POLITECNICO DI TORINO

Collegio di Ingegneria Biomedica

Corso di Laurea Magistrale in Ingegneria Biomeccanica

Tesi di Laurea Magistrale

Rivestimenti Antibatterici e Antiadesivi per Dispositivi di Fissazione Temporanea



Relatrici:

Ing. Sara Ferraris

Prof.essa Silvia Maria Spriano

Prof.essa Enrica Verné

Candidata:

Alice Ristorto

Marzo-Aprile 2019

SOMMARIO

Background: I sistemi di fissazione esterna e interna sono utilizzati nella pratica ortopedica comune, per guarire l'osso, in caso di fratture. Sono dispositivi complessi, realizzati per la maggior parte dei biomateriali metallici, come il titanio e l'acciaio inossidabile. L'infezione sulle superfici di tali impianti rimane un problema rilevante, che di solito è difficile da trattare e può portare alla eventuale rimozione precoce dell'impianto. Inoltre, poiché sono dispositivi temporanei, richiedono biocompatibilità, capacità di sostenere la guarigione dell'osso ma una crescita eccessiva dei tessuti moderata, per rimuoverli facilmente e senza alcun danno collaterale. Di conseguenza, sono necessarie misure preventive per inibire la contaminazione batterica e la crescita eccessiva dei tessuti.

Obiettivi: Questa tesi si colloca nell'ambito di un progetto europeo (Easy-Fix, MANUNET MNET17 / NMCS2311) in collaborazione con un produttore italiano di dispositivi di fissazione temporanea (Intrauma S.p.A.). Lo scopo del lavoro è la realizzazione di innovativi dispositivi di fissazione temporanea antibatterici e antiadesivi, per superare le principali problematiche sopra citate. L'interesse principale di questa ricerca è lo sviluppo di dispositivi medici con proprietà antibatteriche e antiadesive, poiché potrebbero ridurre drasticamente le infezioni e la crescita eccessiva di tessuto.

Metodi: Un rivestimento costituito da nanocluster di argento incorporato in diverse matrici (silice, allumina e zirconia), è stato depositato, tramite la tecnica di sputtering a radiofrequenza (RF), su titanio commercialmente puro, lega di titanio (Ti6Al4V) e acciaio inossidabile (AISI 304L) con l'obiettivo di conferire proprietà antibatteriche e antiadesive, mantenendo la biocompatibilità. Le caratteristiche fisico-chimiche dei rivestimenti sono state analizzate mediante: microscopia elettronica a scansione a emissione di campo (FESEM), misure dell'angolo di contatto a diffrazione ai raggi X (XRD) e profilometria di contatto per valutare morfologia del coating, composizione, rugosità superficiale, bagnabilità, dimensioni e distribuzione locale delle nanoparticelle all'interno del rivestimento. Le misure del potenziale zeta sono state utilizzate per studiare la carica superficiale in funzione del pH, a contatto con un mezzo a base acquosa. La quantità e la

dipendenza rispetto al tempo del rilascio di ioni d'argento in soluzioni di acqua ultra-pura sono stati determinati con la spettrometria di massa (ICP-MS); la stabilità dei rivestimenti è stata valutata anche a contatto con il mezzo di rilascio. L'adesione del rivestimento ai diversi substrati è stata studiata mediante il tape test (ASTM D3359-97).

Risultati: Nell'attuale tesi rivestimenti a base di silice, allumina o zirconia arricchiti con argento sono stati depositati, con successo, su acciaio inossidabile (316L), titanio grado 4 e 5. Lo spessore dei rivestimenti è di circa 150 nm. La rugosità superficiale è in tutti i casi inferiore a 0.2 μm, citato nella letteratura come valore discriminante, al di sotto del quale una potenziale adesione microbica non viene incrementata. L'adesione del rivestimento al substrato è ottimale per tutte le matrici e i substrati, come dimostrano i tape test. Il test di bagnabilità mostra una maggiore idrofilicità ottenuta in tutti i campioni rivestiti, rispetto ai substrati nudi, ma in un modo più pronunciato per i rivestimenti a base di silice. I campioni rivestiti hanno rilasciato una piccola quantità di ioni d'argento in acqua ultrapura; la quantità rilasciata è, per tutti i materiali testati, al di sotto del limite di citotossicità riportato in letteratura. I rivestimenti testati hanno mostrato una diversa stabilità in acqua, in particolare la matrice di zirconia ha dimostrato maggiore stabilità in lunghi periodi, rispetto ad altri rivestimenti.

INDICE DEI CAPITOLI

SOMMARIO		3
INTRODUZION	NE	9
Capitolo 1.	Problematiche associate ai dispositivi temporanei di osteosintesi	11
1.1 Disp	positivi temporanei	. 11
1.1.1	Dispositivi per traumatologia: i fissatori	. 11
1.1.1.1	1 I fissatori interni	. 12
1.1.1.2	2 I fissatori esterni	. 15
1.2 Con	ntaminazione batterica	. 18
1.2.1	Formazione del biofilm batterico	. 19
1.2.1.1	1 I costituenti del biofilm: i batteri	. 20
1.2.1.2	2 I costituenti del biofilm: la matrice extracellulare	. 22
1.2.2	Adesione batterica sui metalli	. 25
1.2.2.1	Adesione batterica su dispositivi di fissazione per traumatologia	. 27
1.3 Ecce	essiva crescita tissutale	. 39
1.3.1	Formazione del tessuto osseo	. 39
1.3.1.1	1 Cellule coinvolte	. 40
1.3.1.2	2 Osteogenesi	. 42
1.3.	1.2.1 Ossificazione intramembranosa	. 42
1.3.	1.2.2 Ossificazione endocondrale	. 43
1.3.2	Crescita ossea all'interfaccia osso-impianto	. 45
1.3.2.1	1 Risposta del materiale	. 45
1.3.2.2	2 Risposta dell'organismo	. 47
1.3.2.3	3 Fattori determinanti	. 48
1.3.3	Crescita ossea nei fissatori	. 55
Capitolo 2.	Rivestimenti antibatterici ed antiadesivi su superfici metalliche	57
2.1 Rive	estimenti antihatterici	57

	Rivestimenti antibatterici a base di metalli57	
2.1.1.1	L'uso del rame	
2.1.1.2	L'uso dello zinco	
2.1.1.3	L'uso dell'argento65	
2.2 Tipol	ogie di rivestimenti antibatterici	
2.2.1	Tecniche che prevedono la deposizione di un rivestimento	
2.2.1.1	Deposizione assistita da fasci ionici	
2.2.1.2	Tecniche elettrochimiche	
2.2.1.3	Scambio ionico	
2.2.1.4	Tecnica sol-gel80	
2.2.1.5	Physical vapor deposition84	
2.2.1.6	Sputtering86	
2.2.1.7	Plasma spray91	
2.2.1.8	Tabella riassuntiva94	
3.1 Tecn	iche di caratterizzazione fisico-chimica	
	iche di caratterizzazione fisico-chimica	
3.2 Tecniche	iche di caratterizzazione fisico-chimica	
3.2 Tecniche 3.2.1 Defi	di caratterizzazione antibatterica	
3.2 Tecniche 3.2.1 Defi 3.2.2 Met	nizione di antibattericità	
3.2 Tecniche 3.2.1 Defi 3.2.2 Met 3.2.3 Met	nizione di antibattericità	
3.2 Tecniche 3.2.1 Defi 3.2.2 Met 3.2.3 Met 3.2.4 Met	e di caratterizzazione antibatterica	
3.2 Tecniche 3.2.1 Defi 3.2.2 Met 3.2.3 Met 3.2.4 Met 3.2.5 Met	e di caratterizzazione antibatterica	
3.2.1 Defi 3.2.2 Met 3.2.3 Met 3.2.4 Met 3.2.5 Met 3.2.6 Met	e di caratterizzazione antibatterica	
3.2 Tecniche 3.2.1 Defi 3.2.2 Met 3.2.3 Met 3.2.4 Met 3.2.5 Met 3.2.6 Met 3.2.7 Tabe	e di caratterizzazione antibatterica	
3.2 Tecniche 3.2.1 Defi 3.2.2 Met 3.2.3 Met 3.2.4 Met 3.2.5 Met 3.2.6 Met 3.2.7 Tabe 3.3 Tecniche	di caratterizzazione antibatterica	
3.2 Tecniche 3.2.1 Defi 3.2.2 Met 3.2.3 Met 3.2.4 Met 3.2.5 Met 3.2.6 Met 3.2.7 Tabe 3.3 Tecniche 3.3.1 Norre	di caratterizzazione antibatterica	
3.2 Tecniche 3.2.1 Defi 3.2.2 Met 3.2.3 Met 3.2.4 Met 3.2.5 Met 3.2.6 Met 3.2.7 Tabe 3.3 Tecniche 3.3.1 Norn 3.3.2 Cito	r di caratterizzazione antibatterica	
3.2 Tecniche 3.2.1 Defi 3.2.2 Met 3.2.3 Met 3.2.4 Met 3.2.5 Met 3.2.6 Met 3.2.7 Tabe 3.3 Tecniche 3.3.1 Norn 3.3.2 Cito 3.3.3 Ade	nizione di antibattericità	
3.2 Tecniche 3.2.1 Defi 3.2.2 Met 3.2.3 Met 3.2.4 Met 3.2.5 Met 3.2.6 Met 3.2.7 Tabe 3.3 Tecniche 3.3.1 Norn 3.3.2 Cito 3.3.3 Ade 3.3.3.1	r di caratterizzazione antibatterica	

3.3.3.2.2 Camera di flusso radiale	137
3.3.3.2.3 Camera di flusso a piastra parallela	139
3.3.3.3 Micromanipolazione a cellula singola	141
3.3.3.1 Citodistaccamento	141
3.3.3.2 Aspirazione con micropipetta	142
3.3.3.4 Tecniche ulteriori	145
3.3.4 Tabella riassuntiva	145
Capitolo 4. Materiali e metodi adoperati in fase speriment	tale147
4.1 Substrati	147
4.2 Preparazione e lavaggio dei campioni	148
4.3 Rivestimento dei campioni	148
4.3 Tecniche di caratterizzazione	152
4.3.1 Bagnabilità	153
4.3.2 Misure di rugosità	155
4.3.3 Test di rilascio	156
4.3.3.1 Misura con fotometro portatile	157
4.3.3.2 Misura con spettrometria di massa	159
4.3.4 Tape test	161
4.3.5 Microscopio a scansione elettronica (SEM)	162
4.3.6 Diffrazione a raggi X	166
4.3.7 Potenziale zeta	167
4.3.8 Test antibatterico	172
Capitolo 5. Risultati	173
5.1 Osservazioni macroscopiche	173
5.2 Bagnabilità	
5.3 Rugosità	
5.4 FESEM	179
5.4.1 EDS	195
5.5 Test di rilascio in acqua	198

5.5.1 Misura con fotometro portatile
5.5.1.1 Valori di rilascio
5.5.2 Misura con spettrometria di massa
5.5.2.1 Campioni B1
5.5.2.2 Campioni B2
5.5.2.3 EDS post-rilascio
5.5.2.4 Valori di rilascio
5.6 Tape test
5.7 Diffrazione a raggi x225
5.8 Potenziale zeta
Capitolo 6. Conclusioni
BIBLIOGRAFIA
FONTI DELLE FIGURE
FONTI DELLE TABELLE
RINGRAZIAMENTI

INTRODUZIONE

La presenza di un impianto biomedicale all'interno del corpo umano aumenta la suscettibilità alle infezioni, stimolando il sistema immunitario a reagire e ad attivare le proprie difese. La superficie di un biomateriale acquisisce, una volta in sede, un film di proteine immerse in una matrice extracellulare (ECM), strato biologicamente attivo composto da una complessa combinazione di macromolecole. L'adesione, la migrazione, la proliferazione e la differenziazione delle cellule sono influenzate dalla composizione e dall'organizzazione strutturale della ECM.

Tuttavia, tale matrice non funge da substrato unicamente per le cellule ospiti, ma anche per i batteri. È stato infatti dimostrato che i microorganismi, quali ad esempio lo *Staphylococcus Aureus*, attraverso le basi azotate del proprio DNA esprimono adesine [1], le quali promuovono il contatto con il plasma e in un secondo momento con le superfici metalliche o polimeriche.

In caso di fratture ossee, che siano chiuse o aperte (in questi casi l'osso fratturato attraversa la cute soprastante ed è a contatto con l'ambiente), occorre intervenire attraverso un sistema per osteosintesi. Fissatori interni rigidi consentono una precoce mobilizzazione e possono essere usati per fratture chiuse ed aperte di grado I; tali sistemi presentano però varie problematiche, che includono loosening dei perni, quindi perdita di stabilità e possibile sviluppo di infezioni ossee. Queste ultime portano spesso a osteomieliti, difficili da trattare attraverso gli antibiotici per via del biofilm che rende il ceppo batterico particolarmente resistente.

Le piastre interne non sono raccomandate per fratture aperte di grado più alto, le quali vengono invece trattate con dispositivi di fissazione esterna, meno invasivi e molto stabili. I fissatori esterni sono tuttavia soggetti ad infezioni localizzate nella zona dei perni, per varie cause quali la lunghezza del tempo per cui è inserito il dispositivo, il movimento della pelle, la necrosi dei tessuti dovuta alla tecnica di inserzione. Nonostante la profilassi antibiotica sistemica e le procedure operative quanto più possibile asettiche, il problema non è totalmente risolto. Occasionalmente queste infezioni, comunemente causate da *Staphylococci*, persistono, nonostante l'uso di antibiotici.

Risulta quindi evidente la necessità di sviluppare superfici metalliche con proprietà antibatteriche, che contrastino la formazione del biofilm e lo sviluppo di infezioni.

Capitolo 1. Problematiche associate ai dispositivi temporanei di osteosintesi

1.1 Dispositivi temporanei

Per dispositivo biomedico, in accordo con le normative EN-ISO, si intende un prodotto, quale strumento, apparecchio, sostanza, impianto, software o altro, destinato ad essere impiegato nell'uomo o sull'uomo a scopo di diagnosi, terapia, compensazione di handicap, ma anche di studio, sostituzione o modifica dell'anatomia o di un processo fisiologico.

I dispositivi biomedici vengono raggruppati, in funzione di diversi fattori, quali l'invasività degli stessi, la dipendenza da una fonte di energia (si parla qui di dispositivi attivi) e la durata del tempo di contatto con il corpo, in base alle regole riportate nell'Allegato IX del Decreto legislativo 24 febbraio 1997, n 46 [2]. Di particolare interesse in questa trattazione è la distinzione basata sulla durata di utilizzo prevista; si possono infatti individuare le seguenti classi:

- Dispositivi ad uso temporaneo, se la durata continua prevista è inferiore a 60 minuti;
- Dispositivi per uso a breve termine, se la durata continua prevista non è superiore
 a 30 giorni;
- o Dispositivi per utilizzo a lungo termine, qualora la durata continua superi 30 giorni.

In base a tale classificazione protesi di ginocchio, ad esempio, possono essere annoverate tra i dispositivi a lungo termine, cosi come i dispositivi per osteosintesi, i quali però, dovendo essere rimossi dopo un periodo di tempo che va da qualche mese a qualche anno, non sono considerati permanenti.

1.1.1 Dispositivi per traumatologia: i fissatori

Con il termine frattura ci si riferisce all'interruzione dell'integrità strutturale dell'osso per motivi di tipo traumatico o spontaneo. Nella maggior parte dei casi, essa è trattata con un approccio di tipo conservativo che prevede l'immobilizzazione mediante bendaggio gessato. Tuttavia, in alcune circostanze è necessario stabilizzare i segmenti ossei attraverso dispositivi di tipo meccanico: in tale caso si parla di osteosintesi. Essa è una metodica che prevede l'esecuzione di un intervento chirurgico e l'impianto di dispositivi (es. chiodi, placche, viti, fissatori esterni ed interni), generalmente metallici, di ausilio alla stabilizzazione del segmento osseo fratturato.

Si esegue quindi la fissazione con mezzo idoneo, eseguita successivamente ad una riduzione¹, di due o più frammenti di osso, con lo scopo di ripristinare la continuità scheletrica interrotta a causa di un trauma. La scelta dei mezzi di osteosintesi, quali chiodi, placche, viti, fissatori esterni ed interni, sia usati singolarmente che combinati, dipende del tipo di frattura, dalla sede, della classificazione, delle condizioni generali del paziente, e soprattutto del tipo di osso da trattare: infatti per gli arti inferiori si punta ad ottenere una precoce mobilizzazione, mentre per quelli superiori si privilegia un rispristino di funzionalità.

I fissatori possono essere innanzitutto distinti in interni o esterni; nel primo caso i componenti, solitamente in acciaio o titanio, sono collocati all'interno del corpo, mentre la seconda tipologia prevede che la maggior parte degli elementi sia all'esterno e collegato alle ossa tramite viti o fili tensionati.

