubini, R. Giardino, A. Bigi, Porous composite scaffolds based on gelatin and partially hydrolyzed a-tricalcium phosphate, *Acta Biomaterialia* 5 (2009) 636–643.

## 6. SISTEMI PER IL RILASCIO CONTROLLATO DI FARMACI

Sostituti ossei a base di apatite biomimetica bioattiva sono di per sè considerabili dei sistemi di rilascio di fattori biologicamente utili, in quanto rilasciano nel sito dell'impianto ioni aventi specifiche funzioni nel metabolismo e nel rimodellamento osseo e nel trattamento di specifiche patologie. Ci si riferisce non solo, quindi, a  $\text{Ca}^{2+}$  e a  $\text{PO}_4^{3-}$ , gli ioni fondamentali sostitutivi la fase minerale, ma anche a ioni secondari a cui sono riconosciute peculiari proprietà (per esempio il carbonato in sito B aumenta la bioattività e la rigenerazione ossea, lo stronzio ha proprietà osteoporotiche).

La possibilità di rilasciare il farmaco, direttamente nel sito dell'impianto, rappresenta un notevole valore aggiunto per il sostituto osseo. A seconda delle indicazioni terapeutiche possono essere rilasciati in situ diversi tipi di agenti biologici, quali fattori di crescita ossea, ecc.. In caso di patologie specifiche possono essere caricati farmaci specifici (es. antitumorali, antiosteoporotici, antibiotici, ecc.).

La funzione di dispensatori in situ di farmaci o ioni per il trattamento di specifiche patologie risulta di estremo interesse, in quanto consente di evitare, o per lo meno limitare, somministrazioni farmacologiche per via orale che possono avere ripercussioni a livello sistemico.

In questo caso è stata scelta la tobramicina, un antibiotico aminoglicosidico largamente utilizzato nel trattamento delle osteomieliti. Purtroppo, se somministrata per un lungo periodo di tempo, può creare seri problemi di ototossicità e nefrotossicità; per questo motivo vanno monitorati attentamente i livelli di farmaco nel plasma. Livelli adeguati di antibiotico si trovano nel range di qualche  $\mu\text{g ml}^{-1}$ .

Come sistemi di trasporto e di rilascio della tobramicina sono stati sperimentati granulati a base apatite parzialmente sostituita con ioni carbonato<sup>3,4</sup> in sito fosfatico (tipo B) (CHA) e porosi a base di HA e di SrHA realizzati mediante freeze-casting.

È stata inoltre sperimentata l'efficacia dell'infiltrazione degli scaffold ceramici con la gelatina, al fine di modulare il rilascio di antibiotico dal materiale.

## **6.1 Procedura sperimentale**

### **6.1.1 Granulato CHA-tobramicina**

È stata sintetizzata ad umido a basse temperature una polvere a base di CHA, effettuando il gocciolamento di una soluzione di ioni  $\text{HCO}_3^-$  simultaneamente con la soluzione di  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , alla sospensione di  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ . La polvere è stata caratterizzata dal punto di vista compositivo e cristallografico. Il contenuto di  $\text{CO}_3^{2-}$  è circa 3% e la s.s.a. è pari a  $40.31 \text{ m}^2/\text{g}$ .

Il materiale è cristallograficamente puro e presenta un basso grado di cristallinità. La polvere di CHA è stata utilizzata tal quale per la preparazione del granulato di dimensioni adeguate, per uso in campo biomedicale quale riempitivo osseo (400-600  $\mu\text{m}$ ). Il metodo di preparazione del granulato è stato messo a punto in modo tale da consentire lo sfruttamento della proprietà biomimetiche della nano polvere, senza indurre alterazioni.

Il granulato a base di tobramicina-CHA è stato preparato miscelando 10.0 g di polvere di CHA con 13 ml di una soluzione tamponata contenente 150 mg di tobramicina. La polvere è stata poi essiccata in stufa ventilata a  $40^\circ\text{C}$  per 3h e setacciata nel range compreso fra 400 e 600  $\mu\text{m}$ .

