

POLITECNICO DI TORINO

Collegio di ingegneria Chimica e dei Materiali

Corso di laurea magistrale in Ingegneria dei Materiali

Tesi di laurea magistrale

**Valutazione delle proprietà chimico-fisiche e reologiche di biomateriali
compositi a base di collagene per la biofabbricazione di scaffold ossei**



Relatrice

Prof.ssa Chiara Vitale Brovarone

Candidato

Enrica Vitale

Sommario

INTRODUZIONE.....	5
1.Ingegneria tissutale ossea	7
1.1 Introduzione	7
1.2 Natura del tessuto osseo.....	7
1.3 Osteoporosi e approccio clinico	10
1.4 L' Ingegneria tissutale nel trattamento delle patologie ossee	12
2.Scaffold ossei	14
2.1 Introduzione	14
2.2 Lo scaffold ideale	14
2.3 I materiali utilizzati per la realizzazione di scaffold	16
2.3.1 Il Collagene	17
2.3.2 I vetri bioattivi.....	19
2.3.3 I vetri bioattivi mesoporosi.....	22
2.3.4 I materiali compositi di collagene e particelle di vetro bioattivo mesoporoso	25
2.4 Reticolazione	26
2.5 Tecniche di produzione degli scaffold	28
2.5.1 La stampa 3D	29
2.6 L'importanza dello stronzio nella rigenerazione ossea	30
3.MATERIALI E METODI	32
3.1 Introduzione	32
3.2 Materiali	33
3.2.1 Collagene di tipo I	33
3.2.2 Sintesi di vetri bioattivi mesoporosi contenenti ioni stronzio.....	33
3.2.3 Sospensioni di collagene/ fase inorganica.....	34
3.2.4 Preparazione di campioni massivi per la caratterizzazione.....	36
3.2.5 Reticolazione chimica del materiale	36
3.2.6 Preparazione del bagno di supporto per la stampa (FRESH).....	37
3.3 Caratterizzazione	38
3.3.1 Microscopia elettronica a scansione ad emissione di campo (FESEM) e microscopio a scansione elettronica (SEM).....	38
3.3.2 Spettroscopica infrarossa (ATR-FTIR)	40
3.3.3 Analisi reologiche.....	41
3.3.4 Prove preliminari di stampa 3D	47

4. Risultati e discussione	50
4.1 Introduzione	50
4.2 Valutazione morfologica.....	50
4.2.1 Sistemi 1.5% collagene/MBG_SD_Sr4%	51
4.2.2 Sistemi 1.5% collagene/MBG_SG_Sr4%	55
4.3 Valutazione spettroscopica tramite ATR-FTIR	59
4.4 Valutazione reologica	61
4.4.1 Proprietà reologiche delle sospensioni di collagene/MBG	61
4.4.2 Proprietà visco-elastiche del materiale reticolato	78
4.5 Prove preliminari di estrusione	88
5. CONCLUSIONI E SVILUPPI FUTURI	92
5.1 Introduzione	92
5.2 Conclusioni	93
5.3 Sviluppi futuri	95
6. BIBLIOGRAFIA	99

INTRODUZIONE

L'osteoporosi è una malattia degenerativa che riduce la densità ossea e danneggia l'osso a livello microstrutturale causando un fragilimento dello scheletro e un incremento del rischio di fratture. Essa è causata da uno squilibrio nel processo di rimodellamento osseo che si verifica quando gli osteoclasti riassorbono più tessuto osseo di quello creato dagli osteoblasti. [1]–[3]

Poiché si tratta di una malattia cronica l'attività di prevenzione e le cure farmacologiche possono solo ritardarne l'insorgere e rallentarne la progressione ma mai portare alla guarigione del paziente. Talvolta per il trattamento di una frattura osteoporotica si rende anche necessario procedere ad un innesto osseo. In caso di autoinnesto si ha il vantaggio di non avere risposte immunitarie ma si ha come controindicazione la necessità di un duplice intervento chirurgico e l'indebolimento del sito donatore.[4]–[7]

In questo scenario, l'ingegneria tissutale dell'osso si è introdotta come innovativa e valida alternativa alle citate tecniche di trattamento, con l'obiettivo di rigenerare e ripristinare funzioni dei tessuti affetti da patologie o danneggiati cercando di replicarli. Nello specifico si tratta di realizzare strutture ingegnerizzate, definite scaffold, che rispondano ai requisiti di biocompatibilità, bioattività e biodegradabilità. La sfida è dunque quella di individuare appropriate tecniche di fabbricazione e specifici materiali che siano in grado di replicare dal punto di vista strutturale, morfologico e composizionale il tessuto osseo. [5], [6], [8], [9]

Il seguente lavoro di tesi è stato svolto nel contesto del progetto europeo ERC BOOST (*Biomimetic trick to re-balance osteoblast-osteoclast loop in osteoporosis treatment: a topological and materials driven approach*, Principal Investigator Prof.^{ssa} Chiara Vitale Brovarone) il quale ha come obiettivo il trattamento dell'osteoporosi attraverso la realizzazione con la tecnica del 3D printing di scaffold intelligenti che replichino il tessuto osseo sano per ripristinare il corretto processo di rimodellamento.

Più nello specifico il materiale messo a punto nell'ambito del progetto BOOST è un sistema ibrido di collagene di tipo I e di particelle di vetro bioattivo mesoporoso contenenti il 4% molare di ossido di stronzio. La scelta è ricaduta su tali materiali in quanto il collagene di tipo I è la proteina che costituisce la maggior parte dei tessuti connettivi e le particelle di vetro mesoporoso sono in grado di stimolare, a contatto con fluidi fisiologici, la deposizione sulla loro superficie di nanocristalli di idrossiapatite, il costituente minerale dell'osso. [10], [11]

Le particelle di vetro bioattivo mesoporoso sono state realizzate attraverso atomizzazione di una soluzione e tecnica sol-gel tradizionale le quali hanno permesso di ottenere particelle sferiche di dimensione rispettivamente micrometrica e nanometrica con dimensione dei pori compresa tra i 7 e i 4

nm. Le particelle contengono il 4% molare di ossido di stronzio, tale ione, infatti, favorisce l'osteogenesi e riduce il riassorbimento osseo e dunque possiede proprietà terapeutiche tali da proporlo come ottimo candidato per il trattamento dell'osteoporosi.[3], [12], [13]

La tecnica che è stata selezionata dal progetto BOOST per la realizzazione di strutture tridimensionali che replicano la struttura trabecolare ossea è la stampa 3D. Quest'ultima è l'unica in grado di creare strutture tridimensionali garantendo un ottimo controllo sulla geometria, sulla dimensione e sull'interconnessione della porosità.[6], [12], [14]–[16]

Durante questo lavoro di tesi sono state realizzate sospensioni di collagene e particelle di vetro bioattivo mesoporoso a diverse concentrazioni di collagene. Le sospensioni sono state poi caratterizzate reologicamente per verificarne la stampabilità e sono state utilizzate per la realizzazione di campioni massivi. Successivamente i campioni massivi sono stati analizzati con la microscopia elettronica e con la spettroscopia a infrarossi per esaminare l'interazione tra le particelle di vetro bioattivo e il collagene, l'omogeneità del sistema e la ricostituzione delle fibre di collagene a seguito della gelificazione indotta da temperatura e pH fisiologici ($T=37^{\circ}\text{C}$, $\text{pH}=7.4$).

Al fine di incrementare la stabilità dei campioni massivi di collagene gelificati a 37°C è stato poi verificato l'effetto di due reticolanti naturali tramite analisi reologiche e morfologiche. I due reticolanti selezionati sono stati la genipina e il 4starPEG, che sono noti in letteratura per il loro effetto rinforzante all'interno di matrici di collagene.

L'ultima parte della tesi è stata infine dedicata alla realizzazione tramite la stampa 3D di reticoli di dimensione $10 \times 10 \times 1$ mm (profondità x larghezza x spessore) impiegando come "inchiostro" le sospensioni di collagene e particelle di vetro bioattivo che hanno presentato un miglior comportamento reologico. Le prove di stampa sono state eseguite all'interno di un supporto di stampa realizzato durante le attività di laboratorio.

1. Ingegneria tissutale ossea

1.1 Introduzione

L'ingegneria tissutale ossea ha come obiettivo la sostituzione di tessuto osseo e/o la rigenerazione delle sue normali funzionalità attraverso la fabbricazione di scaffold biomimetici in grado di ricreare al meglio il microambiente fisiologico di un osso sano. Nel seguente paragrafo verrà effettuata una breve descrizione della natura del tessuto osseo e della sua attività cellulare in modo da comprendere le caratteristiche chimico-fisiche e morfologiche che deve presentare uno scaffold.

Il paragrafo è inoltre finalizzato a descrivere quali siano gli effetti dell'osteoporosi sul tessuto osseo e le cause che la determinano. Verrà mostrato come l'osteoporosi costituisca una malattia invalidante, dagli elevati costi sociali ed economici per la quale esistono trattamenti farmacologici che riescono solo a rallentare gli effetti della patologia.

Verrà infine presentato lo stato dell'arte dell'ingegneria tissutale nella cura di patologie ossee.

1.2 Natura del tessuto osseo

Il tessuto osseo è un tessuto connettivo mineralizzato che mostra elevata resistenza meccanica grazie alla sua struttura. È un sistema composito costituito da una matrice extracellulare mineralizzata composta al 20-30wt.% da un misto di acqua e proteine della famiglia del collagene (parte organica) e al 70wt.% da microcristalli di fosfato di calcio, in particolare idrossiapatite (parte inorganica), il restante 2wt.% è costituito dalla componente cellulare ossea. [14], [17], [18]

La struttura ossea, come è possibile vedere in [figura 1.1](#), è gerarchica e complessa ed effettuare una prima differenziazione in base alla scala di grandezza è importante per comprenderne l'architettura.

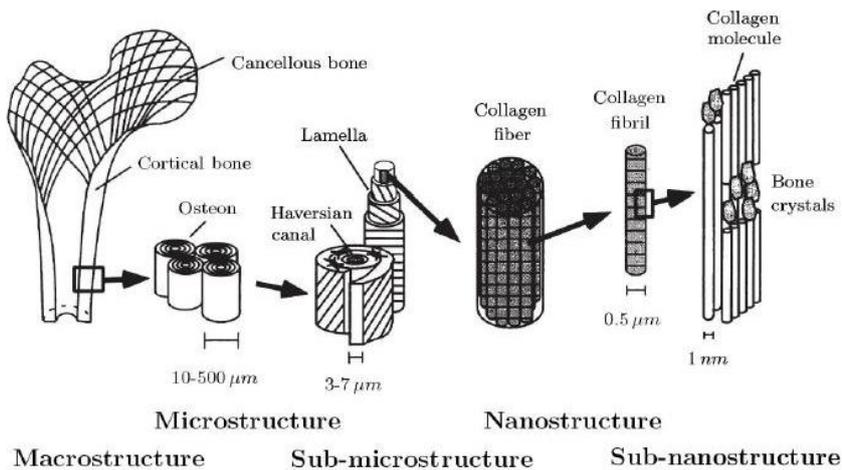


Figura 1.1 Struttura gerarchica dell'osso [19]

I livelli gerarchici di organizzazione strutturale sono i seguenti:

- La macrostruttura è caratterizzata dalla presenza di due tipi di osso, spongioso e corticale, i quali differiscono per struttura e porosità. In particolare l'osso corticale è caratterizzato da una struttura compatta e da una porosità del 5-10%, l'osso spongioso è invece caratterizzato da una struttura trabecolare con porosità del 45-95%;[8], [14]
- La microstruttura è composta dagli osteoni aventi forma cilindrica di grandezza variabile tra 10 e 500 μm;
- La sub-microstruttura è definita da una scala di grandezza compresa tra 1 e 10 μm ed è composta dalle lamelle e dai canali Haversiani all'interno dei quali passano i vasi sanguigni;[20]
- La nanostruttura (0.1-1 μm) è costituita da fibre di collagene;
- La sub-nanostruttura (10^{-3} μm) è definita principalmente da fibrille di collagene. [19]

A livello macroscopico il tessuto osseo è, dunque, principalmente composto da due tipi di tessuti, l'osso corticale e l'osso spongioso, i quali presentano a causa della differente porosità differenti proprietà meccaniche. L'osso spongioso è la parte più interna dell'osso, la meno densa e la più vascolarizzata; esso è caratterizzato da una resistenza a compressione di 7-10MPa, da un basso modulo elastico e da una resistenza a trazione $\sigma_y < 2$ MPa. L'osso corticale, invece, è situato nella parte più esterna dell'osso e grazie alla sua più alta mineralizzazione è caratterizzato da una resistenza a compressione di 130-225 MPa, da un modulo elastico di 3-30GPa e da una resistenza a trazione di 60-160MPa. Date le sue migliori prestazioni meccaniche l'osso corticale svolge la funzione di struttura portante nel corpo.[8], [14]

A livello macroscopico l'osso appare come un sistema statico ma in realtà a livello microscopico risulta un sistema dinamico grazie alla componente cellulare (figura 1.2), costituita da cellule osteoprogenitrici,

osteoblasti, osteoclasti e osteociti. Tali cellule sono responsabili del rimodellamento osseo che comporta il riassorbimento del vecchio tessuto osseo e la sua sostituzione con un nuovo tessuto. [21]

In ogni individuo, di qualsiasi età, avviene tale processo di riassorbimento di vecchio tessuto e rigenerazione di nuovo ma con la differenza che negli individui più giovani (fino ai 20 anni) è predominante la rigenerazione ossea, negli individui adulti (dai 20 ai 50 anni) c'è un bilanciamento dei due processi e negli individui anziani (dai 50 anni in su) è invece predominante il riassorbimento osseo. Se il riassorbimento osseo porta a una densità di massa ossea inferiore al valore limite si parla di osteoporosi. [1]

Il corretto processo di rimodellamento osseo consiste nell'azione simultanea e bilanciata di osteoblasti e di osteoclasti che rimuovono l'osso non più in grado di sopportare le sollecitazioni meccaniche a cui è sottoposto e lo sostituiscono con nuovo tessuto osseo. In particolare, gli osteoblasti secernono matrice extracellulare costituita da collagene di tipo I e altre proteine come osteocalcina, sialoproteina ossea e osteopontina. La matrice extracellulare prodotta è inizialmente amorfa ma diventa gradualmente cristallina grazie alla mineralizzazione. Durante la mineralizzazione il collagene, che funge da struttura portante, è ricoperto da cristalli di fosfato di calcio. [22]

Il riassorbimento osseo è invece effettuato dagli osteoclasti che digeriscono matrice ossea non sana secernendo acidi.[21]

Gli osteoblasti circondati da matrice ossea sono chiamati osteociti. Quest'ultimi coordinano il processo di rimodellamento monitorando le zone dell'osso più sensibili a tensioni. Svolgono tale compito grazie ai loro prolungamenti che si diramano in ogni direzione attraverso i canalicoli e che, come sensori, sono in grado di percepire le tensioni a cui è sottoposto l'osso.[1]

L'osso spongioso grazie alla sua elevata porosità favorisce l'attività cellulare ed è il più soggetto al processo di rimodellamento osseo. [14]

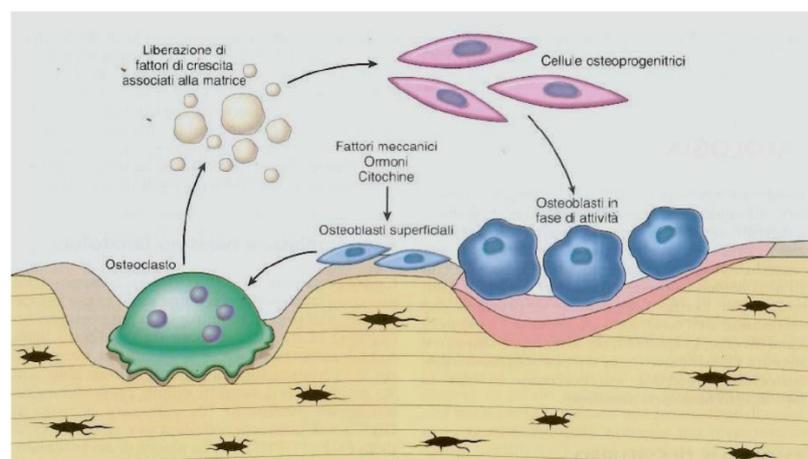


Figura 1.2 Cellule del tessuto osseo [21]

1.3 Osteoporosi e approccio clinico

L'osteoporosi, letteralmente "osso poroso", è una patologia che comporta la riduzione della massa ossea e l'infragilimento dell'osso in individui oltre i 50 anni di età. Essa si verifica a causa di uno sbilanciamento tra il riassorbimento osseo e la nuova formazione di osso nel processo di rimodellamento. In un osso osteoporotico gli osteoclasti riassorbono più tessuto osseo di quello creato dagli osteoblasti. [1]

È stato stimato che l'osteoporosi colpisce mediamente 1 uomo su 5 oltre i 50 anni e 1 donna su 3 dopo la menopausa provocando un aumento del rischio di frattura. I siti più soggetti a una frattura fragile osteoporotica sono l'anca, il polso e la spina dorsale. Tali fratture comportano dolore, sofferenza, diminuzione della qualità e della speranza di vita nei soggetti interessati.[23]

In Europa, USA e Giappone circa 75 milioni di persone soffrono di osteoporosi. La IOF (International Osteoporosis Foundation) riporta che attualmente l'osteoporosi causa nel mondo circa 8.9 milioni di fratture l'anno. Proiezioni attendibili ritengono che nel 2050 le fratture di anca dovute ad osteoporosi incrementeranno del 310% negli uomini e del 240% nelle donne facendo riferimento ai dati del 1990. [24] L'osteoporosi rappresenta quindi un notevole costo economico per la società che è aumentato nell'ultimo decennio con l'invecchiamento della popolazione. Si calcola che attualmente il costo della sola assistenza sanitaria è di 37 miliardi di euro l'anno nella EU e di 19 miliardi di dollari in USA.[24]

Nei grafici in [figura 1.3](#), riportati dal sito dell'istituto nazionale di statistica (ISTAT), è possibile constatare le statistiche di invecchiamento della popolazione italiana. [25]

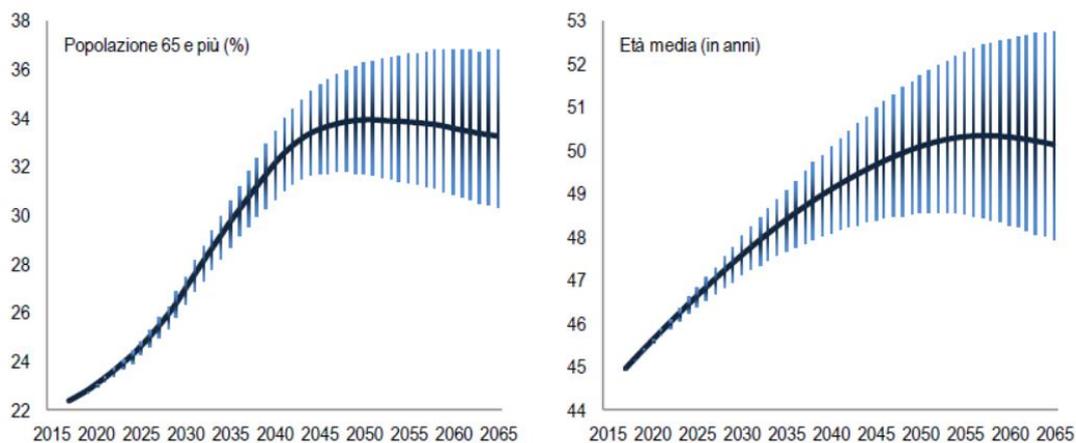


Figura 1.3 Statistiche invecchiamento della popolazione ISTAT [25]

La riabilitazione a seguito di una frattura osteoporotica è lenta e spesso non completa comportando un medio/alto grado di disabilità e dunque un notevole peggioramento della qualità di vita.[2]

La IOF (International Osteoporosis Foundation) stima che dopo una frattura osteoporotica all'anca il 40% degli interessati non cammini più indipendentemente e che l'80% non riesca più a compiere le normali attività quotidiane.

Attualmente sono presenti in commercio farmaci in grado di rallentare la progressione dell'osteoporosi e nel diminuire il rischio di frattura.[4]

Nel sito della LIOS (Lega Italiana Osteoporosi) sono riportate le classi di alcuni farmaci utilizzate a livello clinico per il trattamento dell'osteoporosi, tra essi ricordiamo i bifosfonati, il ranelato di stronzio, il denosumab, l'ormone paratiroideo e gli estrogeni. La nota 79 AIFA (Agenzia Italiana del Farmaco) limita la prescrizione di molti dei farmaci appena citati per gli importanti effetti collaterali che sono collegati alla loro assunzione. In particolare lo stronzio ranelato può essere prescritto solo se non esistono alternative terapeutiche e solo per pazienti affetti da osteoporosi severa. Il denosumab può essere prescritto solo a seguito di specifico piano terapeutico, rinnovabile, della durata di 12 mesi. L'ormone paratiroideo può essere prescritto sino a un massimo di 24 mesi.[4] [26]

Inibire l'azione degli osteoclasti per trattare l'osteoporosi non è considerata la via migliore da perseguire in quanto recenti studi hanno mostrato come gli osteoclasti siano responsabili, oltre al riassorbimento osseo, di almeno tre ulteriori funzioni: la regolazione in emopoiesi grazie al controllo della concentrazione di calcio (Ca) locale, la regolazione dell'attività degli osteoblasti e la regolazione dell'angiogenesi grazie al rilascio di fattori immagazzinati nella matrice ossea e alla secrezione di clastochine, cioè prodotti cellulari che regolano l'attività delle cellule circostanti. [27]

Una terapia definitiva per il trattamento dell'osteoporosi non è ancora stata trovata in quanto nessun farmaco si è rivelato efficace nella così detta inversione del ciclo di rimodellamento. Il farmaco ideale dovrebbe promuovere la rigenerazione ossea sollecitando l'azione degli osteoblasti e contemporaneamente bilanciare il connubio osteoblasti-osteoclasti.

I traumi e le fratture ossee sono di norma trattate con la chirurgia invasiva mediante l'applicazione di viti e placche metalliche. Pur con i progressi che hanno registrato le tecniche di impianto questi tipi di intervento sono fortemente invasivi e possono dare luogo a complicanze come infezioni, dolori cronici ecc. Le placche e le viti di fissaggio devono poi essere rimosse, il che richiede un nuovo intervento chirurgico con dilatazione dei tempi di guarigione e lievitazione dei costi sanitari. Nei pazienti più anziani l'immobilizzazione prolungata causa ancor più perdita di ossa e di muscoli con l'ulteriore rischio di complicanze derivanti da lesioni da pressione. [2], [5]

In alcuni casi le fratture osteoporotiche sono trattate tramite l'innesto osseo che può essere allogenico (se l'osso proviene da un donatore, di norma un cadavere), di origine xenogena (se l'osso è di origine animale) e autologa, se l'osso è prelevato da un altro sito del paziente (di norma la cresta iliaca). In caso

di autoinnesto si ha il vantaggio di non avere risposte immunitarie, che viceversa possono verificarsi in caso di innesto allogenico o di origine xenogena, ma si ha come controindicazione la necessità di un duplice intervento chirurgico e l'indebolimento del sito donatore[5], [7]

Risulta pertanto auspicabile sviluppare nuove soluzioni che possano eliminare o ridurre i problemi legati alle tradizionali tecniche di innesto. La ricerca di tali soluzioni costituisce il campo di azione dell'ingegneria tissutale.

1.4 L' Ingegneria tissutale nel trattamento delle patologie ossee

Il termine *tissue engineering* (ingegneria tissutale) fu per la prima volta definito dai partecipanti del primo convegno NSF (National Science Foundation), tenutosi nel 1988, come "applicazione dei principi e dei metodi dell'ingegneria e delle scienze della vita verso la comprensione fondamentale della relazione tra struttura e funzione in tessuti normali o patologici di mammiferi e lo sviluppo di sostituti biologici per la loro riparazione o rigenerazione delle funzioni di tessuti o di organi".

Successivamente, nel 1993, Langer e Vacanti formularono una nuova definizione di *tissue engineering* basata sui primi sviluppi verificatisi nel campo. Definirono il *tissue engineering* come "un campo interdisciplinare che applica i principi dell'ingegneria e della scienza della vita al fine di sviluppare sostituti biologici che ripristinino, mantengano o migliorino le funzioni dei tessuti o degli organi".[28]

Oggi l'ingegneria tissutale, data la sua giovane età, è in pieno sviluppo e comprende numerose aree di utilizzazione emergendo come una valida alternativa al trapianto di tessuti e di organi. Uno dei campi di azione di tale nuova frontiera della medicina rigenerativa è il tessuto osseo e si parla in questo caso di ingegneria tissutale ossea (bone tissue engineering BTE).

Nell'ambito dell'ingegneria tissutale ossea si cerca di realizzare *scaffold* ossei, ovvero impalcature tridimensionali che sostengono l'architettura cellulare, idealmente biocompatibili, biodegradabili, biomimetiche e bioattive.[29]

L'ingegneria tissutale ossea è applicabile per il trattamento di patologie ossee come l'osteoporosi. In particolare è possibile incrementare l'osteoiduzione (cioè la capacità di stimolare con segnali biologici specifici le cellule alla produzione di nuovo tessuto osseo[30][21]) attraverso la *growth factor-based therapies* cioè l'inserimento all'interno dello scaffold di fattori di crescita (GF). [31]

I GF sono proteine che riescono a legarsi a recettori specifici in grado di influenzare la proliferazione, la differenziazione e la crescita cellulare. Tali fattori di crescita possono essere prelevati dal plasma sanguigno all'interno del quale ne sono contenuti numerosi.

I fattori di crescita più importanti presenti nel tessuto osseo sono l'osteoprotegerina (OPG) che inibisce l'azione di osteoclasti e la differenziazione dei suoi precursori, l'attivatore del recettore del fattore nucleare kappa-B ligando (RANKL) che promuove la proliferazione degli osteoclasti, il fattore di crescita derivato dalle piastrine (PDGF) coinvolto nell'angiogenesi e nella proliferazione cellulare, il fattore di crescita trasformante (TGF) che induce la formazione della matrice extracellulare, e regola il metabolismo delle cellule ossee, il fattore di crescita dell'endotelio vascolare (VEGF) che favorisce l'angiogenesi, il fattore di crescita dell'epidermide (EGF) che promuove la differenziazione cellulare e stimola l'angiogenesi e il fattore di crescita dei fibroblasti (FGF) che stimola la proliferazione dei fibroblasti e induce l'angiogenesi[32].

2. Scaffold ossei

2.1 Introduzione

Gli scaffold ossei costituiscono l'ultima frontiera della medicina rigenerativa per la cura e/o sostituzione di tessuto osseo danneggiato o affetto da patologie. Gli scaffold, attraverso un'opportuna ingegnerizzazione di materiali e tecniche di produzione, devono replicare dal punto di vista fisiologico e morfologico la struttura dell'osso sano.

Nel seguente capitolo verranno definite le principali proprietà che deve possedere uno scaffold osseo, verranno individuati i materiali e le tecniche con le quali può essere realizzato.

Particolare attenzione verrà data al collagene di tipo I e ai vetri bioattivi mesoporosi che rappresentano i materiali di composizione dei sistemi ibridi realizzati e caratterizzati nell'ambito dello studio qui riportato.

2.2 Lo scaffold ideale

Lo scaffold è una struttura temporanea progettata per imitare la matrice extracellulare del tessuto osseo e il cui primo obiettivo è quello di riprodurre le condizioni idonee per far avvenire il processo di rimodellamento osseo.

Affinché l'impianto di uno scaffold osseo abbia successo è necessario ottimizzare le numerose caratteristiche che contraddistinguono uno scaffold in relazione al sito di impiego. Pertanto il livello di rugosità superficiale, l'architettura interna, le dimensioni dei pori, le interconnessioni, la composizione chimica del materiale, la resistenza meccanica e la morfologia dovranno essere in concreto adattate e bilanciate in relazione alle esigenze specifiche dell'impianto. Infatti, le proprietà meccaniche e la struttura del tessuto osseo variano in relazione all'individuo e tra differenti regioni dello stesso osso. Per esempio, l'osso trabecolare presenta proprietà meccaniche nettamente inferiori all'osso corticale a causa della sua maggiore porosità (vedi paragrafo 1.2).[14]

Lo scaffold ideale è pertanto lo scaffold che più si avvicina per caratteristiche alla porzione di osso che deve sostituire. Pur con questa premessa possiamo ovviamente individuare, in linea generale, delle qualità di base che tutti gli scaffold condividono in quanto sostituti ossei.

In particolare, lo scaffold deve essere caratterizzato da proprietà meccaniche, fisiche e morfologiche simili a quelle del sito di impianto, deve essere osteoconduttivo, cioè deve promuovere l'adesione e l'infiltrazione delle cellule ossee, osteoinduttivo, ovvero essere in grado di stimolare la differenziazione cellulare in osteoblasti, biocompatibile al fine di evitare risposte infiammatorie e il suo riassorbimento deve avvenire con l'identica velocità con cui si rigenera il nuovo tessuto osseo.[21], [30], [33], [34]

Lo scaffold ideale deve avere una porosità interconnessa con dimensioni ottimali per ospitare le cellule ossee appena formate. Le interconnessioni dei pori sono dei canali che uniscono tra loro pori adiacenti e la loro presenza è particolarmente importante per favorire una buona vascolarizzazione e il conseguente trasporto di ossigeno e nutrienti. Inoltre, quando lo scaffold degrada alla fine della sua vita, l'efficienza del processo di rimozione dipende dalla dimensione di questi canali di interconnessione. In generale per avere buone proprietà di flusso all'interno dei pori solitamente è consigliata una dimensione dei canali di 100 μm . [14]

Il livello di porosità in uno scaffold influisce direttamente sull'attaccamento cellulare, sulla biodegradazione e sulla velocità di rilascio di farmaci dato che determina la quantità di area superficiale disponibile per le interazioni tra cellule e scaffold. Alti livelli di porosità sono caratterizzati da un maggiore rapporto area superficiale su volume. In generale, maggiore è tale rapporto, migliori sono l'attaccamento cellulare e le caratteristiche di crescita ossea. C'è però una relazione inversa tra livello di porosità e proprietà meccaniche dello scaffold. Una porosità eccessiva influisce negativamente sulle prestazioni meccaniche dello scaffold rendendolo poco idoneo nel sopportare carichi esterni. In sede di progettazione dovrà pertanto trovarsi un punto di equilibrio tra queste due qualità in relazione al sito di impianto. La dimensione dei pori raccomandata è, dunque, strettamente dipendente dal sito di impianto. [5], [14], [33]

Il materiale scelto per la realizzazione dello scaffold deve presentare come caratteristiche imprescindibili un'elevata biocompatibilità, biodegradabilità e permeabilità. L'elevata biocompatibilità minimizza il rischio di tossicità locale con conseguenti reazioni infiammatorie/ immunitarie, la biodegradabilità riduce qualsiasi residuo di matrice sintetica nel sito di rigenerazione, la permeabilità consente il passaggio dei fluidi.[33]

Di rilevante importanza è anche la rugosità superficiale dello scaffold che aumenta la superficie di contatto e favorisce l'inizio dell'attaccamento cellulare.

Riassumendo, nella progettazione degli scaffold dovranno essere opportunamente valutati e bilanciati, in relazione alle qualità finali che ci aspettiamo di ottenere, i seguenti aspetti[14]:

- Proprietà meccaniche, fisiche e morfologiche simili a quelle del sito di impianto;
- Osteoconduttività;
- Osteoinduttività;

- Biocompatibilità;
- Biodegradabilità;
- Porosità e interconnessioni;
- Appropriata rugosità superficiale;
- Permeabilità della superficie.

Occorre tenere presente che l'ottenimento delle caratteristiche qualitative sopra riportate dipendono non solo dal materiale utilizzato ma anche dalla tecnica impiegata per la realizzazione dello scaffold. [1]

2.3 I materiali utilizzati per la realizzazione di scaffold

I materiali utilizzati per la realizzazione degli scaffold possono essere ceramici, polimerici o compositi.[6], [14]

La famiglia dei materiali bioceramici comprende sia ceramici cristallini che vetrosi. I bioceramici sono molto interessanti per il BTE grazie alla loro spiccata bioattività, ovvero sono in grado di indurre una risposta specifica nell'organismo creando un legame chimico con i tessuti ossei.[21] Offrono una buona resistenza alla corrosione, da un punto di vista meccanico presentano un'elevata durezza e un'ottima resistenza a compressione ma sono fragili se sottoposti a sforzi di trazione e di taglio. I bioceramici cristallini maggiormente utilizzati sono i fosfati di calcio tra cui l'idrossiapatite e il tricalcio fosfato, entrambi biocompatibili e osteoconduttivi. [8] Nonostante le loro qualità, i bioceramici hanno una velocità di degradazione non controllabile e ridotta processabilità che ne riduce l'utilizzo per la realizzazione di scaffold.[9]

I vetri bioattivi sono materiali bioceramici amorfi con elevata bioattività che permette, una volta impiantati, la formazione di uno strato biologicamente attivo di idrossiapatite sulla loro superficie. Lo strato di idrossiapatite crea un legame così forte con l'osso del sito d'impianto che per rimuovere il vetro bioattivo è necessario rompere il tessuto osseo circostante.[3] I biovetri come tutti i bioceramici sono caratterizzati da un'elevata fragilità e da ridotta biodegradabilità e ciò ne limita l'utilizzo nel campo clinico. [6], [9]

I polimeri sono un'altra classe di materiali che hanno avuto grande successo nel mondo del BTE grazie alla loro processabilità, biocompatibilità e biodegradabilità. I polimeri si suddividono in polimeri sintetici e naturali. I polimeri sintetici offrono il vantaggio di poter ottenere proprietà meccaniche, velocità di degradazione e porosità desiderata, variandone la composizione, la tecnica di sinterizzazione e geometria esterna. Ma d'altro canto i polimeri sintetici sono spesso idrofobici e non possiedono siti idonei per il riconoscimento cellulare.

I polimeri naturali, invece, trovano ampio utilizzo nel campo dell'ingegneria tissutale grazie alla loro biocompatibilità favorita dalla presenza al loro interno di molecole biofunzionali che favoriscono l'attaccamento e la proliferazione cellulare. Tra i polimeri naturali maggiormente utilizzati spiccano il collagene, la seta, l'alginate, il chitosano e l'acido ialuronico. [6], [9], [14]

I polimeri rispetto ai materiali ceramici hanno scarse proprietà meccaniche. Per supplire a tale carenza si ricorre ai materiali compositi ovvero materiali realizzati inglobando all'interno della matrice polimerica particelle di bioceramici, in questo modo si compensano vantaggi e difetti di entrambe le famiglie di materiali. [6] In generale l'aggiunta di bioceramici nelle matrici polimeriche ha portato a una migliore bioattività, un maggiore controllo sulle cinetiche di degradazione, migliori proprietà meccaniche e stabilità strutturale. [35] In letteratura esistono numerosi esempi di materiali biocompositi utilizzabili per la realizzazione di scaffold. Tang et al. [36], ad esempio, inglobando particelle di idrossiapatite all'interno del chitosano hanno migliorato le proprietà meccaniche e osteoconduttive del materiale. Tamburaci et al. [37], invece, hanno inserito nella matrice di chitosano particelle di diatomite (un minerale naturale a base di SiO_2) ottenendo da parte del composito buone proprietà meccaniche e proliferazione cellulare in vitro. Un composito che ha suscitato particolare interesse nel contesto del progetto ERC BOOST è realizzato inglobando in matrici di collagene particelle di vetro bioattivo. La particolarità di questo composito è rappresentata dalla biomimeticià che deriva dalla presenza del collagene e dalla formazione di idrossiapatite sulla superficie dei vetri bioattivi. [38], [39] Questo lavoro di tesi si incentrerà sullo studio di scaffold realizzati con questo bio composito.

2.3.1 Il Collagene

Il collagene è una proteina che costituisce la maggior parte della matrice extracellulare. In particolare, il collagene di tipo I è quello maggiormente studiato perché forma oltre il 90% della massa ossea organica ed è il principale costituente di tendini, pelle, legamenti, cornea e tessuti connettivi. Per tale motivo negli anni ha trovato largo uso nell'ambito della cosmesi e dell'industria alimentare e farmaceutica [10]. Attualmente grazie alla sua naturale biodegradabilità e alle eccellenti proprietà biologiche e fisico-chimiche che favoriscono l'ancoraggio e la proliferazione delle cellule è impiegato nel campo della medicina rigenerativa e dell'ingegneria tissutale ossea[40].

La famiglia del collagene è costituita da 26 membri accomunati dalla ripetizione di una stessa sequenza di amminoacidi e che differiscono tra loro in base alla struttura e alla organizzazione supramolecolare. A temperatura e pH fisiologici il collagene è in grado di autoassemblarsi formando fibrille e successivamente

fibre. Come è possibile vedere in [figura 2.1](#), la conformazione finale del collagene risulta gerarchica e complessa.