1.1.1.1 | fissatori interni

La fissazione interna comprende varie tecniche chirurgiche, usate a seconda del tipo di frattura del paziente: quella a riduzione aperta (ORIF-*Open Reduction Internal Fixation*) si attua impiantando innesti che guidino il processo di guarigione dell'osso, dopo aver aperto la cute e visto chiaramente la frattura, mentre quella a riduzione chiusa, o *Closed*

_

¹ Per riduzione si intende una manovra che porta a riallineare i frammenti di una frattura, ripristinando così la forma originaria dell'osso prima della frattura; si esegue nei casi di fratture scomposte nelle quali l'osso ha perso la sua forma originale e i monconi di frattura sono orientati diversamente tra loro.

Reduction Internal Fixation (CRIF), si limita a mantenere la pelle integra e a manipolare il sito dall'esterno, al fine di far tornare le ossa in posizione e poi immobilizzare la zona fino a completa guarigione.

La fissazione avviene tramite viti e/o placche, chiodi intramidollari o perni ossei; è rigida, al fine di impedire il micromovimento attraverso le linee di frattura per consentire la guarigione e prevenire l'infezione. Tali tecniche sono spesso usate nei casi che coinvolgono le fratture serie quali quelle comminute o spostate.

I sistemi che impiegano placche e viti stabilizzano i segmenti ossei servendosi di due elementi accoppiati. Si distinguono in placche di tipo neutro, il cui scopo principale è quello di mantenere in posizione i vari segmenti ossei in presenza di fratture scomposte, e di compressione, impiantate al fine di esercitare una forza costante. Le prime sono deputate a funzioni di sostegno ed irrigidimento; consentono di suddividere il carico tra

osso e placca. Le seconde invece possiedono viti, le quali si accoppiano con fori conformati in modo tale che la vite trasli durante l'inserimento e ciò consenta lo scivolamento della placca sull'osso. A mano a mano che viene stretta, la placca esercita una forza tale da comprimere i monconi nella posizione corretta,

come mostrato in figura 1.1.

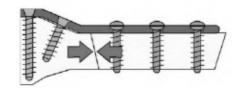


Figura 1.1- Compressione dei monconi, ottenuta con placca di compressione e viti. [F1]

Le placche, solitamente realizzate in acciaio inossidabile o titanio, possiedono una sezione caratterizzata da una leggera curvatura, la quale si rivela utile a migliorare l'adattamento sulla superficie ossea. Il loro spessore varia in funzione dell'applicazione (le placche da femore sono più spesse rispetto alle altre) solitamente tra 1.5 e 4 mm.

Le viti hanno dimensione e calibro diverso per adattarsi ad ogni segmento, ma sono essenzialmente di due tipi: corticale e spongiosa. La prima ha un filetto stretto e profondo ed un'estremità appuntita; si adotta su ossa lunghe ed è generalmente filettata per assicurare massima stabilità. Le viti da spongiosa, di diametro superiore, sono comunemente impiegate nelle epifisi delle ossa lunghe; per via della bassa densità della materia attraversata, in pratica questo tipo di vite è da considerarsi una autofilettante.

La vite più lontana dalla zona di frattura è sottoposta ad un carico maggiore rispetto alle viti più vicine al focolaio di frattura: a parità di lunghezza della placca, aumentando il



Figura 1.2- Chiodo femorale con viti stabilizzate. [F2]

numero di viti l'ampiezza del carico su ciascuna vite diminusce. Con più viti la fissazione ottenuta è più rigida e c'è una minore tendenza al fallimento dovuta alla mobilizzazione delle viti; tuttavia più viti indeboliscono l'osso.

L'inchiodamento endomidollare è una tecnica operatoria che ha rivoluzionato il trattamento delle fratture diafisarie, consentendo una precoce ripresa della funzione, con notevole riduzione della immobilità del paziente. Il principio della tecnica è ristabilire la continuità dell'osso fratturato, mediante l'inserimento di un mezzo di sintesi all'interno della cavità

midollare ossea. In *figura 1.2* ne è mostrato un esempio. Il suo primo uso si ha nel 1939, quando Gerhard Küntscher tentò di sostituire l'applicazione del gesso per fratture femorali su soldati. I primi chiodi avevano forma triangolare, ma data la mancanza di

stabilità dimostrata, il design è stato modificato sino ad ottenere la forma attuale a sezione aperta a forma di trifoglio, che garantisce ottima stabilità in flessione, discreta in rotazione e modesta in asse. Il problema correlato al loro uso, a fronte di una rimozione agevole, più grande era l'omissione di impedire il crollo o la rotazione nelle fratture intrinsecamente instabili. Questo è stato affrontato con l'introduzione del concetto di "bloccaggio" dei chiodi con bulloni su ogni estremità del chiodo (in modo da fissare il

chiodo alla corteccia ossea e impedire la rotazione tra i frammenti). Insomma, tale sistema necessita frequentemente di fissazione ausiliaria e rappresenta un ostacolo alla vascolarizzazione endomidollare.

Ulteriore dispositivo è costituito dai fili di Kirschner o K-wires, visibili in *figura 1.3*: sono perni lisci in acciaio introdotti nel 1909 da un chirurgo tedesco. Disponibili in diverse dimensioni, essi sono utilizzati per tenere insieme frammenti ossei o per fornire un



Figura 1.3- Frattura sopracondilare trattata con K-Wires. [F3]

ancoraggio per la trazione scheletrica. I perni sono rimossi solitamente dopo 4 settimane, ma possono essere adoperati anche per fissazione definitiva se i frammenti sono piccoli. Poiché spesso sono inseriti nell'osso attraverso la pelle (fissazione percutanea del perno), formano un passaggio potenziale per i batteri che migrando verso l'osso possono scatenare una infezione, provocando in un secondo momento arrossamenti ed uscita di pus. Sono anche soggetti a rottura, soprattutto nei casi in cui la frattura non guarisce. Una variante è costituita dai pin Steinmann o pin intramidollari, i quali ad oggi sono possiedono maggior spessore rispetto ai perni visti precedentemente.

1.1.1.2 I fissatori esterni

La fissazione esterna è una tecnica utilizzata per il trattamento delle fratture di bacino e delle ossa lunghe, con la quale i segmenti fratturati vengono ridotti e stabilizzati utilizzando particolati dispositivi posizionati all'esterno del corpo, connessi all'osso attraverso ancoraggi percutanei (pins o fili metallici). Il loro impiego è suggerito in casi di gravi lesioni ossee, aperte o chiuse, e dei tessuti molli, quando la profilassi dell'infezione e la guarigione dei tessuti è di estrema importanza (e la fissazione interna è sconsigliata). Il fissatore esterno può essere di vari tipi: monolaterale, bilaterale, circolare, esapodalico, ibrido; è in ogni caso concepito per consentire il mantenimento in posizione dei frammenti ossei, attraverso un procedimento chirurgico semplice, e permettere i movimenti articolari prima che la frattura sia guarita. Nella tabella 1.1, sottostante, sono raffigurati e brevemente descritti i principali fissatori esterni.

I fattori critici, che ne influenzano la stabilità e la rigidezza meccanica, sono principalmente il pin (diametro, lunghezza e numero) e la localizzazione (dovrebbe essere il più vicino possibile alla frattura e, se possibile, lontano dalle ferite). Tali dispositivi rischiano inoltre problemi legati al fenomeno dello stress shielding, nel momento in cui assorbono eccessivamente la sollecitazione, ed in un secondo momento rottura [4].

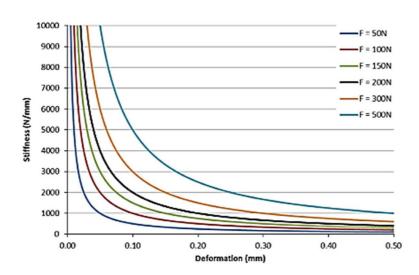
Tabella 1.1-Principali tipologie di fissatori esterni. [T1]

TIPOLOGIA	MONOLATERALE	MONOLATERALE ARTICOLATO	BILATERALE	CIRCOLARE	IBRIDO
DESCRIZIONE	È costituito da una singola struttura portante, connessa all'osso con viti monolaterali infisse in esso.	Possiede corpo centrale in materiale radiotrasparente, con vite di bloccaggio, che vincola il giunto articolare a 0°, 45° e 90°, ed archetto controlaterale.	È costituito da viti trapassanti, connesse con due strutture portanti regolabili, collegate o meno tra loro.	È costituito da una serie di fili trapassanti (fili di Kirschner) connessi con cerchi o semicerchi, a loro volta collegati tra loro attraverso barre di connessione.	È caratterizzato dalla combinazione di un fissatore monolaterale e di un sistema circolare che si interfacciano.
CRITICITA'	È necessario controllarne la stabilità, per via della asimmetria del sistema.	È impiegata in casi di distorsioni articolari, seguite dalla rottura di almeno tre dei principali legamenti, e richiede attenzione in fase di montaggio e manutenzione.	Va monitorata costantemente la stabilità del sistema sotto carico.	Il materiale con cui devono essere costruiti gli anelli deve essere estremamente solido, perché è sottoposto allo stress dovuto al carico applicato ed a quello dovuto al tensionamento dei fili. Il diametro dei cerchi è anche un fattore critico ed è inversamente proporzionale alla rigidità della struttura. Inoltre, il numero e il diametro dei fili per ogni cerchio sono direttamente proporzionali alla stabilità dell'apparato, la quale dipende però anche dalla lunghezza dei fili.	Richiede notevole attenzione nel montaggio, in quanto maggiore è l'angolo formato da 2 fili e maggiore sarà la resistenza del costrutto alle forze di flessione che agiscono sull'osso.
FOTO INDICATIVA					

Tutti i dispositivi di osteosintesi devono essere applicati rapidamente al fine di medicare agevolmente fratture e si possono rimuovere senza difficoltà. In quanto mezzo di sintesi, il fissatore deve garantire alcune proprietà di tipo specificatamente meccanico, quali:

- Un'adeguata rigidezza, al fine di sostenere la zona danneggiata;
- Elasticità, che consenta all'osso di essere caricato, per permettere l'osteosintesi;
- Modulabilità, che comporta l'adattamento ad una condizione che si evolve e consente perciò diverse immobilizzazioni.

Per garantire la stabilità bisogna comprimere molto, in quanto con un impianto rigido un maggior carico agisce sull'impianto [5]: nel grafico, mostrato nella *figura 1.4*, si può notare come piccole deformazioni corrispondano a valori di rigidezza più elevati. Man mano che la rigidezza diminuisce, la deformazione ottenuta aumenta,



indipendentemente dalla forza applicata, provocando uno shift verso destra.

La rigidezza non deve essere eccessiva e deve essere mantenuta entro certi range, a seconda del dispositivo applicato, in quanto rischia di favorire

Figura 1.4- Grafico deformazione/rigidezza al variare della forza applicata. [F4]

una possibile pseudo artrosi a sei mesi dall'applicazione del fissatore. L'equilibrio tra le forze funzionali dell'arto e quelle meccaniche esercitate dal dispositivo non è sempre presente, per cui accade che i punti più delicati, quali ad esempio le giunzioni tra gli elementi di attacco ed il telaio, oppure zone particolarmente sottili (la riduzione dello spessore aumenta l'elasticità e la rimozione in un secondo momento), subiscano carichi eccessivi, con conseguente rottura a fatica. Un elevato numero di cicli spesso unito ad un carico elevato è una delle principali cause di fallimenti di tali tipi di impianti, in quanto i moderni dispositivi impiantabili per via di stringenti controlli di qualità raramente presentano difetti di fabbricazione e quindi è difficile, ma comunque possibile che i motivi

di rottura siano imputabili al materiale in sé [6]. Per limitare ciò è possibile ricorrere ad una dinamizzazione delle viti o del sistema, garantendo dei micromovimenti.

Inoltre, se le infezioni batteriche sono rischiose per quanto riguarda tutti i dispositivi applicati all'essere umano, in questo caso, la situazione risulta particolarmente critica a causa della natura transcutanea dell'impianto che implica una diretta connessione con l'ambiente esterno con rischio elevato di contaminazione.

1.2 Contaminazione batterica

La contaminazione batterica è una problematica che riguarda innumerevoli applicazioni, dal cibo alla vita di tutti i giorni, dalla casa agli impianti medici. Proprio questa ultima categoria è di particolare interesse in questa trattazione. Lo sviluppo di un'infezione porta a conseguenze, quali la necessità di una terapia antibiotica, un aumento del tempo di ospedalizzazione fino alla necessità di rimozione, nel peggiore dei casi, dell'impianto. Ciò comporta un aumento dei costi ospedalieri e soprattutto un peggioramento della salute fisica del paziente, nonché una situazione psicologicamente stressante e dolorosa.

La contaminazione batterica di superfici solide è un fenomeno ben documentato in letteratura e contro l'insorgenza del quale si sono sviluppati molteplici metodi e tecnologie. Tale complicanza è spesso relazionata alla formazione di un biofilm, un'aggregazione complessa composta da microrganismi e materiale extracellulare, che aderisce saldamente ed irreversibilmente alla superficie; essa si contraddistingue per la secrezione di una matrice adesiva e protettiva. I batteri ad esempio producono sostanze esopolimeriche, che contribuiscono alla formazione del biofilm.

L'adesione batterica, oltre ad essere un processo piuttosto complesso, è influenzata da molti fattori distinti, quali l'ambiente (temperatura, periodo di esposizione della superficie, concentrazione di microrganismi), le caratteristiche delle specie batteriche (idrofobicità e idrofilicità soprattutto), e le proprietà superficiali dell'impianto (carica elettrica, rugosità, composizione chimica, idrofilicità/idrofobicità).

Bisogna precisare che alcuni studi riportano come l'adesione iniziale dei batteri e la formazione del biofilm siano in realtà due distinti fenomeni; nonostante l'inibizione della prima non prevenga del tutto la seconda, l'influenza che una fase esercita sull'altra è comunque confermata [7].

1.2.1 Formazione del biofilm batterico

Gli organismi unicellulari mostrano due distinte modalità di comportamento. Possono infatti adottare una forma fluttuante, detta anche planctonica, nella quale le cellule separate si muovono in modo indipendente all'interno di un mezzo liquido. In alternativa assumono uno stato aggregato, nel quale i microorganismi sono strettamente legati gli uni agli altri, oltre che ad un eventuale substrato. La modifica di tali forme di comportamento è relazionata a meccanismi di comunicazione chimica, differenti per ogni specie coinvolta [8].

La formazione del biofilm comincia con l'ancoraggio al materiale di microrganismi, i quali aderiscono instaurando deboli legami di Van der Waals (diventano effettivi solo nel momento in cui le cellule e la superficie si trovano ad una distanza inferiore di 3 nm). Se i primi "colonizzatori" non sono separati dalla superficie, iniziano ad ancorarsi adoperando molecole di adesione cellulare come i pili o flagelli (dimensioni sulla nanoscala, di cui bisogna tenere sempre conto in fase di progetto delle superfici [9]). La rugosità e la topografia superficiale sono in questa fase parametri molto influenti.

L'arrivo di ulteriori cellule è facilitato dai siti esposti dai primi microrganismi e provoca la generazione della matrice extra-cellulare, che garantisce l'integrità del biofilm. La crescita avviene tramite divisioni cellulari ed integrazioni di batteri esterni su superfici solide immerse o esposte a soluzioni acquose. Una volta che la colonizzazione è avvenuta con successo, il biofilm è soggetto ad una fase di maturazione, con la formazione di microcolonie batteriche. A seguito di ciò alcuni batteri possono staccarsi dalla superficie, con l'obiettivo di sopravvivere e colonizzare altre zone; il processo attivo è altamente regolato dalla popolazione cellulare e dipende anche delle singole specie batteriche [10].

È quindi possibile riassumere, in riferimento alla *figura 1.5*, lo sviluppo del biofilm in cinque fasi:

- 1. Attecchimento iniziale reversibile;
- 2. Attecchimento irreversibile;
- 3. Maturazione di grado I;
- 4. Maturazione di grado II;
- 5. Dispersione.

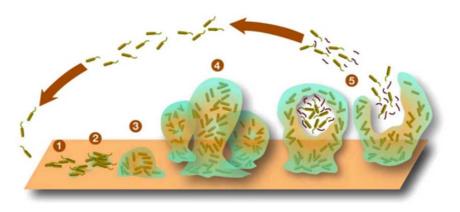


Figura 1.5- Le fasi della formazione del biofilm batterico su un substrato solido. [F5]

Un esempio tipico di biofilm è la placca dentale; nel momento in cui colonizza un impianto, porta allo sviluppo di peri-implantiti (infezioni del tessuto orale) diventando la prima causa di fallimento per via del riassorbimento osseo e della perdita di osteointegrazione [11].