### **6.1.2 Apatiti porose**

Gli scaffold di apatite, infiltrati con la gelatina ed ottenuti mediante la tecnica del freeze-casting (cap. 3), sono stati anche testati dal punto di vista del rilascio.

### **6.1.3 Apatiti porose con tobramicina**

Scaffold ceramici di HA e di SrHA, a differente grado di porosità, ottenuti mediante freeze-casting sono stati caricati con tobramicina, infiltrando lo scaffold con pochi ml di una soluzione contenente l'antibiotico, al fine di ottenere una concentrazione in peso del farmaco caricata pari a circa 1.5%. Gli scaffold sono stati poi essiccati in stufa ventilata a  $40^\circ\text{C}$  per 3h.



Figura 1- Immagine di uno scaffold ottenuto mediante freeze-casting infiltrato con tobramicina e, successivamente, con una soluzione di gelatina reticolata.

Per modulare la cinetica di rilascio, questi scaffold sono stati infiltrati con una soluzione di gelatina al 10% in peso, reticolata con genipina (per 24h) con l'ausilio di una pompa da vuoto. Infine sono stati nuovamente essiccati in stufa ventilata a circa 30°C per 48h (figura 1).

### **Cinetica di rilascio**

Il rilascio di tobramicina dal granulato è stato valutato ponendo in un becker 0.5 g di granulato con 50 ml di soluzione fisiologica a 37°C. Anche per quanto riguarda gli scaffold è stato utilizzato sempre un rapporto 1:100, ovvero 1 g di campione è stato posto in contatto con 100 ml di soluzione, a 37°C.

A determinati intervalli di tempo, 1ml di soluzione è stato prelevato ed analizzato mediante HPLC, a seguito di un trattamento di filtrazione per rimuovere eventuale particolato. Per mantenere le condizioni costanti, un'uguale quantità di SBF (simulated body fluid) fresco è stata addizionata al becker, a seguito di ogni prelievo. Il contenuto di tobramicina è stato determinato mediante curva di calibrazione e ciascuna analisi è stata eseguita in triplicato.

## 6.2 Caratterizzazione

### 6.2.1 Granulato CHA-tobramina

#### Analisi FTIR

Lo spettro FTIR della polvere di CHA, riportato in figura 2, mette in luce tutte le bande tipiche di un'idrossiapatite biomimetica, a bassa cristallinità. Lo spettro infatti presenta segnali poco definiti e non rileva i picchi di stretching e bending dell'OH<sup>-</sup> strutturale, rispettivamente a 3600 e 630 cm<sup>-1</sup>. Sono presenti, comunque, i segnali tipici del fosfato a 1050 ed a 980 cm<sup>-1</sup> e dell'acqua occlusa (1640cm<sup>-1</sup>). Risultano ben visibili anche i due picchi di stretching associati alla carbonatazione di tipo B a 1430 e 1460 cm<sup>-1</sup> ed il segnale di bending a 873 cm<sup>-1</sup>.