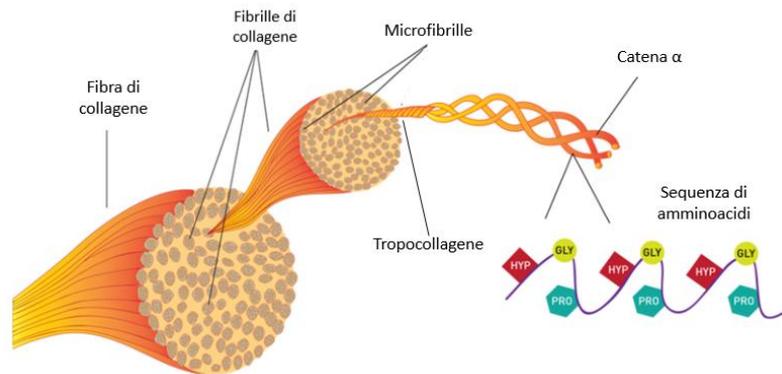


Figura 2.1 Autoassemblaggio del collagene. [41]

In particolare, la catena α è costituita dalla ripetizione della sequenza di amminoacidi $(\text{Gly-X-Y})_n$, dove Gly è la glicina, X e Y sono solitamente prolina e idrossiprolina, meno frequentemente lisina e idrossilisina. Gli amminoacidi X e Y conferiscono al collagene forza e rigidità poiché responsabili della formazione di legami idrogeno intramolecolari. Il tropocollagene, visibile in figura 2.2, costituisce un livello di organizzazione superiore ed è formato da tre catene α avvolte intorno a un asse centrale in modo destrorso e in maniera che tutti i residui di glicina siano posizionati al centro della tripla elica, mentre le catene laterali, più ingombranti, siano costituite dagli altri amminoacidi. Nel caso del collagene di tipo I, il tropocollagene ha una lunghezza di circa 300 nm e un diametro di 1,5 nm ed è di solito formato da due catene identiche $\alpha_1(\text{I})$ -catena e $\alpha_1(\text{II})$ -catena e una $\alpha_2(\text{I})$ -catene con circa 1000 amminoacidi.[42]

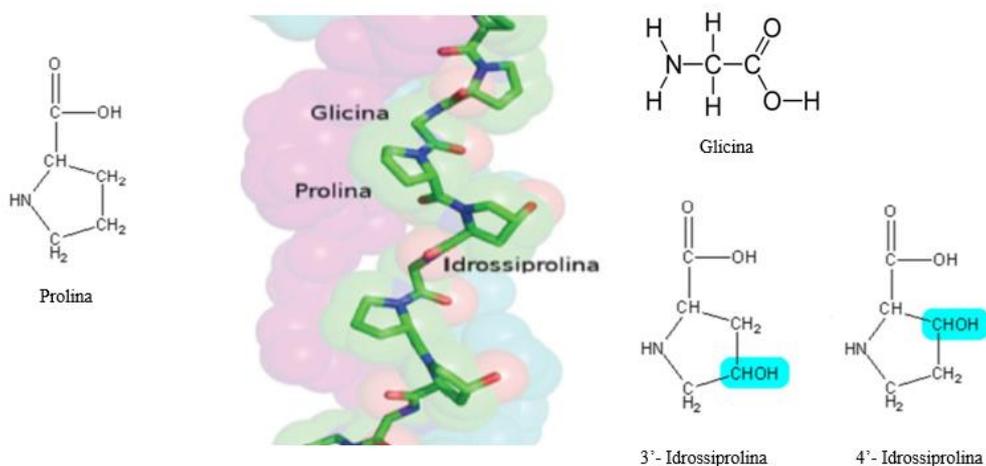


Figura 2.2 Tropocollagene [43]

Le fibrille sono formate da più microfibrille a loro volta costituite dall'unione di più molecole di tropocollagene. L'organizzazione delle molecole di tropocollagene forma il tipico motivo a bande delle fibrille di collagene.[44]–[46]Attraverso l'analisi con la microscopia elettronica (figura 2.3) è possibile infatti distinguere bande chiare, ricche di tropocollagene, e bande scure, in cui sono presenti molecole di tropocollagene e spazi vuoti.[46], [47]

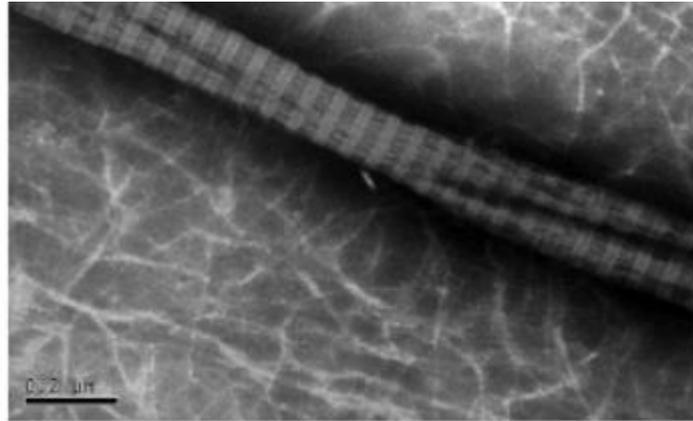


Figura 2.3 Immagine TEM di fibrille di collagene [48]

L'utilizzo del collagene di tipo I come materiale per la realizzazione di scaffold è indicato per l'eccellente biocompatibilità con cellule e tessuti [6], [8] ma trova come limiti le scarse proprietà meccaniche e l'alta velocità di degradazione [6], [14], [49]–[51] che non ne consentono un esteso uso specialmente nell'ingegneria dei tessuti duri. Pertanto per renderne possibile l'impiego nell'ambito dell'ingegneria tissutale ossea è necessario stabilizzare e incrementare le proprietà meccaniche del collagene attraverso metodi di reticolazione chimica e inglobando componenti con prestazioni meccaniche superiori come le particelle di vetro bioattivo.[5], [8]

2.3.2 I vetri bioattivi

I vetri bioattivi sono stati per la prima volta sviluppati nel 1969 dal professor Larry L. Hench come materiali sostitutivi all'osso per i veterani della guerra in Vietnam. Il materiale da lui sintetizzato ha composizione 45wt% SiO₂-24.5wt%Na₂O-24.5wt%CaO-6wt%P₂O₅ ed è noto come 45S5 Bioglass[®]. Quest'ultimo è un vetro silicato e, come tutti i vetri silicati, è composto da tetraedri di silice che condividono tra loro quattro atomi di ossigeno formando ponti Si-O-Si. All'interno del reticolo, il sodio (Na) e il calcio (Ca) agiscono come modificatori, ovvero rompono il reticolo, come mostrato in figura 2.4. [21], [30]

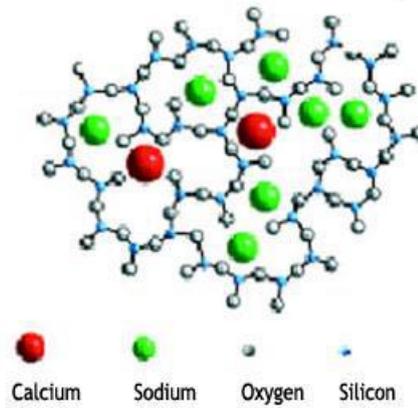
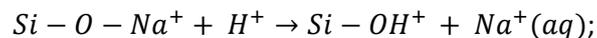


Figura 2.4 Vetro silicato [52]

I 45S5 Bioglass®, una volta impiantati, danno vita a un rapido meccanismo di dissoluzione di silice solubile e di ioni calcio dalla loro superficie inducendo effetti osteoconduttivi e osteoproduttivi. [30] In particolare, il meccanismo di bioattività dei vetri bioattivi in soluzione è stato descritto dallo stesso Hench nel modo che segue[11]:

- 1- Sulla superficie del vetro avviene l'idrolisi dei gruppi di silice e la formazione di gruppi silanoli (Si-OH) a causa dello scambio ionico che avviene tra gli ioni modificatori del vetro e gli ioni H^+ o H_3O^+ presenti in soluzione. Ciò comporta l'idrolisi dei gruppi di silice e la creazione di gruppi silanoli (Si-OH) sulla superficie del vetro. Il pH tende a diventare più basico a causa della riduzione degli ioni H^+ .



- 2- L'ambiente basico comporta a un attacco dei SiO_2 presenti nel vetro, la dissoluzione in soluzione della silice sotto forma di $Si(OH)_4$ e la formazione di gruppi Si-OH sulla superficie del vetro:



- 3- Formazione di uno strato amorfo ricco di SiO_2 sulla superficie del vetro impoverito di Na^+ e Ca^+ ;
- 4- Il vetro continua a dissolversi a favore della formazione di uno strato amorfo di fosfato di calcio sulla superficie dello strato ricco in silice formatosi precedentemente. La formazione dello strato in fosfato di calcio è favorito dalla migrazione di ioni Ca^+ e PO_4^{3-} dalla soluzione attraverso lo strato ricco di SiO_2 ;
- 5- Mentre lo strato di fosfato di calcio cristallizza in idrossiapatite incorporando $(OH)^-$ e $(CO_3)^{2-}$, il vetro prosegue la sua dissoluzione.

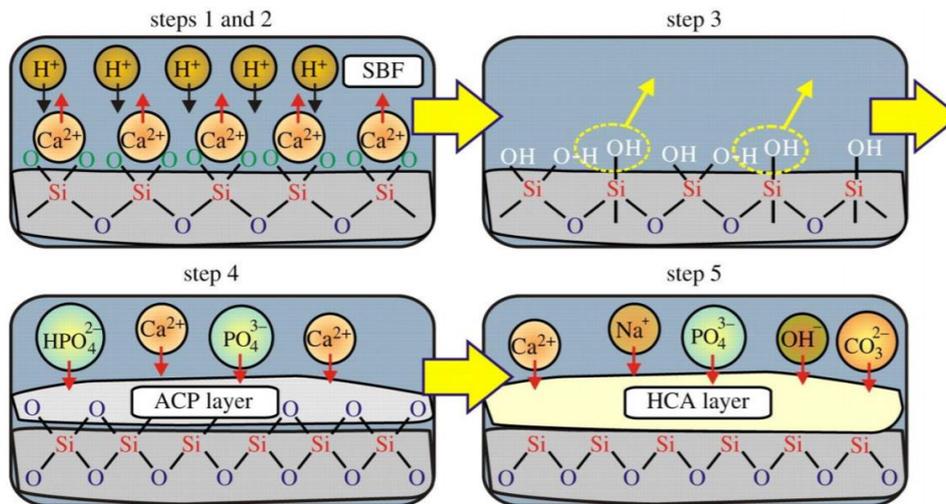


Figura 2.5 Bioattività dei biovetri [21]

A seguito della formazione dell'idrossiapatite avvengono ulteriori reazioni non ancora del tutto comprese che comportano la dissoluzione di prodotti ionici dalla superficie del vetro bioattivo e la mineralizzazione della matrice extracellulare.[53]

Negli ultimi anni la possibilità di incorporare ioni metallici all'interno dei biovetri con l'obiettivo di indirizzare la bioattività dei vetri verso una risposta biologica specifica e quindi di incrementare il loro effetto stimolante sull'osteogenesi e l'angiogenesi ha suscitato molto interesse. [54]

Solitamente i vetri bioattivi 45S5 erano realizzati attraverso il processo tradizionale di fusione e di colata (melting and quenching). Tale tecnica comportava però numerosi svantaggi come le alte temperature coinvolte, la formazione di una struttura poco microporosa e limiti sulla composizione del vetro bioattivo. Quest'ultima doveva favorire una facile fusione del vetro e prevedere una quantità di SiO_2 non superiore al 60 wt%. Un contenuto superiore di SiO_2 comporta, infatti, la formazione di una struttura molto compatta che riduce la bioattività non permettendo il rilascio di ioni. [30], [55]

Per ovviare a tali problematiche nel 1990 Li et al.[55] utilizzarono la tecnica sol-gel per la realizzazione di vetri bioattivi. Tale tecnica permise di realizzare vetri microporosi cioè con pori di dimensione $<2nm$ con un contenuto di SiO_2 fino al 90% mantenendo la loro bioattività legata alla maggiore area superficiale.[55], [56]

Negli anni successivi la combinazione di tale tecnica con l'utilizzo di surfattanti permise di realizzare una nuova classe di vetri bioattivi, i vetri bioattivi mesoporosi (MBG).

2.3.3 I vetri bioattivi mesoporosi

I vetri bioattivi mesoporosi (MBG) sono stati sviluppati per la prima volta nel 2004 da Yu et al. [55] i quali combinarono la tecnica sol-gel con l'utilizzo di surfattanti. Gli MBG sono caratterizzati da una struttura porosa molto ordinata con dimensione dei pori compresa tra i 5 e i 20 nm. Gli MBG presentano numerose vantaggi rispetto ai tradizionali vetri bioattivi (BG). Infatti, gli MBG sono dotati di una maggiore area superficiale specifica e da un maggior volume dei pori rispetto ai BG e ciò si riflette in una più spiccata bioattività, [55], [57] conseguentemente gli MBG mostrano una migliore mineralizzazione di apatite in fluidi corporei simulati (SBF). Gli MBG presentano in aggiunta una bassa alterazione del pH circostante durante la loro dissoluzione garantendo un'eccellente citocompatibilità.[58][55] Ultimi studi hanno poi dimostrato come è possibile indirizzare la bioattività verso una risposta biologica specifica degli MBG incorporando all'interno del reticolo ioni terapeutici come lo stronzio (Sr), il rame (Cu), lo zinco (Zn) o il cobalto (Co).[12], [54] Per i motivi appena citati gli MBG hanno destato grande interesse nel campo dell'ingegneria tissutale ossea. [58]

In generale per ottenere particelle di vetro mesoporoso si utilizza un agente templante che riesca ad autoassemblarsi (self-assembly) in micelle cilindriche all'interno di un solvente. L'agente templante è solitamente un surfattante formato da una testa idrofila e una coda idrofobica. Come è possibile vedere dalla figura 2.6 quando tali surfattanti sono aggiunti in una certa concentrazione all'interno di soluzioni acquose orientano le proprie teste e code per dar vita a delle strutture ordinate. In particolare quando è raggiunta la prima concentrazione micellare critica formano micelle sferiche, quando invece superano la seconda concentrazione micellare critica si autoassemblano per formare strutture cilindriche. [59]

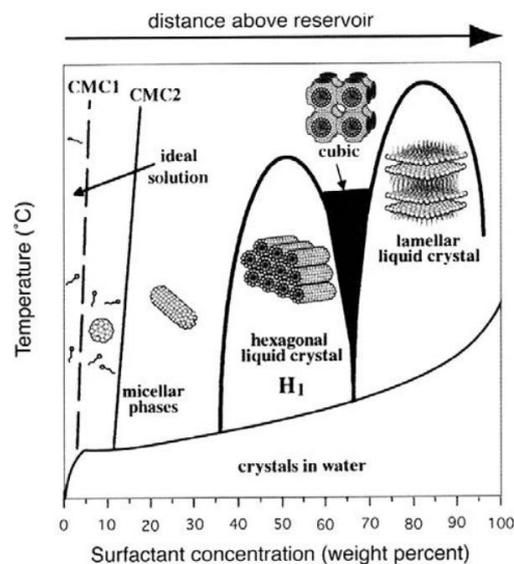


Figura 2.6 Autoassemblamento dei surfattanti [59]

Una delle tecniche maggiormente utilizzate per la sintesi dei vetri bioattivi mesoporosi è quella di autoassemblaggio indotto da evaporazione (EISA). Con questa tecnica si utilizza l'evaporazione di un solvente per raggiungere la concentrazione micellare critica dei tensioattivi e quindi consentire la formazione di una fase liquido-cristallina. A seguito di tale processo avviene la condensazione del precursore del vetro di silice intorno alla struttura micellare. Tramite un trattamento termico di calcinazione viene infine rimosso il surfattante.

La tecnica EISA è molto semplice e permette di controllare le proprietà del prodotto variando parametri come pH, temperatura, composizione e tempo. L'elemento critico di tale tecnica consiste nel fatto che le particelle ottenute non hanno forma regolare. [59]

L'atomizzazione (spray-drying) di una soluzione e la tecnica sol-gel sono due tecniche utilizzate per la produzione di vetri bioattivi mesoporosi che consentono di avere un elevato controllo sulla dimensione e la forma dei prodotti finali.[60], [61]

2.3.3.1 Sintesi Spray-drying

Il metodo spray-drying è una tecnica basata sulla trasformazione di una soluzione in una polvere attraverso l'atomizzazione per mezzo di un gas caldo. Il processo si articola in sei fasi fondamentali[62]:

- 1- Preparazione della soluzione inserendo in un mezzo acquoso molecole di tensioattivo (solitamente un co-polimero a blocchi) e precursori inorganici;
- 2- Atomizzazione della soluzione
- 3- Essiccamento in gas;
- 4- Formazione di particelle essiccate;
- 5- Separazione attraverso un ciclone e collezione dei prodotti.
- 6- Calcinazione delle polveri

Nella figura 2.7 è possibile vedere lo schema di uno spray-dryer.

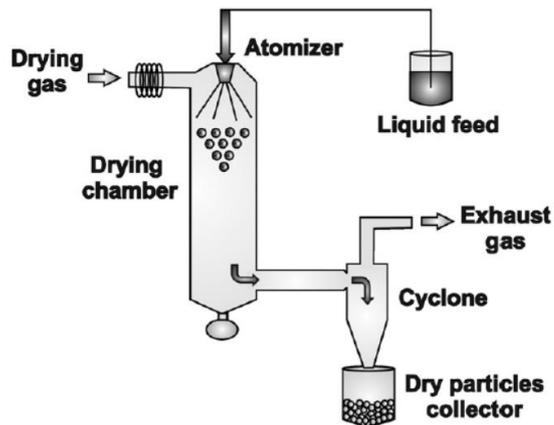


Figura 2.7 Spray dryer [62]

Il vantaggio di tale tecnica è che è possibile controllare la forma e la dimensione delle polveri prodotte. Inoltre i prodotti ottenuti presentano elevata stabilità chimica e fisica.[61], [62]

2.3.3.2 Sintesi Sol-gel

Tramite la tecnica sol-gel è possibile ottenere particelle di vetro bioattivo mesoporoso con un elevato controllo sulla porosità delle particelle prodotte. Al fine di ottenere la morfologia desiderata occorre variare determinati parametri di processo come il pH. [63]

La tecnica sol-gel è principalmente costituita da tre passaggi fondamentali[64]:

- 1- La preparazione della soluzione con i precursori del vetro bioattivo, i tensioattivi e un catalizzatore;
- 2- Trasformazione della soluzione in un gel;
- 3- Trattamento termico di calcinazione per rimuovere il tensioattivo.

Le molecole di tensioattivo formano nella soluzione micelle cilindriche che fungono da “stampo” per i precursori del vetro bioattivo. Come è possibile vedere in [figura 2.8](#), quando alla fine del processo sono rimosse le molecole di tensioattivo si ottiene un materiale mesoporoso.

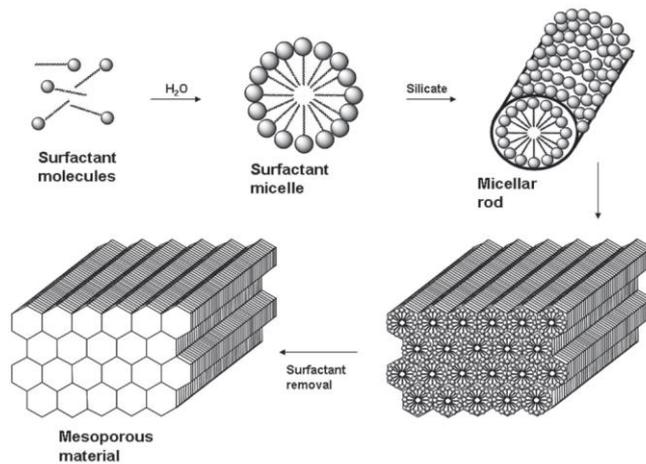


Figura 2.8 Formazione di un materiale mesoporoso con l'uso di tensioattivi [60]

2.3.4 I materiali compositi di collagene e particelle di vetro bioattivo mesoporoso

Il collagene di tipo I e le particelle di vetro bioattivo suscitano grande interesse per l'ingegneria tissutale ossea ma al contempo mostrano numerosi svantaggi che ne limitano l'utilizzo. Il collagene, infatti, come polimero naturale offre elevata processabilità ed è considerato come una perfetta matrice per la coltura cellulare ma mostra basse proprietà meccaniche e strutturali. [9], [38], [65] Le particelle di vetro bioattivo sono considerate osteoconduttive e osteoproduttive ma come tutti i bioceramici sono caratterizzate da elevata fragilità, bassa resistenza a trazione e difficile processabilità. [9], [65]

Negli ultimi 15 anni i due materiali sono stati combinati per la realizzazione di un sistema ibrido che ha superato i limiti delle basse proprietà meccaniche del collagene e della natura fragile delle particelle di vetro bioattivo.[8] [66] Infatti le numerose ricerche effettuate su questo composito sono giunte a definire come inglobando nella matrice di collagene particelle di vetro bioattivo siano incrementate la resistenza a compressione, la rigidità, le capacità osteogeniche e le capacità angiogeniche del collagene. Studiando l'attività del composito collagene/particelle di vetro bioattivo in ambiente fisiologico è stata constatata una veloce e ordinata mineralizzazione di apatite con conseguente incremento delle proprietà meccaniche del materiale. [38], [39], [67] W. Bae et al. [65] hanno studiato il comportamento del composito durante la coltura cellulare, quest'ultimo ha mostrato un'elevata crescita cellulare e la differenziazione delle cellule in osteoblasti.

2.4 Reticolazione

Il collagene possiede la peculiarità di riuscire ad autoassemblarsi in fibrille e successivamente in fibre in opportune condizioni di pH e temperatura (pH=7.4 , T=37°C). Tuttavia, come è stato detto nel paragrafo 2.3.1, l'utilizzo del collagene nell'ingegneria tissutale è fortemente limitato dalle scarse proprietà meccaniche dovute ai legami deboli che si formano durante la semplice gelificazione. Per ovviare a tale problema e rendere il collagene strutturalmente più stabile con proprietà meccaniche simili alla matrice ossea si ricorre alla reticolazione chimica. Attraverso la reticolazione chimica, infatti, è possibile generare legami intramolecolari, intermolecolari e intermicrofibrillari tra le fibre di collagene. [68], [69]

Negli anni si è ricorso a numerose tecniche di reticolazione risultate non idonee. Ad esempio si è ricorso all'utilizzo di enzimi come la lisina ossidasi e transglutanimasi ma il costo relativo al loro impiego è risultato molto elevato. Anche la glicazione non enzimatica è stata utilizzata per la reticolazione del collagene ma le concentrazioni necessarie per raggiungere le volute proprietà meccaniche sono risultate tossiche. È stata anche utilizzata la reticolazione UV e si è constatato che non reticoli uniformemente i tessuti più spessi. Altra tecnica utilizzata è stata quella della nitratura non enzimatica che però è soggetta ad alterazioni nel tempo.[70]

È dunque evidente come sia necessario individuare una tecnica di reticolazione idonea che fornisca le appropriate proprietà meccaniche e che soddisfi le esigenze di citocompatibilità.

Nel seguente lavoro di tesi, per migliorare la stabilità del sistema ibrido a base di collagene e particelle di vetro mesoporoso, sono stati utilizzati due differenti reticolanti di origine naturale: la genipina e il 4star polietilenglicole(PEG).

La genipina è un composto bioattivo proveniente dal frutto della *Gardenia Jasminoides Ellis*, utilizzato nella medicina tradizionale cinese per i suoi vari effetti farmacologici tra cui l'epatoprotezione, le attività antinfiammatorie, antiossidanti e antidepressive. A causa della bassa tossicità e dell'eccellente biocompatibilità, è stato ampiamente utilizzato come agente reticolante naturale per applicazioni in ingegneria tissutale. [71]

Il meccanismo con cui la genipina si lega al collagene è rappresentato in [figura 2.9](#) ed è costituito da due step[72]:

- 1- Attacco nucleofilo delle ammine primarie dei residui di lisina, idrossilisina e arginina sul carbonio C3 della genipina;
- 2- Sostituzione da parte del terzo azoto del collagene di un atomo di ossigeno nell'anello a sei componenti della genipina.

La reticolazione vera e propria avviene quando due molecole di genipina legate al collagene si legano tra loro formando un ponte tra le due fibre.

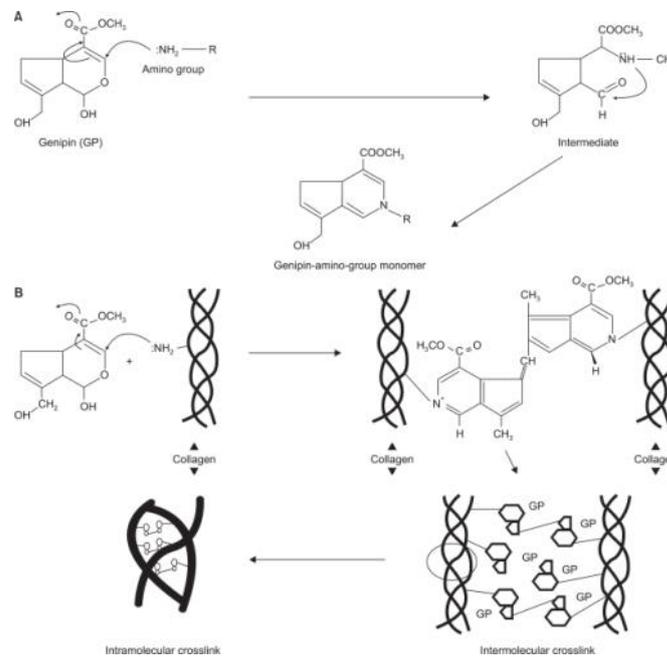


Figura 2.9 Meccanismo di reticolazione del collagene con genipina [73]

Il 4starPEG è un polimero naturale usato in modo esteso nella medicina rigenerativa e per formulazioni farmaceutiche. Il 4starPEG, come la genipina, è utilizzato come reticolante nell'ingegneria dei tessuti e recenti studi hanno mostrato che il 4starPEG è il reticolante con maggiore citocompatibilità, adatto quindi alla proliferazione cellulare. [69]

Il meccanismo con cui reticola il collagene è mostrato in [figura 2.10](#). In particolare, una molecola di 4starPEG si interpone tra due fibre di collagene legandosi alle ammine primarie delle due fibre.

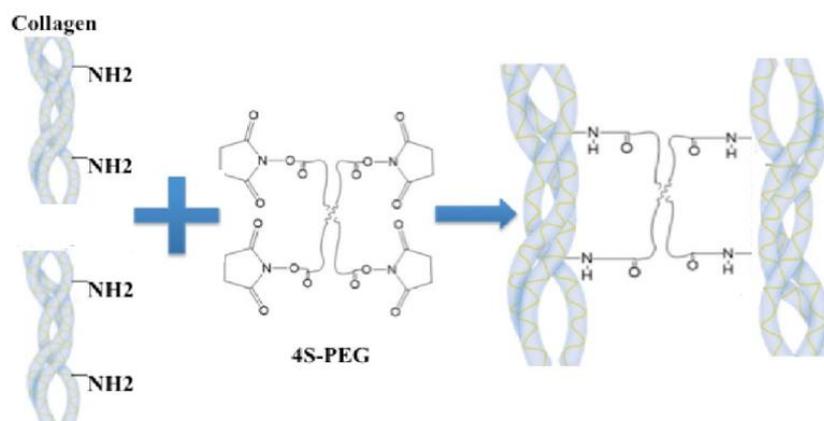


Figura 2.10 Meccanismo di reticolazione del collagene con 4starPEG [74]

2.5 Tecniche di produzione degli scaffold

Negli anni sono state introdotte e sviluppate numerose tecniche per l'ottenimento di scaffold che potessero soddisfare l'esigenza di controllo sulla dimensione, geometria e interconnessione dei pori. Una delle prime tecniche utilizzate per raggiungere tale scopo è stata sviluppata da Mikos et al. [75] nel 1992 e si tratta della colata di solvente e lisciviazione ("*Solvent casting and leaching*"). Tale tecnica consiste nel disperdere un agente porogeno, solitamente un sale, all'interno di una soluzione di polimero in solvente. Successivamente il sale è eliminato mediante un'operazione di lisciviazione dando vita a uno scaffold poroso. La tecnica di solvent casting and leaching, come fanno presente D. Sin et al. [76], presenta numerosi svantaggi, infatti non permette un buon controllo dell'interconnessione tra i pori e la lisciviazione non è in grado di rimuovere tutto il sale intrappolato all'interno del polimero. [6] Nel 1996 Mooney et al. [76] hanno introdotto una nuova tecnica (Gas foaming) che permetteva la realizzazione di scaffold porosi saturando il materiale con del gas ad alta pressione. [6] Harris et al. [77] in un articolo del 1997 evidenziano come la tecnica del gas foaming non consenta di creare una struttura con porosità interconnessa specialmente in superficie e per tale motivo hanno sviluppato un metodo misto tra il *gas foaming* e la *lisciviazione* la quale permette di ottenere una porosità interconnessa anche sulla superficie dello scaffold.

Gli scaffold possono essere realizzati anche con la *liofilizzazione*, una tecnica che prevede il congelamento di una soluzione contenente il polimero e la sublimazione del solvente in vuoto spinto. [6] La liofilizzazione fu introdotta per la prima volta nel 1994 da Whang et al. [78] nel tentativo di individuare una tecnica di fabbricazione di scaffold che permettesse di ottenere una porosità superiore del 90% con un controllo sulla dimensione dei pori. Tale tecnica però non sempre permette di ottenere interconnessione tra i pori. [9], [79]

In un articolo del 1998 Nam et al. [80] mostrano i vantaggi di un'ulteriore tecnica per la realizzazione degli scaffold, ovvero la *separazione di fase*. Quest'ultima sfrutta l'omonimo fenomeno per l'ottenimento di uno scaffold poroso e consente un controllo sulla porosità variando parametri termodinamici e cinetici.

Un'altra tecnica per la realizzazione di scaffold è l'*electrospinning*. Tale tecnica è nata negli anni 30' ed ha trovato utilizzo in numerose applicazioni fino a quando nel 2001 è stata per la prima volta utilizzata da Li et al. per la produzione di scaffold. [81] L'*electrospinning* attraverso l'utilizzo di un campo elettrico è in grado di realizzare delle fibre di polimero che, raccolte da un collettore, formano scaffold nanofibrosi con porosità interconnessa. [6]

Le tecniche appena esposte sono definite tradizionali e tutte condividono lo svantaggio di un limitato controllo sulla dimensione, geometria e interconnessione dei pori.[6] Per ovviare a questi inconvenienti è stata messa a punto una nuova tecnica rappresentata dalla stampa 3D.

2.5.1 La stampa 3D

La stampa 3D rientra nel campo della produzione additiva (additive manufacturing), ovvero realizza strutture tridimensionali strato dopo strato con l'aiuto di un modello CAD. Questa tecnica ha subito suscitato grande interesse nel campo dell'ingegneria tissutale ossea perché permette un elevato controllo sulla geometria dello scaffold, sulla dimensione e interconnessione dei pori. [6], [15], [82], [83] La possibilità di controllare tali parametri è molto importante perché la microarchitettura influisce direttamente sulle proprietà meccaniche, fisiche e sulla biodegradabilità dello scaffold.[15]

Esistono numerose tecniche di stampa 3D e ciascuna, come è stato riscontrato in letteratura, può essere utilizzata per la realizzazione di scaffold ossei. Cooke et al. [84] mostrano come grazie alla *stereolitografia* a polimerizzazione UV sia possibile realizzare scaffold con alto controllo sulla geometria interna ed esterna. Zein et al. [85], invece, tramite la *deposizione fusa* sono riusciti a realizzare uno scaffold in ϵ -caprolattone con un elevato controllo sulla interconnessione della porosità e sulla loro dimensione. Williams et al. [86] con l'utilizzo della *sintesi selettiva con laser* sono riusciti a ottenere con un elevato controllo sulla geometria uno scaffold in policaprolattone da utilizzare per la ricostituzione di articolazioni complesse.

Oltre alle tecniche appena citate, ne esistono altre quattro che offrono la possibilità di stampare bio-inchiostri ovvero materiali costituiti da una matrice (mezzi di coltura o idrogeli) all'interno della quale sono inglobate sostanze biologiche come cellule, fattori di crescita e farmaci. [87] Queste tecniche, lavorando a basse temperature e sottoponendo il materiale a basse sollecitazioni, non sono dannose per le sostanze biologiche in esso contenute. Stiamo parlando della *stampa a getto di inchiostro*, della *stampa assistita da laser*, della *stampa con microvalvola* e dell'*estrusione*. Tra le quattro, quella ad *estrusione* offre elevata versatilità e capacità di stampare strutture porose con una buona risoluzione e con una velocità di stampa superiore. [88] Tale tipo di stampa è idonea per processare qualsiasi polimero naturale, l'unico prerequisito richiesto al materiale è un comportamento pseudo-plastico. Ovvero, una diminuzione della viscosità in fase di estrusione e un aumento di quest'ultima in fase di deposizione al fine di ottenere una buona processabilità e una buona definizione durante la stampa.

Per i motivi appena indicati la stampa 3D a estrusione è stata utilizzata per la realizzazione di strutture 3D in questo lavoro di tesi.

Dobbiamo tuttavia sottolineare che la tecnica di 3D printing, malgrado sia stata sviluppata e studiata per più di 20 anni, non ha ancora raggiunto il livello di risoluzione e di perfezione richiesto e ciò è in parte da attribuire alla mancanza di materiali idonei a tale tipo di processo.[15] Al contempo tale tecnica si mostra promettente per la stampa di scaffold ossei grazie alla grande flessibilità offerta e alle complesse geometrie riproducibili. [16]

2.6 L'importanza dello stronzio nella rigenerazione ossea

Il processo di rimodellamento osseo, il cui sbilanciamento a favore della fase di riassorbimento dà luogo all'osteoporosi, è influenzato dall'azione di alcuni ioni metallici. Il cerio (Ce), il magnesio (Mg) e il boro (B), ad esempio, promuovono in vario modo la formazione di nuovo osso, mentre altri come il rame (Cu), lo zinco (Zn) e lo stronzio (Sr), non solo favoriscono l'osteogenesi ma altresì riducono il riassorbimento osseo.[89]–[95]

Tra gli elementi con potenziali proprietà terapeutiche, lo stronzio ha destato particolare attenzione grazie al suo noto coinvolgimento nel metabolismo osseo svolgendo funzioni anabolizzanti ed anticataboliche. Più in particolare recenti studi hanno dimostrato come l'incorporazione di ioni Sr^{2+} nel MBG rappresenti una strategia molto promettente (anche) nel trattamento delle fratture osteoporotiche in quanto favorisce la rigenerazione ossea promuovendo un effetto pro-osteogenico. [57]

A livello farmacologico l'idea di rimpiazzare il calcio per il trattamento dell'osteoporosi con lo stronzio non è recente ma risale agli anni '50. Abbandonata dopo che erano stati evidenziati dei difetti di mineralizzazione dell'osso associati all'uso dello stronzio, questa idea è stata successivamente ripresa, a seguito di nuovi studi clinici che avevano evidenziato una sua certa efficacia, in associazione con l'acido ranelico, nel trattamento dell'osteoporosi in donne post menopausa.[96]–[98] Lo stronzio utilizzato come farmaco antiosteoporotico è infatti composto da due atomi stabili di stronzio e una molecola di acido ranelico quale agente veicolante (ranelato di stronzio).

Il Ranelato di stronzio appartiene ai farmaci di classe DABA (Dual Action Bone Agents) in quanto agisce sia diminuendo il riassorbimento osseo sia aumentando la produzione di tessuto osseo nuovo. La molecola dello stronzio ranelato si dissocia a livello intestinale liberando lo stronzio che viene assorbito, similmente al calcio, grazie al coinvolgimento di un processo attivo vitamina D dipendente. Sebbene solo una minima parte dello stronzio entri nel processo metabolico il suo assorbimento per via sistemica determina l'insorgenza di numerosi ed importanti effetti collaterali (rash cutanei, convulsioni, attacco cardiaco). La presenza di così gravi controindicazioni ha pertanto indotto la Agenzia europea del farmaco (EMA) prima a sospenderne in via precauzionale l'uso e successivamente a limitarne fortemente i casi in cui è possibile

somministrarlo. Attualmente il ranelato di stronzio può essere prescritto dal medico specialista solo in caso di osteoporosi severa nelle donne post menopausa e negli uomini a rischio di frattura, solo come estrema ratio, cioè nei casi in cui il trattamento con altri farmaci non è possibile.[1] [4]

Se da un punto di vista farmacologico lo stronzio presenta importanti controindicazioni, che nella valutazione rischi/benefici fanno propendere per un suo impiego molto limitato, ben diverse sono le valutazioni da farsi nel caso di un suo utilizzo all'interno dei vetri bioattivi mesoporosi da impiegare nella fabbricazione di scaffold.

Diversi studi condotti su vetri bioattivi in cui il calcio è stato parzialmente sostituito da stronzio hanno mostrato il suo effetto benefico nel promuovere il rimodellamento osseo. [99]–[101] E' stato dimostrato che i biovetri che includono stronzio presentano una maggiore attività biologica che si manifesta in una deposizione più veloce dello strato di apatite sulla loro superficie. Si ritiene che questo fenomeno sia legato al fatto che lo stronzio ha un raggio atomico maggiore rispetto a quello del calcio e pertanto provoca un'espansione del reticolo e quindi un aumento della velocità di dissoluzione della matrice vetrosa.[90], [102]

La capacità dello stronzio di favorire l'osteogenesi rallentando al contempo il riassorbimento osseo è nota da tempo. In particolare lo stronzio è in grado di attivare recettori specifici ed aspecifici (come quelli del calcio) presenti sulle membrane cellulari delle cellule della linea osteoblastica. Numerosi studi pre-clinici hanno inoltre dimostrato che, a differenza del calcio, lo stronzio agisce inibendo l'attività osteoclastica e quindi il riassorbimento osseo. Lo stronzio legandosi ai recettori sensibili al calcio (CaSR), è infatti in grado di indurre l'apoptosi degli osteoclasti e sempre mediante tali recettori, può promuovere la proliferazione degli osteoblasti.[97] Lo stronzio può agire sulla osteoblastogenesi e sull'osteoclastogenesi anche attraverso vie non dipendenti dall'attivazione dei recettori calcio-sensibili. Lo stronzio determina infatti un aumento nella produzione di osteoprotegerina (OPG), una proteina che blocca la differenziazione ed il reclutamento degli osteoclasti, e contestualmente una diminuzione del RANKL una proteina che al contrario interagisce con i monociti, inducendoli a differenziare in osteoclasti.[103]–[106]

Risultati ottenuti da studi condotti in vitro a contatto con osteoblasti umani hanno evidenziato una diminuzione dell'espressione della sclerostina, proteina secreta dagli osteociti che agisce da potente inibitore della formazione di nuovo osso.[106]

3. MATERIALI E METODI

3.1 Introduzione

Lo scopo del presente lavoro di tesi è stato quello di analizzare dal punto di vista reologico e morfologico sospensioni di collagene e di particelle di vetro bioattivo mesoporoso destinate ad essere utilizzate come “inchiostro” per la stampa di strutture tridimensionali.