1.2.1.1 | costituenti del biofilm: i batteri

Con il nome di consorzio batterico si intende un biofilm eterogeneo, composto da molteplici tipi di batteri; è quantitativamente più frequente di quelli che constano di una singola specie. Inoltre, ogni costituente svolge diverse funzioni e perciò presenta un distinto trofismo; ciò conferisce all'aggregato una notevole efficienza. Solitamente i primi batteri colonizzatori sono *Staphylococci* e *Antinomyces* (entrambi Gram-positivi), mentre in fase di maturazione vengono integrate altre specie, meno soggette all'influenza delle proprietà superficiali.

Bisogna poi considerare che i batteri legati possiedono proprietà significativamente diverse dalle medesime specie libere di fluttuare, poiché l'ambiente denso del film consente loro di interagire e cooperare [12].

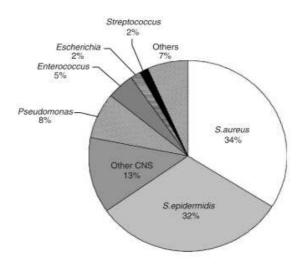


Figura 1.6- Grafico a torta che illustra la percentuale di incidenza di alcune specie patogene. [F6]

Come si può notare dal grafico riportato in *figura 1.6*, un elevato numero di infezioni implantari è causato nello specifico dal genus *Staphylococcus*, il quale comprende molte specie patogene tra cui lo *S. Aureus*, il cui nome deriva dal fatto che le sue colture assumono una pigmentazione giallo oro dovuta alla sintesi di carotenoidi. Gli strumenti dell'azione patogena di *S. Aureus* sono vari: alcuni di questi favoriscono la sua proliferazione, mentre altri sono legati all'azione di particolari esotossine ed enzimi capaci di danneggiare altre cellule o diffondersi nei tessuti prossimi al luogo dell'infezione primaria. Come lo *S. Epidermidis*, entrambi si trovano sulla pelle umana; è perciò molto facile incorrere in una infezione causata da queste specie. A complicare ulteriormente il problema, si ha il fatto che essi sono in grado di resistere al beta-lattame, che costituisce il nucleo funzionale di una importante classe di antibiotici [1].

Gli *Staphylococci* sono batteri anaerobi di tipo Gram-positivo², che crescono mediante respirazione aerobica o fermentazione fino a diametri di 0.5-1.5 µm. La loro parete cellulare è composta da peptidoglicano e acidi teicoico, e ad essa sono attaccate adesine ed esotossine. Gli *Staphylococci* patogeni sono comunemente identificati dalla loro capacità di produrre coagulasi e quindi coagulare il sangue: questa caratteristica distingue i ceppi coagulasi-positivi, di cui fa parte *S. Aureus*, dai ceppi coagulasi-negativi (CoNS), (*S. Epidermidis*, *S. Lugdunensis* e *S. Saprofitico*).

La formazione di biofilm sembra essere disciplinata dalla secrezione di molecole particolari, attraverso un processo noto come *quorum sensing*. Esso è un meccanismo di comunicazione auto-indotto tra le cellule batteriche e fa sì che quando le molecole cominciano ad accumularsi nella zona circostante i microrganismi, essi si sottopongano a una serie di cambiamenti fisiologici, al fine di formare il biofilm [13]. A seguito del quorum sensing autoindotto, i microrganismi possono iniziare la produzione superficiale di polimeri extracellulari adesivi, la produzione biosurfattante, la sporulazione (riproduzione asessuata che produce microspore), la bioluminescenza e la secrezione di sostanze nutritive. Per questi motivi talvolta batteri presenti in un biofilm possono essere fino a 10-1000 volte più resistenti agli antibiotici rispetto allo stesso organismo, in un ambiente allo stato libero [14].

1.2.1.2 I costituenti del biofilm: la matrice extracellulare

La matrice extracellulare (nota come *Extra Cellular Matrix* o *Extracellular Polymeric Substance*) ha un ruolo fondamentale e rappresenta il 70% dell'intero biofilm; è formata da composti polimerici escreti dalle cellule stesse. Ha funzione di protezione e facilita la comunicazione attraverso segnali chimici o fisici; consente inoltre l'apporto di sostanze nutritive, così come l'espulsione delle tossine.

² Si definiscono Gram-positivi quei batteri che rimangono colorati di blu o viola a causa dello strato di peptidoglicano presente nella loro parete cellulare dopo aver subito la colorazione di Gram; si contrappongono ai batteri Gram-negativi, che invece subiscono la decolorazione.

Le sue proprietà chimico-fisiche possono variare molto, ma è generalmente formata da polisaccaridi, la cui composizione e struttura influenza la conformazione primaria della matrice. La presenza, infatti, di esosi connessi attraverso legami β , conferisce all'intera struttura maggiore rigidità, minore deformabilità e in alcuni casi influenza anche la solubilità.

La matrice può incorporare grandi quantità di acqua nella sua struttura attraverso lo sviluppo di legami idrogeno, generando un film particolarmente idratato; in altri casi l'EPS può avere comportamento idrofobico. In ogni caso la composizione non è uniforme e può variare spazialmente e temporalmente: la quantità cresce con l'età, e quindi la maturazione, del biofilm.

La composizione chimica, la carica, la bagnabilità e la rugosità della superficie sono fattori che influenzano l'interazione con i batteri. Ad esempio, un valore di Ra di 0.2 μm è riportato in letteratura [9] come valore soglia al di sotto del quale la formazione di biofilm non viene incrementata. Superfici idrofobiche (con angolo di contatto superiore a 90°) comportano una più elevata colonizzazione batterica, in quanto la ridotta o nulla carica superficiale attrae maggiormente l'insediamento dei microrganismi, i quali si legano al materiale attraverso in legame idrofobico [15]. Substrati metallici hanno in genere una elevata energia superficiale e per via della loro carica negativa e di una buona idrofilicità si prestano meno, rispetto a materiali polimerici ad esempio, all'attecchimento dei microorganismi [16]. Uno studio in vitro ha valutato gli effetti delle superfici titanio in termini di bagnabilità, rugosità e modalità di sterilizzazione sulla colonizzazione batterica primaria: 26 campioni di titanio con superfici ruvide o idrofobiche (con rugosità pari a 1 μm) hanno mostrato effettivamente i più alti gradi di colonizzazione batterica. Ciò è confermato dalla *figura 1.7* [17].

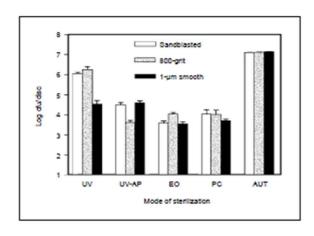


Figura 1.7- Grafico che mostra la colonizzazione dei dischi in titanio da S. sanguinis, rispetto alla modalità di sterilizzazione: UV = luce ultravioletta; UV-AP = luce ultravioletta, passivata con acido; EO = ossido di etilene; PC = pulita al plasma; AUT = autoclavata. [F7]

Inoltre, l'assorbimento di certe sostanze può inibire o favorire l'attecchimento microbico; fibronectina e fibrinogeno, riconosciuti per la capacità di mediare l'adesione superficiale delle cellule eucariote, ad esempio lo aumentano. In particolare, attraverso l'integrina $\alpha_5\beta_1$, recettore della fibronectina, essa diventa uno dei ponti molecolari, che consentono a i batteri di colonizzare la superficie [18]. Nel caso specifico del *S. Aureus* risulta fondamentale per la colonizzazione una proteina denominata AtlE. Essa è composta da due domini attivi: il primo, a base di amidasi, è implicato nell'ultimo passaggio della divisione cellulare, mentre il secondo è una glicosamminosidasi di 52 kDa.

Tale sostanza si lega alla vitronectina, consentendo l'adesione batterica a superfici idrofobiche [19]. L'attecchimento dei microorganismi è invece inibito dall'albumina: tale proteina interferisce, attraverso una diminuzione di idrofobicità (ed un meccanismo non del tutto chiaro [16]), prevenendo sin dai primi stadi la colonizzazione batterica e cellulare. Viene perciò adoperata anche nel momento in cui l'adesione tissutale non è desiderabile, come nel caso dei sistemi di fissazione temporanea [20]. Si dimostra particolarmente efficace contro *Escherichia Coli*, anche in presenza di ridotte quantità (8 mg/l) [21].

La ECM può associare ioni metallici, cationi divalenti ad altre macromolecole, come proteine, DNA, lipidi; può inoltre contribuire alla resistenza agli antibiotici, impedendone il trasporto e la diffusione attraverso il biofilm. La matrice permette quindi la sopravvivenza delle cellule batteriche in un ambiente ostile, di conseguenza costituisce un ceppo resistente e difficile da eliminare. I biofilm sono, infatti, strutturati per consentire lo scambio di liquidi e sostanze nutritive, necessarie per i batteri all'intero, mentre impediscono l'accesso alle cellule immunitarie dell'ospite come i fagociti. Da ciò deriva che le infezioni, che sono la conseguenza della formazione di biofilm, sono notoriamente difficili da sradicare e richiedono l'uso di alte concentrazioni di agenti antimicrobici, la rimozione dei tessuti colpiti, o la combinazione di questi trattamenti.

L'acronimo MIC (concentrazione minima inibente) descrive la quantità di antimicrobico necessaria per inibire i microrganismi liberi capaci di formare biofilm, mentre MBEC (minima concentrazione di eradicazione del biofilm) descrive la concentrazione minima di un agente antimicrobico capace di inibire la crescita di un biofilm.

Tali parametri mostrano le differenze esistenti nella suscettibilità dei batteri liberi rispetto a quelli che formano biofilm. Inoltre, utilizzando una concentrazione di antibiotici in dose pari alla MIC, se l'infezione presenta un biofilm, si può avere un'esposizione a dosi subletali di antibiotici, provocando così una più alta incidenza di resistenze microbiche, con gravi conseguenze per il paziente.

1.2.2 Adesione batterica sui metalli

Varie leghe metalliche sono impiegate nel settore ortopedico e dentale, quali leghe di titanio, acciaio, cobalto-cromo, metalli nobili e leghe a memoria di forma. Il titanio è tra i materiali comunemente adoperati per gli impianti biomedicali: il suo uso è attestato in molti tipi di protesi e dispositivi di fissazione. Il motivo di ciò è costituito dalle buone caratteristiche meccaniche, in quanto possiede un modulo elastico più "fisiologico" (per la lega Ti-6A1-4V, 105 GPa e per l'acciaio 316L 193 GPa, in confronto ai 16.5 GPa dell'osso corticale [22]) ed un'alta resistenza, che consentono di ridurre garantire adeguata resistenza meccanica limitando il fenomeno dello stress-shielding.

L'elevata biocompatibilità del metallo si manifesta attraverso lo sviluppo di uno strato di ossido nativo che si forma in superficie e che fornisce un valido attacco per i tessuti biologici, in particolare quello osseo, oltre che una buona resistenza a corrosione, che ne deriva. Al contrario del cobalto-cromo-molibdeno (CoCrMo), il titanio e le sue leghe mostrano ridotte reazioni immunogeniche o allergiche.

L'acciaio inossidabile 316L è un metallo austenitico adoperato anche in dispositivi di fissazione per via di una buona resistenza a corrosione, la quale dipende dal contenuto di cromo (12% generalmente), il quale comporta anche in questo caso la formazione di uno strato di ossido stabile. A fronte di una attestata riduzione di adesione batterica, le percentuali non trascurabili di Nichel (10-13%) e Molibdeno (2-2.5%), elementi potenzialmente tossici, fanno sì che il suo uso all'interno dei fissatori sia limitato [8].

Nonostante gli alti tassi di successo clinico, le infezioni associate alla formazione di biofilm emergono come meccanismo di fallimento, causato da *Staphylococci* e *Streptococci* [23]. Lo *S. Aureus*, visibile in *figura 1.8a*, è tra le prime cause di infezioni su substrati metallici, mentre *S. Epidermidis*, nella figura a fianco, è più comune con le infezioni implantari associate ai polimeri [24].

Il primo è considerato l'agente patogeno più virulento; è presente naturalmente sulla pelle, ma in caso di trauma è in grado di entrare nei tessuti e penetrare nella lesione. Il suo colore dorato, dovuto ai pigmenti carotenoidi, ha un ruolo nella citotossicità di S. Aureus. Liu et al hanno infatti dimostrato che, interrompendo la biosintesi del carotenoide, si rendono i batteri meno patogeni e più suscettibili ai neutrofili; ciò potrebbe essere un nuovo obiettivo per la terapia antibiotica. In alcuni casi, la persistenza di un'infezione sul substrato metallico potrebbe essere dovuta alla presenza di varianti a piccola colonia di questi batteri. Le SCV sono sottopopolazioni di S. Aureus che crescono lentamente su normali piastre di agar e producono piccole colonie non-pigmentate non emolitiche. Essi sono in grado di sopravvivere all'interno delle cellule ospiti a causa della loro ridotta produzione di tossine α , che li protegge dall'esposizione agli antibiotici e per via del lento metabolismo riescono a resistere maggiormente [25].

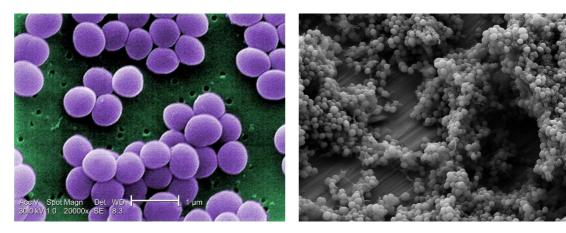


Figure 1.8a e 8b- Staphylococcus Aureus e Staphylococcus Epidermidis su superficie metalliche. [F8]

*S. epidermidis*³ è il CoNS più frequentemente isolato da infezioni associate all'impianto; si trova nella flora fisiologica della pelle e nella mucosa delle membrane. In passato, tali batteri erano considerati saprofiti; tuttavia, diversi ceppi sono stati ora documentati come agenti patogeni umani opportunistici [24]. Essi sono associati ad infezioni nosocomiali o ospedaliere e sono più resistenti agli antibiotici rispetto a *S. Aureus*.

Questo *staphylococco* è in grado di colonizzare la superficie dell'impianto, formando uno spesso biofilm multistrato, spesso indicato come "melma". Il film è composto da un polisaccaride extracellulare, noto come polysaccharide intercellular adhesin (PIA), che causa l'emargoglutazione e l'aggregazione batterica. Inoltre, la produzione di PIA è in grado di proteggere *S. Epidermidis* dalla fagocitosi e da altri componenti principali del sistema di difesa ospite [20].

1.2.2.1 Adesione batterica su dispositivi di fissazione per traumatologia

Il maggior motivo di fallimento di tali dispositivi è dovuto a loosening asettico e ad infezioni. Poiché gli impianti sono progettati per integrarsi, anche se non permanentemente come nel caso dei fissatori, all'osso, l'osteointegrazione viene interrotta dal legame che si forma tra batteri e superficie. Da letteratura [8] si riporta come i tassi di infezione implantari siano oltre il 9%; inoltre tra i pazienti un 0.5%-2% presenta lo sviluppo di biofilm sulla superficie nei due anni successivi.

-

³ Per quanto possa sembrare meno attinente alla trattazione sull'adesione batterica ai metalli, la presenza di tale batterio è attestata anche in biofilm su superfici metalliche, anche se in minore quantità. La complessa eterogenicità dei biofilm rende sempre difficile l'identificazione di tutte le specie presenti.

L'assenza di una standardizzazione dei criteri di diagnosi delle infezioni implantari e la possibilità di risultati di avere colture falsamente positive e negative allo stesso tempo porta ad una certa variabilità nel determinare la prevalenza di patogeni che causino l'infezione. A dispetto dei mutamenti dovuti a diversi criteri applicati, è stato stabilito [1] come la maggior parte delle infezioni batteriche sia causata in particolar modo da batteri aerobi Gram-positivi, *Staphylococci (S. Epidermidis, S. Aureus, Coagulase-Negative S.*) in primis.

Essi causano i 2/3 delle infezioni, ma sono associati anche batteri come *Escherichia Coli* e *Pseudomonas Aeruginosa*.

Sulla base di dati epidemiologici aggiornati relativi a circa 800 casi clinici isolati ortopedici [1], esclusivamente da infezioni associate a impianti protesici, circa il 16% delle infezioni sono di origine polimicrobica. Una percentuale ampia di esse è correlata alla presenza di *Staphylococci* e nello specifico di *Staphylococcus Aureus* e *Staphylococcus Epidermidis*, i quali rappresentano, in assoluto, i principali agenti patogeni in ortopedia, mentre altre specie CoNS, quali *Staphylococcus Hominis* e *Staphylococcus Haemolyticus*, contribuiscono ad un ulteriore 13% delle infezioni. In ordine di rilevanza in termini di prevalenza seguono poi *Pseudomonas Aeruginosa* e *Enterococcus Faecalis*.