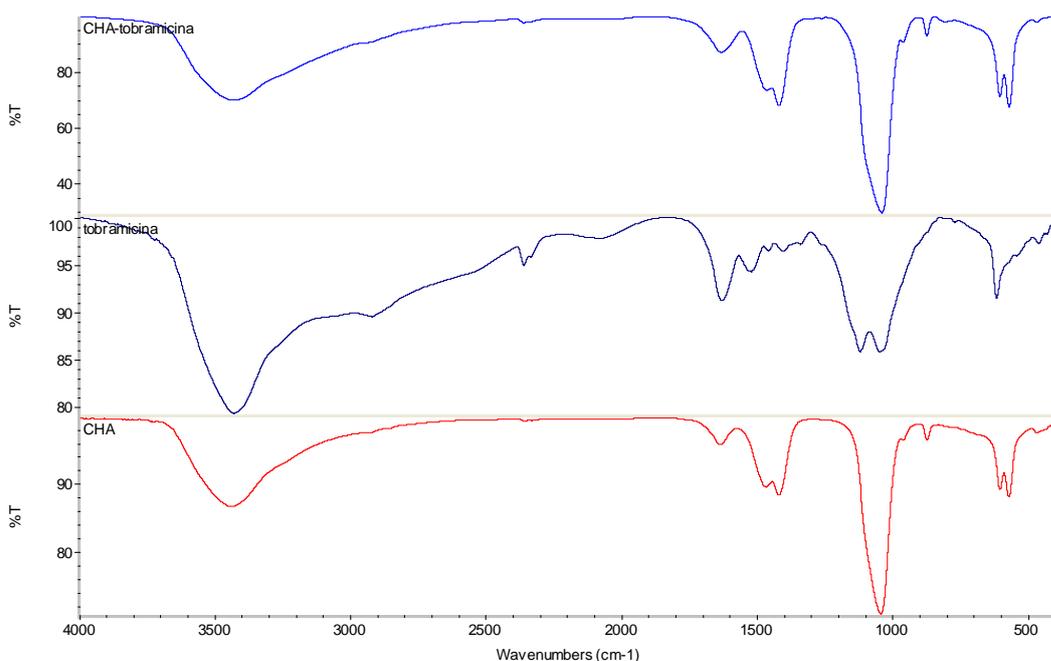


Figura 2- Spettri FTIR del granulato CHA contenente tobramicina, della tobramicina e di CHA.

Gli spettri FTIR del granulato, in cui è stata incorporata anche la tobramicina in concentrazione pari all'1.5% in peso, mostrano un assorbimento per le bande del fosfato e del carbonato simile all'assorbimento del campione di partenza. Risulta invece piuttosto difficile identificare eventuali variazioni indicative delle

interazioni CHA-tobramicina, probabilmente perché l'antibiotico è presente in quantità estremamente bassa. È possibile, comunque, rilevare un leggero allargamento delle bande ed un lieve aumento delle intensità dei segnali a  $600\text{ cm}^{-1}$  dove cadono le bande della tobramicina<sup>5</sup>.

### Cinetica di rilascio

I risultati della cinetica di rilascio per il granulato a base di CHA sono riportati in figura 3.

Il rilascio di tobramicina è pari a circa il 98% entro 150 min, dopo di cui raggiunge un plateau. Sulla base di questi dati è possibile osservare che il metodo analitico sviluppato è adeguato per valutare la cinetica di rilascio del campione, pur essendo molto semplice, in quanto prevede solo una filtrazione della soluzione prima di iniettare il campione all'interno della colonna cromatografica<sup>6</sup>.

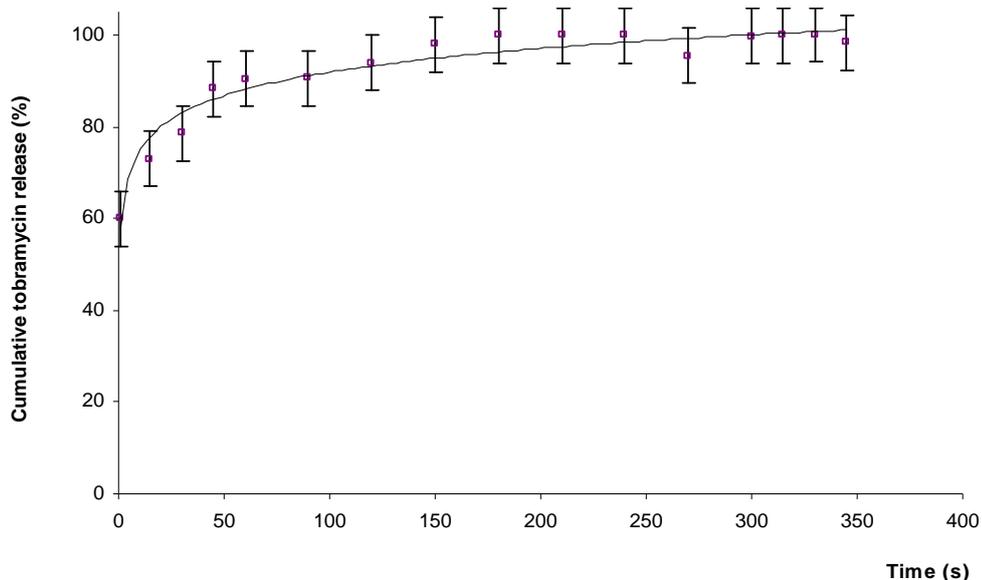


Figura 3 Figura 4- Rilascio di tobramicina da granulato di CHA caricato con 1.5% in peso di tobramicina..