In primo luogo, sono state realizzate le sospensioni utilizzando il collagene di tipo I e due tipi differenti di particelle di vetro bioattivo mesoporoso (MBG) caricate con stronzio al 4%: le MBG_SD_Sr4% realizzate con metodo spray-dry e le MBG_SG_Sr4% realizzate con metodo sol-gel. Quest’ultime sono state sottoposte a test reologici per verificarne la stampabilità, ovvero cercando di replicare con il reometro le condizioni di stress che si verificano durante l’estrusione. Inoltre, sono stati effettuati test reologici a 37°C per constatare la formazione di un gel stabile.

Successivamente sono stati realizzati dei campioni massivi delle sospensioni. Quest’ultimi, dopo essere stati gelificati e reticolati chimicamente, sono stati analizzati tramite microscopia elettronica, reometro e spettroscopia infrarossa.

Infine sono state effettuate le prove preliminari di stampa 3D con le sospensioni di 1.5% collagene/MBG_SD_Sr4% e di 1.5% collagene/MBG_SG_Sr4%. Le stampe sono state effettuate in un bagno di supporto realizzato durante le attività di laboratorio.

Nel seguente capitolo verranno in primo luogo presentati i materiali utilizzati e le procedure seguite per la realizzazione delle sospensioni, dei campioni massivi e del supporto di stampa. Successivamente verranno definite le tecniche di reticolazione fisica/chimica dei campioni massivi e i metodi di caratterizzazione utilizzati per l’analisi delle caratteristiche chimico-fisiche e reologiche dei campioni presi in esame.

Verranno infine presentate le prove preliminari di stampa eseguite con le sospensioni dei sistemi ibridi di collagene/MBG_SD_Sr4% e collagene/MBG_SG_Sr4%.

3.2 Materiali

3.2.1 Collagene di tipo I

Per la realizzazione delle sospensioni è stato utilizzato il collagene di tipo I estratto dal tendine di Achille bovino prodotto dall'azienda Vornia. Quest'ultimo, sotto forma di polveri, ha mantenuto la sua capacità di autoassemblaggio[48] a pH 7.4 e alla temperatura di 37°C.[16] Per evitare la prematura ricostituzione delle fibre è stato conservato a -20°C.

3.2.2 Sintesi di vetri bioattivi mesoporosi contenenti ioni stronzio

Nel seguente lavoro di tesi nella matrice di collagene sono state inglobate polveri di vetro bioattivo mesoporoso con il 4% di Sr (MBG_Sr4%), prodotte presso i laboratori del Politecnico di Torino (gruppo IRIS-Prof.^{ssa} Vitale Brovarone Chiara) dall'Ing. Maria Chiara Palmieri e dalla Dott.ssa Carlotta Pontremoli. In questo modo sono state migliorate le basse proprietà meccaniche del collagene e si è al contempo beneficiato degli effetti biologici degli MBG_Sr4% come la proliferazione cellulare, l'osteogenesi e la mineralizzazione. Di seguito sono riportate le procedure utilizzate per la produzione dei due tipi di particelle di vetro mesoporoso caricate con 4% di stronzio utilizzate nel seguente lavoro di tesi.

Le particelle di vetro micrometriche denominate MBG_SD_Sr4% sono state sintetizzate con un metodo di atomizzazione (spray-drying). In particolare, è stata preparata una prima soluzione (soluzione A) sciogliendo 2 g del co-polimero a blocchi non ionico Pluronic P123 ($\text{EO}_{20}\text{PO}_{70}\text{EO}_{20}$, $M_n \sim 5800$, Sigma Aldrich, Milano, Italia) in 85 g di acqua bidistillata (ddH_2O). Una seconda soluzione (soluzione B) è stata invece realizzata idrolizzando 10,7 g di ortosilicato tetraetile (TEOS, Sigma Aldrich, Milano, Italia) in 5 g di una soluzione acquosa di HCl a pH=2 fino a quando non è stata ottenuta una soluzione trasparente. La soluzione B è stata aggiunta goccia goccia nella soluzione A e mantenuta sull'agitatore magnetico per un'ora. Successivamente, sono stati aggiunti 0,64 g di cloruro di stronzio esaidrato ($\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, per analisi EMSURE® ACS) e nitrato di calcio tetraidrato ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 99%, Sigma Aldrich).

La soluzione finale è stata mescolata per 15 minuti e poi atomizzata (Büchi, Mini Spray-Dryer B-290, Büchi Labortechnik AG, Flawil, Svizzera) usando come gas di atomizzazione l'azoto. I parametri di processo che sono stati utilizzati sono: temperatura dell'ugello 220°C, pressione di N_2 60mmHg e velocità di alimentazione 5ml/min. La polvere ottenuta è stata calcinata a 600°C in aria per 5 ore a una velocità di riscaldamento di 1°C min^{-1} usando un forno (Carbolite 1300 CWF 15/5, Carbolite Ltd., Hope Valley, UK)

per rimuovere l'agente templante.

Le nanoparticelle di vetro bioattivo con il 4% di ioni stronzio (MBG_SG_Sr4%) sono state sintetizzate con una sintesi sol-gel catalizzata da una base. In particolare, 6,6 g di bromuro di cetil-trimetilammonio (CTAB $\geq 98\%$, Sigma Aldrich, Milano) e 12 ml di soluzione di idrossido di ammonio (NH_4OH , Sigma Aldrich, Milano) sono state sciolte in 600 ml di acqua bidistillata e mescolate per 30 minuti. Successivamente, 30ml di ortosilicato tetraetile (TEOS, Sigma Aldrich, Milano), 4,13 g di nitrato di calcio tetraidrato ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 99%, Sigma Aldrich) e 1,68 g di cloruro di stronzio esaidrato ($\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, Sigma Aldrich, Milano, Italia) è stato aggiunto e mantenuto sotto mescolamento per 3 ore.

La polvere ottenuta è stata raccolta centrifugando (Hermle Labortechnik Z326, Hermle LaborTechnik GmbH, Wehigen, Germania) a 10000 rpm per 5 minuti e successivamente lavata solo una volta con acqua distillata e due volte con etanolo puro. Il precipitato finale è stato asciugato a 70°C per 12 ore e poi calcinato a 600°C in aria per 5 ore a una velocità di riscaldamento di 1°C min^{-1} usando un forno (Carbolite 1300 CWF 15/5, Carbolite Ltd., Hope Valley, UK) al fine di rimuovere CTAB. [57]

Analisi effettuate con la BET, riportate dal gruppo di ricerca IRIS, (tabella 3.1) hanno evidenziato che le MBG_SD_Sr4% hanno una dimensione compresa tra i 500 nm e i 5 μm , dimensione dei pori media di 7,8 nm, una superficie specifica di $154 \text{ m}^2/\text{g}$ e un volume dei pori di $0,17 \text{ cm}^3/\text{g}$. Le MBG_SG_Sr4% sono invece caratterizzate da una dimensione compresa tra 100 e 200nm, diametro medio dei pori pari a 4,1 nm, superficie specifica di $551 \text{ m}^2/\text{g}$ e volume dei pori pari a $0,45 \text{ cm}^3/\text{g}$. [57]

Parametri	MBG_SD_Sr4%	MBG_SG_Sr4%
Area superficiale BET	$154 \text{ m}^2/\text{g}$	$551 \text{ m}^2/\text{g}$
Dimensione media dei pori	7,8 nm	4,1 nm
Volume dei pori	$0,17 \text{ cm}^3/\text{g}$	$0,45 \text{ cm}^3/\text{g}$

Tabella 3.1 MBG_SD_Sr4% e MBG_SG_Sr4%

3.2.3 Sospensioni di collagene/ fase inorganica

Le sospensioni sono state realizzate utilizzando una quantità in peso di polveri di collagene e di particelle di vetro bioattivo tali da riprodurre le percentuali in volume delle fasi organiche e inorganiche del tessuto osseo naturale (53% in volume di collagene e 47% in volume di fase inorganica). Le densità utilizzate sono: $1,4 \text{ g cm}^{-3}$ per il collagene, 1 g cm^{-3} per le particelle di vetro mesoporoso. [107]–[109]

Nello specifico sono state realizzate sospensioni di collagene contenenti particelle MBG_SD_Sr4% o MBG_SG_Sr4% con concentrazioni di collagene dell'1%, 1.25% e dell'1.5%. Le dosi di collagene e di MBG utilizzate sono state riportate in tabella 3.2.

	Quantità in peso di Collagene [g]	Quantità in peso di MBG [g]
1% collagene/MBG_SD_Sr4%	0,300	0,1854
1% collagene/MBG_SG_Sr4%	0,300	0,1854
1.25% collagene/MBG_SD_Sr4%	0,360	0,222
1.25% collagene/MBG_SG_Sr4%	0,360	0,222
1.5% collagene/MBG_SD_Sr4%	0,45	0,278
1.5% collagene/MBG_SG_Sr4%	0,45	0,278

Tabella 3.2 Dosi di collagene e particelle MBG delle sospensioni

Le sospensioni sono state realizzate con una concentrazione di collagene crescente con l'intento di aumentarne la viscosità (figura 3.1). Infatti, il materiale ideale per la stampa di scaffold 3D deve essere dotato di alta viscosità per poter ottenere alta precisione di stampa. [83]

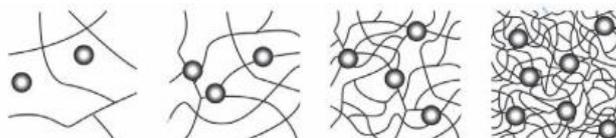


Figura 3.1 Concentrazione di polimero crescente [83]

Per la realizzazione di ogni sospensione è stato seguito il medesimo procedimento.

In particolare, seguendo le istruzioni fornite dal produttore, le polveri di collagene sono state sciolte in 16ml di acido acetico (AA 0,5M). Successivamente le particelle di MBG_Sr4% sono state disciolte in 4ml di AA 0,5M e disperse mediante sonicazione utilizzando un bagno ad ultrasuoni (Digitec DT 103H, Bandelin). Le particelle ottenute con tecnica spray-drying hanno richiesto 5 minuti di sonicazione, invece le particelle ottenute con tecnica sol-gel, a causa di problemi di agglomerazione, hanno richiesto 30 minuti di sonicazione. Infine la sospensione di MBG_Sr4% è stata aggiunta a gocce nella sospensione di collagene e il tutto è stato miscelato con agitatore magnetico per almeno tre ore al fine di assicurare un'omogeneità ottimale.

Per promuovere la transizione sol-gel e la ricostituzione della fibra di collagene, il pH acido è stato neutralizzato aggiungendo 10 ml di una soluzione di idrossido di sodio (NaOH) 1M. [47]

3.2.4 Preparazione di campioni massivi per la caratterizzazione

Con l'obiettivo di studiare le proprietà fisico-chimiche e visco-elastiche del materiale sono stati realizzati dei campioni massivi (bulk) con le sospensioni di collagene/MBG_Sr4%. In particolare, 350 μ l di sospensione sono stati iniettati in uno stampo di silicone per realizzare campioni di diametro 10 mm e spessore 5 mm. Lo stampo è stato lasciato a 37°C per 3 ore per consentire la reticolazione fisica del collagene (transizione sol-gel). I campioni destinati a successive analisi microscopiche e spettroscopiche sono stati congelati a -20°C. [47]

3.2.5 Reticolazione chimica del materiale

Per effettuare la reticolazione, si è proceduto realizzando le seguenti soluzioni reticolanti:

1. 0,25g di genipina in 50ml di D-PBS (tampone salino Dulbecco)
2. 0,25g di 4starPEG in 50 ml di D-PBS

I campioni bulk precedentemente reticolati fisicamente per tre ore sfruttando la transizione sol-gel del materiale a 37°C e pH 7.4 (paragrafo 3.2.4) sono stati posti dentro una multi-well in modo da avere per ciascun pozzetto un solo campione come è possibile vedere in [figura 3.2](#).

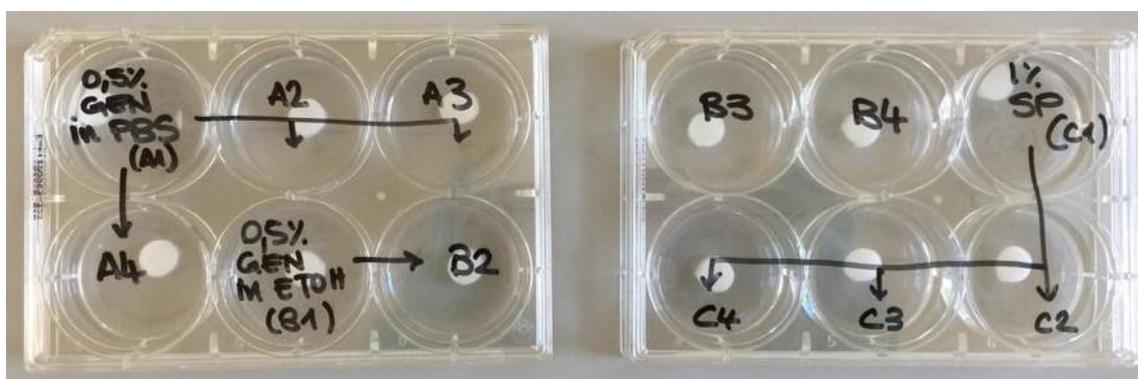


Figura 3.2 Disposizione dei campioni nelle multiwell

All'interno di ogni pozzetto sono stati inseriti 5 ml di soluzione reticolante. Successivamente la piastra contenente i campioni è stata posta in incubatore (37°C) per 24 ore per consentire la reticolazione chimica.

I campioni sono stati successivamente lavati sostituendo all'interno dei pozzetti la soluzione reticolante con acqua distillata e lasciando in agitazione a 100 rpm per 30 minuti. L'operazione è stata eseguita per due volte in modo da assicurare una buona pulizia dei campioni dai residui dell'agente reticolante che potrebbe ostacolare la vitalità cellulare.

3.2.6 Preparazione del bagno di supporto per la stampa (FRESH)

I polimeri naturali, come il collagene, non sono dotati di sufficienti proprietà meccaniche e reologiche pertanto durante il processo di stampa necessitano di un supporto per evitare la deformazione e il collasso della struttura estrusa.

Per questo motivo è stato utilizzato come supporto di stampa lo slurry di gelatina FRESH (Freeform Reversible Embedding of Suspended Hydrogels) realizzato seguendo il protocollo riportato da Hinton et al.[110]La procedura effettuata è riportata di seguito:

- 1- La soluzione di gelatina è stata preparata sciogliendo 13g di gelatina porcina (Sigma Aldrich) in 300 ml di PBS precedentemente riscaldato a 37°C in modo da favorire la dissoluzione;
- 2- La soluzione preparata è stata posta per una notte a 4°C per favorire la gelificazione;
- 3- Il blender è stato riempito con la soluzione ed il PBS, precedentemente raffreddato a 4°C, fino a giungere a un volume di 600 ml. Il tutto è stato mescolato per 2 minuti in modo da ottenere particelle di gelatina con diametro sferico equivalente di $55,3 \pm 2 \mu\text{m}$;
- 4- La sospensione creata è stata trasferita in falcon da 50 ml e centrifugata a 4200 rpm per 2 minuti;
- 5- Da ogni falcon centrifugata è stato eliminato il surnatante. Successivamente le falcon sono state riempite con PBS a 4°C fino a giungere a un volume di 40 ml e poste in vortex per risospendere le particelle;
- 6- I passaggi 4 e 5 sono stati effettuati un paio di volte per rimuovere la gelatina solubilizzata;
- 7- Lo slurry realizzato è stato impiegato subito per la stampa oppure è stato conservato in frigo a 4°C come è consentito dal protocollo di Hinton et al.[110]

Il FRESH è composto da microparticelle di gelatina che agiscono da fluido di Bingham, ovvero agiscono come un corpo rigido a bassi sforzi di taglio e come un fluido viscoso ad alti valori di taglio. Grazie a tale caratteristica reologica il FRESH è in grado di sostenere strutture stampate anche complesse che altrimenti si deformerebbero sotto il loro stesso peso. Lo slurry FRESH mantiene le sue caratteristiche reologiche inalterate fino a 22°C.

Il FRESH offre inoltre una buona biocompatibilità, ciò è molto vantaggioso perché non è facile rimuoverlo completamente dalle strutture stampate. [110]

3.3 Caratterizzazione

3.3.1 Microscopia elettronica a scansione ad emissione di campo (FESEM) e microscopio a scansione elettronica (SEM)

La microscopia elettronica a scansione ad emissione di campo (FESEM) è una tecnica non distruttiva che permette di visualizzare dettagli topografici sulla superficie di campioni fino al nm.

Il FESEM sfrutta un fascio di elettroni primario per sondare la superficie ma, a differenza degli altri microscopi, il fascio di elettroni non è prodotto per effetto termoionico bensì da una sorgente a emissione di campo costituita da un filamento di tungsteno sottoposto a un potenziale negativo di 1-10kV.[111]

All'interno di una colonna ad alto vuoto gli elettroni primari sono accelerati da un alto potenziale elettrico e sono focalizzati e deflessi da lenti elettromagnetiche. Il fascio ristretto così prodotto è utilizzato per bombardare la superficie del campione la quale genera elettroni secondari che sono catturati da un detector. Il detector produce un segnale elettrico che è amplificato e trasformato in un'immagine in scala di grigi che può essere visualizzata su un monitor. [112]

Il FESEM lavora in vuoto spinto (meno di 1×10^{-7} Pa nella zona della pistola) per prevenire la dispersione degli elettroni e per evitare scariche elettriche.

Nel seguente lavoro di tesi è stato utilizzato un microscopio SUPRA™ 40 di ZEISS (figura 3.3). Quest'ultimo è in grado di effettuare ingrandimenti nel range di 12-900000x con una risoluzione spaziale <2nm. Tali capacità rendono il FESEM una tecnica con una risoluzione e una capacità di ingrandimento 3 o 6 volte migliori del SEM. [111]



Figura 3.3 FESEM SUPRA 40 di ZEISS [113]

Il microscopio a scansione elettronica (SEM) è uno strumento che permette di ottenere delle informazioni chimiche, morfologiche, semi-quantitative e qualitative del campione analizzato.

Il principio di funzionamento consiste nell'emissione da parte di un filo di tungsteno (W) o di esaboruro di lantanio di particelle cariche, in particolare elettroni, per effetto termoionico. Gli elettroni emessi sono accelerati da una differenza di potenziale variabile tra 5 e 20 kV. Un sistema di lenti elettromagnetiche permette di focalizzare il fascio di elettroni primari sul campione. Il fascio primario che colpisce la superficie del campione interagisce con quest'ultima generando l'emissione di elettroni secondari, elettroni retrodiffusi, fotoni, elettroni Auger e raggi X. In [figura 3.4](#) è rappresentato in modo schematico l'interazione tra il fascio primario e la superficie.

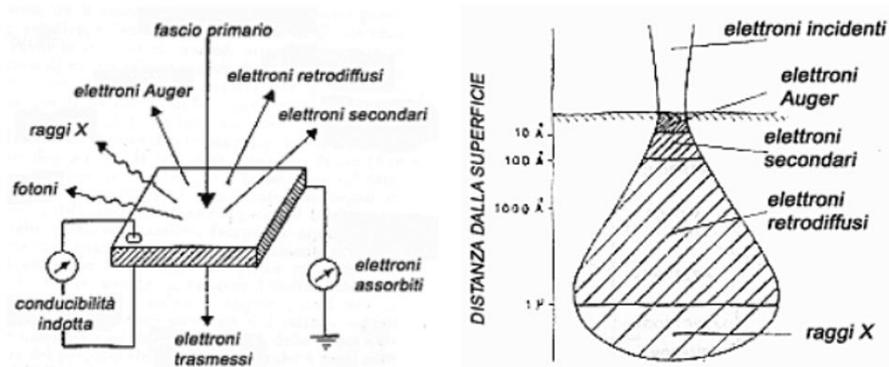


Figura 3.4 Interazione tra fascio primario e superficie del campione [114]

Le radiazioni emesse dal campione sono utilizzate per avere diverse informazioni sulla struttura, morfologia e chimica della superficie.

All'interno della camera è generato un vuoto spinto ($P=10^{-4}$ - 10^{-5} mbar) per limitare l'interazione tra il fascio di elettroni primari e molecole di gas. [111], [114], [115]

Il SEM utilizzato in questo lavoro di tesi è Phenom XL della ThermoFisher ed è mostrato in [figura 3.5](#).



Figura 3.5 Phenom XL [116]

Tale strumento è in grado di effettuare ingrandimenti massimi fino a 100000x e permette di visualizzare immagini con una risoluzione spaziale <10nm.[116]

Durante il lavoro di tesi, attraverso la microscopia elettronica, è stata analizzata la ricostituzione delle fibre di collagene, la distribuzione delle particelle inorganiche nella matrice e l'effetto dei reticolanti sulla morfologia dei campioni. Entrambe le analisi di microscopia elettronica richiedono che il campione analizzato sia elettricamente conduttivo e stabile quando è posto in vuoto spinto. Per tale motivo la preparazione dei campioni per le analisi FESEM e SEM è stata la medesima. In particolare, i campioni massivi derivanti sia da reticolazione fisica (pH, temperatura) che chimica (genipina, 4starPEG) dei due sistemi ibridi (collagene/MBG_SD Sr4% e collagene/MBG_SG Sr4%), realizzati come descritto nei paragrafi 3.2.4 e 3.2.5, sono stati dapprima congelati a -20°C e successivamente liofilizzati per 48 ore tramite un liofilizzatore Lyovapor L-200 (Buchi) sfruttando un vuoto inferiore a 0,1 mbar. In questo modo è stato possibile rimuovere l'acqua. Successivamente, i campioni liofilizzati, sono stati tagliati con un bisturi e le sezioni trasversali sono state poste su appositi supporti metallici (stub). Al fine di migliorare la conduttività elettrica dei campioni, tali sezioni sono state metallizzate deponendo un sottile strato di platino (Pt). [47]

3.3.2 Spettroscopia infrarossa (ATR-FTIR)

L'ATR (riflettanza totale attenuata) è una tecnica non distruttiva che sfrutta la radiazione infrarossa (IR) per analizzare dal punto di vista chimico la superficie del campione analizzato. Lo strumento è caratterizzato dalla presenza di un cristallo, solitamente di seleniuro di zinco (ZnSe) o di germanio (Ge), avente un elevato indice di rifrazione che consente, una volta colpito dalla radiazione IR, di riflettere la radiazione elettromagnetica numerose volte. Durante l'analisi il campione è messo sul cristallo e, per garantire un contatto più esteso, un pistone esercita una pressione sul campione.[117] Lo schema di ciò che accade durante la misurazione ATR è mostrato in [figura 3.6](#).

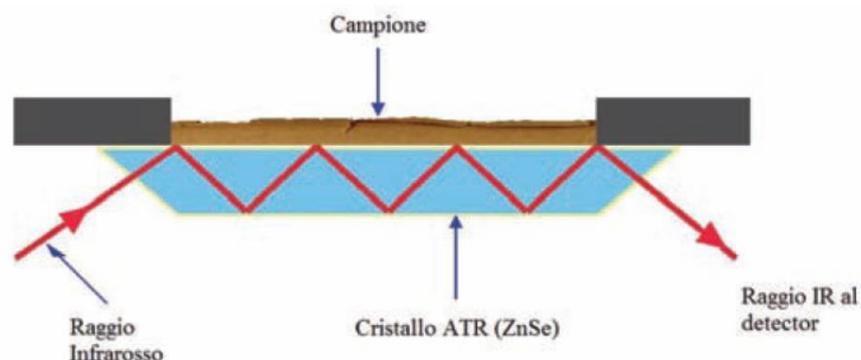


Figura 3.6 ATR [117]

La radiazione IR riflettendo all'interno del cristallo penetra all'interno del campione per pochi micron e viene attenuata. Il raggio IR a seguito dell'attenuazione subita è rilevato dallo spettrofotometro che lo traduce in uno spettro ATR avente in ordinata l'assorbanza e in ascisse la lunghezza d'onda. Lo spettro è caratterizzato da dei "picchi" che possono corrispondere all'impronta (*finger-print*) del materiale, ovvero il suo segnale caratteristico (solitamente individuato nella regione $900-400\text{ cm}^{-1}$), o ai gruppi funzionali presenti in superficie (nella regione compresa tra $4000-1300\text{ cm}^{-1}$). [117], [118]

Il fenomeno fisico sfruttato dall'ATR è l'assorbimento quantizzato da parte delle molecole superficiali del campione dell'energia trasmessa dalla radiazione IR. Tale energia è convertita dalle molecole in energia vibrazionale di bending (piegamento) o di stretching (stiramento) dei legami chimici (figura 3.7). [118], [119]

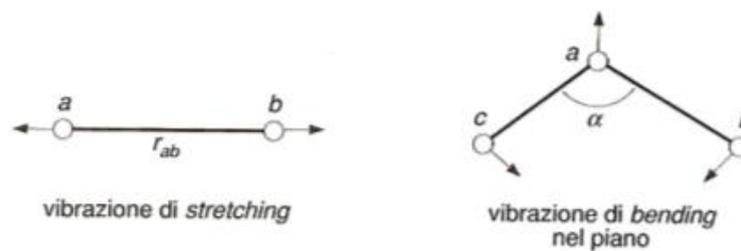


Figura 3.7 Moto di stretching e di bending [118]

Uno dei vantaggi di tale analisi è la non necessaria preparazione del campione.

Nel seguente lavoro di tesi è stato utilizzato lo spettrometro Equinox 55 della Bruker per valutare la composizione chimica dei campioni massivi di collagene/MBG_SD_Sr4% e collagene/MBG_SG_Sr4%.

Nello specifico, i campioni massivi delle sospensioni di collagene/MBG_SD_Sr4% e collagene/MBG_SD_Sr4% gelificati e congelati a -20°C (paragrafo 3.2.4), sono stati liofilizzati per 48 ore con un liofilizzatore Lyovapor L-200 (Buchi). I campioni così ottenuti sono stati successivamente tagliati con un bisturi per ottenere sezioni da poter sottoporre all'analisi ATR-FTIR.

Infine, gli spettri rilevati sono stati messi a confronto con gli spettri caratteristici di collagene e particelle di vetro bioattivo riportati in letteratura.

3.3.3 Analisi reologiche

La *reologia* è la scienza che studia il comportamento dei fluidi sotto deformazione utilizzando tre grandezze fondamentali: lo sforzo di taglio τ (shear stress), la deformazione γ (strain) e la velocità di deformazione $\dot{\gamma}$ (shear rate).[52]

I fluidi, in base al loro comportamento, possono suddividersi in newtoniani e non newtoniani. I primi sono caratterizzati da viscosità costante, i secondi, invece, hanno un comportamento reologico dipendente dalla velocità di deformazione e si suddividono in plastici, pseudoplastici e dilatanti. I fluidi di Bingham e i fluidi plastici hanno rispettivamente un comportamento newtoniano e pseudoplastico quando sul fluido è applicato un valore di stress limite chiamato limite di scorrimento (Yield stress). [120]

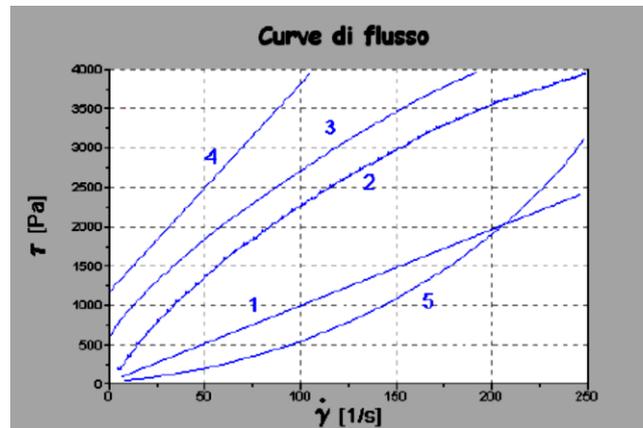


Figura 3.8 Curve di flusso: (1) Fluido Newtoniano, (2) Fluido pseudo-plastico, (3) Fluido plastico, (4) Fluido di Bingham, (5) Fluido dilatante.[52]

La viscosità η è una grandezza che caratterizza i fluidi ed è definita come la resistenza del fluido ad essere deformato ed è pari a $\eta = \frac{\tau}{\dot{\gamma}}$.

Esistono dei materiali che hanno un comportamento intermedio tra i solidi elastici e i fluidi viscosi e sono definiti viscoelastici.[121] Per caratterizzare tali materiali si usano tre parametri: il modulo elastico G' , il modulo di dissipazione G'' e il loro rapporto $\tan\delta = \frac{G''}{G'}$.

Il modulo di dissipazione e il modulo elastico caratterizzano rispettivamente la componente viscosa e elastica del materiale. [120]

Per studiare il comportamento viscoelastico dei materiali si utilizza il reometro, uno strumento di precisione che applica e misura ampi intervalli di sollecitazione, deformazione e velocità di deformazione rilevando la risposta del campione analizzato.[52]

Durante il seguente lavoro di tesi è stato utilizzato un reometro rotativo a densità controllata DHR-2 (TA instruments, Waters). Tale reometro è costituito da una geometria a piastra parallela di 20 mm e la temperatura del sistema è controllata costantemente da un sistema Peltier.



Figura 3.9 Reometro DHR-2(TA instruments).[122]

Le prove reologiche sono state effettuate sulle sospensioni per definire il loro comportamento sotto stress al fine di individuare la sospensione più promettente per l'estrusione tramite stampa 3D.

Ulteriori prove reologiche sono state condotte sui campioni realizzati con le sospensioni reticolate fisicamente e chimicamente. In questo modo è stato possibile determinare il loro comportamento visco-elastico e la loro stabilità in funzione della temperatura.

3.3.3.1 Reologia delle sospensioni

Il comportamento visco-elastico delle sospensioni è stato studiato in dipendenza della velocità di deformazione (*flow ramp* e *peak hold*) e del tempo (*time sweep*). La prima prova effettuata, nominata *flow ramp*, è stata eseguita incrementando in modo lineare nel tempo lo shear rate applicato sul campione al fine di verificarne la variazione del comportamento reologico. Con la seconda prova, definita di *peak hold*, invece, sono state simulate le fasi di estrusione e di deposizione di un processo di stampa. Ovvero sono stati applicati sul campione, in due step consecutivi, due valori costanti di shear rate.

Le analisi appena citate sono state condotte a 4°C per evitare la gelificazione delle sospensioni.

L'ultima prova che è stata eseguita prende il nome di *time sweep*. Quest'ultima è stata effettuata mantenendo il sistema a 37°C e sottoponendo il campione a uno sforzo costante. In questo modo è stata verificata la variazione del comportamento reologico della sospensione in dipendenza dal tempo. Per la prova di *time sweep* è stata utilizzata una trappola per solvente, ovvero una particolare struttura che non permette l'evaporazione del solvente e quindi l'essiccamento del campione.

Per poter effettuare le prove reologiche ogni campione è stato posto sul piatto di Peltier e la geometria avvicinata a quest'ultima di un gap variabile tra 500 e 1000 μm . Ogni campione è stato utilizzato per un solo test.[47]

- *Flow Ramp*

Durante il processo di stampaggio è richiesta una riduzione della viscosità del materiale al momento dell'estrusione in modo che sia garantita una facile erogazione. Per tale motivo il materiale deve possedere un comportamento pseudo-plastico.

Con la prova di *flow ramp* si è indagato il comportamento del campione quando è sottoposto a una sollecitazione di taglio crescente da $0,01 \text{ s}^{-1}$ fino a 1000 s^{-1} . È stato anche possibile determinare il limite di scorrimento delle sospensioni analizzate. Quest'ultimo indica il valore del minimo sforzo per avere lo scorrimento del materiale ed è indice di quanto il materiale riesca ad autosostenersi una volta estruso.[83]

Il valore di yield stress è stato calcolato graficamente ponendo sull'asse delle ordinate lo shear rate e sull'asse delle ascisse lo stress, entrambi in scala logaritmica in base 10. Della curva generata è stato calcolato il valore dell'onset point cioè il punto in cui la curva varia di pendenza.

La prova in *flow ramp* è stata effettuata a una temperatura di 4°C .

- *Peak Hold*

Durante il processo di stampaggio è richiesto da parte del materiale un rapido recupero della propria struttura. Infatti all'interno della siringa di stampa il materiale è soggetto a forti sforzi di taglio che fanno allineare le catene polimeriche nella direzione di estrusione. Tale fenomeno, visibile in [figura 3.10](#), riduce radicalmente la viscosità del materiale e ne favorisce l'estrusione. Una volta depositato, il materiale non è più soggetto a stress e si desidera che esso riacquisisca, nel minor tempo possibile, il suo network originario e un'alta viscosità per garantire una buona risoluzione di stampa. [82]

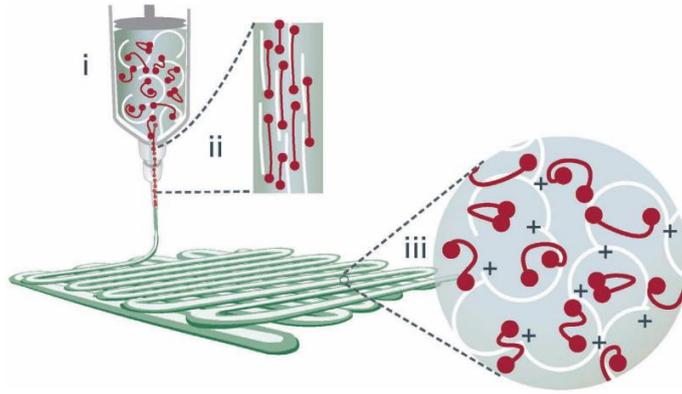


Figura 3.10 Allineamento delle catene polimeriche durante il processo di stampa [82]

La prova di *peak hold* è stata, dunque, effettuata per simulare il processo di stampa. La prova è stata svolta in due step: nel primo step è stato esercitato sul campione uno shear rate di 1000 s^{-1} per 100 secondi per riprodurre la fase di estrusione, nel secondo step è stato esercitato uno shear rate di $0,1 \text{ s}^{-1}$ per 300 secondi per riprodurre la fase di deposizione. L'intera prova è stata eseguita a 4°C .

- *Time sweep*

La variazione del comportamento visco-elastico delle sospensioni in dipendenza dal tempo è stata verificata con la prova di *time sweep*. In particolare, ogni campione è stato sottoposto a uno sforzo dell'1% per 60 minuti mantenendo l'intero sistema a una temperatura di 37°C .

3.3.3.2 Reologia dei campioni massivi reticolati

Le prove reologiche sui campioni massivi reticolati fisicamente e chimicamente (paragrafi 3.2.4 e 3.2.5) sono state effettuate ponendo il campione sulla piastra Peltier come è illustrato nella foto in [figura 3.11](#). Successivamente la geometria è stata avvicinata di un gap di $1000 \mu\text{m}$. Infine, prima dell'inizio della prova, è stato rimosso il materiale in eccesso che avrebbe potuto ostacolare la geometria durante la misura. Ogni campione è stato utilizzato per effettuare un solo test.

In particolare è stata effettuata una prima prova, chiamata *amplitude sweep*, durante la quale è stato analizzato il comportamento viscoelastico dei campioni in dipendenza della percentuale di deformazione. La seconda prova eseguita prende il nome di *temperature ramp* ed è servita per studiare il comportamento dei campioni in dipendenza della temperatura.



Figura 3.11 Prove reologiche su campione reticolato chimicamente con genipina.

- *Amplitude Sweep*

Durante la prova è stata determinata la viscoelasticità dei campioni applicando su quest'ultimi una forzante di andamento sinusoidale. La risposta del campione, anch'essa sinusoidale, è analizzata dal reometro in termini di ampiezza e sfasamento rispetto alla forzante.

In particolare, sono stati misurati i valori di G' e G'' variando lo sforzo di oscillazione dallo 0,01% al 10% fino a quando non è stata individuata una zona a comportamento visco-elastico lineare (LVR), in cui la risposta del campione è in fase con quella della forzante.

La prova di *amplitude sweep* è stata eseguita anche per verificare l'incremento dei moduli G' e G'' a seguito della reticolazione chimica.

- *Temperature ramp*

La prova di temperature ramp è stata eseguita sottoponendo il campione a uno sforzo dell'1% e ad una rampa di temperatura da 37°C a 90°C. In questo modo è stato possibile individuare la temperatura alla quale si ha la denaturazione della fibra di collagene. Cioè la temperatura alla quale il collagene perde la propria organizzazione molecolare. La prova è stata eseguita per verificare gli effetti della reticolazione sul punto di denaturazione che, secondo letteratura, nel collagene non reticolato chimicamente avviene tra 40-45°C. [69]

3.3.4 Prove preliminari di stampa 3D

La stampa 3D è una tecnica di produzione emergente che ha trovato largo utilizzo nel campo dell'ingegneria tissutale ossea.[15], [82], [123] Infatti, con l'utilizzo di stampanti 3D è possibile realizzare, con un elevato controllo sulla geometria interna ed esterna, strutture complesse molto simili ai tessuti organici. Le stampanti 3D realizzano le strutture tridimensionali con l'ausilio di un modello G-Code. Il modello G-Code codifica i modelli CAD in un formato leggibile dalla stampante 3D ovvero sezionando il modello CAD in strati che la stampante riproduce fisicamente. I modelli CAD possono essere creati a partire da analisi di tomografia computerizzata (CT) o di risonanza magnetica.[6]

Nel seguente lavoro di tesi le prove di stampa sono state realizzate con una stampante BIO X (Cellink) mostrata in [figura 3.13](#).

La stampante BIO X è in grado di stampare strutture con la risoluzione di 1 μm e strati fino a 50 μm di spessore come mostrato in [figura 3.12](#). Garantendo la massima precisione nella riproduzione di tessuti.

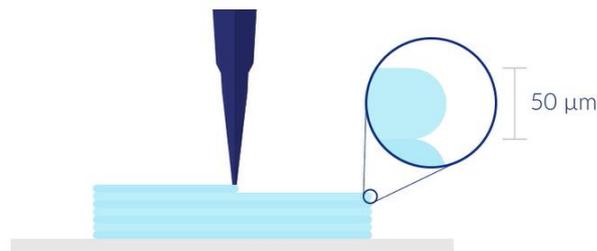


Figura 3.12 Spessore Layer [124]

Essa è dotata di tre testine che consentono di combinare cellule e biomateriali nella struttura stampata.[6]

Le testine e il piatto di estrusione sono termoregolabili. In particolare, la testina può lavorare in intervalli di temperature dai 4°C ai 250°C, il piatto di estrusione invece dai 6°C ai 60°C.