In uno studio di Akens et al., è stata studiata la crescita di biofilm di *S. Aureus* su acciaio 316L e su titanio di grado 4; le superfici sono state trattate con thermal cycling, attraverso procedure di raffreddamento a -148.9°C, immersione in azoto liquido e riscaldamento fino alla temperatura di 20°C. Tale trattamento influenza la rugosità di superficie: ad esempio, i valori ottenuti dalle 12 piastre in acciaio inox variano da 0.07 a 0.12 μ m, con un valore medio pari a 0.10 \pm 0.01 μ m. Non è stata evidenziata correlazione tra le rugosità e la formazione di CFU, in accordo con valori di rugosità tutti al di sotto della soglia (0.2 μ m) riportata in letteratura come limite al di sotto del quale non si ha incremento dell'adesione batterica [9]; perciò le stesse misure non sono state riportate per il titanio.

I dati di bioluminescenza svolti sui campioni di controllo e su quelli trattati non hanno mostrato alcuna differenza significativa, indicando che non vi era alcun cambiamento nell'attività metabolica dei batteri che crescono sulle piastre in esame; è stata notata comunque una riduzione dell'adesione in entrambi i metalli, grazie al trattamento, visibile in *figura 1.9* [26].

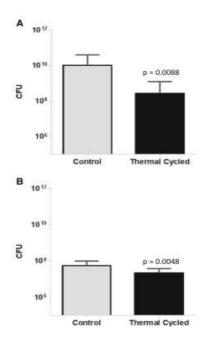


Figura 1.9 - Conto CFU, svolto su campioni di acciaio (A) e di titanio (B). [F9]

In uno studio, svolto in vitro da Bennani et al., sono stati valutati la biocompatibilità e la rimozione, attraverso *air-polishing* ⁴, del biofilm, coltivato anaerobicamente a 37°C per 24h e trasferito su dischi di titanio e composto da batteri appartenenti al ceppo *S. Mutans*, spesso associati a peri-implantiti. Il trattamento, il cui risultato è visibile in *figura 1.10*, non muta la composizione superficiale significativamente, ma dimostra di ridurre la ricolonizzazione batterica per 24 h.

-

⁴ Tale tecnica prevede la rimozione del biofilm batterico attraverso polveri abrasive, che includono bicarbonato di sodio, triossido di alluminio e carbonato di calcio.

La ridotta copertura cellulare e la morfologia anomala, riscontrata sui campioni con airpolishing, può essere dovuta al trattamento, con conseguente formazione di rugosità sub ottima per l'adesione dei fibroblasti (si nota infatti un aumento statisticamente significativo della rugosità superficiale) [27].

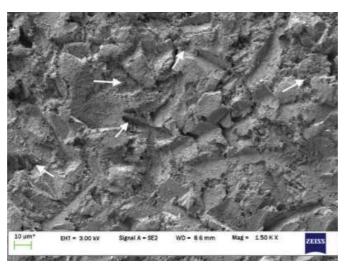


Figura 1.10- Immagine al SEM del titanio rivestito. [F10]

Sempre contro le peri-implantiti, in uno studio di Burgers et al. i campioni di titanio sono stati incubati in *Candida Albicans, Streptococcus Sanguinis, Staphylococcus Epidermidis* per 2 h. Gli esemplari sono stati poi trattati con diversi antisettici topici per 60 s, quali ipoclorito di sodio 1.0%, perossido di idrogeno 3.0%, clorexidina gluconato 0.2%, acido citrico 40.0%, Plax, e con soluzione salina sterile come controllo. L'ipoclorito di sodio è risultato efficace contro tutte e tre le specie, mentre il perossido di idrogeno si è rivelato efficace contro *C. Albicans* e Listerine ha mostrato attività antimicrobica nei confronti di *S. Sanguinis* e *C. Albicans* ed acido citrico e Plax contro entrambi I batteri testati [11]. In *figura 1.11* è mostrata la percentuale di vitalità per *S. Epidermidis*.

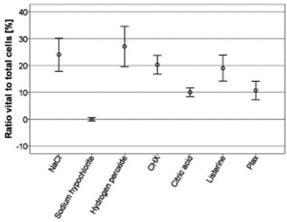


Figura 1.11- Percentuale di vitalità dei batteri sui substrati di titanio, dopo 120 h di incubazione di S. Epidermidis. IF111

Una ricerca di Nune et al. studia l'attività antimicrobica del rame, in lega con acciaio austenitico 316L nanogranulato (*Nano-Grained/Ultra Fine Grained*) e microgranulato (*Coarsed-Grained*), il cui schema è visibile nella *figura 1.12*; il batterio soggetto di investigazione è lo *S. Aureus*. La finitura superficiale a specchio (svolta nel caso del nanogranulato tramite lucidatura a getto, e con elettrolucidatura su grani di dimensione micrometrica) del controllo e dei campioni di acciaio inossidabile contenenti rame presenta una rugosità simile (~ 5 nm). Pertanto, le differenze di attività antimicrobica osservate su diversi campioni di acciaio sono imputabili alla presenza del rame e non a differenze di rugosità superficiale [10].

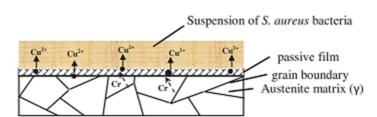


Figura 1.12- Schema che rappresenta il meccanismo antibatterico dell'acciaio austenitico contenente Cu. [F12]

L'alone di inibizione intorno al controllo e ai campioni contenenti rame mostra un effetto antibatterico maggiore nel caso della struttura NG/UFG. La dimensione della zona di inibizione si rivela ridotta del 50%, al diminuire della dimensione granulometrica. Il raffinamento dei grani si rivela favorevole nel limitare la colonizzazione batterica, rispetto ai campioni CG, efficaci solo in presenza di rame.

Il rilascio di ioni rame da parte dell'acciaio arricchito con tale metallo risulta moderato (0.8-1.5 ppb/giorno/cm², per i campioni NG e CG rispettivamente); la quantità è considerata dagli autori perfettamente conforme agli standard, cioè adatta ad una buona attività antibatterica, in quanti in casi estremi si arriverebbero ad effetti insignificanti o a fenomeni di corrosione.

La ragione della riduzione di adesione batterica sui campioni NG/UFG può essere poi attribuita alla formazione di un film passivo altamente stabile e fortemente legato al substrato, il quale contiene un'alta concentrazione di cromo, che ha ridotto il legame batterico alla superficie dell'acciaio. La stabilità del film passivo è stata significativamente migliorata in presenza di rame [10].

Uno studio di Ahariz et al., ha valutato lo sviluppo di *C. Albicans* su substrato di titanio, in forma di polvere e di lamine. Dopo agitazione continua dei campioni in brodo batterico per 2–21 giorni a temperatura ambiente, il surnatante è stato monitorato da attraverso turbidimetria a 600 nm.

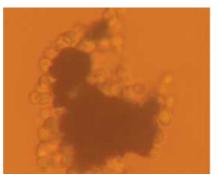


Figura 1.13- Batteri di C. Albicans aderenti al granulo di titanio (ingrandimento 400x), dopo un'incubazione di una settimana. [F13]

L'assorbanza a 600 nm del mezzo liquido risulta rapidamente aumentata per poi raggiungere uno stato stabile in due giorni, in seguito diminuita dopo due settimane; ciò è attribuito a modifiche del liquido della coltura (per esempio, scarico dei nutrienti, presenza di cataboliti tossici e cambiamento di pH). La microscopia fotonica a fluorescenza, di cui è mostrato un esempio in *figura 1.13,* è stata effettuata a tutte le fasi per visualizzare la struttura del biofilm, composta di uno strato denso e di forme ifali.

A 21 giorni, aggiunto materiale polimerico extracellulare si osserva un aspetto reticolare amorfo. Inizialmente, le cellule di *C. Albicans* sono state osservate come blastoconidia e più successivamente (pseudo)ife⁵ sono comparse. Sulla polvere sono stati misurati $7.50 \pm 0.60 \times 10^6$ per grammo e $0.50 \pm 0.04 \times 10^6$ per cm² di blastoconidia su pellicola di titanio. In tale studio è stata valutata la crescita e la modifica del film batterico, fornendo un modello riproducibile in vitro ed una base per lo sviluppo di inibitori, come sistemi di perossidasi [28].

In uno studio di Rodriguez-Hernandez et al. è stata eseguito un test per l'adesione batterica (*S. Sanguinis*) alle superfici di titanio (sabbiate con particelle di allumina e carburo di silicio), quantificando le cellule batteriche distaccate per unità di area. Parallelamente, sono state analizzate le proprietà superficiali dei campioni (cioè rugosità e energia superficiale) per valutare il rapporto tra trattamento superficiale e adesione batterica. Piuttosto che la rugosità, l'energia superficiale, correlata alle proprietà fisicochimiche delle particelle usate per la sabbiatura, appare come fattore critico per l'aderenza di *S. Sanguinis* alle superfici in titanio (ciò si nota con la *figura 1.14*) [29].

-

⁵ Con il termine ife si indicano i filamenti unicellulari o pluricellulari, uninucleati o polinucleati di forma cilindrica allungati.

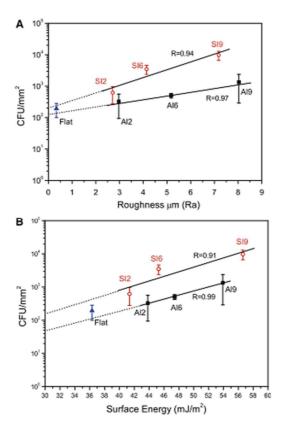


Figura 1.14- Con media e deviazione standard, nei grafici è stata plottata l'aderenza batterica, rispetto alla rugosità superficiale (A) ed alla energia superficiale (B). SI notano le differenze tra i trattamenti: l'allumina presenta la quantità più bassa di batteri rispetto alla superficie con silicio. [F14]

Con questo lavoro è possibile concludere che:

- Le proprietà chimico-fisiche delle particelle utilizzate per la modifica superficiale tramite sabbiatura delle superfici in titanio conducono un'adesione batterica diversa.
- L'allumina ha presentato una quantità più bassa di batteri attaccati, rispetto alla silice [29].

Superfici in acciaio AISI 316L, Ti6Al4V e Ti6Al7Nb sono state analizzate in uno studio di Walkowiak-Przybyto et al [30]. I materiali, visibili in *figura 1.15*, sono stati incubati in presenza di cellule di *Escherichia Coli* per 24 h e la distribuzione di batteri sulle superfici è stata osservata attraverso metodi microscopici.

Sulle superfici in acciaio AISI 316L i batteri morti sono stati trovati sporadicamente e costituivano circa il 7.3% del numero totale di batteri osservati su questa superficie; sulla lega Ti6Al4V, la colonizzazione batterica era paragonabile alla superficie di acciaio di riferimento, ma la percentuale di cellule morte è aumentata al 15%.

La più bassa suscettibilità alla colonizzazione batterica è stata dimostrata dalla lega Ti6Al7Nb e la percentuale di cellule morte (11.6%) è stata inferiore a quella sulla superficie della lega Ti6Al4V, ma superiore alla superficie in acciaio medicale.



Figura 1.15- E. Coli attaccato a superfici di acciaio AISI 316L, Ti6Al4V e Ti6Al7Nb. [F15]

Anche se si nota una più piccola suscettibilità della lega Ti6Al7Nb alla colonizzazione microbiologica in confronto ad altre superfici esaminate, il test ANOVA, i cui risultati sono mostrati in *figura 1.16*, non ha mostrato differenze statisticamente significative nel numero totale di batteri tra tutti i gruppi, come si può notare dalle sigle riportate nell'ultima colonna⁶.

Cell Number per 100 μm²	Ti6AI4V (1)	Ti6Al7Nb (2)	AISI 316L (3)	Significance
Total number	3.47 ± 1.08	2.75 ± 1.13	3.41 ± 0.95	1–3 ns ^a 2–3 ns 1–2 ns
Living cells	2.95 ± 1.09	2.45 ± 1.03	3.16 ± 0.90	1–2 ns 1–3 ns 2–3 ns 1–2 ns
Dead cells	0.53 ± 0.19	0.30 ± 0.15	0.25 ± 0.1	1–2 ns 1–3 p < 0.001 2–3 ns 1–2 p < 0.001

Figura 1.16- Caratteristiche quantitative di E. Coli, esaminato sulle superfici dei materiali. [F16]

D'altra parte, è stato trovato un aumento statisticamente significativo del numero di cellule morte sulla lega Ti6Al4V, in relazione alle superfici rimaste esaminate [30].

_

⁶ ns significa *non rilevante*.

Lo *Staphylococcus* acquisisce, stando a quanto riportato nei precedenti studi, un'importanza enorme nelle infezioni correlate all'impianto. Comprende importanti specie patogene, a volte attualmente addirittura meritevoli della denominazione di "superbatterio", insieme a un ampio numero di specie tipicamente saprofitiche in grado di diventare dannose solo quando le difese dell'ospite sono significativamente in pericolo. Da ciò derivano due aspetti:

- Esistono due principali nemici simili appartenenti allo stesso gruppo (*S. Aureus* e *S. Epidermidis*, di cui si è già parlato);
- La piena comprensione dei meccanismi alla base della virulenza e patogenicità del batterio fornirebbe indizi unici per affrontare il fenomeno dell'infezione implantare sia a livello preventivo che in fase di trattamento, con un significativo impatto numerico e vasti esiti clinici.

In *tabella 1.2* è riassunto quanto trovato in letteratura riguardo alla formazione di biofilm per agenti patogeni su superfici metalliche di titanio ed acciaio.

Tabella 1.2 - Aderenza di vari tipi di batteri su superfici metalliche per ortopedia. [T2]

SUBSTRATI	BATTERI	TRATTAMENTI SUPERFICIALI	CONDIZIONE DEI TEST	TEST	RISULTATI	RIF.
Titanio gr.4, acciaio 316L	Staphylococcus Aureus	Thermal cycling	In vitro	Test attività metabolica a bioluminescenza, colorazione live/dead, conto CFU, profilometria, analisi statistiche.	Formazione del biofilm in tutti i campioni, ma crescita delle CFU inferiore rispetto ai controlli (no differenza di rugosità).	[26]
Titanio gr.4	Streptococcus Mutans	Air-polishing therapy	In vitro	SEM, EDS, Quantizzazione biofilm attraverso saggio crystal violet, test di vitalità, analisi statistiche.	Riduzione dell'88% di adesione sui campioni rivestiti; presenza di microaggregati visibile a più alti ingrandimenti, mentre una rete resistente è diffusa su quelli privi di rivestimento.	[27]
Titanio gr.5	Staphylococcus Epidirmidis, Candida albicans, Streptococcus sanguinis	/	In vitro	SEM, test di vitalità, analisi statistiche.	L'ipoclorito di sodio è il più efficace contro tutti e tre, mentre l'acido citrico ed il Plax si rivelano migliori contro S. sanguinis e S. epidermidis, ed il perossido di idrogeno contro C. albicans.	[11]
Acciaio 316L	Staphylococcus Aureus	Nanoparticelle di rame	In vitro	SEM, test di diffusione in agar, test alone di inibizione, conto CFU, analisi statistiche.	La dimensione dei grani ultrafini inibisce l'attacco batterico. Inoltre, la formazione di film passivante sul metallo, dovuto alla presenza di rame, riduce molto l'adesione dei batteri alla superficie; influisce molto anche l'alta concentrazione di cromo.	[10]
Titanio (in polvere o in lamine, purezza al 99,6%)	Candida albicans	/	In vitro	Microscopio a fluorescenza, analisi statistiche.	Si ha adesione dei batteri e formazione del biofilm dopo due giorni; ciò può essere limitato da lactoperossidasi e da ipotiocianito.	[28]
Titanio gr.2	Streptococcus sanguinis	Sabbiatura	In vitro	Microscopio ottico, bagnabilità, conto CFU, SEM, analisi statistiche.	I valori di angolo di contatto, usati per ricavare l'energia superficiale, non consentono di stabilire nessuna correlazione tra l'adesione e la superficie; si è notato però che all'aumentare della rigidezza si ha maggior energia superficiale. Vi è maggior aderenza nel caso delle superfici sabbiate con carburo di silicio.	[29]

Ti6Al7Nb, Ti6Al4V, Acciaio 316L	Escherichia Coli	/	In vitro	EDS, microscopio a fluorescenza, analisi citometriche, analisi statistiche.	Nonostante sembri che la superficie in Ti6Al7Nb sia meno suscettibile alla colonizzazione batterica, a livello statistico non ci sono particolari differenze sul numero totale di batteri. Si ha invece un aumento significativo nel numero di cellule morte nella lega Ti6Al4V (aumento del 15% rispetto all'acciaio).	[30]
---------------------------------------	---------------------	---	----------	--	---	------

1.3 Eccessiva crescita tissutale

I progressi della medicina hanno portato ad un notevole aumento dell'aspettativa di vita: l'età media è aumentata, portando con sé nuove problematiche e sfide. La perdita di tessuto scheletrico che può accompagnare traumi, lesioni, malattie o l'avanzare dell'età può determinare una notevole morbilità e costi socioeconomici significativi. Per affrontare il bisogno insoddisfatto di aumento osseo, l'ingegneria tissutale, unitamente allo sviluppo di dispositivi ortopedici, è venuta alla ribalta negli ultimi anni con nuovi approcci per la formazione del tessuto scheletrico ex novo [31].