Al fine di rallentare il rilascio di antibiotico, sono state pianificate preparazioni alternative, con l'obiettivo di ridurre l'elevata solubilità del granulato, conseguente alle peculiarità chimico-fisiche e morfologiche della CHA, anche se ciò va a discapito della biomimeticità del materiale.

### **6.2.2 Apatiti porose con gelatina**

Per quanto riguarda gli scaffold a base HA-gelatina, la degradazione della gelatina è stata valutata seguendo la perdita in peso del campione, nell'intervallo di tempo considerato. La perdita in peso è dovuta solamente alla degradazione della gelatina, in quanto la polvere di HA presenta una solubilità estremamente bassa e non contribuisce, quindi, alla diminuzione di peso del campione.

Nei campioni in cui la gelatina, pari al 5% in peso, non è stata reticolata il rilascio di gelatina si è completato in breve tempo: le quantità rilasciate sono state circa il 3.7 ed 7.5 % del valore iniziale, rispettivamente dopo 24 e 72 h, e la degradazione si è completata entro una settimana.

E' stata utilizzata la genipina che, per effetto delle reazioni di reticolazione, induce una colorazione blu alla gelatina, per valutare l'inizio del rilascio da campioni non reticolati, verificando che la soluzione di rilascio si colorasse di blu che il completo rilascio della gelatina dai campioni non reticolati verificando che non variasse il colore dello scaffold una volta terminato il rilascio.

### **6.2.3 Apatiti porose con tobramicina con o senza coating di gelatina**

#### **Cinetica di rilascio ionico**

Confrontando le quantità di ioni  $\text{Ca}^{2+}$  rilasciati dagli scaffold di HA e di SrHA, è possibile osservare che la quantità di Ca rilasciata per grammo di scaffold è molto più alta nel caso di SrHA, rispetto a quella di HA. Considerando il rilascio dello ione  $\text{Sr}^{2+}$ , a cui è riconosciuta una funzione antiosteoporotica, è possibile osservare che dopo circa 100 h lo scaffold a base di SrHA ha rilasciato 5  $\mu\text{mol}$  di Sr per grammo di campione. Da ciò è possibile dedurre che la sostituzione di ioni Sr nella struttura apatitica induce una più alta solubilità della fase stessa, come d'altra parte già messo in luce in precedenza con lo studio delle polveri di partenza ed in accordo con il maggior stato difettivo caratterizzante apatiti

sostituite. Inoltre, confrontando i dati relativi allo scaffold di SrHA con quelli precedentemente ottenuti<sup>1,2</sup> con granulati a base di SrHA, non trattati termicamente, a parità di tempo la quantità di ioni Sr rilasciata è circa la metà: 0.55% di Sr rispetto all'1.0% circa, rispetto alla quantità presente nel materiale di partenza (circa 8% in peso di Sr/SrHA).

Tabella 1 Rilascio ionico per gli scaffold a base di HA e di SrHA caricati con tobramicina

HA scaffold	Ca <sup>2+</sup> (μmol/g)	12.0
SrHA scaffold	Ca <sup>2+</sup> (μmol/g)	38.0
	Sr <sup>2+</sup> (μmol/g)	5.2

#### *Cinetica di rilascio di tobramicina*

La figura 4 riporta la cinetica di rilascio da scaffold aventi differente composizione (HA e SrHA) e porosità (45-60%). Confrontando gli scaffold a base di HA, ma a diversa porosità totale, si osserva che il rilascio nei campioni a porosità inferiore è più lento, probabilmente proprio a causa della minor superficie specifica.

Nel caso, invece, di scaffold con diversa composizione, ma aventi circa la stessa porosità totale, il rilascio risulta simile.

È importante notare che, entro 200 min, tutti gli scaffold hanno rilasciato circa l'80% del farmaco caricato (figura 5).