La stampante è inoltre dotata di una sorgente di radiazioni UV per la fotopolimerizzazione e di radiazioni UV-C con azione germicida.



Figura 3.13 Stampante 3D[125]

A seguito delle prove reologiche, dunque, sono state effettuate le prove preliminari di stampa in modo da verificare l'effettiva stampabilità delle sospensioni e la risoluzione delle strutture stampate. In primo luogo sono state preparate le siringhe di stampa caricandole con le sospensioni di collagene e particelle di MBG_Sr4%.

A causa della presenza di bolle d'aria all'interno delle sospensioni, prima di effettuare le prove, le siringhe sono centrifugate a 2000 rpm e a una temperatura di 4°C per 2 minuti utilizzando una centrifuga Z 326 K (HERMLE).

Con le prove di stampa sono stati realizzati reticoli di dimensioni 10 x 10 x 1 mm (larghezza x profondità x spessore) variando parametri quali pressione, velocità di estrusione, densità di riempimento e altezza del layer al fine di individuare i valori ottimali di stampa.

La stampa è stata effettuata all'interno di multiwell nelle quali è stata posta la gelatina FRESH ([figura 3.14](#)). Quest'ultima è stata utilizzata come supporto di stampa per ridurre il rigonfiamento della sospensione a seguito dell'estrusione e per sostenere la struttura estrusa che, non essendo ancora reticolata, non possiede adeguate proprietà meccaniche per autosostenersi.[47]

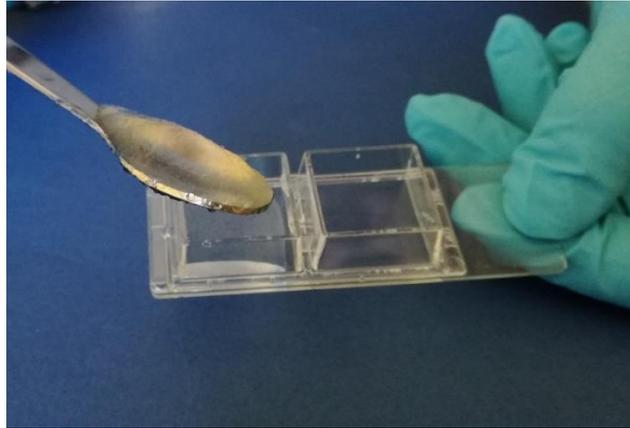


Figura 3.14 Deposizione della gelatina FRESH nel vetrino

In fase di stampa la temperatura della testina è stata mantenuta a 4°C per evitare che la sospensione reticolasse all'interno della siringa; il letto di stampa è stato invece portato a 20°C affinché la gelatina del FRESH non tornasse in soluzione.

Successivamente i reticoli stampati sono stati incubati a 37°C per ottenere una struttura gelificata e per portare allo stato liquido la gelatina di supporto. In seguito, le strutture stampate sono state lavate con D-PBS, precedentemente riscaldato a 37°C, e congelate a -20°C.

4. Risultati e discussione

4.1 Introduzione

In questo capitolo saranno riportati i risultati delle analisi effettuate sui campioni realizzati seguendo le procedure riportate nel capitolo 3.3.

In primo luogo verranno mostrati i risultati delle analisi FESEM e SEM a cui sono stati sottoposti i campioni massivi gelificati di collagene/MBG_SD_Sr4% e collagene/MBG_SG_Sr4%. Saranno poi riportate le immagini ottenute mediante analisi SEM dei campioni massivi di collagene/MBG_SD_Sr4% e collagene/MBG_SG_Sr4% reticolati chimicamente con genipina e 4starPEG.

Successivamente saranno evidenziati i risultati delle analisi composizionali dei campioni massivi gelificati di collagene/MBG_SD_Sr4% e collagene/MBG_SG_Sr4% ottenuti tramite spettroscopia ATR-FTIR.

A seguire saranno illustrati i risultati delle prove reologiche effettuate sulle sospensioni di collagene/MBG_SD_Sr4% e collagene/MBG_SG_Sr4% a diverse concentrazioni di collagene. Verranno successivamente riportati gli esiti delle prove reologiche eseguite sui campioni massivi di 1.5% collagene/MBG_SD_Sr4% e 1.5% collagene/MBG_SG_Sr4% gelificati e reticolati chimicamente con genipina e 4starPEG.

L'ultima parte di questo capitolo sarà invece dedicata ai risultati delle prove preliminari di stampa eseguite con le sospensioni di 1.5% collagene/MBG_SD_Sr4% e 1.5% collagene/MBG_SG_Sr4% per la realizzazione di reticoli di dimensioni 10 x 10 x 1 mm (larghezza x profondità x spessore).

Nel seguito i campioni sottoposti a semplice reticolazione fisica del collagene ossia creati sfruttando il processo di gelificazione a 37°C e pH neutro verranno definiti con *non reticolati*. I campioni così realizzati e sottoposti ad un successivo processo di reticolazione chimica (genipina, 4starPEG) verranno invece definiti campioni *reticolati*.

4.2 Valutazione morfologica

I campioni massivi di collagene e particelle di MBG_SD_Sr4% e MBG_SG_Sr4% gelificati e reticolati chimicamente, dopo essere stati congelati e liofilizzati, sono stati posti su degli stub e metallizzati con platino per analizzarli con la microscopia elettronica.

Tramite FESEM e SEM si è voluto constatare il corretto autoassemblaggio del collagene all'interno dei campioni gelificati di collagene/MBG_SD_Sr4% e collagene/MBG_SG_Sr4%. Tale autoassemblaggio, infatti, può essere ostacolato dalla presenza delle particelle di vetro bioattivo mesoporoso [126]. In particolare, le analisi al FESEM sono state condotte per apprezzare meglio la ricostituzione delle fibre di collagene e la morfologia dei campioni utilizzando ingrandimenti molto elevati impossibili da raggiungere con il SEM.

Mediante SEM, invece, è stata osservata la morfologia dei campioni di collagene/MBG_SD_Sr4% e collagene/MBG_SG_Sr4% reticolati chimicamente con genipina e 4starPEG per constatare gli effetti della reticolazione sulla ricostituzione del collagene.

Di seguito verranno riportate le sole immagini relative ai sistemi ibridi a base di collagene al 1.5% in peso in quanto non sono state riscontrate significative differenze con le immagini ricavate per concentrazioni inferiori di collagene.

4.2.1 Sistemi 1.5% collagene/MBG_SD_Sr4%

4.2.1.1 Analisi morfologica tramite FESEM

In figura 4.1 e in [figura 4.2](#) sono mostrate le immagini FESEM del campione di 1.5% collagene/MBG_SD_Sr4% non reticolato. Le immagini mostrano come il collagene si sia autoassemblato formando fibre e pareti su cui sono adese le particelle di MBG_SD_Sr4%. L'assenza di significativi agglomerati di particelle MBG_SD_Sr4% ha dimostrato la buona dispersione di quest'ultime nella matrice durante la preparazione della sospensione.

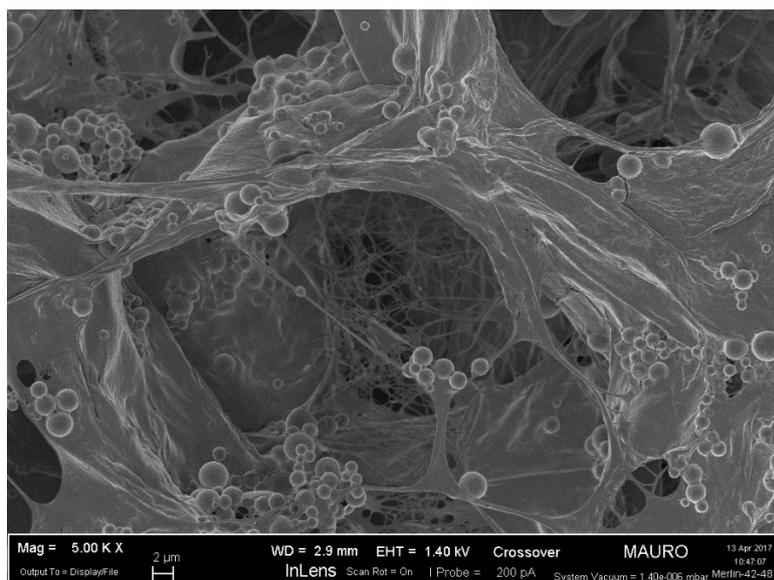


Figura 4.1 Immagine FESEM relativa al campioni di collagene/MBG_SD_Sr4% non reticolato

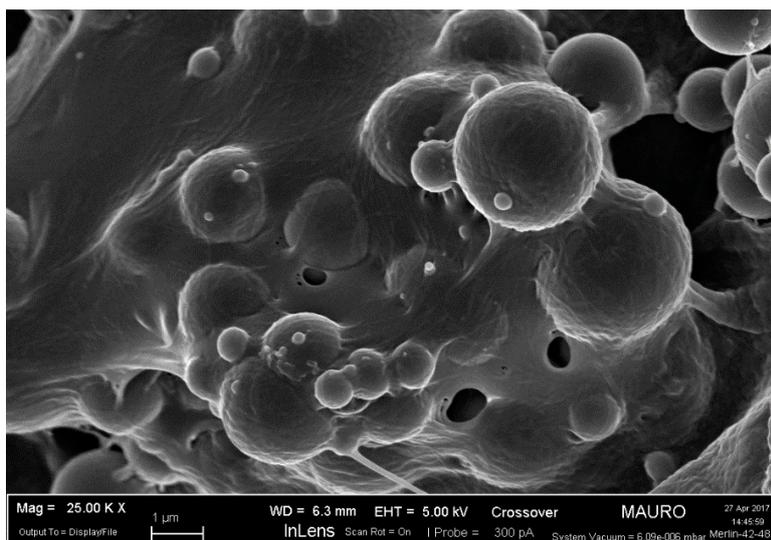


Figura 4.2 Immagine FESEM relativa al campione di collagene/MBG_SD_Sr4% non reticolato

4.2.1.2 Analisi morfologica tramite SEM

- *Collagene/MBG_SD_Sr4% non reticolato*

Le immagini ottenute tramite SEM del campione non reticolato di collagene e particelle MBG_SD_Sr4% sono state riportate in figura 4.3 e in [figura 4.4](#). Le immagini confermano la dispersione omogenea delle particelle MBG_SD_Sr4% all'interno della matrice di collagene. Nella prima immagine (3300x) è possibile vedere una fibra di collagene su cui sono presenti delle particelle di MBG_SD_Sr4%. La seconda immagine (8700x) mostra la morfologia sferica delle particelle di MBG_SD_Sr4% adese alle pareti di collagene.

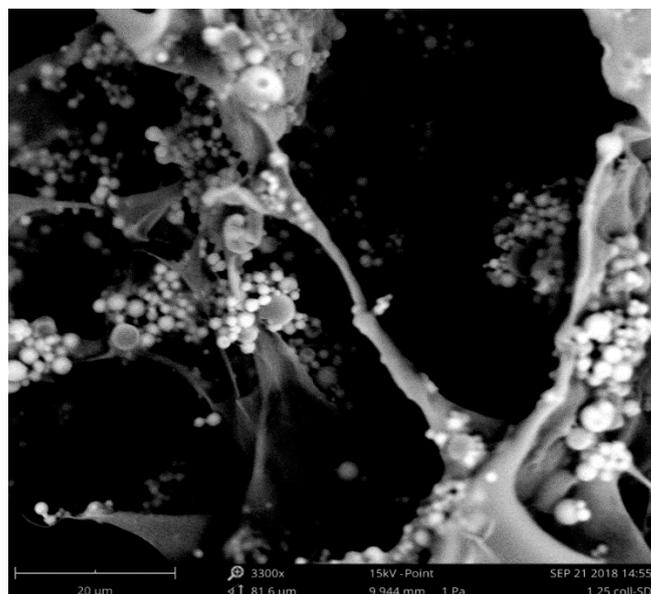


Figura 4.3 Immagine SEM relativa al campione di collagene/MBG_SD_Sr4% non reticolato

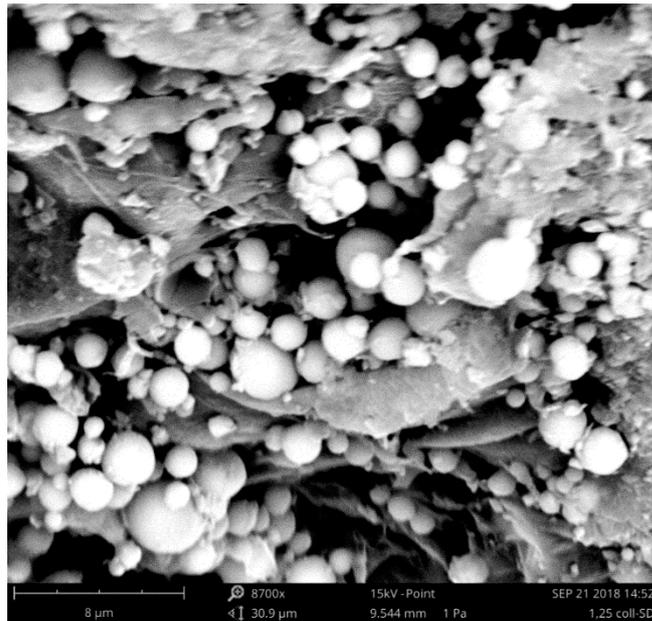


Figura 4.4 Immagine SEM relativa al campione di collagene/MBG_SD_Sr4% non reticolato

- *Collagene/MBG_SD_Sr4% reticolato con 4starPEG*

Le immagini SEM del campione di collagene e particelle MBG_SD_Sr4% reticolato con 4starPEG riportate in figura 4.5 e in [figura 4.6](#) mostrano come, grazie alla reticolazione, il collagene sia riuscito a formare una rete di fibre più fitta rispetto al campione non reticolato. Nella foto a ingrandimenti superiori (7100x) si osserva, inoltre, come le fibre di collagene si siano autoassemblate circondando le particelle di vetro bioattivo.

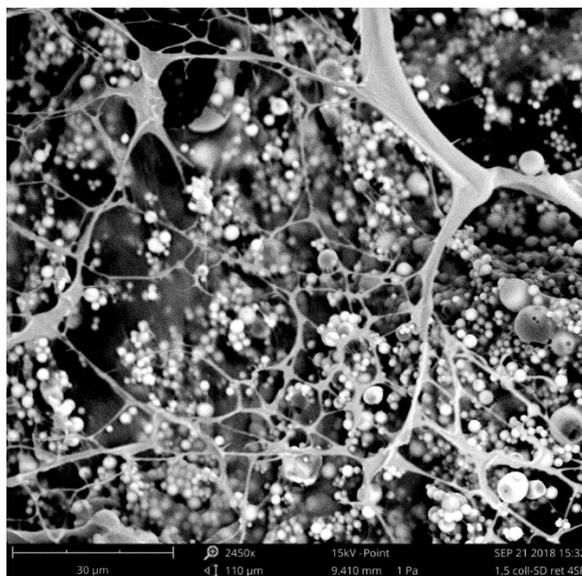


Figura 4.5 Immagine SEM relativa al campione di collagene/MBG_SD_Sr4% reticolato con 4starPEG

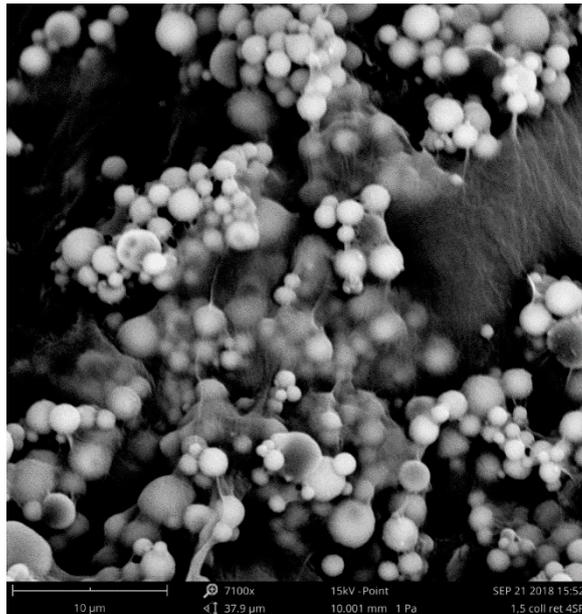


Figura 4.6 Immagine SEM relativa al campione di collagene/MBG_SD_Sr4% reticolato con 4starPEG

- *Collagene/MBG_SD_Sr4% reticolato con genipina*

La figura 4.7 e la [figura 4.8](#) riportano le immagini SEM del campione di collagene MBG_SD_Sr4% reticolato con genipina. La reticolazione chimica ha portato a una migliore ricostituzione delle fibre di collagene intorno alle particelle di MBG_SD_Sr4% rispetto al campione non reticolato.

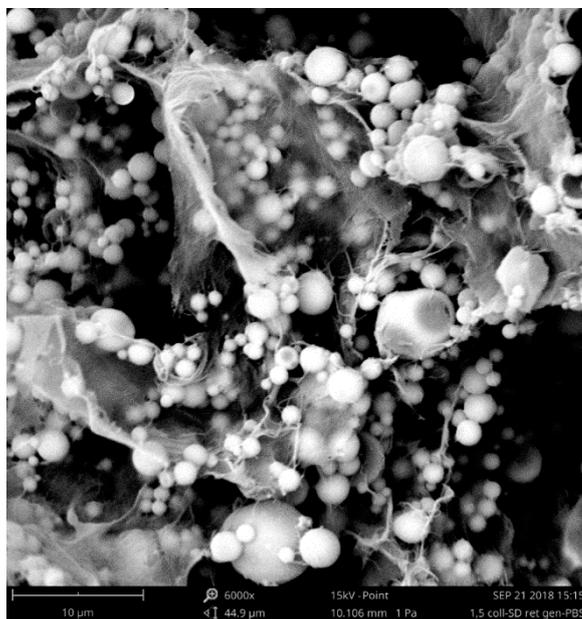


Figura 4.7 Immagine SEM relativa al campione di collagene/MBG_SD_Sr4% reticolato con genipina

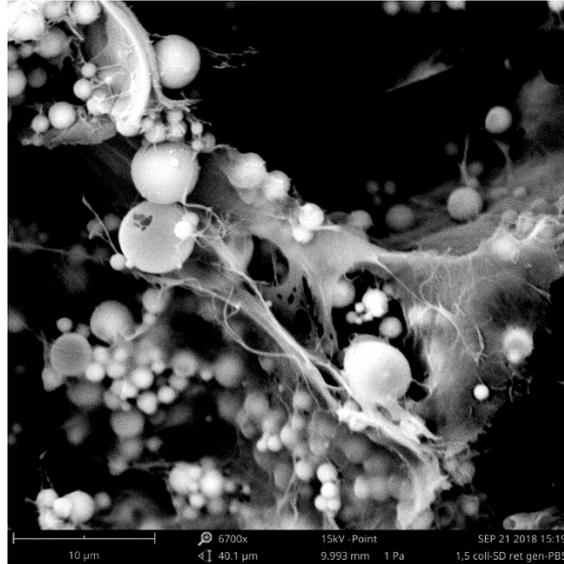


Figura 4.8 Immagine SEM relativa al campione di collagene/MBG_SD_Sr4% reticolato con genipina

4.2.2 Sistemi 1.5% collagene/MBG_SG_Sr4%

4.2.2.1 Analisi morfologiche tramite FESEM

Le immagini FESEM del campione non reticolato di collagene/MBG_SG_Sr4% (figura 4.9 e figura 4.10) hanno mostrato una buona ricostituzione delle fibre collagene. A bassi ingrandimenti (5000x) è possibile vedere come il collagene abbia formato una fitta rete di fibre sulle quali sono adese le particelle di MBG_SG_Sr4% visibili distintamente a ingrandimenti superiori (50000x). La morfologia mostrata in queste immagini è quella che ci aspettiamo presenti un sistema ibrido, ovvero un perfetto autoassemblamento del collagene con le particelle MBG_SG_Sr4% adese alle fibre. Tale morfologia non è però presente in tutto il campione.

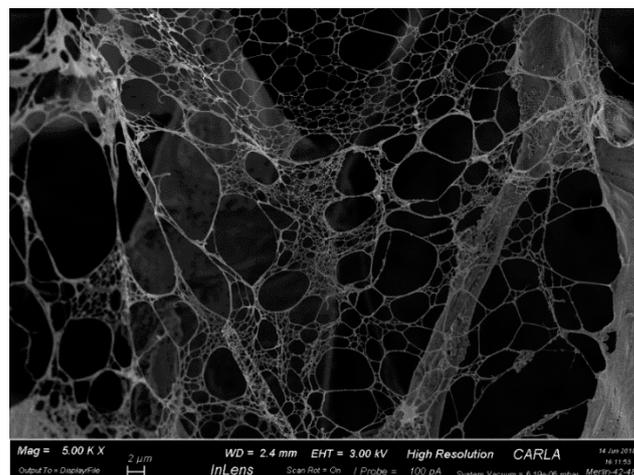


Figura 4.9 Immagine FESEM relativa al campione di collagene/MBG_SG_Sr4% non reticolato

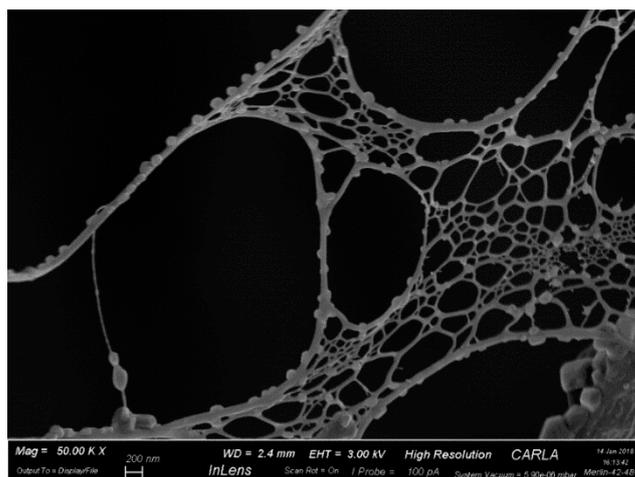


Figura 4.10 Immagini FESEM relativa al campione di collagene/MBG_SG_Sr4% non reticolato

Infatti, visualizzando a ingrandimenti superiori (250000x) altre zone del campione le particelle di MBG_SG_Sr4% hanno formato degli agglomerati (figura 4.11). La dimensione nanometrica delle particelle di MBG_SG_Sr4% se da un lato ha permesso un ottimo autoassemblamento delle fibre di collagene creando un ambiente biomimetico, dall'altro ha causato la formazione di importanti agglomerati all'interno della matrice. Inoltre le particelle di MBG_SG_Sr4% risultano meno ricoperte da fibre rispetto alle particelle MBG_SD_Sr4% viste in precedenza.

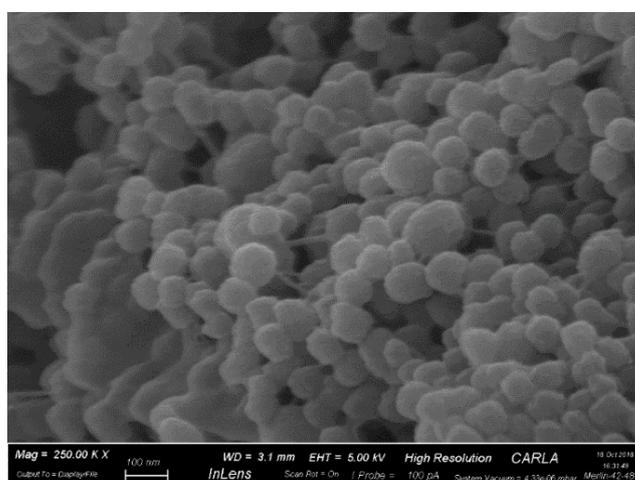


Figura 4.11 Immagine FESEM relativa al campione di collagene/MBG_SG_Sr4% non reticolato

4.2.2.2 Analisi morfologica tramite SEM

- *Collagene/MBG_SG_Sr4% non reticolato*

Le immagini SEM del campione non reticolato di collagene/MBG_SG_Sr4% (figura 4.12 e figura 4.13), realizzate con ingrandimenti di 9200x e 10500x, hanno confermato la buona ricostituzione del collagene in fibre e pareti sulle quali si collocano agglomerati di particelle MBG_SG_Sr4%.

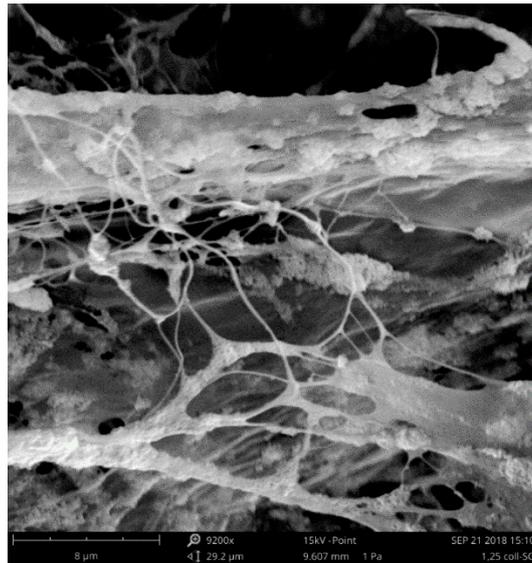


Figura 4.12 Immagine SEM relativa al campione di collagene/MBG_Sr4% non reticolato

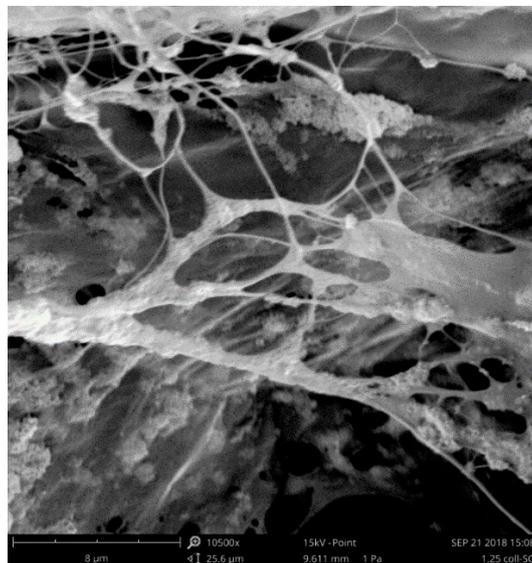


Figura 4.13 Immagine SEM relativa al campione di collagene/MBG_Sr4% non reticolato

- *Collagene/MBG_Sr4% reticolato con 4starPEG*

In figura 4.14 e in figura 4.15 sono mostrate le immagini SEM del campione collagene/MBG_Sr4% reticolato con 4starPEG. Gli ingrandimenti utilizzati sono 4700x per l'immagine in figura 4.14, 9200x per l'immagine in figura 4.15. Dalle immagini è possibile riscontrare che il campione di collagene/MBG_Sr4% reticolato con 4starPEG presenta una morfologia molto simile a quella del campione di collagene/MBG_Sr4% sottoposto a semplice reticolazione fisica non evidenziando, dunque, particolari cambiamenti a seguito della reticolazione. Sulle fibre e sulle pareti create dal collagene è possibile vedere le particelle MBG_Sr4% e alcuni sali derivanti dal PBS utilizzato durante la reticolazione.

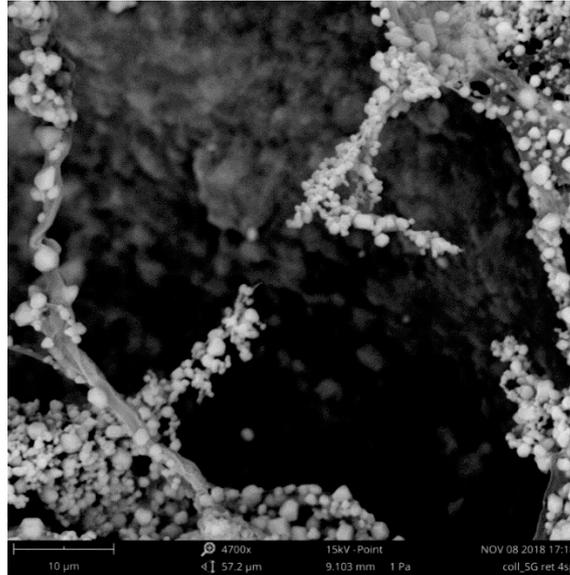


Figura 4.14 Immagine SEM relativa al campione di collagene/MBG_Sr4% reticolato con 4starPEG

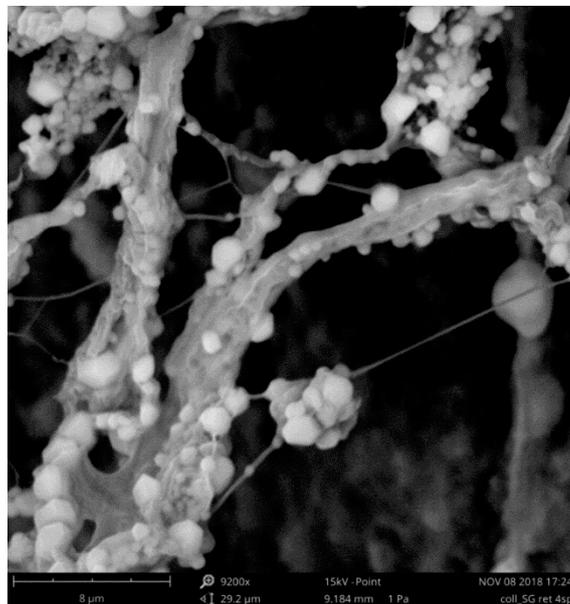


Figura 4.15 Immagine SEM relativa al campioni di collagene/MBG_Sr4% reticolato con 4starPEG

- *Collagene/MBG_Sr4% reticolato con genipina*

La figura 4.16 e la figura 4.17 mostrano le immagini SEM del campione collagene/MBG_Sr4% reticolato con genipina. In particolare, l'immagine in figura 4.16 è stata ottenuta con un ingrandimento di 9100x, l'immagine in figura 4.17, invece, con un ingrandimento di 23500x. Il campione presenta una morfologia completamente differente rispetto al campione collagene/MBG_Sr4% non reticolato e al campione collagene/MBG_Sr4% reticolato con 4starPEG. Il collagene, infatti, ha formato una ramificazione di fibre molto fitta all'interno della quale sono inglobate le particelle MBG_Sr4%.

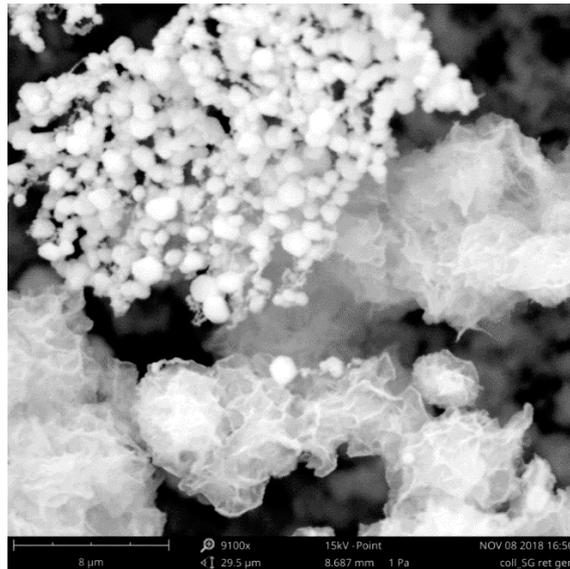


Figura 4.16 Immagine SEM relativa al campione di collagene/MBG_SG_Sr4% reticolato con genipina



Figura 4.17 Immagine SEM relativa al campione di collagene/MBG_SG_Sr4% reticolato con genipina

4.3 Valutazione spettroscopica tramite ATR-FTIR

Le analisi con spettroscopia a IR sono state effettuate per osservare la variazione degli spettri in base alla presenza di particelle di vetro bioattivo mesoporoso SD_Sr4% o SG_Sr4% nella matrice di collagene, dove è possibile rilevare qualitativamente la presenza dei picchi tipici dei legami chimici presenti nei componenti dei due sistemi ibridi.

Di seguito vengono riportate le sole analisi relative ai sistemi ibridi a base di collagene al 1.5% in peso in quanto non sono state riscontrate significative differenze con le analisi ricavate per concentrazioni inferiori di collagene.

La [figura 4.18](#) mostra un confronto tra i grafici ATR-FTIR dei campioni di solo collagene, di collagene/MBG_SD_Sr4% e di collagene/MBG_SG_Sr4% nella finestra di lunghezze d'onda compresa tra 1800 cm^{-1} e 700 cm^{-1} .

Nello spettro del solo collagene sono state individuate le tipiche bande centrate a 1645 cm^{-1} , 1539 cm^{-1} e 1445 cm^{-1} per ammidine I (stretching C=O), ammidine II (stretching NH) e ammidine III (bending CN) rispettivamente. [67], [126]

Gli spettri dei due materiali compositi hanno mostrato le bande relative all'ammidine I e ammidine II ma non quella dell'ammidine III poiché nascosta dalle bande tipiche dei vetri bioattivi. Quest'ultime sono relative al bending del Si-O-Si e allo stretching del Si-O-Si e sono state individuate rispettivamente a 1070 cm^{-1} e 947 cm^{-1} . Da letteratura risulta che un'ulteriore banda tipica degli MBG dovrebbe collocarsi a 464 cm^{-1} ma non è stato possibile individuarla poiché lo strumento è in grado di rilevare i picchi fino a un massimo di lunghezza d'onda pari a 700 cm^{-1} . [127]

Gli spettri dei sistemi ibridi non hanno presentato picchi relativi a legami tra il collagene e le particelle di vetro bioattivo suggerendo un semplice inglobamento. Al fine di migliorare l'interfaccia tra i due costituenti si potrebbe pensare di funzionalizzare la superficie delle particelle di vetro bioattivo con un gruppo -NH_2 in modo da formare un forte legame con il gruppo carbossilico presente nel collagene. [126]

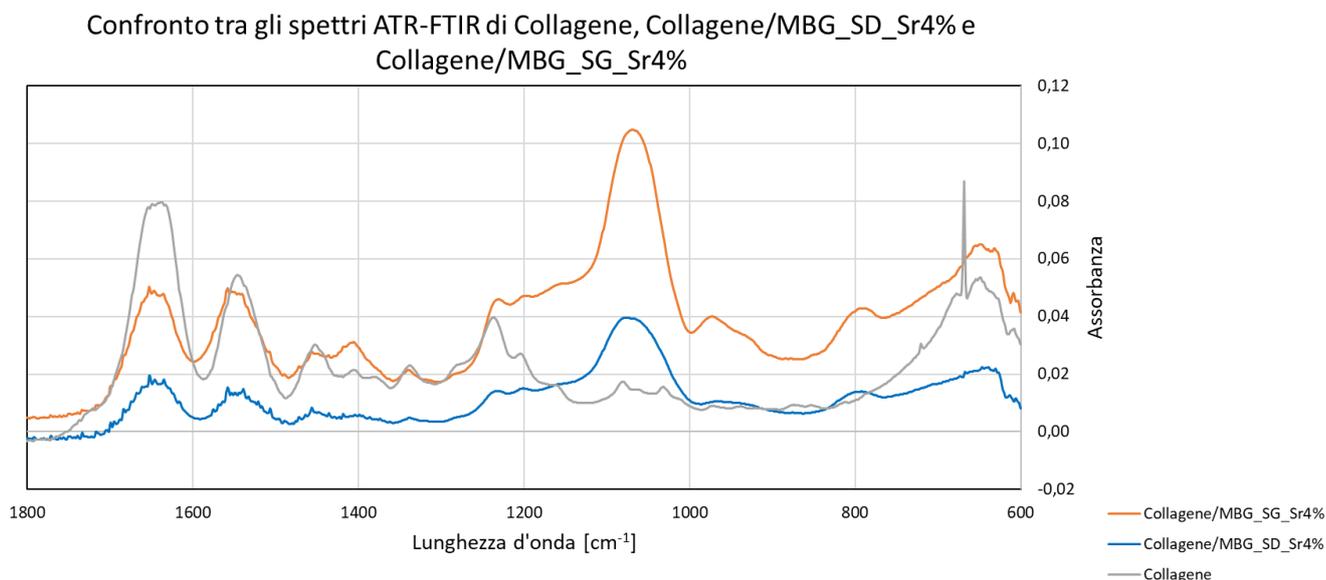


Figura 4.18 Grafico ATR-FTIR dei campioni di collagene, collagene/MBG_SD_Sr4% e collagene/MBG_SG_Sr4%

4.4 Valutazione reologica

4.4.1 Proprietà reologiche delle sospensioni di collagene/MBG

I biomateriali per applicazioni di stampa 3D devono mostrare proprietà reologiche tali da consentire un'estrusione corretta e un'elevata precisione di stampa, devono quindi garantire lo scorrimento durante la fase di estrusione e un veloce recupero della viscosità al momento della deposizione. [82], [83]

Le analisi reologiche sono state condotte su sospensioni di collagene/MBG_SD_Sr4% e collagene/MBG_SG_Sr4% a diverse concentrazioni di collagene per valutare e confrontare le loro proprietà visco-elastiche in condizioni di stress tipiche dei processi di stampa. [47] Delle stesse sospensioni è stata, inoltre, verificata la transizione sol-gel indotta dalla temperatura (37°C) e la formazione di una struttura stabile.

Ogni prova è stata eseguita per tre volte utilizzando sempre un nuovo campione. I grafici, realizzati con il programma Excel, riportano la media delle tre prove e le deviazioni standard dei vari punti sperimentali. Nel caso delle prove di *time sweep* non è stata riportata la deviazione standard poiché il suo valore è trascurabile.

4.4.1.1 Sistemi di collagene/MBG_SD_Sr4%

- *Flow Ramp*

Al fine di verificare il comportamento pseudo-plastico delle sospensioni sono state eseguite prove di *flow ramp* sottoponendo il materiale a uno shear rate crescente da $0,01 \text{ s}^{-1}$ fino a 1000 s^{-1} e mantenendo la temperatura della piastra Peltier a 4°C .