Escludendo la medicina rigenerativa, di minor interesse in questa trattazione, molta della letteratura sino ad ora disponibile è legata in particolar modo alla stimolazione del fenomeno di crescita ossea, per quanto riguarda dispositivi ortopedici di tipo permanente.

Nel caso dei dispositivi di fissazione temporanea per traumatologia, sebbene sia necessario stabilizzare i segmenti ossei fratturati per consentirne la guarigione, un'adesione troppo salda dell'osso all'impianto può risultare problematica in sede di rimozione dell'impianto, prolungando i tempi di intervento e introducendo rischi di nuove fratture ossee. Sebbene il problema sia sentito a livello clinico, la letteratura scientifica risulta ad oggi piuttosto scarsa in merito. Lo studio dei meccanismi di formazione del nuovo osso rappresenta uno spunto per comprendere e guidare la guarigione fisiologica dell'osso ma anche per modularla in funzione della tipologia di impianto che si va a progettare, sia esso di tipo permanente o di tipo temporaneo.

1.3.1 Formazione del tessuto osseo

L'osteogenesi o ossificazione è il processo che porta alla formazione di tessuto osseo; esso avviene partendo dal tessuto mesenchimale preesistente, successivamente trasformato in tessuto osseo [32].

1.3.1.1 Cellule coinvolte

Le cellule fondamentali del tessuto osseo, responsabili della sintesi dei componenti della matrice, sono gli osteoblasti: di forma tondeggiante, essi derivano dalla differenziazione delle cellule osteoprogenitrici. Queste ultime sono cellule staminali determinate, che a loro volta derivano da quelle mesenchimali, le quali costituiscono una popolazione residente nel midollo osseo in grado di differenziarsi in molteplici tipi, come illustrato in figura 1.17.

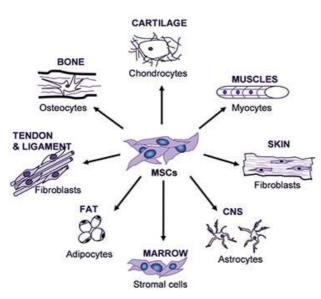


Figura 1.17- Differenziazione delle cellule mesenchimali. [F17]

Gli osteoblasti, in quanto cellule secernenti, sono caratterizzati dalla presenza di un reticolo endoplasmatico rugoso e di un apparato di Golgi molto estesi e responsabili da un punto di vista istologico della loro basofilia citoplasmatica 7. Similmente fibroblasti (le cellule fondamentali del tessuto connettivo propriamente osteoblasti detto), gli sono costantemente impegnati, nelle fasi di

formazione dell'osso, nella sintesi dei componenti molecolari che vanno a costituire sia le fibre (a base di collagene e ricoperte da cristalli di idrossiapatite [34]) che le glicoproteine della matrice. Tali composti vengono successivamente espulsi dalle cellule per esocitosi e vengono quindi assemblati nella loro forma definitiva all'esterno della cellula [35].

Una volta completata la sintesi della matrice ed avvenuta la sua calcificazione, gli osteoblasti si sistemano in cavità ellissoidali non mineralizzate scavate nella matrice stessa definite *lacune ossee*. In questa fase diventano osteociti e, pur rimanendo cellule vitali, entrano in uno stato di quiescenza; analogamente ai fibrociti per il tessuto connettivo, mostrano in tale fase un reticolo endoplasmatico poco sviluppato. Si formano però lunghi prolungamenti, utili per il nutrimento della cellula, che decorrono all'interno

40

⁷ È definita come "la proprietà caratteristica di alcune cellule e di alcuni costituenti cellulari, detti perciò basofili, di colorarsi in maniera elettiva con i coloranti basici dell'anilina." [33].

dei *canalicoli ossei*: essi possono anche intersecarsi tra loro cosicché non solo più osteociti sono in contatto tra loro ma anche il liquido interstiziale giunge a tutte le cellule, anche quelle lontane dalla sorgente nutritizia.

In caso vi sia necessità di deporre matrice ossea gli osteociti vengono reclutati degli osteoblasti, attraverso opportuni segnali. Sono inoltre in grado di controllare l'azione di altri tipi di cellule, coinvolte nel processo inverso: gli osteoclasti, il cui compito è produrre e secernere enzimi che agiscono degradando la matrice calcificata, permettendo il riassorbimento dell'osso. Tali cellule entrano in gioco sia nei processi di crescita, durante i quali è necessaria la sostituzione del tessuto osseo immaturo (non lamellare) in tessuto osseo lamellare adulto, sia per permettere il rimodellamento dell'osso.

Inoltre, il tessuto osseo è costituito da una abbondante matrice di natura proteica, prodotta dalle cellule del tessuto e nella quale le stesse sono immerse. Questa presenta una porzione di natura organica, grosso modo similare a quella connettiva, ed una componente minerale calcificata. La prima frazione è composta da una componente fibrillare e da una amorfa, di natura

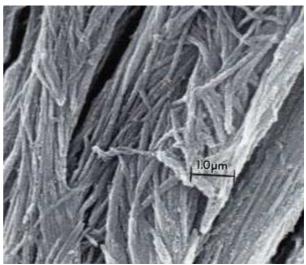


Figura 1.18- Fibre di collagene con cristalli di idrossiapatite, viste al SEM. [F18]

proteoglicanica. Quest'ultima, però, è in porzione molto ridotta all'interno dell'osso, tanto che la componente non minerale prevalente della matrice (circa il 20% del suo peso secco) risulta essere il collagene di tipo I, che forma le fibre omonime. Nell'osso adulto, tali fibre sono disposte secondo una organizzazione precisa ed ordinata, a costituire dei fasci che a loro volta formano una struttura ad elica che aumentano le doti di compattezza e resistenza del tessuto, come mostrato in *figura 1.18*.

Ulteriori componenti della matrice sono le glicoproteine: sono di vario tipo ed hanno per lo più ruolo di adesione. Fra di esse possono essere menzionate la fibronectina, la trombospondina, l'osteopontina; in comune hanno il compito di ancorare le cellule alla matrice. Una proteina caratteristica della matrice ossea è invece l'osteocalcina, coinvolta presumibilmente nella sintesi del tessuto, mentre l'osteonectina ha il ruolo di promuovere la mineralizzazione della matrice stessa [34].

La componente minerale calcificata va invece a costituire una impalcatura dura e compatta, essenziale per le funzioni di sostegno e di locomozione proprie dell'osso stesso. Il processo di mineralizzazione inizia già durante lo sviluppo embrionale dei vertebrati, ma incrementa e giunge al completamento solo in fase postnatale; in un individuo adulto, la componente minerale costituisce circa il 65% del peso secco del tessuto osseo. Tale componente minerale è costituita principalmente da calcio, combinato con ossigeno, fosforo e idrogeno al fine di formare idrossiapatite, un composto minerale che forma sottili cristalli a forma di prismi, della lunghezza di 20 nm e dello spessore di circa 2 nm.

È importante notare come le diverse componenti della matrice, quella organica e quella minerale, conferiscano proprietà diverse ed interdipendenti al tessuto: la frazione calcificata è responsabile della durezza dell'osso, mentre quella fibrillare è responsabile della flessibilità e, dunque, della robustezza e della resistenza alla trazione del tessuto.

1.3.1.2 Osteogenesi

L'ossificazione può avvenire secondo due modalità, l'ossificazione intramembranosa, o diretta, e l'ossificazione endocondrale, o indiretta. In entrambi i casi il processo prevede la sostituzione del tessuto mesenchimale con tessuto osseo, tramite una velocità di deposizione dello stesso superiore o uguale alla sua velocità di riassorbimento. Tuttavia, nel primo caso si ha un passaggio diretto dal tessuto mesenchimale a quello osseo, mentre in quella endocondrale si passa attraverso una fase intermedia cartilaginea. La seconda modalità è tipica delle ossa lunghe ed alle vertebre, definite perciò cartilaginee, mentre la prima appartiene a quelle membranose, tra cui mandibola e clavicola [36].

1.3.1.2.10ssificazione intramembranosa

L'ossificazione intramembranosa prevede come fase iniziale una vascolarizzazione del tessuto mesenchimale: grazie allo stimolo dovuto a citochine, fattori di crescita e ormoni

(in particolare il somatotropo e gli ormoni tiroidei), va incontro ad una crescita e a una trasformazione della popolazione cellulare, che si tramuta dapprima in preosteoblasti ed in un secondo momento in osteoblasti.

Le cellule di nuova formazione si raggruppano in file formate da due o tre strati, noti come *aggregati densi*, ed iniziano la produzione di osteoide; la struttura, mostrata in *figura 1.19*, è il centro di ossificazione. L'osteoide non appena prodotto, viene immediatamente mineralizzato, formando una trabecola ossea. Gli osteoblasti appongono su di essa un nuovo strato di osteoide, il quale come il precedente viene immediatamente mineralizzato. Così facendo la matrice ossea cresce e gli osteoblasti vengono man mano imprigionati all'interno, trasformandosi in osteociti. I centri di ossificazione crescono e tendono ad unirsi, portando ad un aspetto macroscopicamente spugnoso, tipico delle ossa con questo tipo di ossificazione. Inoltre, le fibre di collagene sono disposte a fasci incrociati e ciò rende l'osso più debole alle sollecitazioni.

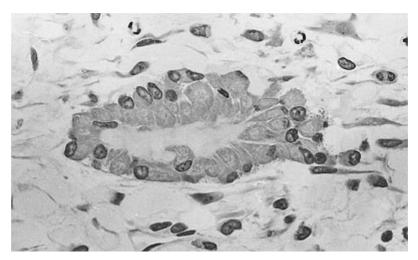


Figura 1.19- Osteoblasti formano l'osteoide al centro dell'aggregato. [F19]

Successivamente, una volta raggiunto il completamento del processo, si ha un rimodellamento continuo, basato sull'aumento dell'attività osteoclastica e la diminuzione dell'attività osteoblastica, che conferisce maturità all'osso. Il tessuto mesenchimale rimanente andrà incontro a trasformazione in midollo osseo emopoietico.

1.3.1.2.2 Ossificazione endocondrale

L'ossificazione endocondrale permette la creazione di una struttura estremamente resistente alla compressione e quindi adatta alla funzione di sostegno dello scheletro, al contrario del processo spiegato precedentemente.

La prima tappa è l'addensamento del tessuto mesenchimale successivamente a stimoli di crescita mediati da citochine e ormoni. Si formano numerosi centri condrogenici, in cui le cellule si differenziano in condroblasti, i precursori dei condrociti. Similmente al processo intramembranoso, intorno a questi centri avviene la formazione di un pericondrio⁸ di cellule producenti cartilagine ialina che, con il passare del tempo, cresce fino a formare un modello cartilagineo per il futuro osso.

A livello diafisario i condroblasti, differenziatisi in condrociti, vanno incontro ad ipertrofia, aumentando di dimensioni e riassorbendo la cartilagine circostante. Quindi degenerano, lasciando lacune, successivamente riempite da vasi sanguigni. I fattori di crescita dell'angiogenesi (AGF) attivano i recettori delle cellule endoteliali presenti nei vasi sanguigni esistenti; queste rilasciano gli enzimi (proteasi) che permettono alle stesse di

fuggire dalle pareti dei vasi sanguigni e di proliferare e formare germogli che collegano i vasi limitrofi [36].

le cellule contemporanea contenute nel pericondrio attività acquisiscono osteoblastica, trasformandolo in periostio e formando così il centro di ossificazione primario,

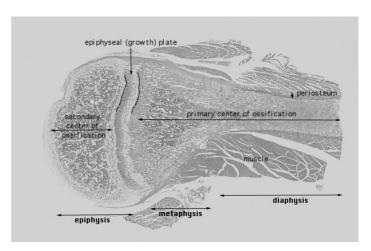


Figura 1.20- Centri di ossificazione primario e secondario. [F20]

visibile in figura 1.20. I macrofagi invadono il tessuto osseo periostale e, diventati osteoclasti, procedono nella digestione della cartilagine presente, mentre i vasi sanguigni invadono il tessuto, portando con sé gli osteoblasti presenti nel periostio.

A livello delle metafisi viene a crearsi una struttura definita piastra di crescita epifisaria. La porzione diafisaria risulta costituita da osteoclasti, la cui funzione è quella di digerire la cartilagine ialina, e da osteoblasti, mentre quella epifisaria risulterà costituita dal

⁸ Il pericondrio è una membrana di rivestimento della cartilagine; è ricca di vasi sanguigni e di nervi.

pericondrio, avente condroblasti e condrociti, la cui funzione è quella di continuare a produrre grandi quantità di cartilagine ialina.

A livello del centro delle epifisi vengono a formarsi successivamente i *centri di ossificazione secondari*. Qui il processo di ossificazione non risulta ordinato come a livello metafisario, per cui l'osso assume una struttura trabecolare più simile a quella delle ossa, formatesi tramite ossificazione intramembranosa. Ciò costituisce un vantaggio, in quanto conferisce resistenza all'osso senza fargli raggiungere un peso eccessivo rispetto alle necessità motorie effettive, ma d'altro canto rende quest'area estremamente suscettibile a fratture in caso di osteoporosi [37]. Mentre a livello epifisario una piccola parte di cartilagine ialina rimane per andare a costituire la cartilagine articolare, il rimanente tessuto va incontro a trasformazione in tessuto osseo.

1.3.2 Crescita ossea all'interfaccia osso-impianto

L'interfaccia osso-impianto è un delicato sistema in continua evoluzione. Per quanto complesso si possono distinguere due distinte risposte che si intrecciano vicendevolmente: una propria del materiale e la seconda dell'ambiente ospite.

Bisogna precisare che la risposta locale del tessuto è un prolungamento del normale processo di guarigione di una ferita e, in quanto tale, prevede due fasi:

- Infiammazione, con modifiche alla vascolarizzazione e della composizione cellulare;
- 2. Riparazione del danno, con il tentativo di ripristino della zona danneggiata [38].

Un corpo estraneo scatena lo stesso tipo di meccanismi di difesa, ma persistendo all'interno del corpo costituisce una fonte di irritazione continua, che porta ad una graduale inibizione dei meccanismi di infiammazione.

1.3.2.1 Risposta del materiale

Il primo evento, direttamente successivo all'impianto del dispositivo metallico, è l'assorbimento di proteine, provenienti dal sangue e dai tessuti circostanti. Una volta in loco mediano l'interazione con il tessuto e condizionano la risposta dell'organismo, come si tratterà in seguito. In tale fase mutamenti avvengono sulla superficie del materiale: ne è un esempio l'ossidazione dei metalli, di cui c'è una ampia trattazione in letteratura [39]. Nel titanio commercialmente puro, prima dell'impianto lo spessore dello strato di ossido nativo, formatosi sulla superficie, è pari a 2-6 nm, mentre all'interno dell'organismo ospite raggiunge valori di due o tre volte superiori, come dimostrato dalla *tabella 1.3*.

Implant time (years)	Relative oxide thickness	Elements found in the oxide in addition to Ti, O, and C
0	1 (35 Å)	
0.5	2-2.5	P, Ca, S
1.5	3	P, Ca, S
2	3	P, Ca, S
2	4	P, Ca,
3	3.5	P, Ca, S
3	4.5	P, Ca, S
.6	13 (10-18)	P, Ca, S
8	11 (9-15)	P, Ca, S

Tabella 1.3- Andamento dello spessore dell'ossido di titanio rispetto al tempo di impianto. [T3]

Un'ulteriore conseguenza di tale evento è il rilascio di ioni metallici nei tessuti. Essi sono il prodotto della corrosione superficiale; possono precipitare e formare composti quali ossidi ed idrossidi, che si accumulano localmente, così come si estendono ad altre zone per via sistemica [40].

Elevate concentrazioni di metallo sono state misurate sia nei tessuti antistanti l'impianto in titanio e sia nelle urine dei pazienti; tale quantità va tenuta sotto controllo, per via di un elevato rischio di citotossicità e di possibili reazioni di ipersensibilità.

Studi in vitro rivelano come gli ioni metallici, anche in dosi non letali, interferiscano con la differenziazione di osteoblasti ed osteoclasti, ma ancora non è chiaro se questo fenomeno sia ugualmente rilevante in vivo [41].

1.3.2.2 Risposta dell'organismo

La risposta dell'organismo coinvolge una serie di eventi cellulari e matriciali, che culminano con l'osteointegrazione, cioè con l'apposizione di nuovo tessuto osseo alla superficie del materiale.

Nei primi nanosecondi a seguito dell'impianto le molecole d'acqua presenti nel fluido biologico raggiungono la superficie formando un film di idratazione orientato, all'interno del quale sono presenti ioni, quali Cl⁻, Na⁺, Ca²⁺, o biomolecole idrosolubili. Questo strato influenza l'interazione con le proteine, che nell'arco di alcuni millisecondi iniziano ad intervenire, come citato in precedenza.