Le interazioni che si sono venute a formare tra lo scaffold ed il farmaco sono estremamente deboli, soprattutto poiché il caricamento di tobramicina è stato eseguito su di uno scaffold sinterizzato ad alta temperatura, la cui reattività superficiale è quindi ridotta rispetto ad un materiale non trattato termicamente.

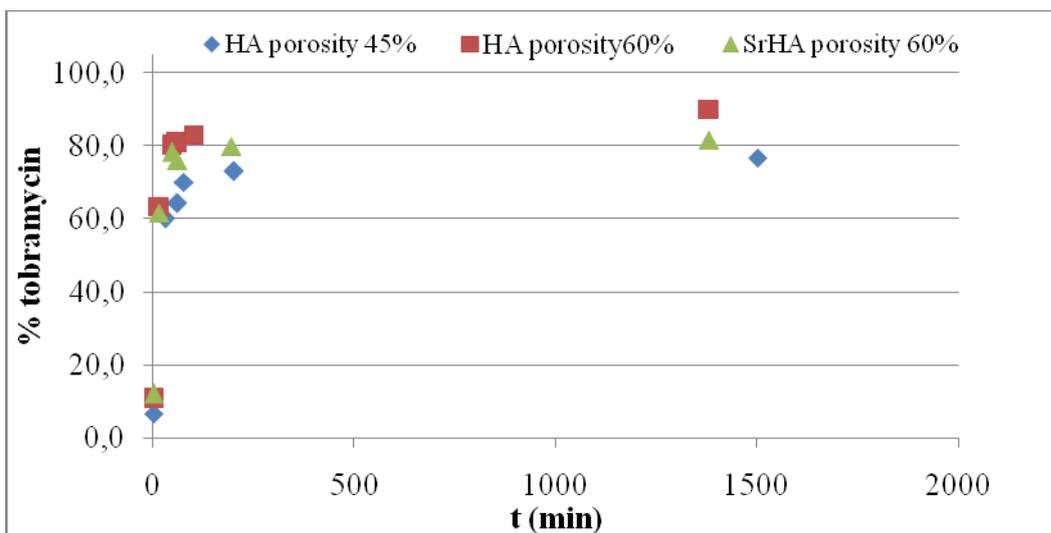


Figura 5- Rilascio di antibiotico da scaffold a base di HA e di SrHA a differente grado di porosità

D'altra parte, il trattamento termico è necessario per consolidare il materiale, conferendogli sufficienti proprietà meccaniche, per l'uso specifico di sostituto osseo.

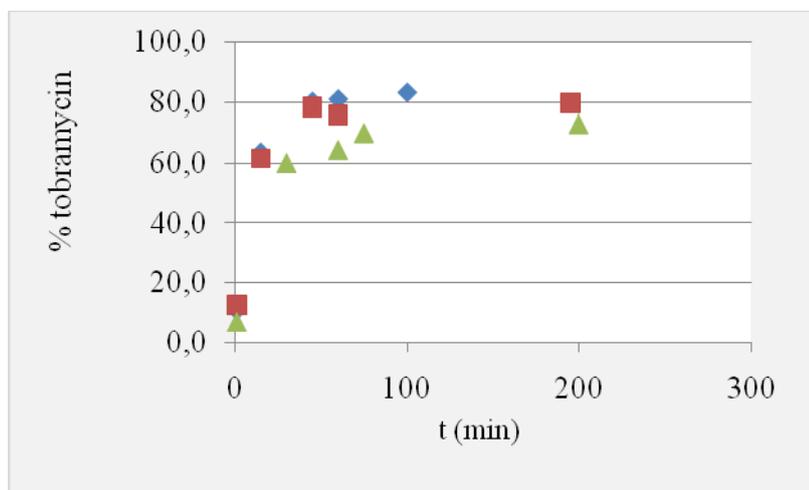


Figura 6- Particolare della figura 4.

### Effetto del trattamento con gelatina

Per modulare il rilascio di farmaco dai campioni porosi, sono stati realizzati campioni con un coating di gelatina reticolata.