La sospensione contenente l'1% di collagene e particelle di vetro bioattivo MBG_SD_Sr4% presenta un andamento pseudo-plastico visibile nel grafico in figura 4.19. In particolare, la sospensione presenta un valore massimo di viscosità pari a $54,10 \text{ Pa}\cdot\text{s}$ e una viscosità minima di $0,13 \text{ Pa}\cdot\text{s}$.

La sospensione riporta un valore del limite di scorrimento pari a $28,3 \text{ Pa}$ come è visibile dal grafico in figura 4.20.

Flow Ramp 1% collagene/MBG_SD_Sr4%

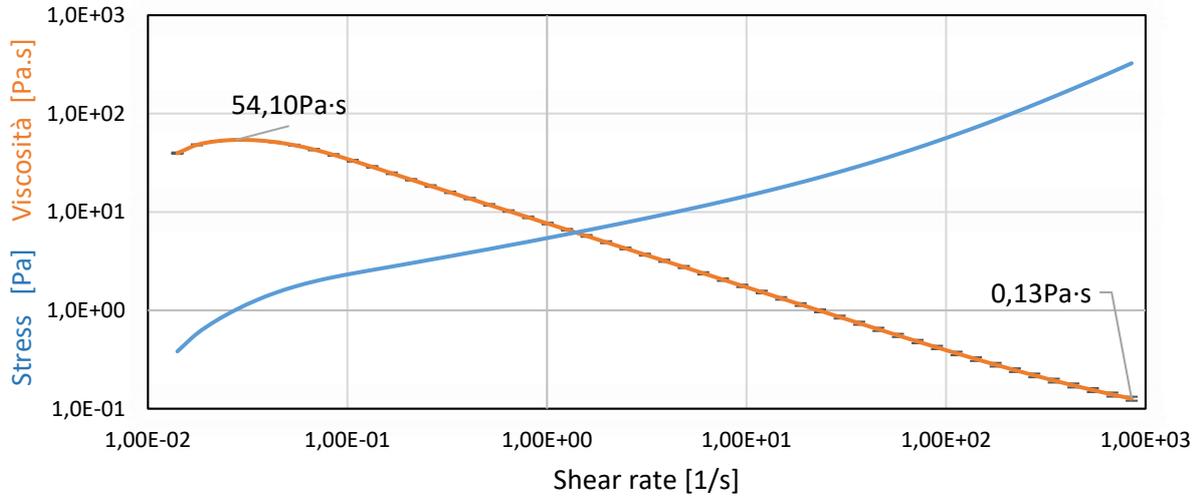


Figura 4.19 Flow ramp 1% collagene/MBG_SD_Sr4%

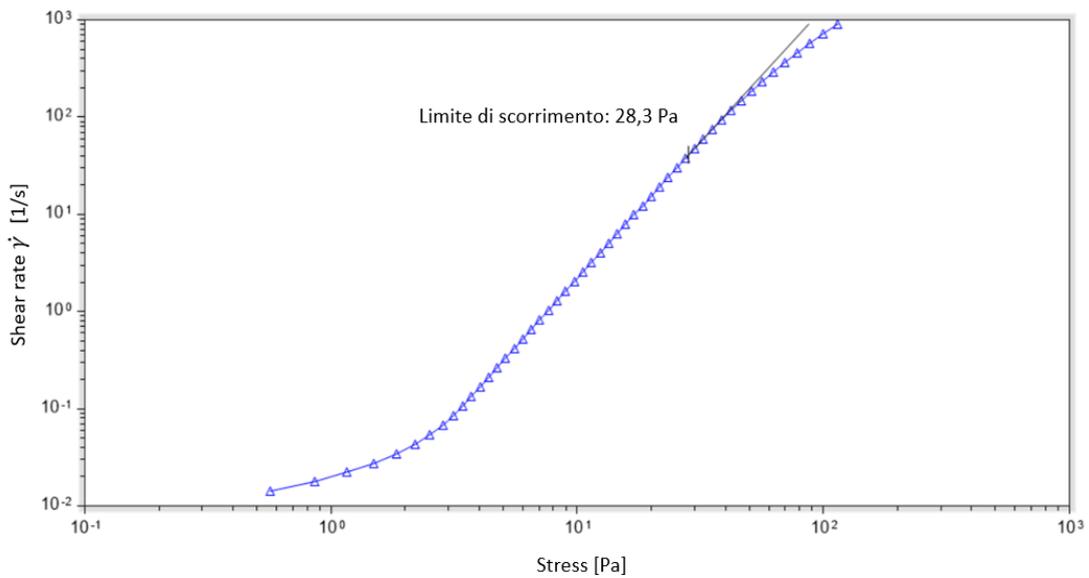


Figura 4.20 Flow ramp 1% collagene/MBG_SD_Sr4%

Il grafico ottenuto per la sospensione 1.25% collagene/ MBG_SD_Sr4% riportato in figura 4.21 mostra un comportamento pseudo-plastico della sospensione al variare dello shear rate applicato. La viscosità massima risulta essere pari a $63,60 Pa \cdot s$ e la viscosità minima risulta essere $0,14 Pa \cdot s$. Il valore del limite di scorrimento riportato nel grafico in [figura 4.22](#) è di $28,40 Pa$.

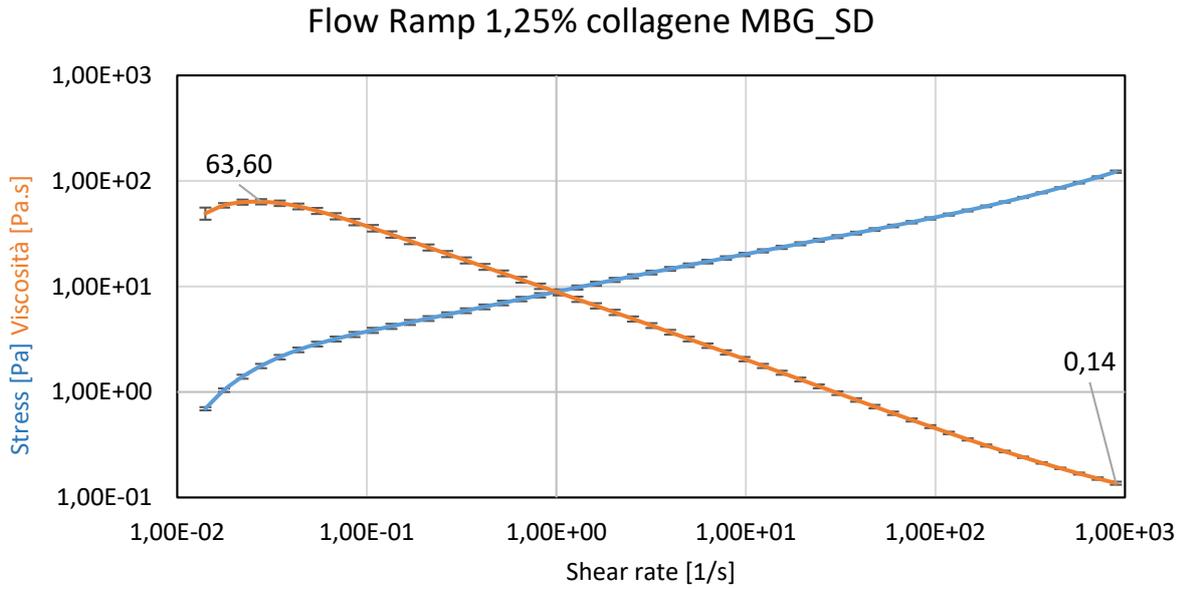


Figura 4.21 Flow ramp 1.25% collagene/MBG_SD_Sr4%

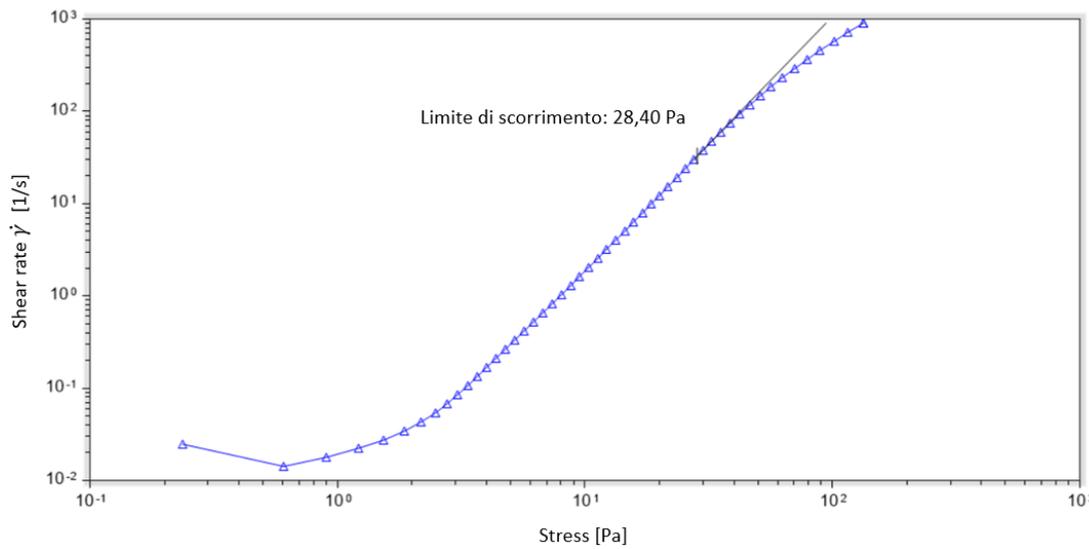


Figura 4.22 Flow ramp 1.25% collagene/MBG_SD_Sr4%

La sospensione con l'1.5% di collagene e particelle MBG_SD_Sr4% risulta avere un andamento pseudo-plastico visibile nel grafico di figura 4.23. La viscosità massima è 110,08 Pa·s e la viscosità minima è 0,16 Pa·s. Il valore di limite di scorrimento, riportato nel grafico in [figura 4.24](#), è invece pari a circa 40,67 Pa.

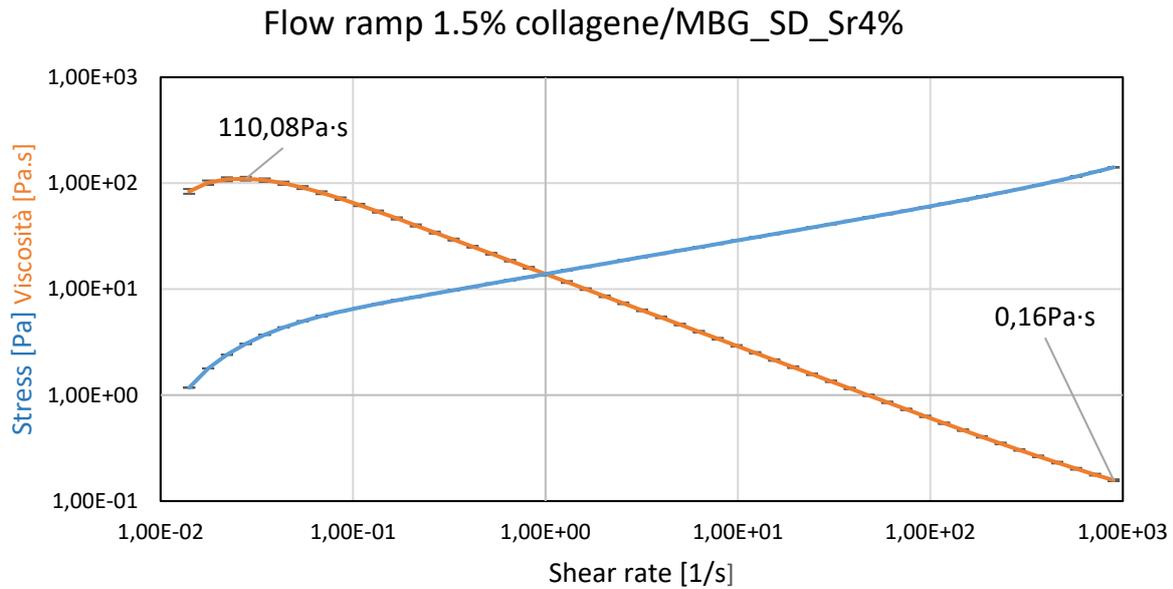


Figura 4.23 Flow ramp 1.5% collagene/MBG_SD_Sr4%

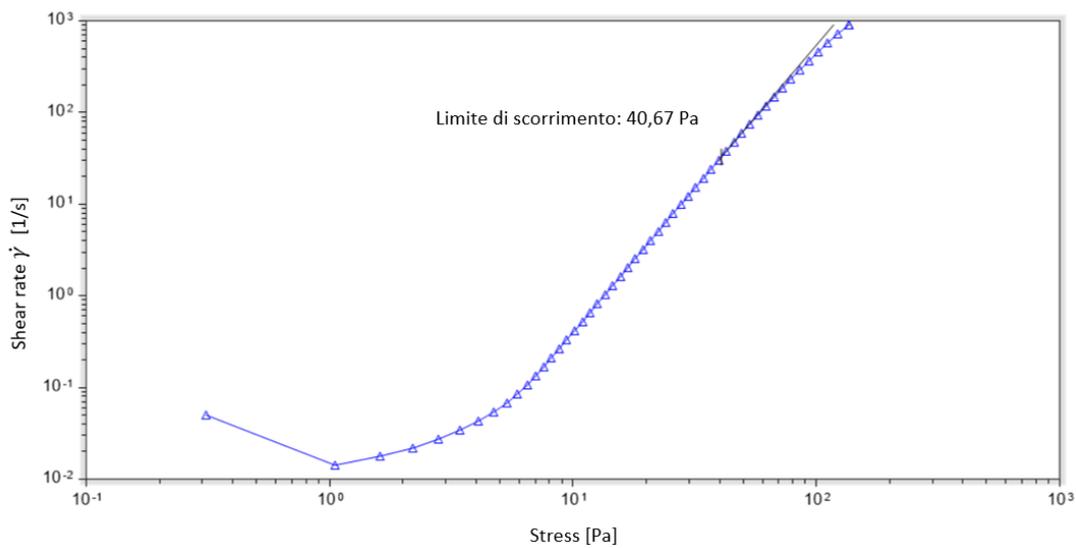


Figura 4.24 Flow ramp 1.5% collagene/MBG_SD_Sr4%

Per facilitare il confronto tra le tre sospensioni, i valori della viscosità massima, della viscosità minima e del limite di scorrimento sono stati riportati in [tabella 4.1](#).

Durante le prove di *flow ramp* tutte le sospensioni hanno presentato un comportamento pseudo-plastico, ovvero la loro viscosità è diminuita con l'incrementare dello shear rate a causa dell'orientamento delle catene polimeriche.

In generale, l'aumento della percentuale di collagene influisce sulla viscosità massima raggiunta dalla sospensione incrementandola ma sembra non aver influenzato la viscosità minima raggiunta in corrispondenza di uno shear rate di 1000 s^{-1} . Il limite di scorrimento, indice della stabilità della sospensione dopo estrusione, è aumentato con l'incremento della concentrazione di collagene.

In particolare, passando da una concentrazione di collagene dell'1% a quella dell'1.5% il valore della viscosità massima è aumentato del 103,5%, quello del limite di scorrimento è incrementato del 43,7%.

Sospensione	Viscosità massima [Pa·s]	Viscosità minima [Pa·s]	Limite di scorrimento [Pa]
1% collagene/MBG_SD_Sr4%	54,10	0,13	28,31
1.25% collagene/MBG_SD_Sr4%	63,0	0,14	28,40
1.5% collagene/MBG_SD_Sr4%	110,08	0,16	40,67

Tabella 4.1 Confronto dei dati ottenuti nella flow ramp delle sospensioni di collagene/MBG_SD_Sr4%

- *Peak Hold*

Per verificare il comportamento della sospensione durante la stampa, tramite la prova di *peak hold* sono stati simulati gli stress tipici di un processo di stampa mantenendo la temperatura del sistema a 4°C . Il grafico ottenuto durante il test di *peak hold* della sospensione 1% collagene/MBG_SD_Sr4% è mostrato in [figura 4.25](#). La sospensione presenta in corrispondenza della prima fase (1000 s^{-1}) una viscosità di $0,07\text{ Pa}\cdot\text{s}$ e dopo 10,11 secondi dalla rimozione della sollecitazione di 1000 s^{-1} giunge a una viscosità di $5,72\text{ Pa}\cdot\text{s}$. La viscosità continua ad aumentare fino a giungere ad un valore di $7,95\text{ Pa}\cdot\text{s}$ alla fine della prova.

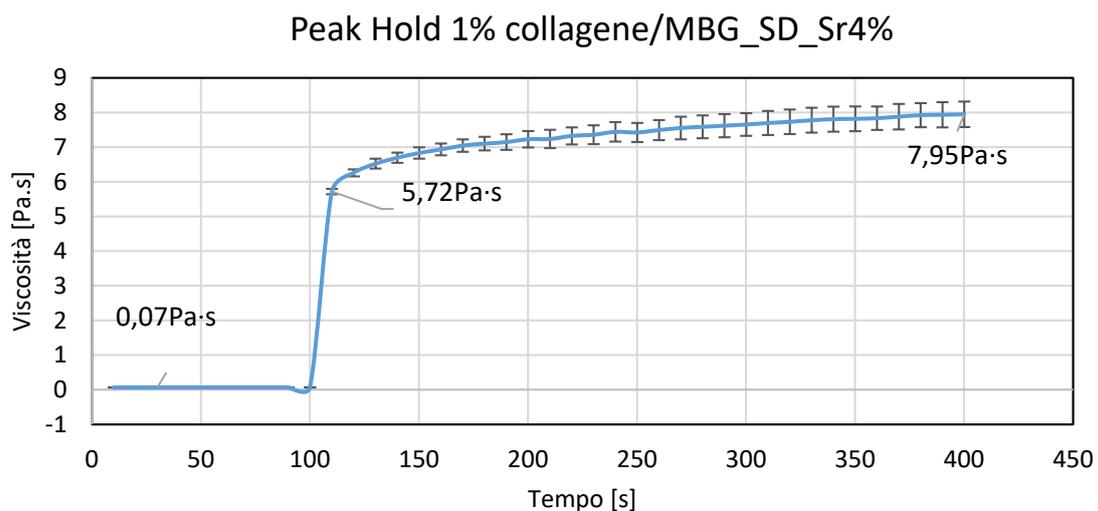


Figura 4.25 Peak hold 1% collagene/MBG_SD_Sr4%

Nel caso della sospensione 1.25% collagene/MBG_SD_Sr4% (figura 4.26) in corrispondenza della fase di estrusione (1000 s^{-1}) la viscosità è di $0,09 \text{ Pa}\cdot\text{s}$, nella fase di deposizione ($0,1 \text{ s}^{-1}$) dopo 10,12 secondi il valore della viscosità incrementa fino al valore di $16,59 \text{ Pa}\cdot\text{s}$. Si nota un aumento progressivo della viscosità fino a raggiungere un valore di $25,09 \text{ Pa}\cdot\text{s}$ a fine prova.

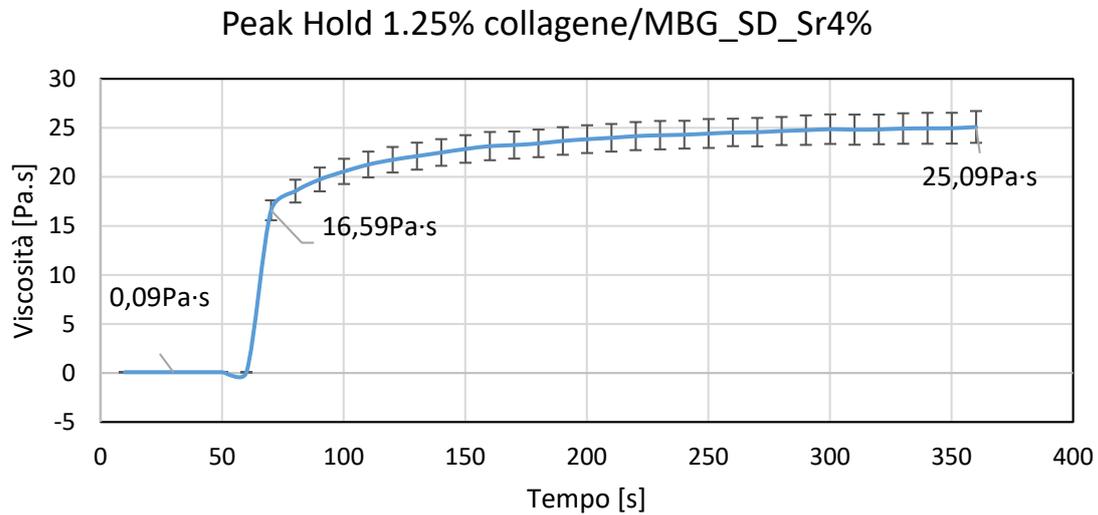


Figura 4.26 Peak hold 1.25% collagene/MBG_SD_Sr4%

Il grafico ottenuto per la sospensione 1.5% collagene/ MBG_SD_Sr4% mostrato in figura 4.27 risulta avere in corrispondenza del primo step una viscosità pari a $0,12 \text{ Pa}\cdot\text{s}$ mentre nella seconda fase raggiunge una viscosità di $28,80 \text{ Pa}\cdot\text{s}$ dopo 10,10 secondi. Anche in questo caso la viscosità tende ad aumentare fino a giungere al valore finale di $46,37 \text{ Pa}\cdot\text{s}$.

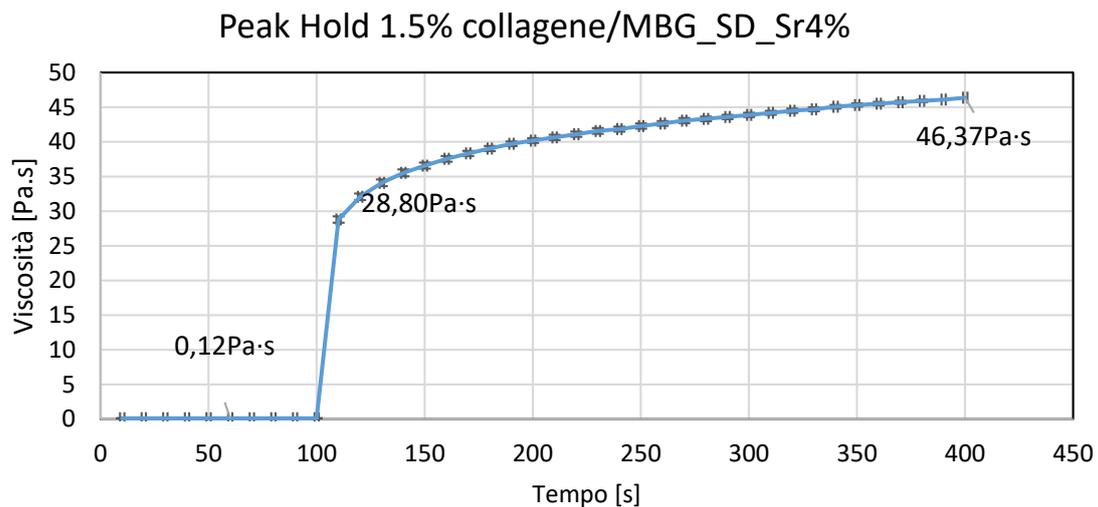


Figura 4.27 Peak hold 1.5% collagene/MBG_SD_Sr4%

Come si può evincere dalla tabella 4.2, l'aumento della concentrazione di collagene ha in generale portato all'aumento del valore della viscosità della sospensione. I brevi tempi di recupero sono variati in maniera non significativa con l'incremento della concentrazione di collagene.

La sospensione che ha mostrato una maggiore viscosità a seguito del primo step e maggiore viscosità finale è stata quella con l'1.5% di collagene e particelle MBG_SD_Sr4%.

Sospensione	Viscosità prima fase [Pa·s]	Viscosità seconda fase [Pa·s]	Tempo di ripresa [s]	Viscosità finale [Pa·s]
1% collagene/MBG_SD_Sr4%	0,07	5,72	10,11	8
1.25% collagene/MBG_SD_Sr4%	0,09	16,59	10,13	25,09
1.5% collagene/MBG_SD_Sr4%	0,12	28,80	10,10	46,37

Tabella 4.2 Confronto dei dati ottenuti nella peak hold delle sospensioni di collagene/MBG_SD_Sr4%

- *Time sweep*

Le prove di *time sweep* effettuate a 37°C sottoponendo la sospensione a uno sforzo dell'1% hanno permesso di identificare la transizione sol-gel e la formazione di un gel stabile in dipendenza del tempo. In [figura 4.28](#) è mostrato il grafico risultante dalla prova di *time sweep* della sospensione 1% collagene/MBG_SD_Sr4%. Il punto di transizione sol-gel, ovvero quando il valore del modulo G' supera quello del modulo G'', è collocato a 80,48 secondi dall'inizio della prova. La struttura gelificata stabile si forma, invece, quando tra i due moduli si crea un sostanziale gap e in questo caso è avvenuto dopo circa 8 minuti dall'inizio della prova. Il modulo G' tende a crescere fino a giungere a un valore finale di 146,56 Pa.

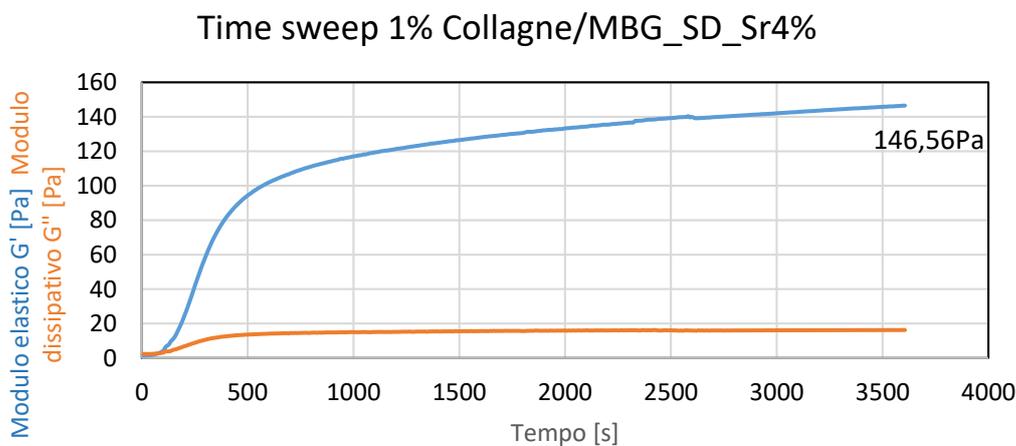


Figura 4.28 Time sweep 1% collagene/MBG_SD_Sr4%

La sospensione 1.25% collagene/MBG_SD_Sr4% (figura 4.29) mostra la transizione sol-gel nei primi secondi della prova, la formazione di un gel stabile si è ottenuta dopo 8 minuti dall'inizio della prova. Il modulo G' aumenta durante la prova giungendo a un valore finale di 245,35 Pa.

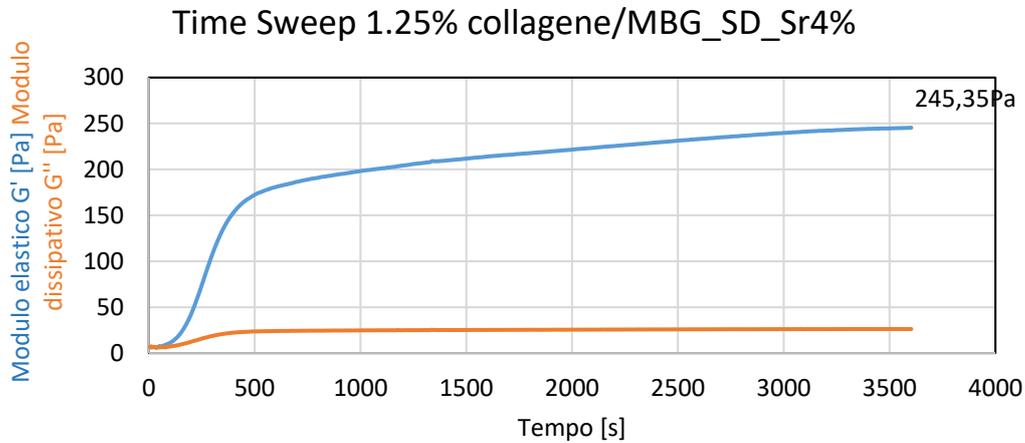


Figura 4.29 Time sweep 1.25% collagene/MBG_SD_Sr4%

Il grafico relativo alla prova di *time sweep* della sospensione 1.5% collagene/ MBG_SD_Sr4% in figura 4.30 mostra al secondo 127,3 la transizione sol gel e al minuto 12 la formazione di un gel stabile. Il valore di G' cresce fino a giungere alla fine della prova un valore di 188,72 Pa.

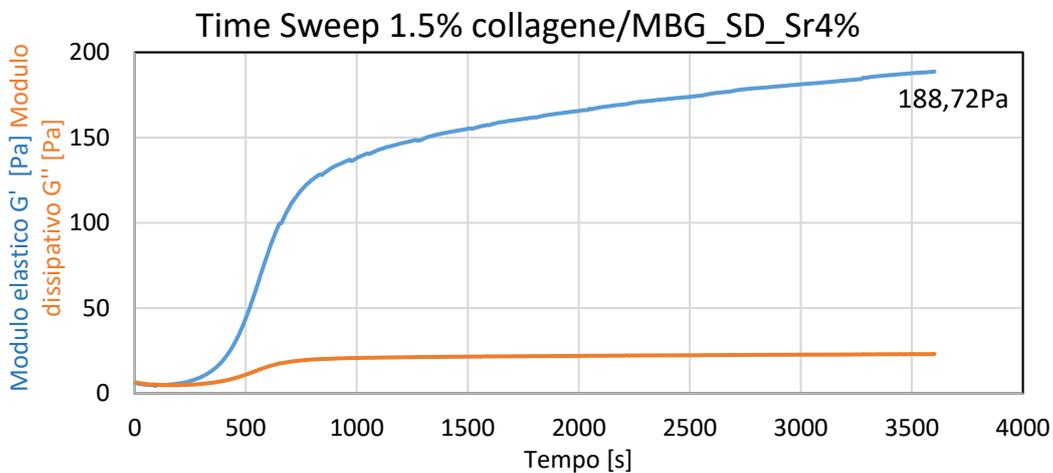


Figura 4.30 Time sweep 1.5% collagene/MBG_SD_Sr4%

In tabella 4.3 è visibile il confronto tra i valori del modulo G' individuati per le tre sospensioni. La sospensione con 1.25% collagene/MBG_SD_Sr4% ha raggiunto alla fine della prova un valore maggiore di G' rispetto alle altre sospensioni. In tutti e tre i casi la curva di G' non ha raggiunto un plateau alla fine

della prova ma ha mostrato un andamento crescente che suggerisce un ulteriore aumento del modulo nel caso di prolungamento dei tempi di gelificazione a 37°C.

Le sospensioni hanno presentato la transizione sol-gel entro i primi 130 secondi dall'inizio della prova. Dopo la transizione sol-gel il modulo G' è incrementato superando ampiamente quello di G'' . In tutte e tre le prove di *time sweep*, tale divario si è formato dopo massimo 12 minuti segnalando la formazione di strutture gelificate stabili con un comportamento più simile a un solido elastico. Il rapido raggiungimento di una struttura solida grazie alla gelificazione a 37°C può essere utilizzato in sede di stampa per aumentare la rigidità della struttura appena estrusa al fine di evitare la sua deformazione.

La curva di G' in tutti e tre i casi non raggiunge un valore di plateau alla fine della prova ma mostra un andamento crescente suggerendo un suo ulteriore aumento del modulo in caso di prolungamento dei tempi di gelificazione.

Sospensioni	Modulo G' dopo 60 minuti a 37°C [Pa]
1% collagene/MBG_SD_Sr4%	146,55
1.25% collagene/MBG_SD_Sr4%	243,35
1.5% collagene/MBG_SD_Sr4%	188,72

Tabella 4.3 Confronto dei dati ottenuti nella *time sweep* delle sospensioni di collagene/MBG_SD_Sr4%

4.4.1.2 Sistemi di collagene/MBG_SG_Sr4%

- *Flow ramp*

Le prove di *flow ramp* sono state realizzate per verificare il comportamento pseudo-plastico dei sistemi ibridi di collagene/MBG_SG_Sr4% a diversa concentrazione di collagene. In particolare, i campioni sono stati sottoposti a shear rate crescenti da $0,01 \text{ s}^{-1}$ fino a 1000 s^{-1} mantenendo la temperatura del sistema a 4°C.

Il grafico ottenuto tramite la prova di *flow ramp* della sospensione 1% collagene/MBG_SG_Sr4% è riportato in figura 4.31. Esso mostra un comportamento pseudo-plastico con una viscosità iniziale di 6,54 Pa·s e una viscosità finale di 0,08 Pa·s. Il limite di scorrimento è invece riportato nel grafico in [figura 4.32](#) e corrisponde a 10,21 Pa.

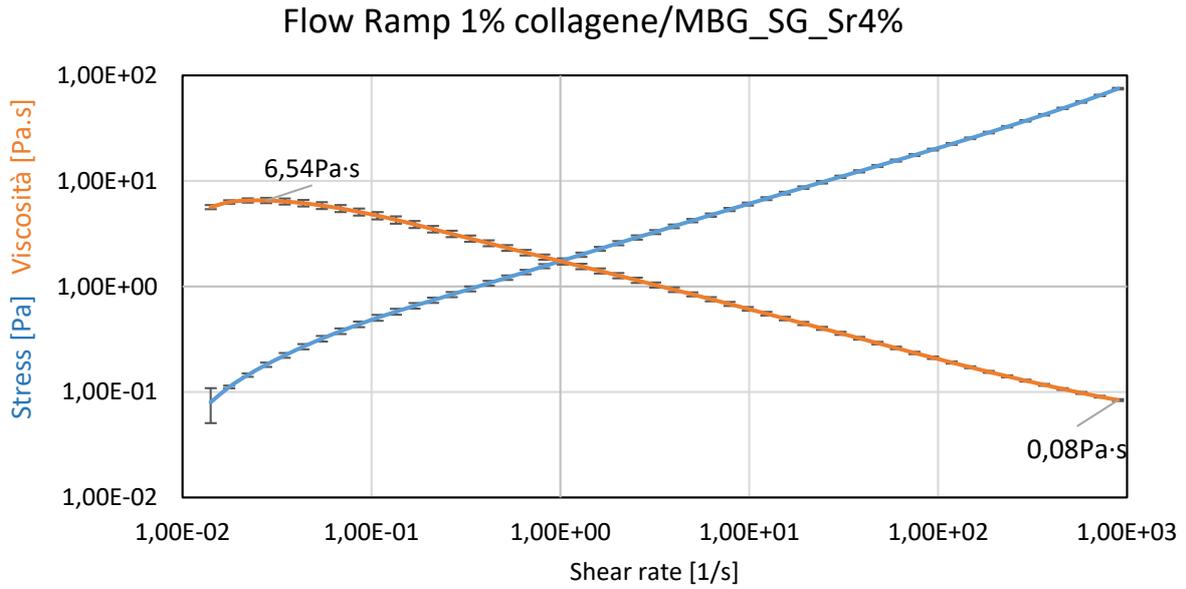


Figura 4.31 Flow ramp 1% collagene/MBG_SG_Sr4%

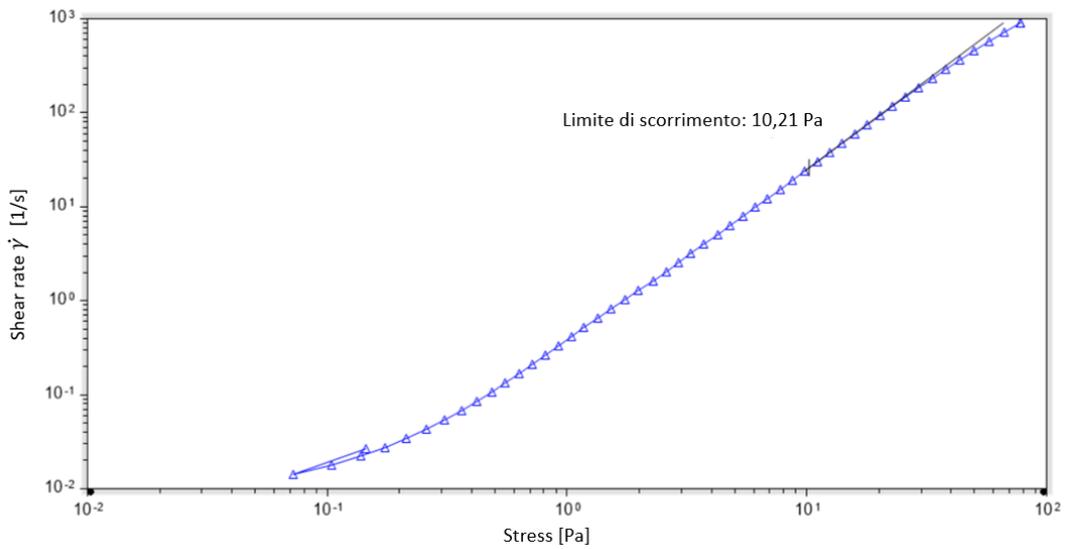


Figura 4.32 Flow ramp 1% collagene/MBG_SG_Sr4%

La sospensione 1.25% collagene/MBG_SG_Sr4% (figura 4.33) presenta un andamento pseudo-plastico con una viscosità massima di 14,22 Pa·s che con l'aumentare dello shear rate decresce fino al valore finale di 0,09 Pa·s. Il valore del limite di scorrimento, come è possibile vedere nel grafico in [figura 4.34](#) è di 10,34 Pa.