Le cellule che successivamente giungono sulla superficie vedono lo strato di proteine; la loro interazione con il materiale dipende da tale zona proteica, le cui proprietà a sua volta dipendono dallo strato idrato e dalle caratteristiche dell'area del dispositivo impiantato. Un evento ulteriormente presente è la formazione di una capsula fibrotica; la superficie, in quanto esterna all'ambiente fisiologico, stimola la risposta immunitaria e si osserva l'adesione dei macrofagi [42]. Tali particelle tuttavia non riescono ad inglobare l'impianto e iniziano a fondersi in cellule giganti e a produrre citochine. Attraverso tali molecole proteiche, intervengono i fibroblasti; essi producono collagene che forma una capsula priva di cellule e non vascolarizzata, che racchiude la superficie e i macrofagi. Si desume da ciò come il contatto osso-impianto necessiti di una fase di danneggiamento, necessaria per porre in situ il dispositivo, ed una di riparazione (è molto delicata, poiché la capsula fibrotica danneggia ed indebolisce il neo-tessuto).

Studi morfologici rivelano l'eterogeneità dell'interfaccia osso-impianto: si riporta spesso di una zona afibrillare, che, per quanto il suo spessore vari, si forma indipendentemente dal biomateriale impiantato [43].

Ricerche più recenti hanno inoltre dimostrato, attraverso test immunocitochimici, che la zona è ricca, oltre che di glicosamminoglicani, anche di proteine non di tipo collagenico come la osteopontina (OPN) o la sialoproteina ossea (BSP); l'assenza di proteine sieriche, quali l'albumina, indica l'accumulo selettivo di molecole all'interfaccia. La presenza di

OPN e BSP è particolarmente importante dell'adesione cellulare, fornendo un ulteriore legame tra il tessuto naturale e il materiale estraneo. Inoltre, la presenza di osteoblasti, osteoni e matrice mineralizzata in una zona adiacente alla *lamina limitans* ossea, suggerisce come la formazione di nuovo tessuto avvenga attraverso la deposizione direttamente sulla superficie dell'impianto, estendendosi poi a tutto il biomateriale [44].

1.3.2.3 Fattori determinanti

La formazione di osso avviene attraverso un doppio meccanismo di formazione e riassorbimento: la ferita viene creata e la guarigione dovrà avvenire nello stesso modo con cui il sito di impianto era stato precedentemente formato, cioè attraverso una risposta immunitaria, una neovascolarizzazione ed il reclutamento di cellule progenitrici.

L'ambiente biomeccanico e biochimico nel qual è immerso la zona in questione influenza molto lo sviluppo della cartilagine e dell'osso di nuova formazione. Una volta che l'impianto è in sede, la reazione delle piastrine è immediata: esse si aggregano e secernono fattori di crescita (IGF, TGF, FGF) e molecole, come serotonina ed istamina. La differenziazione di queste ultime particelle favorisce la proliferazione e l'attacco degli osteoblasti, come si nota dalla *Figura 1.21*. La nuova matrice ossea si forma ed il suo sviluppo è regolato da proteine di trascrizione, come la Cbfa1.

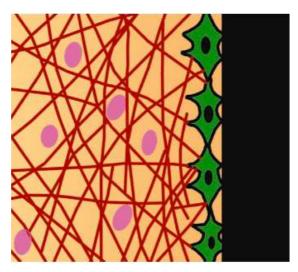


Figura 1.21- Adesione degli osteoblasti ad una superficie di titanio. [F21]

Il pattern di crescita è diverso a seconda del tipo di osso: nel caso corticale si ha un rimodellamento degli osteoni (capillari attorno a cui sono disposte le lamelle, composte da fibre di collagene e cristalli di idrossiapatite, circondate da cemento organico), mentre in quello trabecolare la formazione di tessuto avviene tramite osteoinduzione ed osteoconduzione. La prima individua il reclutamento di cellule staminali mesenchimali, che diventano osteoblasti, favorendo l'apposizione di nuova matrice, mentre la seconda fase regola il processo di sviluppo osseo su un sito o una superficie.

Ulteriore differenza è dovuta al fatto che l'osteointegrazione è influenzata dalla superficie dell'impianto, dalla sua composizione chimica e dalla biomeccanica. Una vasta letteratura dimostra la diretta relazione tra osteointegrazione e topografia ([45]-[49]).

La rugosità della superficie, più di altri fattori, ha un'influenza altissima in tale ambito [45]: così come con i batteri, una superficie con valori di Ra (Rugosità media) pari al micron favorisce la colonizzazione di cellule ematiche ed ossee, con un aumento di fattore Cbfa1 e del numero di filopodi. Esiste un range indicativo, confermato da alcuni studi [46], all'interno del quale le cellule reagiscono in maniera ottimale con la superficie.

Si hanno effetti maggiori di fissazione con valori di Ra compresi tra 200-2000 nm e 2 μ m: al di sotto della soglia inferiore le cellule aderiscono in vitro, ma nessun mutamento è osservato in vivo [47].

In uno studio *in vitro* di Boyan et al., alcune cellule di topo, simili ad osteoblasti, sono state coltivate su dischi in titanio (spessore 1 mm, diametro 15 mm) con rugosità diverse, in modo che queste corrispondessero ai valori comunemente adoperati negli impianti dentali. Nel grafico in *figura 1.22* è mostrato il quantitativo di cellule che ha aderito alle superfici di plastica, titanio macchinato ($R_a=0.60\pm0.02~\mu m$), titanio acidato e sabbiato ($R_a=3.97\pm0.04~\mu m$) e titanio con plasma spray ($R_a=5.21\pm0.24~\mu m$), in presenza ed assenza di desametasone o BMP-2. All'aumentare della rugosità, gli autori rilevano come il numero di cellule che aderisce diminuisca, indipendentemente rispetto all'uso di agenti osteogenici, quali glucocorticoidi e proteine che promuovono la crescita ossea. Inoltre, la rugosità influisce positivamente sulla calcificazione, con qualche differenza, però, nella distribuzione di Ca/P nella matrice [48].

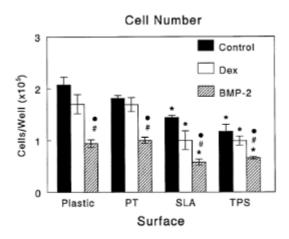


Figura 1.22 - Effetto della rugosità sulla proliferazione cellulare; le sigle PT, SLA e TPS identificano rispettivamente superfici macchinate, acidate/sabbiate e trattate con plasma spray. [F22]

Uno studio di Abrahamsson et al. valuta l'effetto di due diversi trattamenti superficiali: superfici sabbiate ed acidate (SLA) e macchinate (T) sull'adesione di tessuto osseo. Lo studio è stato condotto su 20 cani labrador, a cui sono state impiantate 160 viti appartenenti ad impianti endossei caratterizzate dai due diversi trattamenti superficiali sopra citati. La ricerca mostra come le due superfici abbiano molti fattori in comune per quanto riguarda la crescita ossea: in entrambi ad esempio si nota una precoce proliferazione di strutture vascolari e la migrazione di fibroblasti nel sito di guarigione. Tuttavia, sin dai primi eventi, la formazione di osso appare più pronunciata nelle superfici SLA: la presenza di osteoblasti formanti il nuovo osso è stata osservata dopo 1 settimana ed in maniera più incisiva nei bordi laterali delle viti, apparendo come un continuo rispetto al tessuto naturale. Tra le 2 e le 4 settimane, la componente spongiosa primaria ha lasciato il posto a osso lamellare fibrato, in modalità meno rapida nuovamente nelle superfici T. Tuttavia, in seguito, il volume di osso lamellare è aumentato rispetto a quello dei dispositivi SLA: alle 6, 8 e 12 settimane di osservazione, le prime possedevano più tessuto mineralizzato che le seconde. Poichè però dalla settimana 2 si è notato con certi parametri un'area di contatto sostanzialmente e significativamente più grande tra l'osso appena formato e le pareti in titanio dell'SLA rispetto ai dispositivi T, si considera più prominente l'osteointegrazione in superfici sabbiate ed acidate [42].

È invece riportato come superfici lucidate a specchio contrastino l'adesione dell'osso. In uno studio di Hayes et al., è presente un confronto tra varie superfici di titanio grado 4, titanio grado 5 e di acciaio di tipo diverso: viti lucidate a specchio, attraverso elettrolucidatura ($R_a=0.22~\mu m$) e tramite paste-polishing ($R_a=0.52~\mu m$), al fine di confrontarle con quelle in titanio microrugoso ($R_a=1.04~\mu m$) ed in acciaio ($R_a=0.33~\mu m$) . I campioni sono stati impiantati per 6, 12 e 18 mesi in tibia di pecora e sono stati valutati per coppia di rimozione, percentuale del contatto dell'osso e risposta tessuto-materiale. Entrambe le superfici con elettrolucidatura e con paste-polishing hanno ridotto significativamente la coppia media richiesta per la rimozione rispetto alle loro controparti rugose; ciò è stata accompagnato da una tendenza per una percentuale più bassa del contatto dell'osso per le viti lucidate, come visibile in *figura 1.23*. Ex vivo, la rimozione dal tessuto molle era molto più facile (5 minuti circa) per i costrutti lucidati, e almeno 4 volte più lunga per i costrutti micro-rugosi [46].

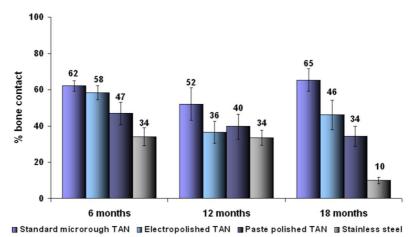


Figura 1.23- Percentuale di contatto osseo per viti in lega di titanio microrugose TAN-S, elettrolucidate TAN-EP, viti lucidate con pasta TAN-PP e viti con acciaio SS dopo l'impianto di 6, 12 e 18 mesi, le viti in acciaio hanno avuto significativamente meno contatto dell'osso confrontato agli altri. Tuttavia, le viti TAN-PP hanno influenzato significativamente la quantità di contatto dell'osso, confrontata a TAN-S (p < 0,001), ma questa non è stata osservata per le viti TAN-EP (p = 0.066). Inoltre, non è stata notata alcuna differenza significativa nel contatto osseo per le viti a TAN lucido (p = 0.752). [F23]

La morfologia di alcuni componenti costituisce inoltre un terreno fertile per la proliferazione cellulare: la forma delle viti ad esempio le rende particolarmente atte a crescita tissutale, in quanto nelle filettature si forma un'interfaccia fibro-ossea, che comporta un'aderenza maggiore. Inoltre, il design influenza molto la resistenza a fatica del dispositivo, in quanto può compensare la minore rigidezza del metallo (soprattutto con il titanio, il quale presenta modulo di Young inferiore) [22].

Il tipo di materiale è un altro fattore da tenere in considerazione. è stato riportato, ad esempio, che tra i metalli impiegati nell'implantologia, il titanio induce una maggior adesione del tessuto osseo rispetto all'acciaio. Ciò è confermato da uno studio in vivo di Albrektsson et al.: sono state studiate superfici di policarbonato, rivestito attraverso magnetron sputtering con strati di titanio gr.4 e di acciaio 316L (entrambi spessi 1000 A). Una volta impiantate le protesi si è notato come nel caso dell'acciaio inossidabile uno spesso strato composto da proteoglicani e da cellule infiammatorie separi la superficie dal tessuto osseo. Gli impianti in titanio, invece, sono stati direttamente ancorati all'osso senza alcun strato cellulare all'interfaccia; l'ossido era coperto da uno strato sottile (200-400 A) di macromolecole composto da proteoglicani (responsabili dell'aderenza tra cellule, fibre ed altre strutture) e glicosamminoglicani attaccati alla superficie con acido ialuronico. Non si può escludere in tale sede una differenza di comportamento dovuta al diverso modo di adesione tra il rivestimento ed i substrati, in quanto la tecnica di fabbricazione della superficie è meno importante per le reazioni tissutali del sito ospitante rispetto alla composizione chimica e ad altre proprietà superficiali correlate [43].

Un ulteriore studio appartenente a Christensen et al. confronta viti in titanio gr.5 ed acciaio 316L impiantate su 17 maiali in vivo ed indica come i dispositivi di entrambi i gruppi hanno avuto contatto diretto tra osso e superficie, ma le prime hanno avuto maggior grip di quelle in SS. Per via di ciò si ha un aumento nella resistenza alla rimozione della vite, con un aumento del valore della forza torsionale ed una fissazione aumentata. Inoltre, il rimodellamento del nuovo osso sulla superficie può cambiare la forza di legame della vite: qualsiasi micromovimento dei segmenti può influenzare la fusione dell'innesto. La stabilità di rotazione della vite diventa essenziale per mantenere la stabilità di tutto il costrutto, soprattutto per la fissazione a corto raggio [22].

Brown et al., inserendo 48 viti in acciaio 316L e 48 in lega di titanio (grado 5) nelle tibie di 12 conigli, mostrano come a 6 settimane dall'intervento tutti i dispositivi fossero correttamente integrati e stabilizzati (mobilità <1 mm). Secondo gli autori non vi era differenza nella coppia esercitata per la rimozione, ma in quella per l'inserimento si: quella del titanio era più elevata ($12 \pm 0.25 \text{ N*cm}$) rispetto alla seconda ($11.01 \pm 0.24 \text{ N*cm}$)

N*cm), con una differenza del 9% (cosa che potrebbe non avere conseguenze a livello clinico). La coppia di rimozione è un parametro che riflette le caratteristiche dell'interfaccia ed aumenta gradualmente con la compattazione lamellare in fase di guarigione dell'osso, raggiungendo livelli significativi a 3-6 settimane dall'impianto. Date le premesse ci si aspettava un valore più alto per la lega in titanio; in questo studio, tuttavia, appare simile per entrambi i materiali. Ciò è probabilmente dovuto al fatto che entrambi producono simili quantitativi di micromovimenti, che comportano una accelerazione della guarigione ossea [49].

Tutti gli studi fino ad ora elencati sono riassunti nella tabella 1.4.

Tabella 1.4- Tabella che riassume gli studi svolti sul tema della crescita tissutale su diversi substrati metallici. [T4]

SUBSTRATI	TESSUTO	CONDIZIONI DI TEST	TEST	RISULTATI	RIF.
Titanio gr.1 (lucidato, acidato o acidato/sabbiato)	Osseo	Tramite placche, in vivo, in osso di topo o coniglio	Misura coppia torcente di rimozione, test intraperitoneale, colorazione cellulare, istomorfometria, analisi statistiche.	Transitorio iniziale nel reclutamento cellulare per le superfici, ma nessuna correlazione diretta tra il reclutamento delle cellule e la formazione ossea intorno agli impianti. Nessuna differenza significativa osservata tra i valori di coppia torcente ed il contatto dell'ossometallo o le misure svolte nella zona dell'osso.	[45]
Acciaio 316L, Titanio gr.4, Lega Tl6Al7Nb (elettrolucidate, lucidate con pasta o microruvide)	Osseo, fibroso	Tramite viti, in vivo, in tibia di pecora	Misura coppia torcente di rimozione, profilometro, angolo di contatto, SEM, XPS.	Le viti in lega producono una percentuale significativamente più bassa di contatto diretto con l'osso, rispetto alle viti standard. mentre l'elettrolucidatura mostra una tendenza inferiore. Le viti in acciaio hanno una percentuale significativamente inferiore di contatto osseo rispetto a quelle in lega microruvida e lucida. Mostrano I apresenza di tessuto fibroso. Nessun problema di instabilità delle viti rilevato.	[46]

Titanio gr.2 (pretrattato, sabbiato/acidato o plasma- sprayed)	Cellule fetali osteoblastiche di topo (FRC)	In vitro	Morfologia e conto CFU, spettroscopia ad infrarossi (FTIR), analisi statistiche.	All'aumentare della rugosità, il numero di cellule che aderisce diminuisce, indipendentemente parlando rispetto all'uso di agenti osteogenici, quali glucocorticoidi e proteine che promuovono la crescita ossea. Inoltre, la rugosità influisce positivamente sulla calcificazione.	[48]
Titanio gr.4 (macchinato o acidato/sabbiato)	Osseo	Tramite viti, in vivo, in osso di cani labrador	Analisi istologiche, analisi statistiche.	In entrambi si nota una precoce proliferazione di strutture vascolari e la migrazione di fibroblasti nel sito di guarigione. Sin dai primi eventi, però, la formazione di osso appare più pronunciata nelle superfici SLA, ma in quelle macchinate si ha un volume di osso lamellare aumentato.	[42]
Policarbonato rivestito con Titanio gr.4, acciaio 316L (tramite magnetron sputtering)	Osseo, fibroso	Tramite impianto cilindrico, in vivo, in tibie di conigli	Analisi al microscopio, analisi statistiche.	Con l'acciaio inossidabile si forma uno spesso strato composto da proteoglicani e da cellule infiammatorie, che separa la superficie dal tessuto osseo. Gli impianti in titanio, invece, sono stati direttamente ancorati all'osso senza alcun strato cellulare all'interfaccia.	[43]
Acciaio 316L, Titanio gr.5	Osseo, fibroso	Tramite viti, in vivo, in osso di maiali maschi	Test meccanici, analisi istologiche, analisi statistiche.	I dispositivi di entrambi i gruppi hanno avuto contatto diretto tra osso e superficie, ma quelle in titanio hanno avuto maggior grip delle altre. Nessuna differenza nel volume di osso.	[22]
Acciaio 316L, Titanio gr.5	Osseo	Tramite miniviti, in vivo, in osso di coniglio	Misura coppia torcente di rimozione, analisi istomorfometriche, microscopio a fluorescenza, analisi statistiche.	Coppia torcente di inserimento diversa, ma non muta quella di rimozione. Non si rilevano differenze nelle analisi istomorfometriche e nei microdanneggiamenti. Aumento della percentuale ossoimpianto per quanto riguarda il titanio.	[49]

1.3.3 Crescita ossea nei fissatori

La crescita tissutale ossea, precedentemente spiegata, si rivela fondamentale per ottenere a seguito di un impianto una buona stabilità, di cui si individuano due step:

- 1- Stabilità Primaria, la quale è essenziale per contenere i micromovimenti entro un certo range, per evitare la formazione di tessuto fibroso all'interfaccia ossoimpianto;
- 2- Stabilità Secondaria, che si manifesta con crescita del tessuto osseo sulla superficie dell'impianto, grazie ad una corretta trasmissione dei carichi [50].