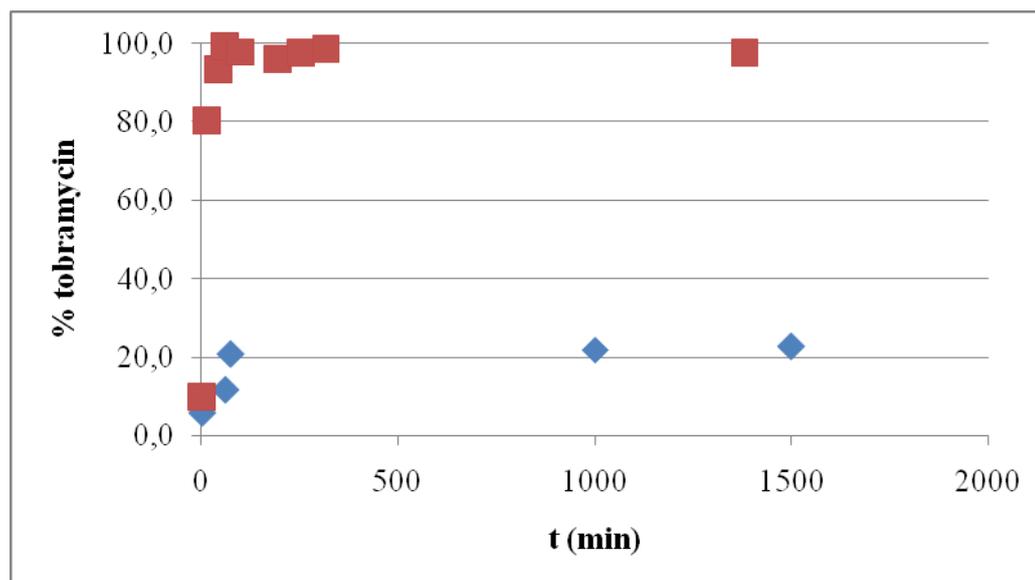


Figura 7. Confronto del rilascio di tobramicina di scaffold a base di HA con (■) o senza rivestimento (◆) a base di gelatina-genipina

Come si può vedere in figura 6, il coating di gelatina reticolata consente di rallentare notevolmente il rilascio di antibiotico, in quanto questo risulta controllato dalla cinetica di rilascio della gelatina che riveste il materiale.

### 6.3 Conclusioni

In questa sezione si dimostra che è possibile incorporare la tobramicina in uno scaffold o in un granulato di apatite, associando alla funzione intrinseca di sistema di rilascio di ioni, fisiologicamente utili per la rigenerazione ossea, quella del sistema di rilascio di farmaco per il trattamento di specifiche patologie. Per diverse ragioni, nei due dispositivi analizzati il rilascio si completa in tempi piuttosto brevi (eccessiva solubilizzazione della CHA da un lato, ridotta interazione con apatite sinterizzata dall'altro).

Il trattamento con gelatina più o meno reticolata si è rilevato utile nel modulare il rilascio del farmaco, precedentemente caricato sulla matrice ceramica.

### **Riferimenti bibliografici**

1. E. Landi, S. Sprio, M. Sandri, G. Celotti, A. Tampieri Development of Sr and  $\text{CO}_3^{2-}$  co-substituted hydroxyapatites for biomedical applications, *Acta Biomaterialia* 4 (2008) 656–663.
2. E. Landi, A. Tampieri, G. Celotti, S. Sprio, M. Sandri, G. Logroscino, Sr-substituted hydroxyapatites for osteoporotic bone replacement *Acta Biomaterialia* 3 (2007) 961–969.
3. E. Landi, A. Tampieri, G. Celotti, L. Vichi, M. Sandri, Influence of synthesis and sintering parameters on the characteristics of carbonate apatite, *Biomaterials* 25 (2004) 1763–1770.
4. E. Landi, G. Celotti, G. Logroscino, A. Tampieri, Carbonated hydroxyapatite as bone substitute, *Journal of the European Ceramic Society* 23 (2003) 2931–2937.
5. M. Stigtera, K. Groota, P. Layrolle, Incorporation of tobramycin into biomimetic hydroxyapatite coating on titanium, *Biomaterials* 23 (2002) 4143–4153.
6. F Valentini, P L Buldini, E Landi, A Tampieri, D Tonelli, HPLC determination of tobramycin in a simulated body fluid, *Microchemical Journal* 90 (2008) 113–117.