Flow Ramp 1.25% collagene/MBG_SG_Sr4%

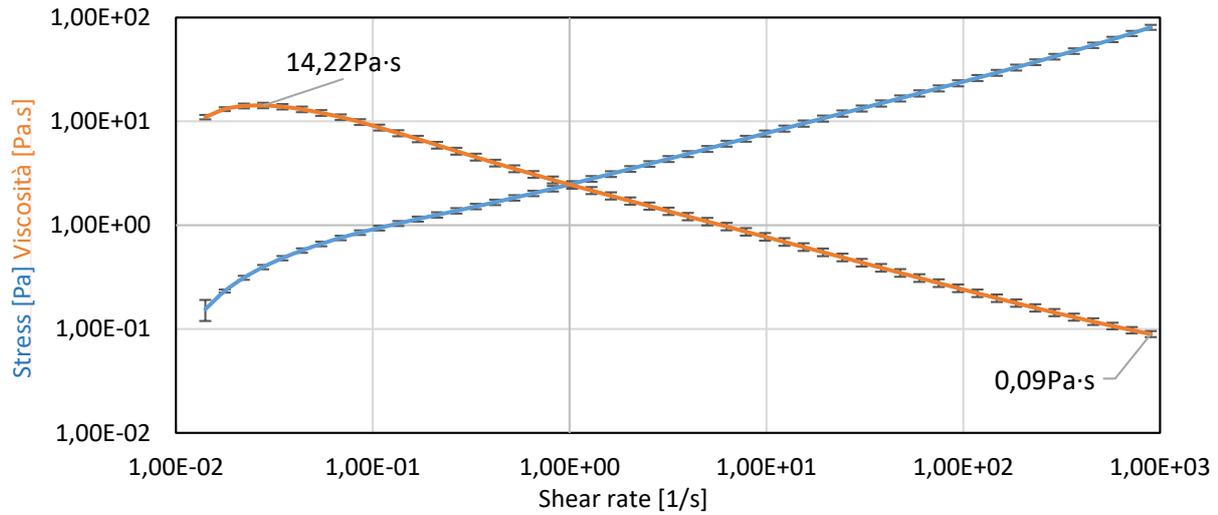


Figura 4.33 1.25% collagene/MBG_SG_Sr4%

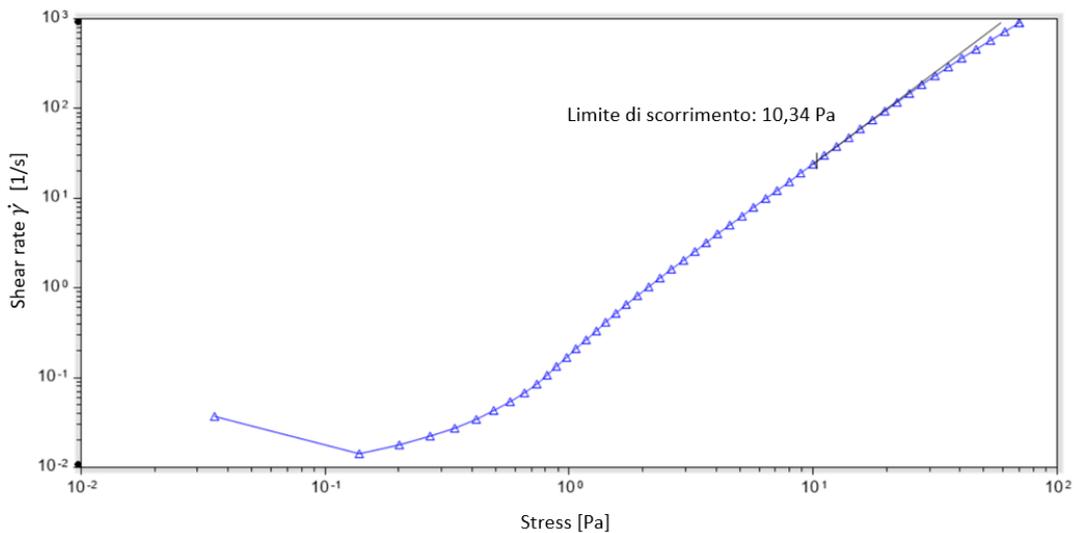


Figura 4.34 1.25% collagene/MBG_SG_Sr4%

La figura 4.35 e la [figura 4.36](#) mostrano i grafici relativi alla sospensione 1.5% collagene/MBG_SG_Sr4%. Quest'ultima presenta un andamento pseudo-plastico con una viscosità massima di 80,20 Pa.s e una viscosità minima di 0,15 Pa.s. Nel [grafico in figura 4.36](#) è mostrato il valore del limite di scorrimento equivalente a 36,63 Pa.

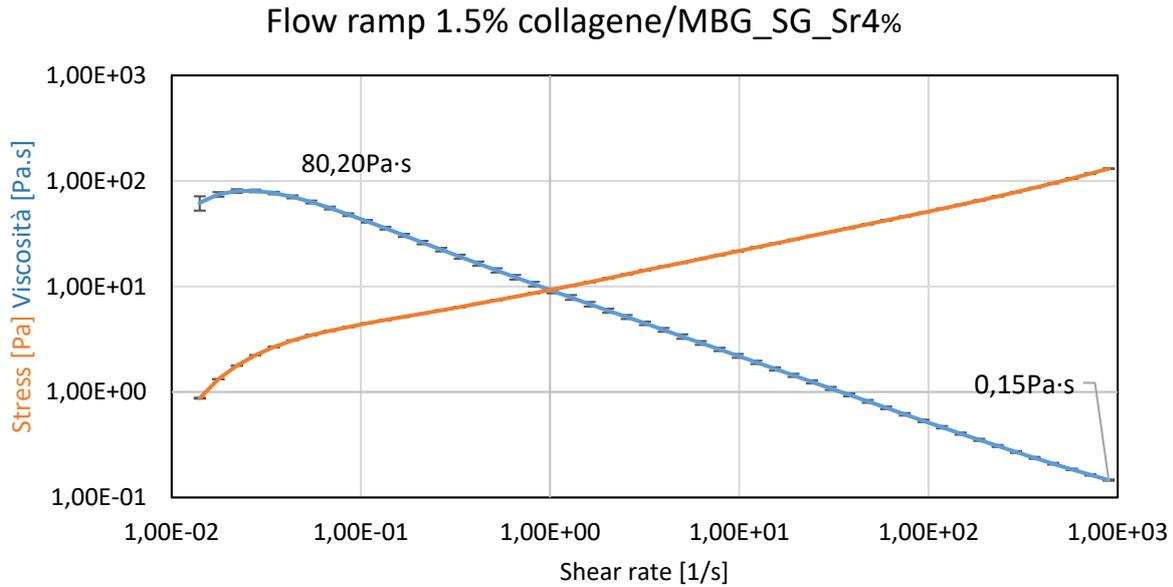


Figura 4.35 1.5% collagene/MBG_SG_Sr4%

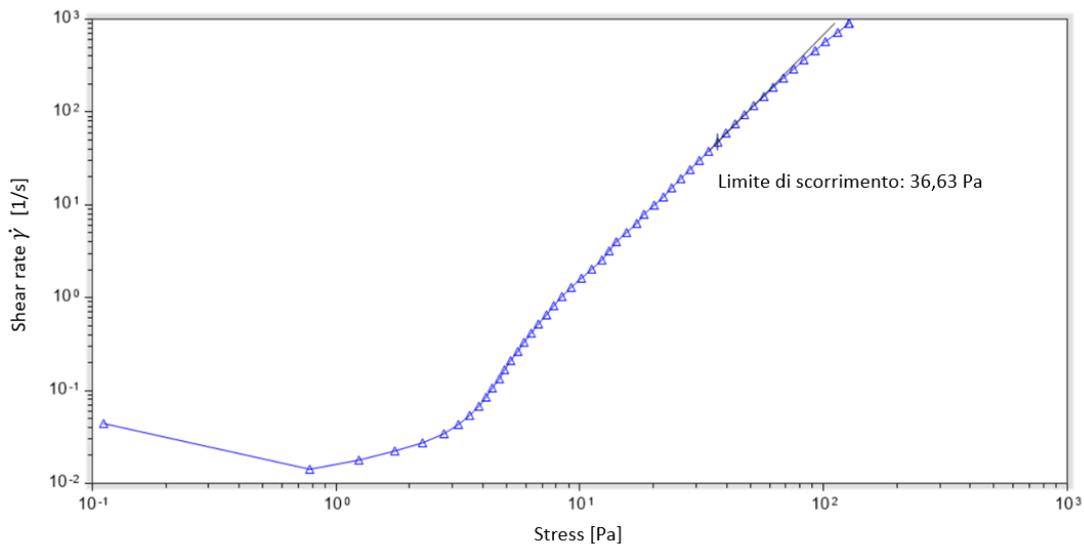


Figura 4.36 1.5% collagene/MBG_SG_Sr4%

In generale tutte le sospensioni hanno mostrato un comportamento pseudo-plastico dovuto all'orientamento delle catene polimeriche quando su di esse è applicato uno shear rate crescente. Come è possibile notare dalla tabella 4.4, l'incremento della percentuale di collagene influisce sulla viscosità massima della sospensione aumentandola, contrariamente, non ha alcun effetto sulla viscosità minima raggiunta alla fine della prova che risulta variare in modo non significativo. L'aumento della concentrazione di collagene ha inoltre incrementato il valore del limite di scorrimento, migliorando di conseguenza la stabilità della sospensione a seguito dell'estrusione. Nel caso della sospensione 1.5% collagene/MBG_SG_Sr4% i valori

di viscosità e di limite di scorrimento sono incrementati rispettivamente del 1126,3% e del 259% rispetto alla sospensione 1% collagene/MBG_SG_Sr4%.

Sospensione	Viscosità massima [Pa·s]	Viscosità minima [Pa·s]	Limite di scorrimento [Pa]
1% collagene/MBG_SG_Sr4%	6,54	0,08	10,21
1.25% collagene/MBG_SG_Sr4%	14,21	0,09	10,34
1.5% collagene/MBG_SG_Sr4%	80,20	0,15	36,63

Tabella 4.4 Confronto dei dati ottenuti nella flow ramp delle sospensioni di collagene/MBG_SG_Sr4%

- *Peak hold*

Tramite la prova di *peak hold* sono state simulate le fasi di un tipico processo di stampa. Il materiale è stato dunque sottoposto a shear rate di 1000 s^{-1} e di $0,1 \text{ s}^{-1}$ che simulano rispettivamente la fase di estrusione e la fase di deposizione. L'intera prova è stata condotta mantenendo la temperatura del sistema a 4°C .

Il grafico ottenuto tramite il test di *peak hold* della sospensione 1% collagene/MBG_SG_Sr4% è mostrato in [figura 4.37](#). La sospensione presenta un valore della viscosità pari a $0,05 \text{ Pa}\cdot\text{s}$ quando è applicato uno shear rate di 1000 s^{-1} , quando nel secondo step è applicato uno sforzo di $0,1 \text{ s}^{-1}$ il valore della viscosità dopo 10,12 secondi aumenta fino al valore di $2,51 \text{ Pa}\cdot\text{s}$. La viscosità continua a incrementare fino a giungere, alla fine della prova, a un valore massimo di $4,09 \text{ Pa}\cdot\text{s}$.

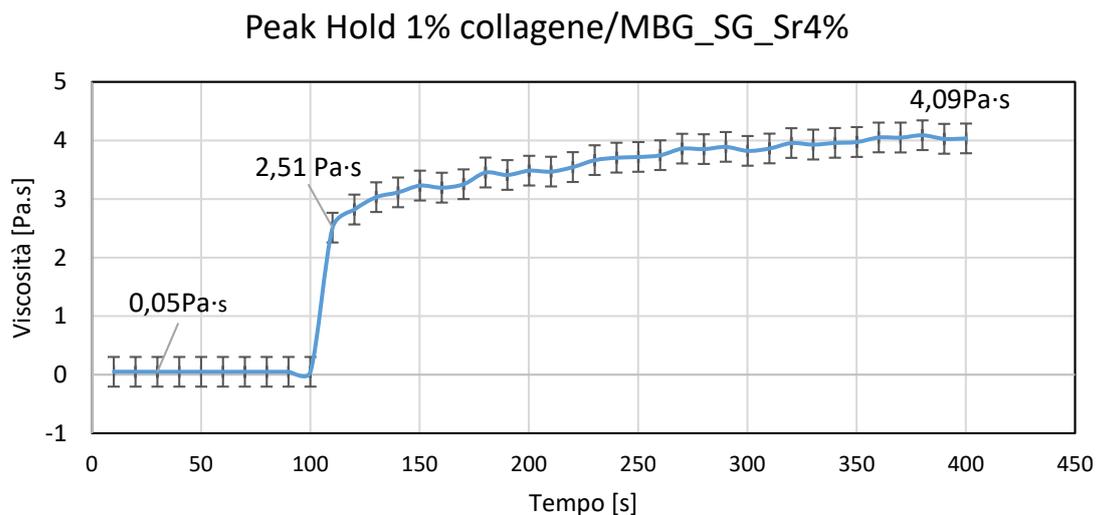


Figura 4.37 Peak hold 1% collagene/MBG_SG_Sr4%

Il grafico ottenuto dalla prova di *peak hold* della sospensione 1.25% collagene/MBG_SG_Sr4% è riportato in [figura 4.38](#). Il valore iniziale della viscosità in corrispondenza dello shear rate di 1000 s^{-1} è di $0,06 \text{ Pa}\cdot\text{s}$, in corrispondenza del secondo step quando è applicato uno shear rate di $0,1 \text{ s}^{-1}$ la viscosità dopo 10,12 secondi aumenta fino a un valore di $4,48 \text{ Pa}\cdot\text{s}$. Successivamente la viscosità continua a incrementare fino a giungere a un valore massimo di $7,47 \text{ Pa}\cdot\text{s}$.

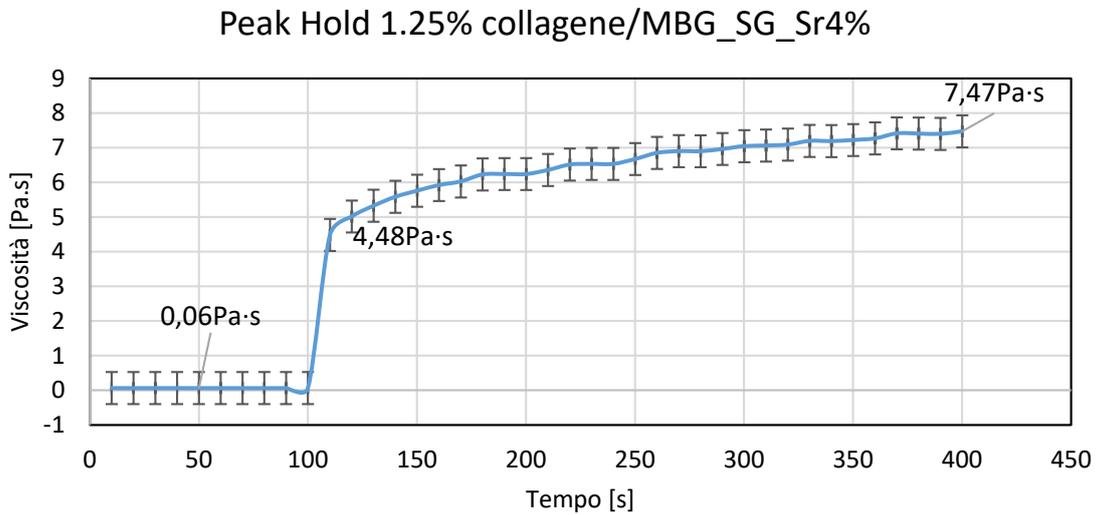


Figura 4.38 Peak hold 1.25% collagene/MBG_SG_Sr4%

La sospensione 1.5% collagene/MBG_SG_Sr4% presenta nel primo step una viscosità di $0,11 \text{ Pa}\cdot\text{s}$, nel secondo step dopo 10,12 secondi avviene una ripresa della viscosità fino a un valore di $22,75 \text{ Pa}\cdot\text{s}$. Successivamente la viscosità continua ad aumentare fino a raggiungere un valore massimo pari a $37,73 \text{ Pa}\cdot\text{s}$.

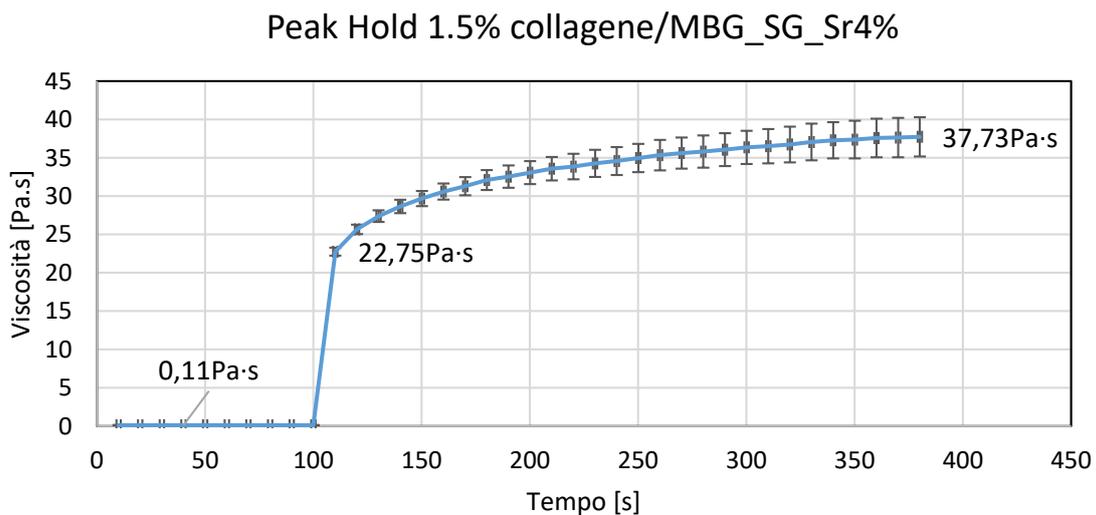


Figura 4.39 Peak hold 1.5% collagene/MBG_SG_Sr4%

Per facilitare il confronto, i dati risultanti dalle diverse prove sono stati riportati in tabella 4.5. Con l'aumentare della concentrazione di collagene, il valore della viscosità incrementa e i brevi tempi di ripresa tendono a diminuire ma in maniera poco significativa.

La sospensione 1.5% collagene/MBG_SG_Sr4% mostra la massima viscosità di ripresa dopo il primo step e la massima viscosità finale. Ciò indica, in sede di stampa, una maggiore stabilità della sospensione a seguito dell'estrusione.

Sospensione	Viscosità prima fase [Pa·s]	Viscosità seconda fase [Pa·s]	Tempo di ripresa [s]	Viscosità finale [Pa·s]
1% collagene/MBG_SG_Sr4%	0,05	2,51	10,122	4,08
1.25% collagene/MBG_SG_Sr4%	0,06	4,48	10,121	7,47
1.5% collagene/MBG_SG_Sr4%	0,11	22,75	10,120	37,73

Tabella 4.5 Confronto dei dati ottenuti nella peak hold delle sospensioni di collagene/MBG_SG_Sr4%

- *Time sweep*

Le prove di *time sweep* effettuate a 37°C sottoponendo la sospensione a uno sforzo dell'1% hanno permesso di identificare la transizione sol-gel e la formazione di un gel stabile in dipendenza del tempo.

In figura 4.40 è mostrato il grafico ottenuto durante la prova di *time sweep* della sospensione 1% collagene/MBG_SG_Sr4%. La sospensione ha effettuato la transizione sol gel a 394,4 secondi dall'inizio della prova e ha formato un gel stabile dopo circa 20 minuti. Il modulo G' mostra un andamento crescente e giunge alla fine della prova al valore di 75,08 Pa.

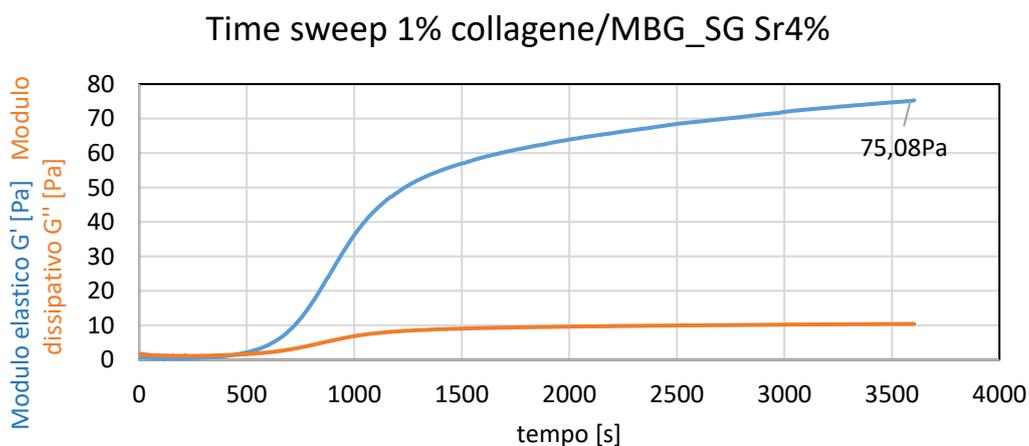


Figura 4.40 Time sweep 1% collagene/MBG_SG_Sr4%

La sospensione 1.25% collagene/MBG_SG_Sr4% (figura 4.41) ha mostrato il punto di transizione sol-gel dopo 17 minuti dall'inizio della prova e la formazione di un gel stabile dopo circa 33 minuti.

Il modulo G' durante la prova ha un andamento crescente e raggiunge alla fine della prova un valore di 52,55 Pa.

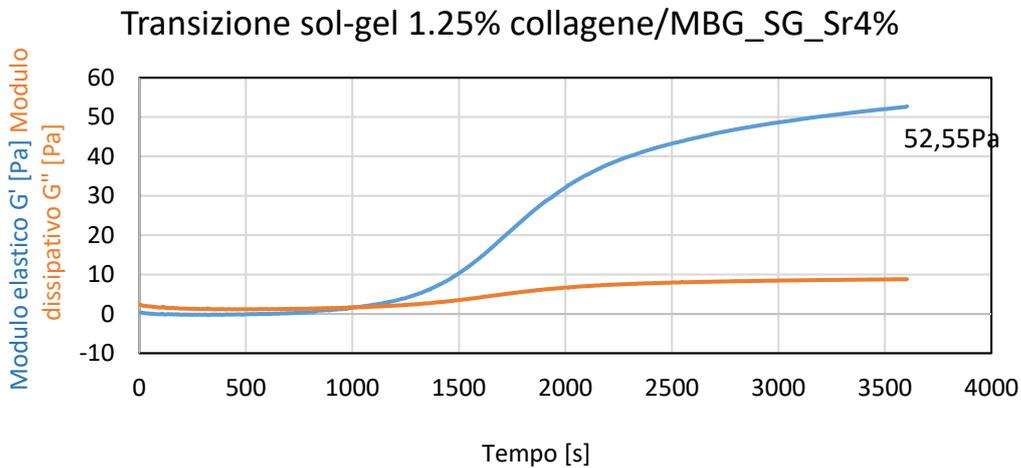


Figura 4.41 Time sweep 1.25% collagene/MBG_SG_Sr4%

In figura 4.42 è mostrato il grafico ottenuto per la sospensione 1.5% collagene/MBG_SG_Sr4%. Quest'ultima non ha mostrato il punto di transizione sol-gel ma i valori di G' e G'' risultano molto simili all'inizio della prova. Con il proseguire della prova il valore di G' è incrementato notevolmente rispetto a quello di G'' creando un sostanziale gap dopo circa 25 minuti segnalando la formazione di una struttura gelificata stabile. Alla fine della prova il modulo G' giunge a un valore di 107,68 Pa.

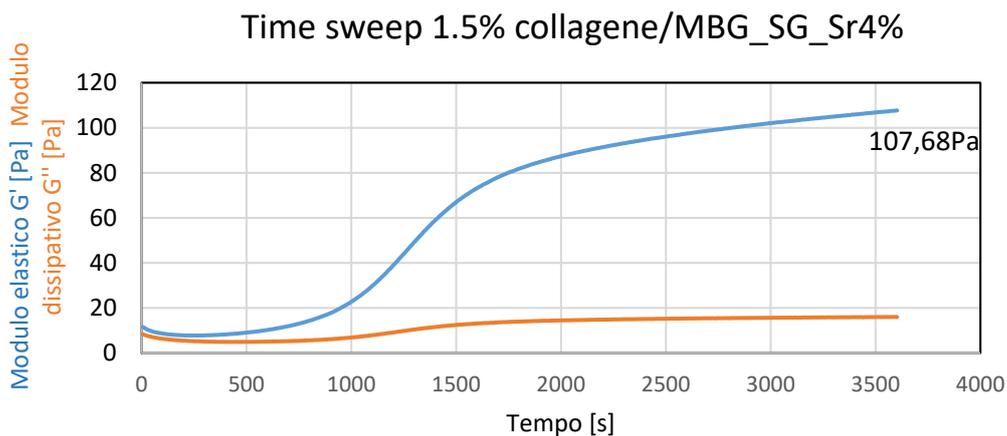


Figura 4.42 Time sweep 1.5% collagene/MBG_SG_Sr4%

In tabella 4.6 sono mostrati i dati ottenuti durante le prove di *time sweep* per le sospensioni a diverse concentrazioni di collagene. Il tempo di gelificazione delle sospensioni 1% collagene/MBG_SG_Sr4% e 1.25% collagene/MBG_SG_Sr4% avviene entro 1020 secondi dall'inizio della prova. La sospensione 1.5% collagene/MBG_SG_Sr4% mostra, invece, fin dall'inizio della prova un comportamento più vicino a un solido elastico, infatti possiede un valore di $G' > G''$. In tutte e tre le prove di *time sweep*, dopo 33 minuti si è formato un gap tra le curve di G' e G'' che ha segnalato la formazione di strutture gelificate stabili. La rapida formazione di un gel stabile a 37°C può essere utilizzata in sede di stampa per ottenere una maggiore stabilità della struttura stampata.

La curva di G' in tutti e tre i casi non raggiunge un valore di plateau alla fine della prova ma mostra un andamento crescente suggerendo un suo ulteriore aumento in caso di prolungamento dei tempi di gelificazione.

Sospensione	Modulo G' finale [Pa]
1% collagene/MBG_SG_Sr4%	75,07
1.25% collagene/MBG_SG_Sr4%	52,55
1.5% collagene/MBG_SG_Sr4%	107,68

Tabella 4.6 Confronto dei dati ottenuti nella *time sweep* delle sospensioni di collagene/MBG_SG_Sr4%

4.4.1.3 Commento finale dei risultati delle prove reologiche

Le sospensioni 1.5% collagene/MBG_SD_Sr4% e 1.5% collagene/MBG_SG_Sr4% sono risultate le più idonee ad essere sottoposte a un processo di stampa 3D. Entrambe hanno infatti presentato rispetto ai corrispettivi sistemi ibridi con minore concentrazione di collagene un maggior valore di viscosità e di limite di scorrimento. Entrambi questi aspetti sono indice di una migliore stabilità della struttura estrusa in sede di stampa. In particolare, le prove di *flow ramp* hanno evidenziato per la sospensione 1.5% collagene/MBG_SD_Sr4% un valore massimo della viscosità di 110,08 Pa, e di limite di scorrimento pari a 40,67 Pa. La sospensione 1.5% collagene/MBG_SG_Sr4% ha invece presentato un valore di viscosità massima di 80,20 Pa e di limite di scorrimento di 36,63 Pa. Anche le prove di *peak hold* hanno dimostrato la migliore stampabilità di queste sospensioni grazie alla migliore ripresa della viscosità dopo la fase di estrusione. In particolare, la sospensione 1.5% collagene/MBG_SD_Sr4% ha mostrato una ripresa del valore di viscosità da 0,12 Pa·s a 28,80 Pa·s dopo soli 10 secondi dalla rimozione dello uno shear rate di 1000 s^{-1} . La sospensione 1.5% collagene/MBG_SG_Sr4% ha invece presentato pochi secondi dopo il primo step un aumento del valore di viscosità da 0,11 Pa·s a 22,75 Pa·s.

Dalla comparazione dei dati ottenuti per le due sospensioni si evidenzia che la sospensione 1.5% collagene/MBG_SD_Sr4% ha in assoluto il comportamento reologico migliore. Pertanto ci aspettiamo di ottenere dal suo impiego in sede di stampa delle strutture con maggiore risoluzione.

Le prove di *time sweep* hanno evidenziato un miglior rafforzamento della struttura generata a seguito della gelificazione a 37°C della sospensione con l'1.25% collagene per i sistemi ibridi collagene/MBG_SD_Sr4% e della sospensione con l'1.5% collagene per i sistemi ibridi collagene/MBG_SG_Sr4%. Confrontando i grafici di *time sweep* di queste due sospensioni risulta che il miglior risultato è quello ottenuto con la sospensione 1.25% collagene/MBG_SD_Sr4% che raggiunge un valore di 245,45 Pa contro il valore di 107,68 Pa della sospensione 1.5% collagene/MBG_SG_Sr4%. Poiché in entrambi i casi la curva non ha raggiunto il plateau per avere risultati più certi occorrerebbe prolungare i tempi di prova.

4.4.2 Proprietà visco-elastiche del materiale reticolato

Per migliorare la stabilità dei campioni è stata eseguita una reticolazione chimica con genipina e con 4starPEG. Al fine di verificare la natura solida e la temperatura di denaturazione dei campioni sono state effettuate prove reologiche di *amplitude sweep* e *temperature ramp*.

In particolare durante l'*amplitude sweep* il materiale è stato sottoposto a una deformazione di oscillazione compresa tra lo 0,1% e il 10% in modo da individuare la regione viscoelastica lineare. Tale zona è indice della formazione di un materiale solido elastico che trasmette alla geometria del reometro una risposta in fase con la forzante. Durante le prove il sistema è stato mantenuto a 37°C.

La prova di *temperature ramp* è stata invece effettuata per verificare l'effetto della reticolazione sulla temperatura di denaturazione. In particolare il campione è stato sottoposto a una rampa di temperatura da 20°C a 90°C con velocità di riscaldamento di 5°C/min. In generale ci si aspetta un incremento di quest'ultima rispetto al campione non reticolato a causa della presenza di un maggior numero di legami chimici da rompere durante il riscaldamento.

4.4.2.1 Sistema 1.5% collagene/MBG_SD Sr4%

- *Campione non reticolato*

I risultati della prova di *amplitude sweep* effettuata con il campione di 1.5% collagene MBG_SD_Sr4% non reticolato sono riportati nel grafico in [figura 4.43](#). È stata individuata una zona visco-elastica lineare nella regione compresa tra lo 0,04% e il 2,5% della deformazione in oscillazione. In tale regione il valore di G' e

G'' è rispettivamente pari a 230 Pa e 32 Pa, il divario presente tra i due moduli conferma la natura solida del campione.

La diminuzione del modulo G' per deformazioni superiori è associata al danneggiamento del gel. [70]

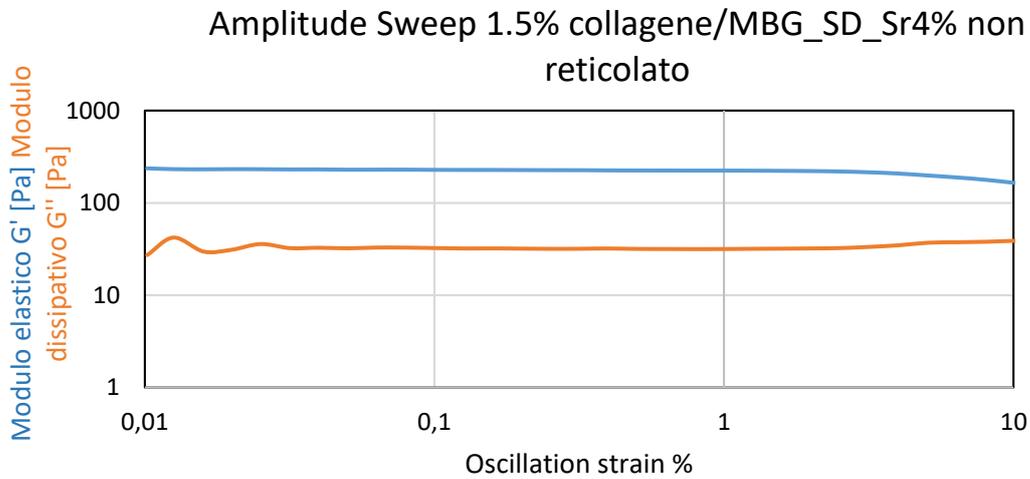


Figura 4.43 Amplitude sweep 1.5% collagene/MBG_SD_Sr4% non reticolato

La prova di *temperature ramp* del campione di 1.5% collagene/MBG_SD_Sr4% non reticolato è visibile nel grafico di figura 4.44. Il valore iniziale del modulo G' , in corrispondenza di $T=20^{\circ}\text{C}$, risulta pari a 164,8 Pa, con l'aumentare della temperatura il valor del modulo tende ad aumentare fino a giungere a un picco di 224,33 Pa a $43,19^{\circ}\text{C}$ dove si individua il punto di denaturazione in cui avviene il collasso della struttura di collagene. Infatti, a temperature maggiori si rileva un valore di G' prossimo allo zero e non è più possibile parlare di una struttura solida.

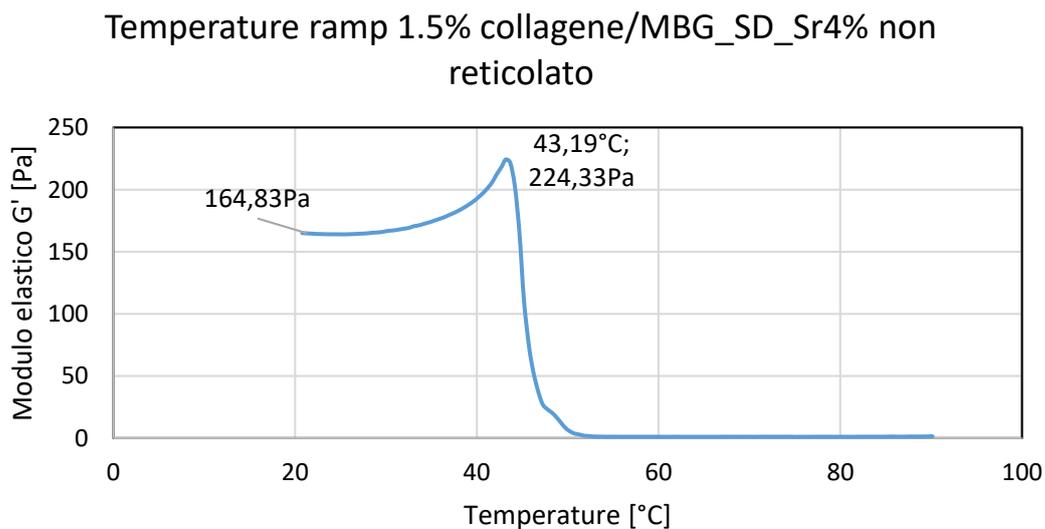


Figura 4.44 Temperature ramp 1.5% collagene/MBG_SD_Sr4% non reticolato

- Campione reticolato chimicamente con 1% 4starPEG in PBS

I risultati della prova di *amplitude sweep* effettuata con il campione di 1.5% collagene/MBG_SD_Sr4% reticolato con il 4starPEG sono riportati nel grafico in [figura 4.45](#). La risposta in fase tra campione e forzante è individuata nella zona di deformazione compresa tra lo 0,01% e il 5%. In questo caso l'intero grafico è collocato nella regione visco-elastica lineare. Il valore di G' e G'' è rispettivamente pari a 420 Pa e 45 Pa e il gap presente tra i due moduli rileva la natura solida del campione. In corrispondenza di valori di deformazione maggiori il campione tende a danneggiarsi, infatti il valore di G' inizia a diminuire.

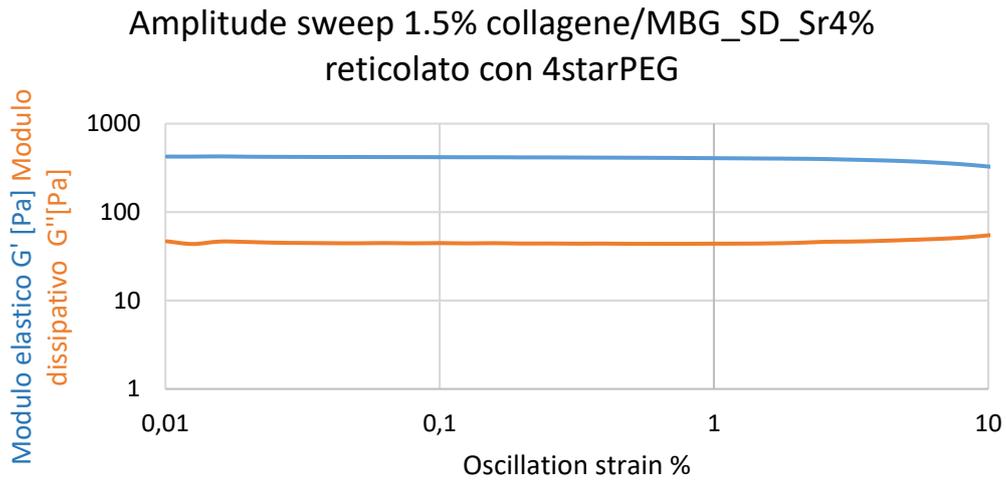


Figura 4.45 Amplitude sweep 1.5% collagene/MBG_SD_Sr4% reticolato con 4starPEG

La prova di *temperature ramp* del campione di 1.5% collagene/MBG_SG_Sr4% reticolato con 4starPEG è visibile nel grafico di [figura 4.46](#). A $T=20^{\circ}\text{C}$ il modulo G' risulta pari a 334,16 Pa, con l'aumentare della temperatura il suo valore tende ad aumentare fino a giungere a un picco di 407,22 Pa a $44,192^{\circ}\text{C}$ in cui avviene la denaturazione del collagene. A temperature superiori di circa 44°C il valore del modulo G' crolla fino a valori prossimi allo zero indicando la rottura della struttura solida del collagene.