Una corretta osteointegrazione è l'obiettivo che si persegue comunemente in ortopedia attraverso queste due fasi. Tuttavia, ciò è valido per dispositivi per traumatologia di tipo permanente; per quanto riguarda i fissatori temporanei, sebbene sia necessaria una buona stabilità osso-impianto per garantire una corretta guarigione ossea, un'eccessiva aderenza tra osso ed impianto è può risultare dannosa, poiché rende la procedura di rimozione dell'impianto più complessa e ed è legata ad un maggior rischio di frattura ossea in sede di rimozione.

La crescita eccessiva infatti non solo aumenta la durata dell'operazione chirurgica, ma aumenta il rischio di perdite ematiche ed una prolungata esposizione all'anestesia. Inoltre, tale complicanza costituisce un fattore iatrogeno, in quanto comporta rottura dell'impianto e quindi contaminazione con residui della zona. Non sono esclusi poi fenomeni come infezioni ritardate e reazioni allergiche [51].

Poiché è stato dimostrato che la microrugosità promuove maggiormente la crescita ossea, costituendo un fattore determinante per la fissazione [45] [46], riducendola ed adottando superfici più lisce tale fenomeno risulta ridotto, consentendo di fatto una più agevole rimozione dell'impianto. Per fare ciò possono essere adottate tecniche di lucidatura, con le quali si ottengono superfici che hanno dimostrato una percentuale più bassa di contatto con l'osso, riducendo la coppia di rimozione richiesta [51].

Inoltre, si osserva spesso la crescita di tessuto fibroso [22] [43], il quale con le sue caratteristiche meccaniche inferiori, data da un'organizzazione cellulare multilayer e più disordinata del tessuto originale, costituisce un "anello debole" [51]. Viti d'acciaio lucidate hanno dimostrato di possedere uno strato di cellule infiammatorie fra l'osso e la superficie dell'innesto [22].

Capitolo 2. Rivestimenti antibatterici ed antiadesivi su superfici metalliche

2.1 Rivestimenti antibatterici

I rivestimenti atti a limitare le infezioni da parte di agenti patogeni si basano sull'uso di materiali antibatterici. Questi possono avere azione limitata o prolungata nel tempo; appartengono alla prima tipologia tutti quei materiali che rilasciano sostanze in grado di uccidere i batteri al nei primi tempi successivi all'impianto (giorni-settimane), ma che non risultano più efficaci al termine del rilascio. I materiali del secondo tipo sono invece capaci di degradare i microrganismi in maniera prolungata e costante nel tempo (in genere mediante un'azione diretta della superficie sull'adesione dei microrganismi).

2.1.1 Rivestimenti antibatterici a base di metalli

Le infezioni batteriche possono essere trattate tramite l'applicazione per via locale e sistemica di antibiotici. Ciò tuttavia comporta un aumento della resistenza batterica ed uno spettro di attività limitato ad alcune specie, che non consente un adeguato trattamento per tutte le tipologie di infezioni. In un tale contesto si è sviluppato un maggior interesse verso agenti antibatterici alternativi, in particolar modo quelli di tipo inorganico, quali ioni, sali e nanoparticelle metalliche. Tra tutti uno dei più conosciuti ed adoperati è l'argento, ma vengono anche usati rame e zinco. Il meccanismo di azione di tali metalli contro i batteri è stato in letteratura studiato più volte e risulta ancora oggi parzialmente noto, nonostante gli effetti osservabili da cambi strutturali e morfologici [52].

Numerosi studi considerano i valori di concentrazione inibitoria minima (MIC) degli ioni d'argento contro i batteri, mentre meno considerano rame e zinco. Sono stati segnalati MIC compresi tra 3-180 μ g/ml per le nanoparticelle di argento, con diametri di 3-95 Nm. Per quanto concerne quelle di rame, di dimensione pari a 9 – 95 Nm, sono stati riportati valori di 20-2500 μ g/ml [53] [54]. Si possono trovare valori leggermente più bassi per le nanoparticelle di ossidi di rame (22-95 Nm), in particolare 100-5000 μ g/ml per CuO e 500-

5000 µg/ml per Cu_2O . Infine, MIC nel range 2055-5000 µg/ml sono stati segnalati per le nanoparticelle ZnO (22-95 Nm) [54]. Tali dati sottolineano l'azione antibatterica significativamente più alta dell'argento, confrontata rispetto al rame e allo zinco, in grado di supportare un numero più elevato di pubblicazioni relative a trattamenti superficiali. La dose letale LD_{50} esprime la concentrazione che riduce la crescita delle cellule tissutali del 50%: in tabella sono presentati valori elevati per il rame, il quale necessita di una quantità superiore per essere efficace. Per gli ioni di argento e zinco è sufficiente invece una dose minore, a prova di un effetto antibatterico molto pronunciato, a scapito tuttavia di citocompatibilità [55].

Tabella 2.1- Tabella raffigurante la minima concentrazione inibente (MIC) e la dose letale (LD50), contro vari ceppi batterici per cellule di fibroblasti di topo. [T5]

	MIC (μg/ml)	Rif.	LD ₅₀ (mmol/l)	Rif.
Ag⁺	0.03-8	[56], [57], [58]	$3.5 * 10^{-3}$	[59]
Cu ²⁺	256-448	[60], [58]	$2.3 * 10^{-1}$	[59]
Zn⁺	768	[58]	$3.6 * 10^{-3}$	[59]

A conferma di quanto detto precedentemente, si evince dalla *tabella 2.1* che i valori sono nettamente inferiori per il primo caso, mentre aumentano con gli ioni di rame e zinco [9].

2.1.1.1 L'uso del rame

Il rame è un metallo rosato o rossastro, molto resistente alla corrosione (per via di una patina di ossido aderente che si forma spontaneamente sulla superficie, prima di colore bruno e poi di colore verde o verde-azzurro). È batteriostatico, in quanto combatte la proliferazione dei batteri sulla sua superficie [60] [61].

Sebbene i meccanismi che stanno alla base dell'attività biocida delle nanoparticelle metalliche non siano ancora pienamente compresi, tre meccanismi ipotetici sono riportati nella letteratura:

1. Accumulo e dissoluzione di nanoparticelle nella membrana batterica, che porta alla modifica della sua permeabilità, con conseguente rilascio di lipopolisaccaridi,

- proteine di membrana e biomolecole intracellulari e dissipazione della forza motrice protonica attraverso la membrana plasmatica;
- 2. Generazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS), le quali provocano danno ossidativo alle strutture cellulari;
- 3. Assorbimento di ioni metallici derivati da NPs⁹, seguito dall'esaurimento della produzione intracellulare di ATP e dall'interruzione della replicazione di DNA.

Vi sono pochi studi segnalati sullo specifico meccanismo di attività battericida del rame.

Raffi et al. [62] e Ruparelia et al. [53] hanno suggerito come gli ioni Cu²⁺, provenienti dalle nanoparticelle, visibili nell'immagine al TEM presentata in *figura 2.1*, possano interagire con fosforo e biomolecole contenenti zolfo, come il DNA e le proteine, al fine di distorcere le strutture cellulari e quindi interrompere i processi biochimici. Esse infatti presentano alta affinità con il DNA, portando a disordini nella sequenza della struttura elicoidale, attraverso cross-linking tra i filamenti di acido nucleico [53].

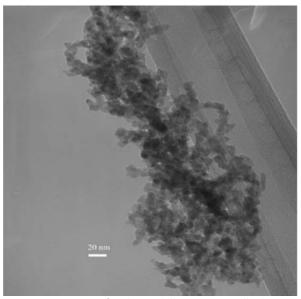


Figura 2.1- Micrografia al TEM delle nanoparticelle di rame; sono visibili la forma tonda e la dimensione. [F24]

Gli ioni Cu²⁺ posso combinarsi con la membrana plasmatica, attraverso attrazione elettrostatica, per poi penetrare nella cellula, attraverso l'apertura o la chiusura di canali.

59

⁹ Tale sigla è comunemente adoperata per indicare le nanoparticelle. Deriva dal termine inglese *Nanoparticles*.

Ciò ne altera la permeabilità, provocando perdita di ioni intracellulari e di metaboliti a basso peso molecolare. Allo stesso tempo, gli ioni che entrano nelle cellule si combinano fortemente con gli aminoacidi intracellulari, con conseguente degenerazione che porta infine alla denaturazione delle proteine.

In un altro studio, Wu et al. hanno segnalato la partecipazione degli ioni di Cu²⁺ nell'attività antibatterica di xerogel ¹⁰ di silice, drogati con rame mesoporoso. Aumentando la concentrazione in rame da 1 wt% a 5 wt% nel gel, è stata rivelata un'efficacia antibatterica, testata con *E. Coli* ed *S. Aureus* pari al 99%, con una riduzione dei tempi gradualmente da 24 h a 1 h, rispettivamente [63].

In uno studio di Kim et al. è stato studiato l'effetto antibatterico su *Pseudomonas Aeruginosa*, *Salmonella Typhimurium* e *Helicobacter Pylori* di ioni di rame. Il materiale è stato depositato su substrato di vetro, attraverso il processo di spin coating (ottenendo un layer spesso 63 nm); poi è stato trattato termicamente a temperature pari a 200°C e 250°C. Percentuali pari a 0.2, 0.6 e 1.0 mol% di ioni hanno permesso di ottenere una efficacia pari a 99.9%. I cambiamenti morfologici visibili sulle cellule batteriche attraverso il SEM, come mostrato in *figura 2.2*, denotano pareti seriamente danneggiate dalla presenza del metallo. Il rame genera molecole di formaldeide (HCHO), la cui formazione è strettamente legata alla transmetilazione enzimatica dell'istamina. Il composto HCHO si lega a gruppi idrossimetilici, formando un complesso di coordinazione, attraverso il quale si esplica il potenziale citotossico [64].

¹⁰ Lo xerogel è un colloide solido, ottenuto essiccando un gel a temperature non elevate (non superiori ai 100 °C), con una conseguente contrazione strutturale finale; è prodotto attraverso tecnica sol-gel.

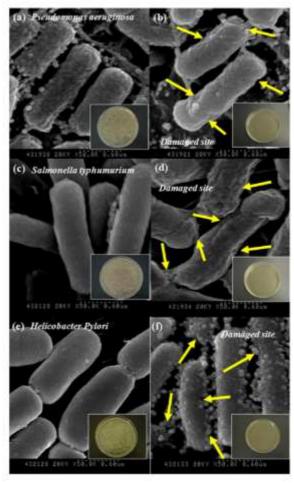


Figura 2.2 - Immagini al SEM, che illustrano le superfici batteriche e relativi danneggiamenti di Pseudomonas Aeruginosa (a-b), Salmonella Typhimurium (c-d) e Helicobacter Pylori (e-f). [F25]

I risultati sperimentali ottenuti in uno studio di Chatterjee et al. rivelano che la filamentizzazione delle cellule batteriche è causata dalla depolarizzazione della membrana cellulare, causata dalla mediazione delle nanoparticelle. La citotossicità cellulare è causata dalla generazione di ROS, mediata da nanoparticelle, che si traduce in perossidazione lipidica cellulare, ossidazione proteica e degradazione del DNA; per tutti questi effetti, la prima causa è la formazione di ioni Cu²⁺, provenienti dall'ossidazione delle NPs [65].

2.1.1.2 L'uso dello zinco

Lo zinco è un metallo moderatamente reattivo, che si combina con l'ossigeno e altri non metalli. Esso non è generalmente tossico, ma esiste una sindrome detta *brividi da zinco*, che può verificarsi per inalazione di ossido di zinco appena formato [66].

All'interno dei rivestimenti è attestato l'uso di nanoparticelle di zinco, in forma di ossido (ZnO), il quale mostra una significativa attività antibatterica su un ampio spettro di specie batteriche esplorate. Esso è in grado di interagire con la superficie degli agenti patogeni ed in seguito con il nucleo batterico, presentando comportamenti battericidi.

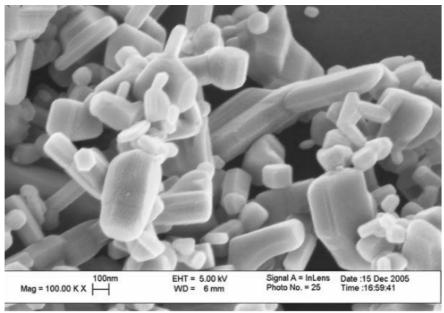


Figura 2.3- Immagine al microscopio a trasmissione elettronica, che raffigura nanoparticelle di ZnO (alcune hanno dimensioni maggiori di 200 nm). [F26]

È interessante notare come le nanoparticelle di ZnO, di cui un esempio è mostrato in *figura 2.3*, siano segnalate da diversi studi come non tossiche per le cellule umane, confermando una buona biocompatibilità [67]. I vari meccanismi antibatterici dei nanomateriali sono per lo più attribuiti alla loro elevata superficie specifica e loro peculiari proprietà fisico-chimiche. Tuttavia, le fasi precise sono ancora soggetto di discussione [68].

Parecchi studi hanno suggerito due meccanismi possibili, coinvolti nell'interazione fra le nanoparticelle ed i batteri:

1. La produzione di un numero elevato di specie reattive dell'ossigeno (ROS), principalmente radicali dell'idrossile ed ossigeno singolo:

Sirelkhatim et al. spiegano come la produzione di ROS parta dalla superficie delle NPs e propongono una correlazione tra le reazioni fotoniche e l'attività antibatterica. L'elettrone e la lacuna interagiscono con l'acqua (H₂O) per produrre [•]OH e H⁺; le molecole di O₂, rese anioni ($^{\bullet}O^{-}_{2}$), reagiscono con H⁺, per produrre HO $^{\bullet}_{2}$, il quale interferisce con $^{\bullet}HO_{2}$. Ciò provoca la combinazione tra questo e H⁺, portando alla formazione di molecole di perossido di idrogeno.

I superossidi e i radicali idrossili non possono penetrare nella membrana a causa delle loro cariche negative, ma si trovano sulla superficie esterna dei batteri; al contrario, le molecole di H_2O_2 sono in grado di passare attraverso la parete delle cellule batteriche, provocando danni. Esiste una proporzionalità lineare tra le concentrazioni di H_2O_2 e la granulometria delle nanoparticelle di ZnO [68].

- 2. La deposizione delle nanoparticelle sulla superficie dei batteri o l'accumulo delle stesse sia nel citoplasma che nella regione periplasmatica, causando la rottura cellulare e/o l'interruzione e la disorganizzazione delle membrane.
 - Zhang et al. hanno suggerito come l'interazione elettrostatica fra NP e la superficie delle cellule batteriche sia la causa dell'inibizione di sviluppo delle stesse. Poiché la carica batterica totale è negativa, per via dell'eccessiva formazione dei gruppi carbossilici, la superficie delle cellule si carica altrettanto mentre le NPs possiedono una carica positiva in sospensione acquosa. Le forze di attrazione elettrostatica, generate dalle cariche diverse, fungono da potente legame tra NPs e la superficie batterica. Di conseguenza, la membrana cellulare risulta danneggiata [67].

È stato ipotizzato come le nanoparticelle ZnO siano in grado di rallentare la crescita di *E. Coli* per via della disorganizzazione delle membrane, che aumenta la permeabilità delle stesse, portando ad un accumulo di nanoparticelle. Entrambi i meccanismi sopracitati portano ad una inibizione della crescita batterica ed all'uccisione di *S. Aureus* [69].