## 7. CONCLUSIONI

Questo lavoro di ricerca mira ad ideare ed ottimizzare nuovi materiali a base ceramico/polimerica, utili alla realizzazione di dispositivi innovativi per la sostituzione/rigenerazione ossea.

Negli ultimi anni, infatti, la richiesta di impianti per la sostituzione ossea è aumentata progressivamente, in particolare nei settori ortopedico, dentale, maxillofacciale e neurochirurgico. Questi settori hanno in comune la necessità di sostituire osso mancante e di stimolare la rigenerazione ossea. Nonostante i notevoli progressi,, alcuni problemi restano tuttora irrisolti, quali: il rischio d'infezioni, la biocompatibilità e ancor più la biofunzionalità.

La ricerca è volta alla realizzazione di materiali in grado di conferire al dispositivo, non solo un ruolo di ripristino funzionale, bensì un ruolo più importante, quello di stimolare i processi auto-riparativi intrinseci dei tessuti connettivi danneggiati, secondo il concetto di chirurgia rigenerativa.

Essendo il tessuto osseo il soggetto chiave di questa ricerca, il primo passo è stato quello di condurre un'analisi approfondita su: funzione, composizione, morfologia, organizzazione micro-strutturale, chimica e biologia di questo fondamentale e complesso tessuto connettivo.

A partire dalle conoscenze acquisite, sono stati studiati nuovi materiali compositi *biomimetici*, costituiti da una fase minerale calcio fosfatica ed una organica proteica di origine naturale, che mimino composizione e morfologia del tessuto naturale da ricostruire. Materiali adatti alla realizzazione di bio-protesi innovative ed originali che si dimostrino ben tollerate ed efficaci, che vengano completamente integrate nell'organismo e che siano impiantabili per mezzo di interventi sempre meno demolitori.

Gli impianti ceramici, realizzati mediante le tecniche del freeze casting e del foaming, hanno presentato una dimensione dei pori ed un'interconnessione adeguata sia per l'abitazione cellulare che per la penetrazione dei fluidi fisiologici e la vascolarizzazione.

In particolare, l'elevata unidirezionalità nei campioni ottenuti mediante freeze casting si presenta molto promettente poiché fornisce cammini guida che

migliorano la vascolarizzazione dell'impianto e l'abitazione cellulare in tempi rapidi anche nella parte più interna dello scaffold. Dall'altra parte, la tecnologia del foaming ha permesso l'ottenimento di materiali apatitici ad alta porosità multidimensionale ed interconnessa, con proprietà meccaniche implementate, rispetto a tipologie precedenti, e lavorabili, dopo sinterizzazione, mediante prototipazione rapida.

Per questo motivo, questi materiali sono attualmente in corso di sperimentazione, con risultati preliminari promettenti per un'applicazione clinica, come sostituti ossei di condilo mandibolare, sito estremamente critico per gli sforzi meccanici presenti. È stata dimostrata la possibilità di utilizzare lo scaffold ceramico biomimetico con la duplice funzione di sostituto osseo bioattivo e sistema di rilascio in situ di ioni specifici e di antibiotico, in cui la cinetica di rilascio risulta fortemente dipendente dalle caratteristiche chimico-fisico e morfologiche del dispositivo (solubilità, ssa,...)

La sperimentazione con la gelatina ha messo in luce proprietà positivamente sfruttabili della stessa. Oltre a conferire allo scaffold un'implementata mimesi composizionale del tessuto osseo, essa ha consentito di aumentare le proprietà meccaniche, sia come resistenza a compressione che deformazione.

Inoltre la gelatina ha consentito di modulare la funzionalità di dispensatore di farmaco, mediante controllo della cinetica di rilascio, tramite processi di reticolazione più o meno spinti.