Temperature ramp 1.5% collagene/MBG_SD_Sr4% reticolato con 4starPEG

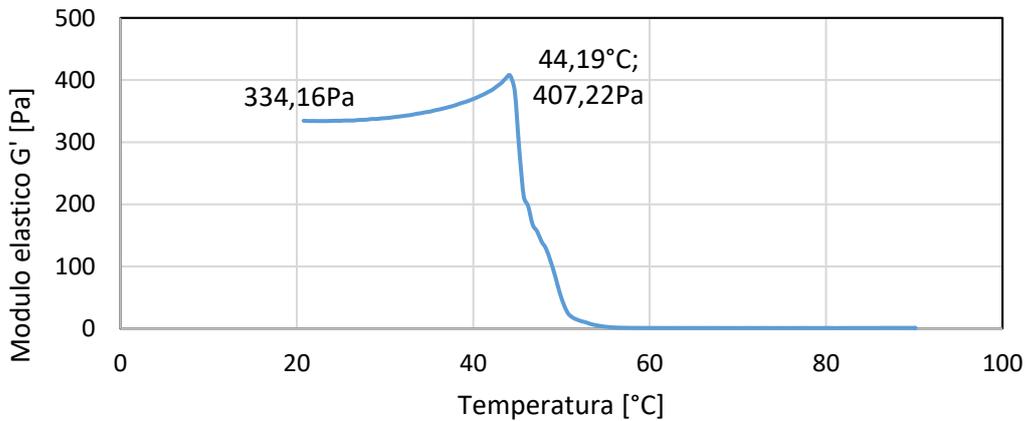


Figura 4.46 Temperature ramp 1.5% collagene/MBG_SD_Sr4% reticolato con 4starPEG

- Campione reticolato chimicamente in 0,5% genipina

I risultati della prova di *amplitude sweep* effettuata con il campione di 1.5% collagene/MBG_SD_Sr4% reticolati con la genipina sono riportati nel grafico in [figura 4.47](#). La regione visco-elastica lineare è individuata nell'intervallo di deformazione compreso tra 0,01% e 2%. Il valore di G' e G'' nella regione considerata sono circa 6800 Pa e 150 Pa rispettivamente e tale differenza conferma la natura solida del campione. A deformazioni superiori il gel tende a danneggiarsi mostrando una graduale diminuzione del modulo G' .

Amplitude sweep 1.5% collagene/MBG_SD_Sr4% reticolato con genipina

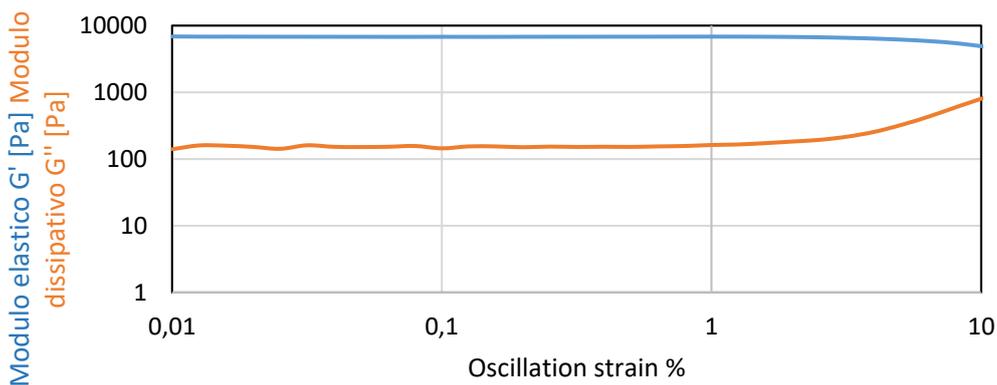


Figura 4.47 Amplitude sweep 1.5% collagene MBG_SD_Sr4% reticolato con genipina in PBS

La prova di *temperature ramp* del campione di 1.5% collagene/MBG_SG_Sr4% reticolato con genipina è visibile nel grafico di [figura 4.48](#). Il valore del modulo G' a 20°C risulta pari a 6655,6 Pa, con l'aumentare della temperatura il suo valore tende a diminuire gradualmente fino a giungere a un valore di 6602 Pa a 58,83 °C in cui si individua il punto di denaturazione. Non è ben chiara la graduale diminuzione del valore di G' nella regione $20 < T < 55^\circ\text{C}$, molto probabilmente è da attribuire a un'iniziale rottura della struttura di collagene fino a che, a temperature maggiori di circa 59°C, non si è verificato un improvviso collasso. Il valore registrato del modulo G' a seguito del collasso della struttura di collagene è di circa 15 Pa. Tale valore fa pensare alla presenza all'interno del campione di legami che riescano ancora a sostenere la struttura.

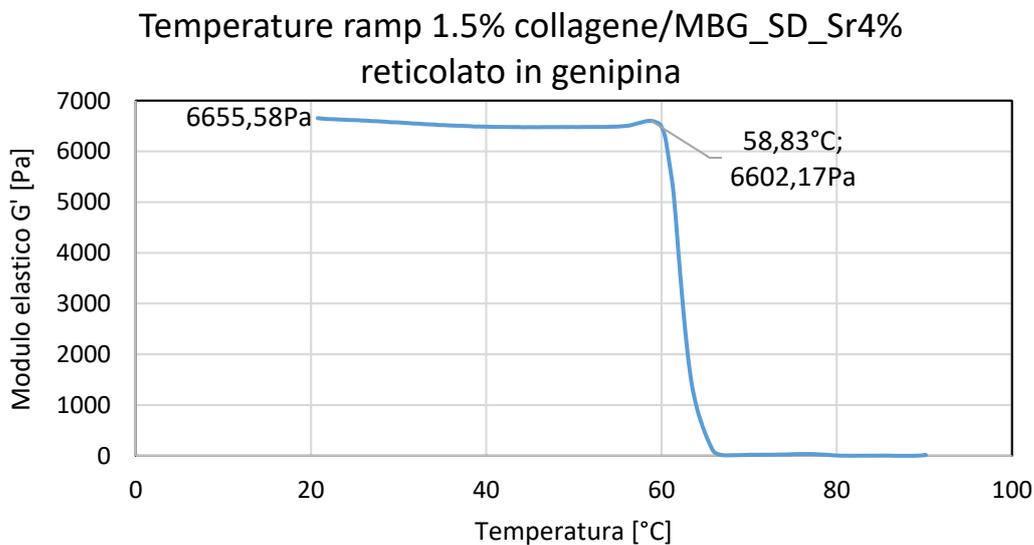


Figura 4.48 Temperature ramp 1.5% collagene/MBG_SD_Sr4% reticolato con genipina

4.4.2.2 Sistema 1.5% collagene/MBG_SG Sr4%

- *Campione non reticolato*

In [figura 4.49](#) è riportato il grafico della prova di *amplitude sweep* del campione di 1.5% collagene/MBG_SG_Sr4% non reticolato. La regione in cui si registra un comportamento visco-elastico del campione è compresa tra le deformazioni dello 0,06% e il 5%. I due valori di G' e G'' sono rispettivamente pari a 205 Pa e 20 Pa e il divario tra i due valori segnala la natura solida del campione. In corrispondenza di deformazioni superiori il modulo di G' tende a diminuire leggermente segnalando un deterioramento del gel.

Amplitude Sweep 1.5% collagene/MBG_SG_Sr4% non reticolato

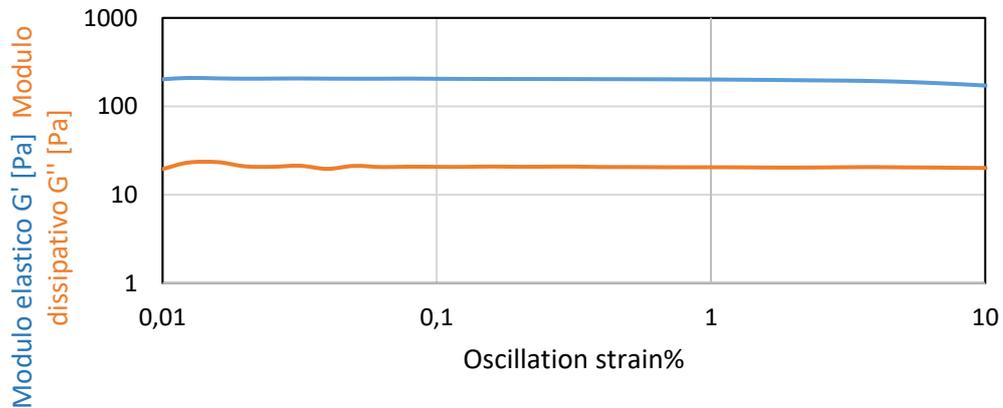


Figura 4.49 Amplitude Sweep 1.5% collagene MBG_SG_Sr4% non reticolato

Il grafico in [figura 4.50](#) mostra i risultati ottenuti nella prova di *temperature ramp* del campione di 1.5% collagene/MBG_SG_Sr4% non reticolato. Il valore del modulo G' risulta a T=20°C pari a 155,71 Pa, con l'aumentare della temperatura tende ad aumentare fino a giungere a un picco di 221,6 Pa a 45,2°C. In corrispondenza di temperature superiori di 45°C il valore del modulo G' subisce una veloce decrescita fino a circa 1,2 Pa. Il campione ha, infatti, perso la sua natura solida a causa della rottura della struttura di collagene a 45,21°C in cui si individua il punto di denaturazione della proteina.

Temperature ramp 1.5% collagene/MBG_SG_Sr4% non reticolato

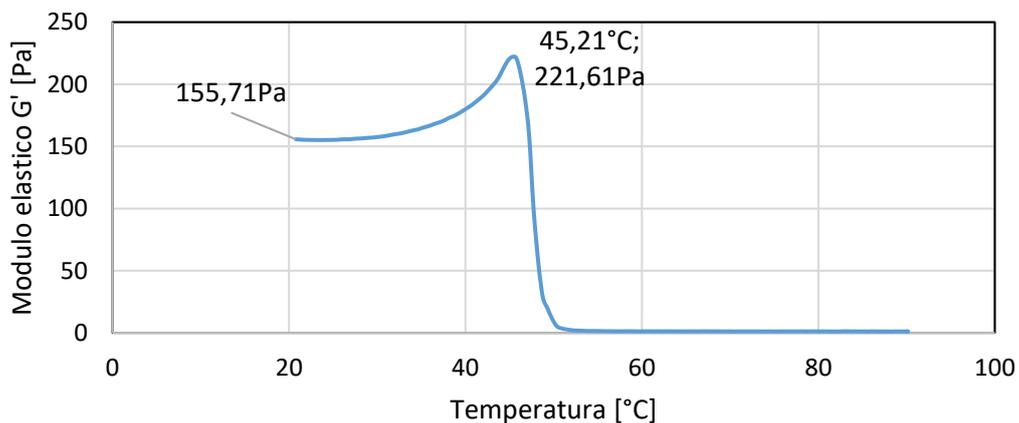


Figura 4.50 Temperature ramp 1.5% collagene MBG_SG_Sr4% non reticolato

- *Campione reticolato chimicamente in 1% 4starPEG in PBS*

Il grafico ottenuto nella prova di *amplitude sweep* del campione di 1.5% collagene/MBG_SG_Sr4% reticolato con 4starPEG è riportato in [figura 4.51](#). Nella regione compresa tra lo 0,1% e l'1% della deformazione è individuato il comportamento visco-elastico lineare del campione. In questa regione il valore dei due moduli G' e G'' risulta essere pari a 300 Pa e 25 Pa, la grande differenza tra i due moduli dimostra la natura solida del campione.

A deformazioni superiori, la diminuzione del modulo G' e il corrispondente aumento di G'' è da attribuire a un danneggiamento del gel.

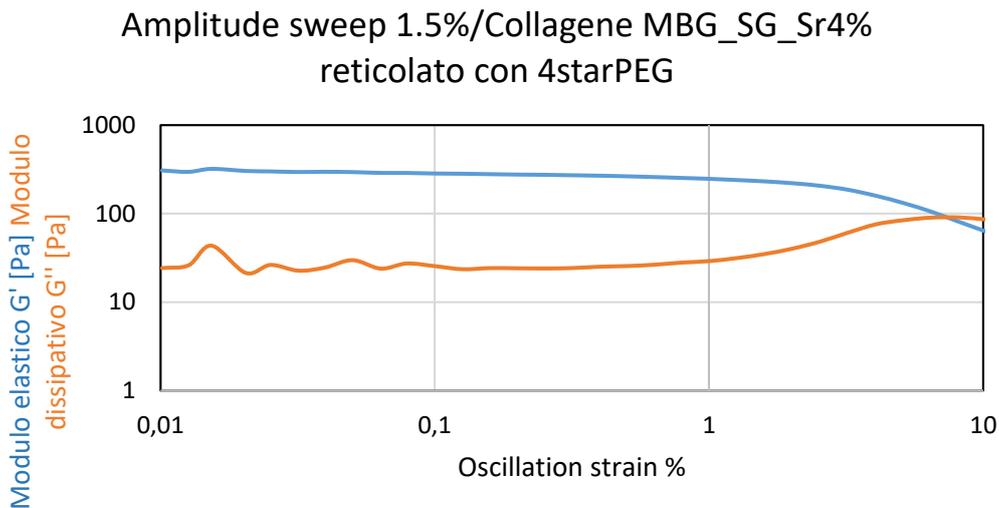


Figura 4.51 Amplitude sweep 1.5% collagene/MBG_SG_Sr4% reticolato con 4starPEG

In [figura 4.52](#) è mostrato il grafico ottenuto durante la prova di *temperature ramp* del campione di 1.5% collagene/MBG_SG_Sr4% reticolato con 4starPEG. Il valore del modulo G' in corrispondenza di $T=20^{\circ}\text{C}$ risulta pari a 215,4 Pa, con l'aumentare della temperatura tende a diminuire gradualmente fino a che a $44,7^{\circ}\text{C}$ giunge a un valore di 196 Pa. Da questo punto in poi si registra un crollo del modulo G' fino a valori prossimi allo zero, ciò indica un collasso della struttura solida di collagene. Per tale motivo la denaturazione della proteina è stata collocata a $44,7^{\circ}\text{C}$. Il leggero incremento del modulo G' che si è presentato intorno ai 64°C non è di grande rilevanza poiché la geometria del reometro può aver rilevato la risposta di una piccola parte di campione non ancora collassata.

Temperature ramp 1.5% collagene/MBG_SG_Sr4% reticolato con 4starPEG

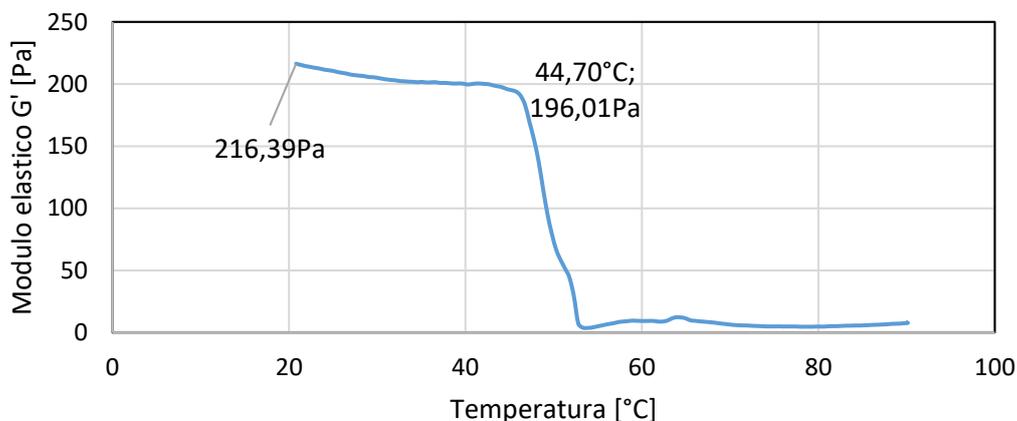


Figura 4.52 Temperature ramp 1.5% collagene/MBG_SG_Sr4% reticolato con 4starPEG

- Campione reticolato chimicamente in 0,5% genipina in PBS

Il grafico in [figura 4.53](#) mostra i risultati della prova di *amplitude sweep* del campione di 1.5% collagene/MBG_SG_Sr4% reticolato con genipina. La zona visco-elastica lineare è individuata nel range di deformazione compreso tra 0,01% e 1%. In questa regione il valore di G' e G'' è rispettivamente pari a 2680 Pa e 55 Pa e il divario presente tra i due moduli è indice della formazione di una struttura solida. Anche in questo caso a deformazioni maggiori si inizia ad avere il danneggiamento del gel, infatti, il modulo G' tende a diminuire.

Amplitude sweep 1.5% collagene/MBG_SG_Sr4% reticolato con genipina

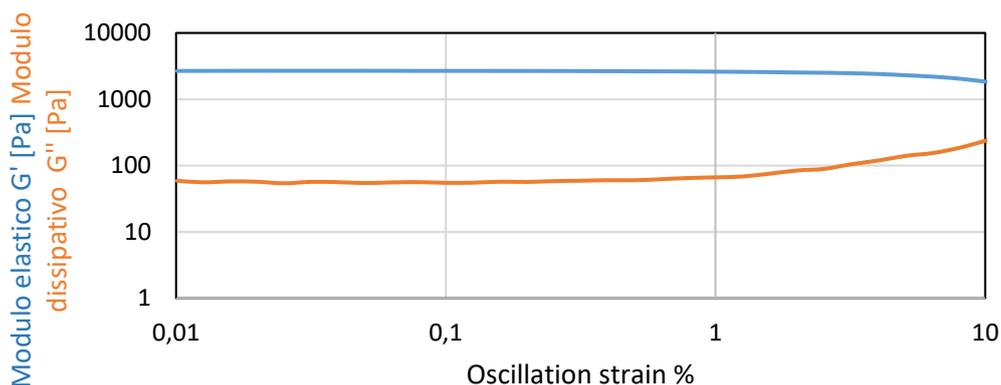


Figura 4.53 Amplitude sweep 1.5% collagene/MBG_SG_Sr4% reticolato con genipina

Il grafico ottenuto nella prova di *temperature ramp* del campione di 1.5% collagene/MBG_SG_Sr4% reticolato con genipina è riportato in [figura 4.54](#). Il modulo G' risulta avere a 20°C un valore pari a 2743,63 Pa, successivamente con l'aumentare della temperatura il suo valore aumenta fino a giungere a un picco

di 2822 Pa a 59,38°C. Da questo punto in poi si registra una brusca diminuzione del modulo G' che segnala il collasso della struttura di collagene. Il valore del modulo di G' che si registra a seguito del collasso è pari a circa 35 Pa. A seguito del collasso della struttura di collagene sono quindi ancora presenti dei legami che sostengono parzialmente la struttura.

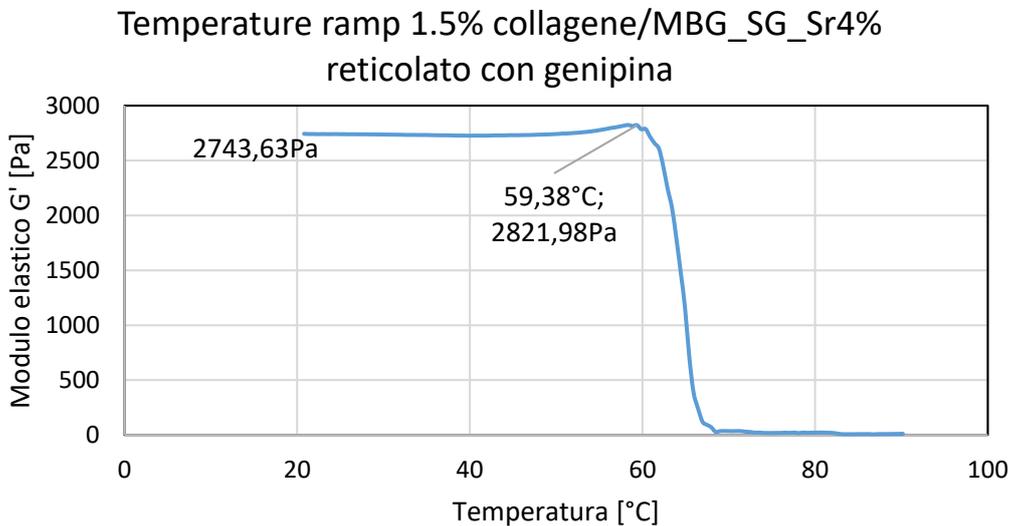


Figura 4.54 Temperature ramp 1.5% collagene/MBG_SG_Sr4% reticolato in genipina

4.4.2.3 Confronto tra i diversi tipi di reticolazione chimica

La [tabella 4.7](#) mostra i risultati ottenuti durante le prove reologiche eseguite sui campioni massivi non reticolati e reticolati chimicamente dei due sistemi ibridi di 1.5% collagene/MBG_SD_Sr4% e 1.5% collagene/MBG_SG_Sr4%. In generale è possibile dire che la reticolazione chimica dei campioni ha portato ad ottenere valori di modulo G' e temperature di denaturazione maggiori rispetto ai campioni non reticolati. Durante le prove di *amplitude sweep* è stata rilevata la natura solida di tutti i campioni, la loro risposta era infatti in fase con quella della forzante. Nel caso del sistema 1.5% collagene/MBG_SD_Sr4%, la reticolazione con 4starPEG e con genipina ha portato a un aumento del modulo G' rispettivamente del 90% e del 2400%. Per il sistema 1.5% collagene/MBG_SG_Sr4% l'aumento del modulo G' è stato del 31,34% nel caso di reticolazione con 4starPEG, del 1207,3% con la reticolazione in genipina. È dunque evidente come per entrambi i sistemi ibridi la reticolazione con genipina abbia portato a un incremento di gran lunga maggiore del modulo G' .

I campioni reticolati con genipina hanno mostrato una temperatura di denaturazione maggiore rispetto ai campioni non reticolati. In particolare nel caso della sospensione 1.5% collagene/MBG_SD_Sr4% l'incremento è stato del 36% mentre nella sospensione 1.5% collagene/MBG_SG_Sr4% l'incremento è

stato del 31% Nei campioni reticolati con 4starPEG la variazione della temperatura di denaturazione rispetto ai campioni non reticolati è stata poco significativa. Infatti nel caso della sospensione 1.5% collagene/MBG_SD_Sr4% il valore è aumentato del 2,32% mentre nel caso della sospensione 1.5% collagene/MBG_SG_Sr4% è diminuito del 1,15%.

Dopo aver raggiunto la temperatura di denaturazione i campioni reticolati con genipina di entrambi i sistemi ibridi non hanno mostrato un totale collasso della struttura. Il valore di G' , infatti, a $T > T_{denaturazione}$ è risultato maggiore di 10 Pa. Ciò è probabilmente dipeso dal fatto che, pur a seguito della denaturazione della proteina, all'interno del campione sono risultati presenti legami chimici in grado di sostenere in parte la struttura.

Il migliore effetto della reticolazione con genipina rispetto a quello con 4starPEG era già noto dalla letteratura. La genipina, infatti, forma all'interno del collagene legami covalenti forti, in particolare si lega ai gruppi amminici del collagene creando legami intramolecolari e intermolecolari.[69], [70] Il 4starPEG induce all'interno della struttura di collagene una reticolazione più debole ma al contempo maggiormente citocompatibile. [69], [74]

	Campione	G'[Pa]	Temperatura di denaturazione [°C]
1.5% collagene/MBG_SD_Sr4%	<i>Non reticolato</i>	200	43,19
	<i>Reticolato con 4starPEG</i>	380	44,19
	<i>Reticolato con genipina</i>	5000	58,83
1.5% collagene/MBG_SG_Sr4%	<i>Non reticolato</i>	205	45,21
	<i>Reticolato con 4starPEG</i>	300	44,69
	<i>Reticolato con genipina</i>	2680	59,38

Tabella 4.7 Confronto tra i diversi tipi di reticolazione

4.5 Prove preliminari di estrusione

A seguito delle prove reologiche si è deciso di eseguire delle prove preliminari di estrusione usando i sistemi ibridi di 1.5% collagene/MBG_SD_Sr4% e 1.5% collagene/MBG_SG_Sr4% che hanno mostrato un comportamento pseudo plastico migliore rispetto alle sospensioni aventi una concentrazione di collagene inferiore. Nonostante la maggiore viscosità e il maggiore limite di scorrimento, i due sistemi ibridi non sono in grado di autosostenersi. È stato quindi necessario l'utilizzo di un bagno di stampa.

L'impostazione delle prove di stampa è risultata complessa a causa dei molteplici parametri coinvolti nel processo di stampa che hanno un'influenza diretta sulla qualità del risultato finale.

Per esempio, la misura del diametro del filamento estruso dipende dalla velocità di stampa. Se infatti aumentiamo la velocità di stampa l'ago della stampante nell'unità di tempo si sposterà su una superficie maggiore e pertanto il rapporto tra materiale depositato e superficie diminuirà e con esso il diametro del filamento. Allo stesso tempo, la pressione di erogazione della sospensione è collegata alla dimensione del filamento con una relazione diretta, sicché incrementando la pressione di estrusione si ottengono filamenti di diametro maggiore. Al fine di ottenere una buona risoluzione del processo di stampa riproducendo un filamento estruso con un diametro il più possibile simile al diametro interno dell'ago utilizzato per la stampa[82], è necessario calibrare e bilanciare con estrema precisione i due valori di velocità di stampa e di pressione di erogazione.

È inoltre importante scegliere la distanza appropriata tra i diversi strati in modo da garantire l'aderenza del filamento depositato su quello sottostante ed evitare la compenetrazione tra gli strati con conseguente diminuzione della porosità e della risoluzione finale. [82]

Durante le prove di stampa i diversi parametri sono stati variati fino ad ottenere un reticolo con una buona risoluzione.

I parametri di stampa che hanno portato alla realizzazione di reticoli più definiti sono riportati in tabella 4.8.

	1.5% Collagene MBG_SD_Sr4%	1.5% Collagene MBG_SG_Sr4%
Diametro interno dell'ago	0,120 mm	0,120 mm
Velocità della testina	8mm/s	8 mm/s
Pressione	30kPa	20kPa
Altezza	0,1 mm	0,1mm

Tabella 4.8 Parametri ottimali di estrusione delle sospensioni di 1.5% collagene/MBG_SD_Sr4% e 1.5% collagene/MBG_SG_Sr4%

Di rilevante importanza è stata la qualità del supporto di stampa (slurry di gelatina FRESH), il quale, per sostenere la stampa, deve presentare una consistenza gelatinosa come si evidenzia nelle foto in [figura 4.55](#).

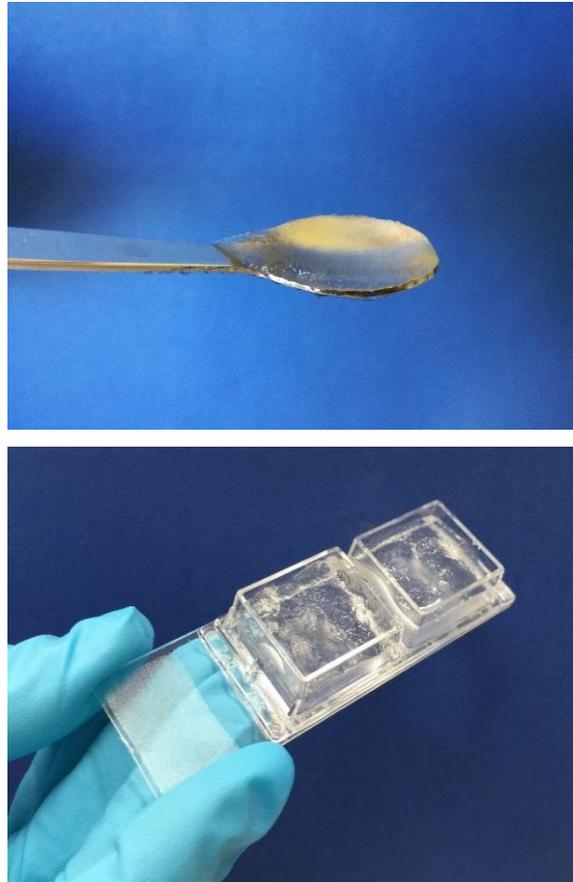


Figura 4.55 Slurry di gelatina FRESH

Nelle foto riportate in [figura 4.56](#) sono mostrate prove di stampa effettuate in due supporti di qualità differente.

I reticoli raffigurati nella foto a sinistra sono stati effettuati in un supporto di stampa particellare con bassa concentrazione di acqua e di bolle d'aria, quelli nella foto a destra, invece, sono stati realizzati in un supporto con alta concentrazione di acqua. È possibile notare come i reticoli della seconda foto si siano facilmente deformati e siano collassati sotto il proprio peso.



Figura 4.56 Prove di stampa

La foto riportata in [figura 4.57](#) mostra ulteriori prove di stampa effettuate con le sospensioni 1.5% collagene/MBG_SD_Sr4% e 1.5% collagene/MBG_SG_Sr4%. In particolare, nella foto a sinistra sono raffigurati i reticoli ottenuti con la sospensione 1.5% collagene/MBG_SD_Sr4% e a destra i reticoli realizzati con la sospensione 1.5% collagene/MBG_SG_Sr4%.

I reticoli realizzati con la sospensione di collagene e MBG_SD_Sr4% mostrano una migliore riproduzione del modello di partenza. I reticoli ottenuti con la sospensione di collagene e MBG_SG_Sr4% sono invece meno definiti e presentano delle ramificazioni che diminuiscono la risoluzione di stampa. Il motivo è da attribuire al valore della viscosità e del limite di scorrimento che, nonostante la presenza del supporto, non sono stati sufficienti per il sostenimento della strutture.



Figura 4.57 Prove di stampa

Dopo la stampa, le multiwell sono state poste a 37°C per consentire la gelificazione del collagene e per portare il supporto di stampa allo stato liquido. Questa operazione è stata necessaria per poter ottenere un reticolo con sufficienti proprietà meccaniche. I due processi sono avvenuti in modo simultaneo non causando la deformazione dei reticoli.

5. CONCLUSIONI E SVILUPPI FUTURI

5.1 Introduzione

Il lavoro di tesi è stato svolto nel contesto del progetto ERC BOOST che ha come obiettivo la realizzazione, tramite stampa 3D, di scaffold biomimetici in grado di mimare composizione e struttura del tessuto osseo naturale per favorire il ribilanciamento dell'attività di osteoblasti e osteoclasti in caso di osteoporosi.

Nello specifico questo lavoro di tesi ha visto la realizzazione di sistemi ibridi a base di collagene e particelle di vetro bioattivo MBG_SD_Sr4% o MBG_SG_Sr4% finalizzate all'utilizzo come "inchiostro" per la realizzazione di strutture tridimensionali tramite la stampa 3D. A tal fine le diverse sospensioni sono state sottoposte ad analisi reologiche che permettessero di verificare il comportamento reologico delle sospensioni quando sono sottoposte a sforzi simili a quelli delle fasi di stampa. In particolare sono state effettuate le prove di *flow ramp* per determinare il comportamento pseudo-plastico delle sospensioni e prove di *peak hold* per simulare gli step di estrusione e deposizione del processo di stampa.

Quando le strutture tridimensionali, a seguito della stampa, sono poste in incubatore a 37°C si desidera che gelifichino assumendo nel minor tempo possibile una certa stabilità. Per tale motivo è stata studiata tramite prove reologiche di *time sweep* la transizione sol-gel delle sospensioni a 37°C fino al raggiungimento di una struttura solida.

Durante il lavoro di tesi sono stati realizzati campioni massivi gelificati delle sospensioni in modo da poter effettuare su di essi analisi composizionali e morfologiche. In particolare, con la spettroscopia IR è stata esaminata la composizione chimica dei campioni e la presenza di legami tra collagene e particelle MBG all'interno del sistema, con il FESEM, invece, si è valutata la dispersione delle particelle MBG nella matrice e la ricostituzione delle fibre di collagene a seguito della gelificazione.

Per incrementare la stabilità e le prestazioni meccaniche del materiale a seguito della stampa è stato testato, tramite prove reologiche di *amplitude sweep* e *temperature ramp*, l'effetto della reticolazione chimica sui campioni massivi delle sospensioni gelificate. In particolare, sono stati utilizzati e messi a confronto due reticolanti chimici: la genipina e il 4starPEG.

I campioni massivi reticolati chimicamente sono stati esaminati tramite la microscopia elettronica per constatare le differenze morfologiche con i rispettivi campioni gelificati.

Infine sono state effettuate le prove preliminari di stampa per verificare l'effettiva stampabilità delle sospensioni realizzate.

I paragrafi che seguono hanno lo scopo di mostrare una panoramica dei risultati raggiunti durante il lavoro di tesi e i miglioramenti che potrebbero essere apportati per giungere allo scopo finale, ovvero la realizzazione di scaffold ossei tramite la stampa 3D.

5.2 Conclusioni

Aumentando la concentrazione di collagene all'interno del sistema ibrido è incrementata la viscosità del sistema causando una sempre più difficile miscelazione omogenea tramite agitatore magnetico. Nonostante le difficoltà riscontrate, tutte le sospensioni sono risultate omogenee a livello visivo. L'analisi dei campioni massivi tramite microscopia elettronica (FESEM e SEM) ha mostrato che le sospensioni realizzate con collagene e particelle MBG_SD_Sr4% hanno una migliore distribuzione delle particelle di vetro bioattivo nella matrice rispetto alle sospensioni con le MBG_SG_Sr4%. La dimensione nanometrica delle particelle MBG_SG_Sr4% causa, infatti, una facile agglomerazione di quest'ultime e di conseguenza una dispersione non omogenea all'interno della matrice. Le immagini FESEM del campione di collagene/MBG_SG_Sr4% evidenziano come le fibre abbiano realizzato un network ramificato su cui aderiscono, senza alterarlo, le particelle MBG_SG_Sr4%. I campioni con le particelle MBG_SD_Sr4% non mostrano la stessa ramificazione delle fibre di collagene perché, molto probabilmente, la dimensione micrometrica delle particelle ne ha impedito la formazione.

Si può dunque sottolineare che, se da un lato la dimensione nanometrica delle particelle MBG_SG_Sr4% causa una facile agglomerazione, dall'altro favorisce una migliore ricostituzione delle fibre di collagene e una migliore biomimetività finale. Infatti, le particelle di MBG_SG_Sr4% riescono a riprodurre il microambiente osseo perché più simili ai nanocristalli di idrossiapatite del tessuto osseo.

I campioni massivi di collagene e particelle di vetro bioattivo analizzati attraverso la spettroscopia IR (ATR-FTIR) hanno mostrato, come da letteratura, i picchi tipici del collagene e delle particelle di vetro bioattivo senza evidenziare la formazione di legami tra i due materiali a seguito della gelificazione.

Le analisi reologiche di *flow ramp* delle sospensioni di collagene e particelle MBG hanno evidenziato un loro comportamento pseudo-plastico, ovvero una diminuzione della viscosità con l'aumento dello sforzo di taglio applicato. Tale comportamento rende le sospensioni idonee per la stampa 3D che richiede in fase di estrusione una diminuzione della viscosità. Con l'aumento della concentrazione di collagene dall'1% all'1.5%, il valore della viscosità è aumentato del 103,47% per le sospensioni di collagene/MBG_SD Sr4%

e del 1126,3% per le sospensioni di collagene/MBG_SG_Sr4%. Le prove di *flow ramp* hanno inoltre evidenziato come la concentrazione di collagene abbia influenzato il valore del limite di scorrimento cioè l'indice di quanto la sospensione riesca ad autosostenersi una volta estrusa. In particolare, con l'incremento della concentrazione di collagene dall'1% all'1.5%, il valore del limite di scorrimento è aumentato del 43,65% nel caso delle sospensioni di collagene e particelle MBG_SD_Sr4%, del 259% nel caso delle sospensioni con le MBG_SG_Sr4%. Tuttavia i valori raggiunti non sono idonei affinché il reticolo stampato si autosostenga ed è stato dunque necessario effettuare la stampa con l'ausilio di un supporto (slurry di gelatina FRESH).

Le prove reologiche di *peak hold* hanno ulteriormente confermato l'idoneità delle sospensioni all'estrusione tramite stampa 3D, esse, infatti, una volta che non sono più sottoposte a sforzi di taglio, riescono a recuperare parte della propria viscosità iniziale. Il recupero migliore è stato ottenuto con le sospensioni 1.5% collagene/MBG_SD_Sr4% e 1.5% collagene/MBG_SG_Sr4% le quali hanno presentato nel secondo step della prova di *peak hold* un valore maggiore della viscosità dopo soli 10 secondi dalla rimozione della sollecitazione di taglio e una viscosità maggiore alla fine della prova.

Le analisi di *time sweep* hanno evidenziato come a 37° C il riassetto del collagene per formare un gel stabile avvenga in tempi relativamente brevi (circa 25 minuti). In tutte le analisi effettuate la curva di G' non sembra raggiungere un plateau, il che suggerisce un suo ulteriore incremento nel caso di mantenimento della sospensione a 37°C per più tempo.

Per incrementare la stabilità del materiale, sono stati utilizzati due reticolanti chimici naturali: la genipina e il 4starPEG. Sono stati selezionati tali reticolanti poiché sono entrambi di origine naturale e, da letteratura, risultano i migliori dal punto di vista della citocompatibilità e dell'incremento delle proprietà meccaniche. [69], [70] È stato constatato come la reticolazione con genipina sia migliore dal punto di vista della stabilità termica e delle prestazioni meccaniche fornite ai campioni. I campioni, infatti, sono stati analizzati reologicamente tramite prove reologiche di *amplitude sweep* e *temperature ramp* al fine di verificarne rispettivamente le proprietà meccaniche e l'aumento della temperatura di denaturazione.

Le analisi reologiche di *amplitude sweep* hanno mostrato che il valore di G' dei campioni di 1.5% collagene/MBG_SD_Sr4% è aumentato solo del 90% reticolando con 4starPEG e del 2400% utilizzando come reticolante la genipina. Nel caso dei campioni con l'1.5% collagene/MBG_SG_Sr4% la reticolazione con 4starPEG ha portato a un incremento del valore di G' del 46,34%, mentre utilizzando la genipina l'incremento è stato del 1207,3%.

I campioni di 1.5% collagene/MBG_SD_Sr4% e 1.5% collagene/MBG_SG_Sr4% reticolati con genipina hanno mostrato durante le prove di *temperature ramp* una maggiore temperatura di denaturazione. Infatti i risultati conseguiti evidenziano un aumento della temperatura di denaturazione rispetto quella

dei campioni gelificati del 36,21% nel caso dei campioni 1.5% collagene/MBG_SD_Sr4%, del 31,34% per i campioni 1.5% collagene/MBG_SG_Sr4%.

Le prove di stampa sono state effettuate con le sospensioni contenenti l'1.5% di collagene e particelle di vetro bioattivo mesoporoso SD_Sr4% e SG_Sr4% perché nelle prove reologiche hanno mostrato un miglior comportamento pseudo-plastico. Malgrado la migliore risposta pseudoplastica è stato comunque necessario utilizzare un supporto di stampa per evitare il collasso e la deformazione del reticolo stampato. I reticoli realizzati con la sospensione 1.5% collagene/ MBG_SD_Sr4% sono risultati i migliori dal punto di vista della risoluzione rispetto a quelli ottenuti con la sospensione 1.5% collagene/MBG_SG_Sr4%. Il motivo è da ricercare nelle caratteristiche reologiche delle due sospensioni. Infatti, la prova di *flow ramp* aveva mostrato un valore maggiore della viscosità nominale e del limite di scorrimento della sospensione 1.5% collagene/MBG_SD_Sr4%. Inoltre, l'assenza di significativi agglomerati all'interno della sospensione con le MBG_SD_Sr4% ha evitato l'ostruzione degli aghi di stampa.

L'incubazione a 37°C non ha alterato la forma dei reticoli il che indica una buona simultaneità tra il passaggio in sospensione della gelatina e la reticolazione fisica del collagene.

In generale si può concludere che sono stati prodotti sistemi ibridi idonei per la realizzazione di scaffold ossei tramite la stampa 3D. Le particelle di MBG_SD_Sr4% sono state incorporate omogeneamente, è invece necessario migliorare la dispersione delle particelle MBG_SG_Sr4% nella matrice di collagene per evitare la formazione di agglomerati. Entrambe le particelle hanno permesso la ricostituzione delle fibre di collagene in fase di gelificazione. Le analisi reologiche hanno evidenziato il comportamento pseudo-plastico e presentato un limite di scorrimento delle sospensioni, proprietà importanti affinché i biomateriali siano stampabili. La rapida transizione sol-gel a temperatura fisiologica di 37°C può migliorare la stabilità del materiale dopo l'estrusione. Come è stato constatato da prove reologiche, la reticolazione chimica con genipina ha migliorato ulteriormente la stabilità del materiale incrementandone il modulo G' e la temperatura di denaturazione. I risultati ottenuti hanno, dunque, dimostrato la potenziale idoneità delle sospensioni proposte ad essere utilizzate come un materiale per la stampa 3D di strutture tridimensionali che mimano la complessa natura del tessuto osseo.

5.3 Sviluppi futuri

La dispersione delle particelle MBG_SG_Sr4% all'interno della matrice di collagene deve essere migliorata per evitare la formazione di agglomerati micrometrici che vanificherebbe l'utilizzo di particelle nanometriche. Per evitare tale inconveniente, le precauzioni da adottare durante il processo di

preparazione delle sospensioni potrebbero essere l'incremento del tempo di sonicazione della sospensione di MBG_SG_Sr4% in acido acetico 0,5M oppure l'incremento del tempo di omogeneizzazione della sospensione di collagene e di MBG_SG_Sr4%.

Un altro metodo che potrebbe essere utilizzato per migliorare la dispersione delle particelle nanometriche di vetro bioattivo è quello sviluppato da Chen et al. [128] che prevede, durante la fase di sintetizzazione delle particelle MBG_SG, la funzionalizzazione della loro superficie con amminopropiltrirossisilano (APTES). Infatti, grazie ad interazione idrofobiche si riesce ad ottenere una migliore dispersione delle particelle.[129]

Gli spettri individuati tramite analisi ATR-FTIR dei campioni di collagene/MBG non contengono picchi relativi a legami chimici tra le particelle di MBG e il collagene, pertanto le particelle di vetro bioattivo sono semplicemente inglobate nel collagene. Come è stato già detto in precedenza, le particelle di MBG sono inserite nella matrice di collagene anche per incrementarne le prestazioni meccaniche. Affinché si raggiunga tale risultato, sarebbe opportuno creare una buona interfaccia tra le particelle MBG e il collagene mediante la formazione di legami chimici. In questo modo si avrà un trasferimento diretto degli stress tra i due componenti. El Fiqi et al. [126] sono riusciti a creare legami chimici tra MBG e collagene funzionalizzando la superficie delle particelle di vetro bioattivo con gruppi $-NH_2$ che sono in grado di formare un forte legame chimico con il gruppo carbossilico presente nel collagene. Tale interazione chimica ha migliorato la rigidità del materiale e incrementato la sua stabilità chimico-fisica.

I test reologici hanno mostrato che le sospensioni realizzate hanno caratteristiche idonee alla stampa ma ancora non ottimali. Per migliorare la stampabilità delle sospensioni una possibile strada può essere quella di incrementare ulteriormente la concentrazione di collagene al fine di ottenere una viscosità maggiore della sospensione. Come già detto nel paragrafo 3.2.3, la maggiore viscosità permette di ottenere una maggiore stabilità del materiale e quindi una migliore risoluzione delle strutture stampate.

Per ottimizzare le proprietà dei sistemi ibridi di collagene/MBG e dello scaffold finale si potrebbe inoltre agire sulla composizione stessa. Il progetto ERC BOOST prevede, infatti, di inglobare nelle sospensioni di collagene e particelle di MBG anche particelle di idrossiapatite mesoporosa al fine di mimare la composizione dell'osso naturale.

L'idrossiapatite è il principale componente dell'osso e, come tale, presenta una buona biocompatibilità ed un' eccellente osteoconduttività [130] ma il suo utilizzo nell'ingegneria tissutale ossea è limitato dalla sua fragilità e dalle lente cinetiche di degradazione[6]. Diversi studi hanno mostrato che l'impiego dell'idrossiapatite come filler all'interno di matrici di collagene migliora le prestazioni meccaniche e biologiche dello scaffold finale. Al-Munajjed et al. [131] e JP Gleeson et al. [132], ad esempio, hanno combinato la matrice porosa in collagene con la rigidità dell'idrossiapatite ottenendo uno scaffold con

ottime proprietà meccaniche e un' osteoconduttività tale da renderlo un supporto ideale per la crescita cellulare.

Coerentemente a quanto riportato in studi già presenti in letteratura si prevede che l'aggiunta di idrossiapatite nella composizione finale dello scaffold potrebbe migliorarne le proprietà meccaniche e incrementarne la bioattività lavorando in sinergia con le particelle MBG.

Al fine di incrementare le prestazioni meccaniche e la stabilità degli scaffold sono stati analizzati due reticolanti naturali: la genipina e il 4starPEG. Tra i due metodi di reticolazione, quello effettuato con la genipina è risultato fornire al campione una migliore stabilità e migliori proprietà meccaniche. Per validare definitivamente tale tecnica di reticolazione è necessario effettuare in futuro test di citotossicità sui campioni reticolati. Secondo letteratura, infatti, la presenza di residui di genipina all'interno dello scaffold risulta dannosa per le cellule[69], [70], [133]. Gaudet et al. [134] riportano inoltre che l'utilizzo di agenti reticolanti come la genipina limita severamente il controllo spaziale delle proprietà meccaniche non permettendo, in questo modo, di riprodurre l'eterogeneità delle prestazioni meccaniche dell'osso. Per ovviare a tale inconveniente si può ricorrere alla reticolazione UV la quale offre la possibilità di modulare le proprietà meccaniche in base al tempo di esposizione dello scaffold alla radiazione. La reticolazione UV può essere inoltre effettuata in situ durante la stampa dello scaffold consentendo l'istantanea formazione di un gel. [134]

Per effettuare tale reticolazione è prima necessario funzionalizzare il collagene con un gruppo metacrilato foto sensibile. Drzewiecki et al.[48] hanno mostrato come la metacrilazione del collagene oltre a permettere la reticolazione UV porti a un particolare comportamento termoreversibile. Nello specifico, riscaldando e raffreddando il materiale in un range di temperature compreso tra 10 e 37°C è possibile avere un passaggio reversibile tra sospensione non reticolata e gel. Tale comportamento potrebbe essere sfruttato ad esempio per il rilascio di farmaci. [48]

Le prove di stampa effettuate con le sospensioni di 1.5% collagene/MBG_SD_Sr4% sono risultate migliori rispetto quelle realizzate con le sospensioni di 1.5% collagene/MBG_SG_Sr4%. Il motivo è da attribuire alla maggiore viscosità della sospensione e alla migliore dispersione delle particelle MBG_SD_Sr4% nella matrice di collagene.

In conclusione, per incrementare la qualità di stampa delle sospensioni, sarà necessario aumentare la concentrazione di collagene e migliorare ulteriormente la dispersione delle particelle MBG. Successivamente, una volta individuata la concentrazione di collagene ottimale e sarà migliorato il processo di dispersione delle particelle, si dovranno individuare i parametri ottimali di stampa. Una volta

raggiunti tali obiettivi si potrà eseguire la stampa di strutture complesse come quella dell'osso trabecolare.

I risultati ottenuti in questo lavoro di tesi sono serviti a verificare l'idoneità dei sistemi ibridi a base di collagene e particelle di vetro bioattivo mesoporoso per la realizzazione di strutture tridimensionali tramite tecniche di stampa 3D. Il seguito di questi studi avrà come obiettivo quello di ottimizzare l'omogeneità e le proprietà reologiche delle sospensioni apportando le opportune modifiche alla composizione del sistema ibrido e migliorando le procedure del suo ottenimento. Questo lavoro di tesi, dunque, vuole essere un contributo ai futuri sviluppi previsti dal progetto ERC BOOST che ha come prossimo step quello di aggiungere all'interno della sospensione idrossiapatite mesoporosa e fattori di crescita. In questo modo si vuole migliorare la biomimetici  del sistema e gli effetti terapeutici dello stesso nei casi in cui occorre ribilanciare il processo di rimodellamento osseo. Obiettivo ultimo del progetto sar  infine quello di ottenere tramite la stampa 3D strutture che replichino le propriet  morfologiche e meccaniche dell'osso trabecolare.

6. BIBLIOGRAFIA

- [1] "<http://www.lios.it/scheletro/pagina.asp?cap=0&pag=>" .
- [2] F. Jakob *et al.*, "Bone tissue engineering in osteoporosis," *Maturitas*, vol. 75, no. 2, pp. 118–124, 2013.
- [3] E. Gentleman *et al.*, "The effects of strontium-substituted bioactive glasses on osteoblasts and osteoclasts in vitro," *Biomaterials*, vol. 31, no. 14, pp. 3949–3956, 2010.
- [4] G. Ufficiale and D. Repubblica, "(RNRL). Disposizioni finali Gazzetta Ufficiale Gaz - zetta Ufficiale Il direttore generale : Gazzetta Ufficiale Gazzetta Ufficiale," 2017.
- [5] J. M. Holzwarth and P. X. Ma, "Biomimetic nanofibrous scaffolds for bone tissue engineering," *Biomaterials*, vol. 32, no. 36, pp. 9622–9629, 2011.
- [6] G. Turnbull *et al.*, "3D bioactive composite scaffolds for bone tissue engineering," *Bioact. Mater.*, vol. 3, no. 3, pp. 278–314, 2018.
- [7] R. Pietrabissa, *Biomateriali per protesi e organi artificiali*. 1996.
- [8] M. A. Fernandez-Yague, S. A. Abbah, L. McNamara, D. I. Zeugolis, A. Pandit, and M. J. Biggs, "Biomimetic approaches in bone tissue engineering: Integrating biological and physicomechanical strategies," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 84, pp. 1–29, 2015.
- [9] X. I. L. lu and P. X. M. A. Eter, "Abstracts of the 40th Annual Meeting of the United Kingdom Environmental Mutagen Society, 25th–28th June 2017 at the Park Inn Hotel, Leuven, Belgium," *Mutagenesis*, vol. 32, no. 6, pp. 607–628, 2017.
- [10] C. M. A. M. G. Deshpande, "Biomedical and industrial applications of collagen," 1999.
- [11] L. L. Hench, "Bioceramics," *Stress Int. J. Biol. Stress*, vol. 28, pp. 1705–1728, 1998.
- [12] J. Zhang *et al.*, "Three-dimensional printing of strontium-containing mesoporous bioactive

- glass scaffolds for bone regeneration,” *Acta Biomater.*, vol. 10, no. 5, pp. 2269–2281, 2014.
- [13] Y. Xiang and J. Du, “Effect of strontium substitution on the structure of 45S5 bioglasses,” *Chem. Mater.*, vol. 23, no. 11, pp. 2703–2717, 2011.
- [14] A. Wubneh, E. K. Tsekoura, C. Ayranci, and H. Uludağ, “Current state of fabrication technologies and materials for bone tissue engineering,” *Acta Biomater.*, vol. 80, pp. 1–30, 2018.
- [15] A. A. Zadpoor and J. Malda, “Additive Manufacturing of Biomaterials, Tissues, and Organs,” *Ann. Biomed. Eng.*, vol. 45, no. 1, pp. 1–11, 2017.
- [16] S. V. Murphy, A. Skardal, and A. Atala, “Evaluation of hydrogels for bio-printing applications,” *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*, vol. 101 A, no. 1, pp. 272–284, 2013.
- [17] W. Suchanek and M. Yoshimura, “Processing and properties of hydroxyapatite-based biomaterials for use as hard tissue replacement implants,” *J. Mater. Res.*, vol. 13, no. 1, pp. 94–117, 1998.
- [18] “https://it.wikipedia.org/wiki/Tessuto_osseo.” .
- [19] J.-Y. Rho, L. Kuhn-Spearing, and Z. P., “Mechanical properties and the hierarchical structure of bone,” *Med. Eng. Phys.*, vol. 20, pp. 92–102, 1998.
- [20] T. Gong, J. Xie, J. Liao, T. Zhang, S. Lin, and Y. Lin, “Nanomaterials and bone regeneration,” *Bone Res.*, vol. 3, no. July, 2015.
- [21] E. Vernè, “Dispense di Biomateriali.” .
- [22] A. L. Boskey, “Biomineralization: An Overview,” *Connect. Tissue Res.*, vol. 44, no. 1, pp. 5–9, 2003.
- [23] “<https://www.iofbonehealth.org/facts-statistics>.” .
- [24] International Osteoporosis Foundation, “The global burden of osteoporosis: a factsheet,” *Int. Osteoporos. Found.*, p. 1, 2014.
- [25] ISTAT, “Il Futuro Demografico Del Paese,” pp. 1–30, 2017.

- [26] S. Khosla, J. J. Westendorf, and M. J. Oursler, "Jci0833612," vol. 118, no. 2, pp. 421–428, 2008.
- [27] A. Cappariello, A. Maurizi, V. Veeriah, and A. Teti, "Reprint of: The Great Beauty of the osteoclast," *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 561, pp. 13–21, 2014.
- [28] A. Singh, T. J. Bivalacqua, and N. Sopko, "Urinary Tissue Engineering: Challenges and Opportunities," *Sex. Med. Rev.*, vol. 6, no. 1, pp. 35–44, 2018.
- [29] D. M. K. Junjie Zhao, Michelle Griffin, Jun Cai, Shaoxue Li, Peter E.M Bulter, "Bioreactors for tissue engineering: An update," 2016.
- [30] E. Fiume, J. Barberi, E. Vern, and F. Baino, "Bioactive Glasses : From Parent 45S5 Composition to Scaffold-Assisted Tissue-Healing Therapies," 2018.
- [31] M. J. Miller and C. W. Patrick, "Tissue engineering.," *Clin Plast Surg*, vol. 30, no. 1, p. 91–103, vii, 2003.
- [32] P. Lunati and E. Orsoni, "L'ingegneria tissutale : utilizzo di fattori di crescita e cellule staminali in traumatologia dello sport Tissue engineering : use of growth factors and stem cells in sports traumatology," pp. 163–169, 2009.
- [33] S. Bose, M. Roy, and A. Bandyopadhyay, "Recent advances in bone tissue engineering scaffolds," *Trends Biotechnol.*, vol. 30, no. 10, pp. 546–554, 2012.
- [34] T. Albrektsson and C. Johansson, "and Osseointegration," *J. Eur. Spine*, vol. 10, pp. 96–101, 2001.
- [35] I. L. Vegting *et al.*, "Analysing completion times in an academic emergency department: Coordination of care is the weakest link," *Neth. J. Med.*, vol. 69, no. 9, pp. 392–398, 2011.
- [36] L. X. Tang XJ, Gui L, "Hard tissue compatibility of natural hydroxyapatite/chitosan composite.," *Biomed Mater*, 2008.
- [37] S. Tamburaci and F. Tihminlioglu, "Biosilica incorporated 3D porous scaffolds for bone tissue engineering applications," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 91, no. May, pp. 274–291, 2018.
- [38] B. Marelli *et al.*, "Accelerated mineralization of dense collagen-nano bioactive glass hybrid

gels increases scaffold stiffness and regulates osteoblastic function," *Biomaterials*, vol. 32, no. 34, pp. 8915–8926, 2011.

- [39] D. Eglin, S. Maalheem, J. Livage, and T. Coradin, "In vitro apatite forming ability of type I collagen hydrogels containing bioactive glass and silica sol-gel particles," *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 17, no. 2, pp. 161–167, 2006.
- [40] A. Nowakowski, *Quantitative Active Dynamic Thermal IR-Imaging and Thermal Tomography in Medical Diagnostics*. 2006.
- [41] "<https://slideplayer.it/slide/990267/>."
- [42] P. Fratzl, "Cellulose and collagen: from fibres to tissues," 2003.
- [43] "<https://www.gefonutrition.it/collagene-idrolizzato/colplus.>"
- [44] B. D. Walters and J. P. Stegemann, "Strategies for directing the structure and function of three-dimensional collagen biomaterials across length scales," *Acta Biomater.*, vol. 10, no. 4, pp. 1488–1501, 2014.
- [45] A. M. Ferreira, P. Gentile, V. Chiono, and G. Ciardelli, "Collagen for bone tissue regeneration," *Acta Biomater.*, vol. 8, no. 9, pp. 3191–3200, 2012.
- [46] K. Gelse, E. Pöschl, and T. Aigner, "Collagens - Structure, function, and biosynthesis," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 55, no. 12, pp. 1531–1546, 2003.
- [47] G. Montalbano, S. Fiorilli, A. Caneschi, and C. Vitale-brovarone, "Type I collagen and strontium-containing mesoporous glass particles as hybrid material for 3D printing of bone like materials," pp. 1–17, 2017.
- [48] K. E. Drzewiecki *et al.*, "Methacrylation Induces Rapid, Temperature-Dependent, Reversible Self-Assembly of Type - I Collagen," 2014.
- [49] A. Sionkowska and J. Kozłowska, "Properties and modification of porous 3-D collagen/hydroxyapatite composites," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 52, no. 1, pp. 250–259, 2013.
- [50] W. T. Brinkman, K. Nagapudi, B. S. Thomas, and E. L. Chaikof, "Photo-Cross-Linking of Type I

Collagen Gels in the Presence of Smooth Muscle Cells : Mechanical Properties , Cell Viability , and Function,” pp. 890–895, 2003.

- [51] C. H. Lee, A. Singla, and Y. Lee, “Biomedical applications of collagen,” *Int. J. Pharm.*, vol. 221, no. 1–2, pp. 1–22, 2001.
- [52] C. Vitale Brovarone and G. Monalbano, “Dispense di Ingegneria dei materiali.” .
- [53] J. R. Jones, “Acta Biomaterialia Reprint of : Review of bioactive glass : From Hench to hybrids,” *Acta Biomater.*, vol. 23, pp. S53–S82, 2015.
- [54] A. Hoppe, N. S. Güldal, and A. R. Boccaccini, “A review of the biological response to ionic dissolution products from bioactive glasses and glass-ceramics,” *Biomaterials*, vol. 32, no. 11, pp. 2757–2774, 2011.
- [55] C. Wu and J. Chang, “Mesoporous bioactive glasses: structure characteristics, drug/growth factor delivery and bone regeneration application.”
- [56] X. X. Yan *et al.*, “Mesoporous bioactive glasses. I. Synthesis and structural characterization,” *J. Non. Cryst. Solids*, vol. 351, no. 40–42, pp. 3209–3217, 2005.
- [57] S. Fiorilli *et al.*, “The incorporation of strontium to improve bone-regeneration ability of mesoporous bioactive glasses,” *Materials (Basel)*, vol. 11, no. 5, 2018.
- [58] C. Wu, Y. Zhang, Y. Zhou, W. Fan, and Y. Xiao, “A comparative study of mesoporous glass/silk and non-mesoporous glass/silk scaffolds: Physiochemistry and in vivo osteogenesis,” *Acta Biomater.*, vol. 7, no. 5, pp. 2229–2236, 2011.
- [59] C. J. Brinker, “Evaporation-induced self-assembly: Functional nanostructures made easy,” *MRS Bull.*, vol. 29, no. 9, pp. 631–640, 2004.
- [60] M. Colilla, M. Manzano, and M. Vallet-Ragí, “Recent advances in ceramic implants as drug delivery systems for biomedical applications,” *Int. J. Nanomedicine*, vol. 3, no. 4, pp. 403–414, 2008.
- [61] L. Pontiroli, M. Dadkhah, G. Novajra, I. Tcacencu, S. Fiorilli, and C. Vitale-Brovarone, “An aerosol-spray-assisted approach to produce mesoporous bioactive glass microspheres

under mild acidic aqueous conditions,” *Mater. Lett.*, vol. 190, pp. 111–114, 2017.

- [62] A. Sosnik and K. P. Seremeta, “Advantages and challenges of the spray-drying technology for the production of pure drug particles and drug-loaded polymeric carriers,” *Adv. Colloid Interface Sci.*, vol. 223, pp. 40–54, 2015.
- [63] K. Zheng and A. R. Boccaccini, “Sol-gel processing of bioactive glass nanoparticles: A review,” *Adv. Colloid Interface Sci.*, vol. 249, pp. 363–373, 2017.
- [64] L. L. Hench and J. K. West, “The sol-gel process,” *Chem. Rev.*, vol. 90, no. 1, pp. 33–72, 1990.
- [65] W. J. Bae, K. S. Min, J. J. Kim, J. J. Kim, H. W. Kim, and E. C. Kim, “Odontogenic responses of human dental pulp cells to collagen/nanobioactive glass nanocomposites,” *Dent. Mater.*, vol. 28, no. 12, pp. 1271–1279, 2012.
- [66] B. Sarker, J. Hum, S. N. Nazhat, and A. R. Boccaccini, “Combining collagen and bioactive glasses for bone tissue engineering: A review,” *Adv. Healthc. Mater.*, vol. 4, no. 2, pp. 176–194, 2015.
- [67] B. Marelli, C. E. Ghezzi, J. E. Barralet, A. R. Boccaccini, and S. N. Nazhat, “Three-dimensional mineralization of dense nanofibrillar collagen-bioglass hybrid scaffolds,” *Biomacromolecules*, vol. 11, no. 6, pp. 1470–1479, 2010.
- [68] B. Manickam, R. Sreedharan, and M. Elumalai, “‘Genipin’ – The Natural Water Soluble Cross-linking Agent and Its Importance in the Modified Drug Delivery Systems: An Overview,” *Curr. Drug Deliv.*, vol. 11, no. 1, pp. 139–145, 2014.
- [69] M. Sanami *et al.*, “The influence of poly(ethylene glycol) ether tetrasuccinimidyl glutarate on the structural, physical, and biological properties of collagen fibers,” *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.*, vol. 104, no. 5, pp. 914–922, 2016.
- [70] H. G. Sundararaghavan, G. A. Monteiro, N. A. Lapin, Y. J. Chabal, J. R. Miksan, and D. I. Shreiber, “Genipin-induced changes in collagen gels: Correlation of mechanical properties to fluorescence,” *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*, vol. 87, no. 2, pp. 308–320, 2008.
- [71] Y. Yang, Y. Ding, and T. Zhang, “Biotransformation of geniposide into genipin by immobilized

- trichoderma reesei and conformational study of genipin," *Biomed Res. Int.*, vol. 2018, 2018.
- [72] Y.-J. Hwang, J. Larsen, T. B. Krasieva, and J. G. Lyubovitsky, "Effect of genipin crosslinking on the optical spectral properties and structures of collagen hydrogels.," *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 3, no. 7, pp. 2579–84, 2011.
- [73] "https://openi.nlm.nih.gov/detailedresult.php?img=PMC3249303_kjtcs-44-197-g004&req=4." .
- [74] M. Sanami *et al.*, "Biophysical and biological characterisation of collagen/resilin-like protein composite fibres," *Biomed. Mater.*, vol. 10, no. 6, p. 065005, 2015.
- [75] A. G. Mikos, G. Sarakinos, S. M. Leite, J. P. Vacanti, and R. Langer, "Laminated three-dimensional biodegradable foams for use in tissue engineering," *Biomaterials*, vol. 14, no. 5, pp. 323–330, 1993.
- [76] D. J. Mooney, D. F. Baldwin, N. P. Suh, J. P. Vacanti, and R. Langer, "Novel approach to fabricate porous sponges of poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) without the use of organic solvents," *Biomaterials*, vol. 17, no. 14, pp. 1417–1422, 1996.
- [77] L. D. Harris, B. S. Kim, and D. J. Mooney, "Open pore biodegradable matrices formed with gas foaming," *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 42, no. 3, pp. 396–402, 1998.
- [78] K. Whang, C. H. Thomas, K. E. Healy, and G. Nuber, "A novel method to fabricate bioabsorbable scaffolds," *Polymer (Guildf)*, vol. 36, no. 4, pp. 837–842, 1995.
- [79] Y. S. Nam and T. G. Park, "Porous biodegradable polymeric scaffolds prepared by thermally induced phase separation.," *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 47, no. 1, pp. 8–17, 1999.
- [80] Y. S. Nam, J. J. Yoon, and T. G. Park, "A novel fabrication method of macroporous biodegradable polymer scaffolds using gas foaming salt as a porogen additive," *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 53, no. 1, pp. 1–7, 2000.
- [81] M. Tenuta, X. Gao, D. N. Flaten, and B. D. Amiro, "Lower Nitrous Oxide Emissions from Anhydrous Ammonia Application Prior to Soil Freezing in Late Fall Than Spring Pre-Plant Application," *J. Environ. Qual.*, vol. 45, no. 4, p. 1133, 2016.

- [82] F. P. W. Melchels, W. J. A. Dhert, D. W. Hutmacher, and J. Malda, "Development and characterisation of a new bioink for additive tissue manufacturing," *J. Mater. Chem. B*, vol. 2, no. 16, pp. 2282–2289, 2014.
- [83] J. Malda *et al.*, "25th anniversary article: Engineering hydrogels for biofabrication," *Adv. Mater.*, vol. 25, no. 36, pp. 5011–5028, 2013.
- [84] M. N. Cooke, J. P. Fisher, D. Dean, C. Rimnac, and A. G. Mikos, "Use of Stereolithography to Manufacture Critical-Sized 3DBiodegradable Scaffolds for Bone Ingrowth," pp. 65–69, 2002.
- [85] I. Zein, D. W. Hutmacher, K. C. Tan, and S. H. Teoh, "Fused deposition modeling of novel scaffold architectures for tissue engineering applications," *Biomaterials*, vol. 23, no. 4, pp. 1169–1185, 2002.
- [86] B. N. Mason, A. Starchenko, R. M. Williams, L. J. Bonassar, and C. A. Reinhart-King, "Tuning three-dimensional collagen matrix stiffness independently of collagen concentration modulates endothelial cell behavior," *Acta Biomater.*, vol. 9, no. 1, pp. 4635–4644, 2013.
- [87] W. L. Ng, J. M. Lee, W. Y. Yeong, and M. Win Naing, "Microvalve-based bioprinting-process, bio-inks and applications," *Biomater. Sci.*, vol. 5, no. 4, pp. 632–647, 2017.
- [88] I. T. Ozbolat and M. Hospodiuk, "Current advances and future perspectives in extrusion-based bioprinting," *Biomaterials*, vol. 76, pp. 321–343, 2016.
- [89] C. Wu *et al.*, "Copper-containing mesoporous bioactive glass scaffolds with multifunctional properties of angiogenesis capacity, osteostimulation and antibacterial activity," *Biomaterials*, vol. 34, no. 2, pp. 422–433, 2013.
- [90] I. Cacciotti, "Bivalent cationic ions doped bioactive glasses: the influence of magnesium, zinc, strontium and copper on the physical and biological properties," *J. Mater. Sci.*, vol. 52, no. 15, 2017.
- [91] S. M. Rabiee, N. Nazparvar, M. Azizian, D. Vashaei, and L. Tayebi, "Effect of ion substitution on properties of bioactive glasses: A review," *Ceram. Int.*, vol. 41, no. 6, pp. 7241–7251, 2015.

- [92] M. Yamaguchi, "Role of nutritional zinc in the prevention of osteoporosis," *Mol. Cell. Biochem.*, vol. 338, no. 1–2, pp. 241–254.
- [93] S. Castiglioni, A. Cazzaniga, W. Albisetti, and J. A. M. Maier, "Magnesium and osteoporosis: Current state of knowledge and future research directions," *Nutrients*, vol. 5, no. 8, pp. 3022–3033, 2013.
- [94] C. Wu *et al.*, "Proliferation, differentiation and gene expression of osteoblasts in boron-containing associated with dexamethasone deliver from mesoporous bioactive glass scaffolds," *Biomaterials*, vol. 32, no. 29, pp. 7068–7078, 2011.
- [95] J. C. Zhang, Y. P. Li, Q. Zhang, and S. X. Wang, "Effect of praseodymium chloride on proliferation, differentiation and mineralization of primary mouse Osteoblasts in vitro," *Chinese J. Inorg. Chem.*, vol. 28, no. 8, pp. 1749–1754, 2012.
- [96] R. C. Reginster JY, Deroisy R, Dougados M, Jupsin I, Colette J, "Prevention of early postmenopausal bone loss by strontium ranelate: the randomized, two-year, double-masked, dose-ranging, placebo-controlled PREVOS trial.," *Osteoporos Int*, 2002.
- [97] J. Y. Reginster *et al.*, "Strontium ranelate reduces the risk of nonvertebral fractures in postmenopausal women with osteoporosis: Treatment of Peripheral Osteoporosis (TROPOS) study," *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 90, no. 5, pp. 2816–2822, 2005.
- [98] R. J. Meunier PJ, Slosman DO, Delmas PD, Sebert JL, Brandi ML, Albanese C, Lorenc R, Pors-Nielsen S, De Vernejoul MC, Roces A, "Strontium ranelate: dose-dependent effects in established postmenopausal vertebral osteoporosis--a 2-year randomized placebo controlled trial.," 2002.
- [99] A. Moghanian, S. Firoozi, and M. Tahriri, "Characterization, in vitro bioactivity and biological studies of sol-gel synthesized SrO substituted 58S bioactive glass," *Ceram. Int.*, vol. 43, no. 17, pp. 14880–14890, 2017.
- [100] F. Taherkhani, S.; Moztaizadeh, "Influence of strontium on the structure and biological properties of sol-gel-derived mesoporous bioactive glass (MBG) powder," *Sol-Gel Sci. Technol*, 2016.

- [101] P. Naruphontjirakul, A. E. Porter, and J. R. Jones, "In vitro osteogenesis by intracellular uptake of strontium containing bioactive glass nanoparticles," *Acta Biomater.*, vol. 66, pp. 67–80, 2018.
- [102] F. F. Liu J, Rawlinson SC1, Hill RG, "Strontium-substituted bioactive glasses in vitro osteogenic and antibacterial effects.," *Dent Mater.*, 2016.
- [103] F. D. Atkins GJ, Welldon KJ, Halbout P, "Strontium ranelate treatment of human primary osteoblasts promotes an osteocyte-like phenotype while eliciting an osteoprotegerin response.," *Osteoporos Int.*, 2009.
- [104] M. R. Brennan TC, Rybchyn MS, Green W, Atwa S, Conigrave AD, "Osteoblasts play key roles in the mechanisms of action of strontium ranelate.," *Br J Pharmacol*, 2009.
- [105] B. M. Marie PJ, Felsenberg D, "How strontium ranelate, via opposite effects on bone resorption and formation, prevents osteoporosis.," *Osteoporos Int*, 2011.
- [106] Z. Saidak and P. J. Marie, "Strontium signaling: Molecular mechanisms and therapeutic implications in osteoporosis," *Pharmacol. Ther.*, vol. 136, no. 2, pp. 216–226, 2012.
- [107] R. Bedini *et al.*, "Rapporti ISTISAN 10/15 ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ Analisi microtomografica del tessuto osseo trabecolare: influenza della soglia di binarizzazione sul calcolo dei parametri istomorfometrici," vol. 4915, no. 10, 2010.
- [108] H. P. Schwarcz, D. Abueidda, and I. Jasiuk, "The Ultrastructure of Bone and Its Relevance to Mechanical Properties," *Front. Phys.*, vol. 5, no. September, 2017.
- [109] J.-M. Pagani, R.; Chiesa, G.; Tulliani, *Biomimetica e Architettura. Come la natura domina la tecnologia.* 2016.
- [110] T. J. Hinton *et al.*, "Three-dimensional printing of complex biological structures by freeform reversible embedding of suspended hydr(1) Hinton, T. J.; Jallerat, Q.; Palchesko, R. N.; Park, J. H.; Grodzicki, M. S.; Shue, H.-J.; Ramadan, M. H.; Hudson, A. R.; Feinberg, A. W. Thr," *Sci. Adv.*, vol. 1, no. 9, pp. e1500758–e1500758, 2015.
- [111] "https://areeweb.polito.it/ricerca/carbongroup/fac_fesem.html."

- [112] G.-J. Janssen, "1.1.What does the word FESEM mean?"
- [113] "<https://smfi.unipr.it/it/node/3354>." .
- [114] "http://www.ing.unitn.it/~colombo/7020MANU/MICROSCOPIA_ELETTRONICA_A_SCANSIONE_NE.htm." .
- [115] "Microscopio a scansione elettronica dalle lezioni del prof . Vittone Indice," 2004.
- [116] "<https://www.phenom-world.com/desktop-scanning-electron-microscopes/phenom-pharos>." .
- [117] A. Gorassini, "Spettrofotometria infrarossa in riflettanza totale attenuata," pp. 133–152.
- [118] "<http://labterenzi.unical.it/metcf%5COLivieroIR.pdf>." .
- [119] R. Baxter, N. Hastings, A. Law, and E. J. . Glass, "FTIR-ATR," *Anim. Genet.*, vol. 39, no. 5, pp. 561–563, 2008.
- [120] A. Frache, "Dispense di Tecnologia dei materiali polimerici." .
- [121] M. Sangermano, "Dispense di Scienza e tecnologia dei materiali polimerici." .
- [122]: "<http://www.directindustry.it/prod/ta-instruments/product-38477-517980.html>." .
- [123] J. Jang, T. G. Kim, B. S. Kim, S. W. Kim, S. M. Kwon, and D. W. Cho, "Tailoring mechanical properties of decellularized extracellular matrix bioink by vitamin B2-induced photocrosslinking," *Acta Biomater.*, vol. 33, pp. 88–95, 2016.
- [124] "<https://cellink.com/>:" .
- [125] "<https://cellink.com/product/cellink-bio-x-bioprinter/>:" .
- [126] A. El-Fiqi, J. H. Lee, E. J. Lee, and H. W. Kim, "Collagen hydrogels incorporated with surface-aminated mesoporous nanobioactive glass: Improvement of physicochemical stability and mechanical properties is effective for hard tissue engineering," *Acta Biomater.*, vol. 9, no. 12, pp. 9508–9521, 2013.
- [127] E. Sharifi *et al.*, "Preparation of a biomimetic composite scaffold from gelatin/collagen and

bioactive glass fibers for bone tissue engineering," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 59, pp. 533–541, 2016.

- [128] X. Chen, C. Guo, and N. Zhao, "Preparation and characterization of the sol-gel nano-bioactive glasses modified by the coupling agent gamma-aminopropyltriethoxysilane," *Appl. Surf. Sci.*, vol. 255, no. 2, pp. 466–468, 2008.
- [129] A. Wittmar, D. Ruiz-Abad, and M. Ulbricht, "Dispersions of silica nanoparticles in ionic liquids investigated with advanced rheology," *J. Nanoparticle Res.*, 2012.
- [130] H. Shao, J. He, T. Lin, Z. Zhang, Y. Zhang, and S. Liu, "3D gel-printing of hydroxyapatite scaffold for bone tissue engineering," *Ceram. Int.*, no. May, pp. 0–1, 2018.
- [131] A. A. Al-Munajjed *et al.*, "Development of a biomimetic collagen-hydroxyapatite scaffold for bone tissue engineering using a SBF immersion technique," *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.*, vol. 90 B, no. 2, pp. 584–591, 2009.
- [132] J. P. Gleeson, N. A. Plunkett, and F. J. O'Brien, "Addition of hydroxyapatite improves stiffness, interconnectivity and osteogenic potential of a highly porous collagen-based scaffold for bone tissue regeneration," *Eur. Cells Mater.*, vol. 20, no. 0, pp. 218–230, 2010.
- [133] X. Zhang *et al.*, "The effects of different crossing-linking conditions of genipin on type I collagen scaffolds: an in vitro evaluation," *Cell Tissue Bank.*, vol. 15, no. 4, pp. 531–541, 2014.
- [134] I. D. Gaudet and D. I. Shreiber, "Characterization of methacrylated Type-I collagen as a dynamic, photoactive hydrogel," *Biointerphases*, vol. 7, no. 1–4, pp. 1–9, 2012.

Ringraziamenti

Un ringraziamento particolare va alla professoressa Chiara Vitale Brovarone che mi ha permesso di lavorare nell'ambito di un progetto interessante e ambizioso come il progetto ERC BOOST.

Ringrazio l'Ing. Giorgia Montalbano che con grande pazienza e disponibilità mi ha guidato durante le attività di laboratorio e la stesura di questo lavoro.

Ringrazio l'Ing. Maria Chiara Palmieri e la Dott.^{ssa} Carlotta Pontremoli per la sintesi delle particelle di vetro mesoporoso.

Grazie alla mia famiglia che mi ha sempre sostenuto e appoggiato in ogni mia scelta. Grazie Mamma e grazie Papà che mi siete sempre stati accanto come due angeli custodi anche a 1200km distanza.

Grazie a Roberto che più di tutti mi è stato accanto in questi anni e che, anche nei momenti più difficili, è riuscito a tranquillizzarmi strappandomi un sorriso.

Grazie ai miei amici e alla mia "famiglia torinese" con cui ho condiviso la quotidianità, le ansie degli esami ma specialmente la gioia dello stare insieme.