La concentrazione inibitoria minima (MIC) si colloca in un range 4-7 mM, a seconda del ceppo batterico, e sono state usate più comunemente tali quantità (ad esempio l'inibizione della crescita batterica di *S. Aureus* in presenza di una concentrazione molare di 6 mM di NPs, come dimostrato da Raghupathi et al.) [69].

Nel medesimo studio si nota come la granulometria delle nanoparticelle di ZnO influenzi l'attività antibatterica, come si può vedere nella *figura 2.4*.

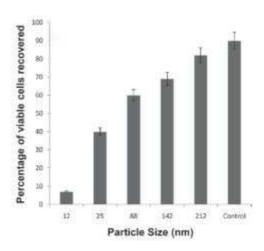


Figura 2.4-Percentuale di cellule vive di S. Aureus, a seconda della dimensione di nanoparticelle. [F27]

Uno studio di Padmavathy et al. conferma quanto detto precedentemente e dimostra la bioattività aumentata delle nanoparticelle di ZnO al variare delle dimensioni (12 nm, 45 nm, 2 µm). Nel caso delle particelle più piccole, la bioattività migliore è attribuita al più alto rapporto area superficiale/volume. Inoltre, più NP sono necessarie per coprire una colonia batterica di dimensioni pari a 2 µm e ciò provoca la generazione di un maggior numero di specie attive di ossigeno (ROS), che uccidono gli agenti patogeni, in questo caso *E. Coli* (come visibile dalla *figura 2.5*), in modo più efficace. Una volta che le nanoparticelle penetrano nella membrana cellulare, esse rimangono strettamente adsorbite sui residui di batteri morti, mentre continuano a rilasciare perossidi nell'ambiente anche dopo che la superficie è completamente coperta, mostrando così un'alta efficacia battericida È stata inoltre constatato una maggior abrasività, che contribuisce così al maggiore danno meccanico della membrana cellulare e all'effetto battericida. [70]

ZnO particle size	Zone of inhibition (mm) E. coli
12 nm	31 (0.1)
45 nm	27 (0.1)
$2\mu\mathrm{m}$	22 (0.3)

Figura 2.5- Tabella che illustra la correlazione tra dimensione delle NPs ed alone di inibizione. [F28]

L'attività antibatterica esposta da nanoparticelle ZnO potrebbe anche essere dovuta alla presenza di ioni Zn²⁺ solubili, formati quando l'ossido è sospeso in acqua o per via di cambiamenti di pH, in quanto l'attività batterica è sensibile ad entrambi questi fattori. La solubilità delle nanoparticelle di ossido di metallo aumenta man mano che la dimensione delle stesse diminuisce, e l'attività aumentata delle nanoparticelle ZnO di dimensioni minori potrebbe anche essere dovuta alla formazione di ioni disciolti [69].

Uno studio di Zhang et al., infine, studiando l'attività antibatterica delle nanoparticelle di ZnO contro *Escherichia Coli, Salmonella Typhimurium, Bacillus Subtilis* e *Staphylococcus Aureus*, trae le seguenti conclusioni:

- Le particelle ZnO sono efficaci nell'inibire ugualmente batteri Gram-positivi e Gram-negativi;
- 2. Le nanoparticelle ZnO più piccole hanno un'attività antibatterica migliore;
- 3. L'attività antibatterica dipende dall'area superficiale e dalla concentrazione, mentre la struttura e la forma delle particelle hanno scarso effetto;
- 4. Il trattamento ad alta temperatura ha un effetto significativo sulla loro attività antibatterica, portando ad una diminuzione;
- 5. I meccanismi dell'attività antibatterica delle particelle ZnO non sono ad oggi ancora compresi totalmente [67].

2.1.1.3 L'uso dell'argento

L'argento è un metallo di transizione, molto duttile e malleabile, appena più duro dell'oro, con una lucentezza metallica bianca. Si può rivelare tossico, quindi il quantitativo deve essere ben calibrato: i suoi composti possono infatti essere assorbiti nel sistema circolatorio e depositarsi in diversi tessuti dell'organismo portando all'argiria [71]. Questa patologia si manifesta, inizialmente, con la comparsa sulla pelle di una colorazione grigionera permanente dovuta alla formazione superficiale di Ag e di Ag₂S; successivamente insorgono bronchiti croniche, danni renali e sclerosi delle arterie [72].

Gli ioni di argento, nello specifico, sono in grado di legarsi ai gruppi tioli, caratteristici di molte proteine, alterando le loro funzioni; ciò consente loro di giocare un ruolo importante a livello anche strutturale, portando alla morte per apoptosi e rottura delle cellule batteriche. Possono inoltre legarsi a molti enzimi: questi ultimi sono cruciali per la respirazione e l'attività metabolica delle cellule, con la conseguenza di possibili interferenze con il DNA nella divisione e replicazione delle stesse. L'azione multipla degli ioni di argento permette di fare fronte ai limiti precedentemente detti: la resistenza batterica diminuisce ed il loro spettro di attività diventa molto più ampio. Medesimi meccanismi si riscontrano anche con altri metalli, quali rame e zinco, tra i più diffusi.

Le nanoparticelle, di cui un esempio è mostrato nella *figura 2.6*, hanno una maggior area superficiale e nel caso dell'argento consentono una maggior rilascio.

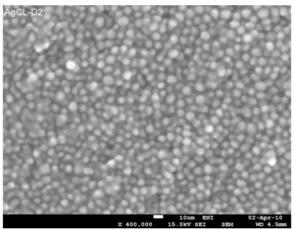


Figura 2.6- Nanoparticelle di Ag di diametro pari a 5 nm, viste al SEM. [F29]

Esse si legano direttamente alle membrane cellulari dei batteri e sono in grado di penetrarvisi, come mostrato nella *figura 2.7*.

Uno studio di Qing et al. [73] riporta due meccanismi di tipo antibatterico delle nanoparticelle di argento:

1. Diretto contatto con i microrganismi

Le nanoparticelle, possedendo proprietà fisiochimiche e biologiche migliori dell'argento sfuso, sono in grado di ancorarsi alla parete batterica delle cellule e infiltrarsi di conseguenza in esse. Tale azione causa cambiamenti fisici nella membrana batterica, che può portare a perdita di contenuti cellulari e alla morte.

È inoltre dimostrato come l'efficacia antibatterica sia maggiore sulle specie Gramnegative rispetto a quelle Gram-positive. Ciò è dovuto al fatto che differisce lo spessore della parete cellulare tra le due tipologie di batteri: le prime possiedono uno spessore pari a 3-4 nm, mentre per le seconde è di 30 nm.

Inoltre, è stato dimostrato che la membrana cellulare dei batteri ha una carica negativa dovuta alla presenza di acido carbossilico, gruppi fosfati ed amminici. la carica positiva conferisce l'attrazione elettrostatica tra nanoparticelle di argento e la membrana delle cellule, di carica negativa, facilitando l'attacco. Quindi, gli effetti antibatterici avanzati possono essere ottenuti modificando la carica superficiale delle AgNPs¹¹, al fine di ottenere una forza attraente più forte.

Dopo l'adesione alla parete, le particelle possono anche penetrare nei batteri, interagendo con biomolecole come proteine, lipidi e DNA. In particolare, l'interazione AgNP-ribosomi porta alla loro denaturazione, causando inibizione della traduzione e della sintesi proteica. Inoltre, il meccanismo antibatterico è anche la causa della loro capacità di produrre alti livelli di specie reattive dell'ossigeno (ROS) e di radicali liberi come perossido di idrogeno, anione superossido, radicale idrossile, acido ipocloroso, e l'ossigeno singolo. In normali circostanze, i ROS generati nelle cellule sono limitati e possono essere eliminati dai sistemi antiossidanti. Le AgNPs possono regolare l'espressione di enzimi antiossidanti come il GSH o la catalasi, che può accelerare l'accumulo di ROS.

2. Meccanismo mediato dal rilascio di ioni

Gli ioni di argento rilasciati (Ag⁺) dalle nanoparticelle sono importanti nell'attività antibatterica. Uno dei parametri importanti è l'area di superficie dei nanomateriali: la più alta concentrazione di Ag⁺ rilasciato è stato osservato in caso di AgNPs con la più alta superficie. Il meccanismo dell'azione antimicrobica di tali ioni è strettamente associato alla sua interfaccia con gruppi di enzimi e proteine. Ad esempio, Ag⁺ può legare alle proteine che sono presenti nella membrana delle cellule per formare legami stabili con conseguente disattivazione proteica. Le proteine sono coinvolte nella generazione di ATP transmembranosa e mediano il trasporto ionico attraverso le membrane cellulari. Inoltre, gli ioni sono in grado di formare complessi con l'acido nucleico, interagendo con nucleosidi: tra la purina e

-

¹¹ Sigla con cui si identificano le nanoparticelle di argento.

la pirimidina, essi distruggono i legami H, prevenendo la divisione cellulare e la riproduzione.

Inoltre, gli ioni di argento, essendo costituiti di un metallo pesante, causano un aumento dello stress ossidativo cellulare nei microbi e ciò si concretizza in un ulteriore meccanismo antibatterico.

Si reputa che il meccanismo antibatterico delle nanoparticelle sia dato dall' uso sinergico di queste due tattiche, come visibile in *figura 2.7* [73].

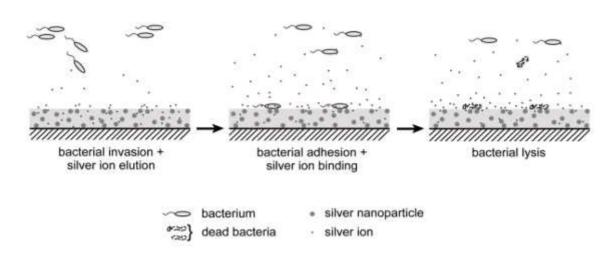


Figura 2.7- Meccanismo di azione antibatterica di nanoparticelle e ioni di argento: le prime rilasciano dal coating i secondi in soluzione; questi si legano alla membrana causando lisi cellulare. [F30]

L'attività antimicrobica dipende dalle dimensioni e dalla forma, aspetti di cui bisogna tenere perciò conto: infatti diametri inferiori ai 10 nm mostrano un effetto battericida più efficace [72]. In uno studio di Pal et al., si dimostra inoltre la dipendenza tra attività antibatterica e forma: le particelle triangolari hanno un potere antibatterico (qui testato in vitro su *E. Coli*) superiore rispetto a quelle sferiche [74].

Cao et al. realizzano invece nanoparticelle di Ag con diversi diametri (4-25 nm), inglobate all'interno di uno strato di ossido di titanio attraverso impiantazione ionica al fine di studiare il comportamento antibatterico contro *E. Coli* e *S. Aureus*: dipendentemente dalla dimensione, particelle oltre i 5 nm hanno rivelato una efficacia maggiore, rispetto a quelle più piccole. Tenuto conto del rilascio di argento, decisamente trascurabile (<10 ppb/cm² dopo 70 giorni in acqua), osservato per queste superfici, il potere antibatterico pare proporzionale alla capacità di immagazzinamento di elettroni delle nanoparticelle, la

quale è maggiore a fronte di dimensioni più elevate. Va inoltre notata una buona tolleranza da parte degli osteoblasti [75].

Dall'altro lato non sono prive di citotossicità; tale aspetto è ancora oggetto di studi [76]. Numerose trattazioni si sono concentrate su questa tematica, in quanto si rischia di danneggiare anche le cellule sane, provocando danni a livello sistemico. Con l'assorbimento delle stesse negli osteoblasti, le nanoparticelle rischiano di causare la prima manifestazione di lesione cellulare, attraverso la generazione di ossido nitrico eccessivo; tuttavia concentrazioni molari di ioni idonee ad un buon effetto antibatterico si attestano tra le 10 nM e 10 μ M [77]. Sembra in ogni caso che l'efficacia aumenti con la formazione di radicali liberi, tramite stress ossidativo [78].

L'attività antibatterica degli ioni d'argento e le nanoparticelle e il loro meccanismo d'azione, sono state dimostrate in vitro su ceppi gram-positivi (*S. Aureus*) [79] e gramnegativi (*E. Coli*) [80].



Figura 2.8- Alone di inibizione con Pseudomonas Aeruginosa. [F31]

I primi possiedono uno strato spesso qualche decina di nm, composto da peptidoglicani, a cui sono attaccati acidi teicoici¹²; quelli negativi sono più complessi strutturalmente e chimicamente. Le nanoparticelle sono in grado con entrambe le tipologie di attaccarsi alle membrane e distruggere l'integrità cellulare: ad esempio NPs di ossido di titanio si rivelano tossiche per *Pseudomonas Aeruginosa* (–) (visibile in *figura 2.8*), *Enterococcus Hire* (+), *E. Coli* (–), *S. Aureus* (+), e *Bacteroides Fragilis* (–) [78].

.

¹² Componenti importanti nella parete dei batteri gram-positivi, essi sono molecole che attraversano completamente la parete e sono dei polimeri di alcoli polivalenti legati tra loro attraverso un gruppo fosfato.

2.2 Tipologie di rivestimenti antibatterici

Diverse tecniche sono state esplorate nella letteratura scientifica e nell'ambito di applicazioni industriali e cliniche per ottenere superfici metalliche ricche di agenti antibatterici. In particolare, si possono distinguere tre particolari categorie di modifiche superficiali:

- Arricchimento superficiale con agenti antibatterici inorganici, senza l'introduzione di uno strato ulteriore;
- 2. Crescita di uno strato di ossido di superficie e suo drogaggio con l'agente antibatterico (può avvenire nello stesso passaggio o in una seconda fase);
- 3. Deposizione di un rivestimento (uno nativo o uno estraneo) e relativo drogaggio con l'agente antibatterico (nel medesimo passaggio o in una seconda fase).

Tali strategie sono riportate, con le principali tecniche utilizzate per la loro applicazione, nella *figura 2.9*, riferendosi in particolar modo al titanio.

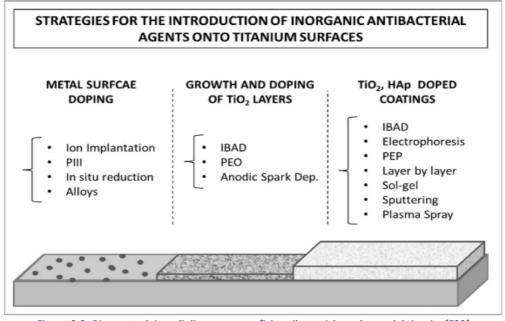


Figura 2.9- Riassunto dei modi di creare superfici antibatteriche nel caso del titanio. [F32]

Applicando trattamenti di tipo antibatterico le prestazioni meccaniche potrebbero subire delle alterazioni: ad esempio, in uno studio di Rodrigues et al, è valutato l'effetto di diverse concentrazioni di argento e di oro, rispettivamente 14-72 mol% per Ag e 14-73 mol% per Au, depositati tramite sputtering su una matrice di ossido di titanio. Le analisi

strutturali e morfologiche hanno mostrato differenze significative nell'evoluzione strutturale, durante la crescita del film: l'analisi XRD ha infatti mostrato campioni amorfi per le concentrazioni metalliche di Ag fino a 46 mol% e Au fino a 43 mol%, e per più alte concentrazioni sono state rilevati fasi cristalline dei metalli nobili. In termini di funzionalità, i film cristallini hanno, in generale, una peggiore aderenza e proprietà meccaniche inferiori rispetto a quelli amorfi. Confrontando i due sistemi, è stato possibile concludere che le proprietà meccaniche del TiO₂-Au sono, in generale, migliori rispetto a TiO₂-Ag, mostrando in ogni caso durezza e modulo elastico inferiori rispetto ai controlli non dopati, come mostrato in *figura 2.10*. Per i tassi di usura, sono stati ottenuti valori simili [81].

Coating	H/GPa	$H/E^{+}/\times 10^{-2}$
TiO ₂	11	6.6
Ag14	7.2	5.1
Ag46	3.3	2.2
Ag63	3.7	3.9
Ag72	1.4	2.3
Au14	13.1	7.2
Au23	10.8	7.3
Au43	10.3	7.0
Au64	8.3	5.2
Au73	6.1	4.1

Figura 2.10 - Rapporti durezza/modulo di Young per i vari campioni dopati con Au e Ag. [F33]

Risulta quindi fondamentale trovare un compromesso adeguato tra resistenza meccanica e proprietà antibatteriche.

2.2.1 Tecniche che prevedono la deposizione di un rivestimento

Per quanto valide ed oggetto di molti studi tutte le alternative, in tale sede ci si concentrerà in particolar modo sulla seconda e la terza tipologia, che prevedono la creazione di un rivestimento, al fine di ridurre l'adesione batterica.

Di seguito sono riportate varie tecniche, quali placcatura elettrolitica, sputtering, deposizione a fascio ionico, deposizione chimica [82], utilizzate per la deposizione di rivestimenti contenenti ioni/nanoparticelle di argento.

2.2.1.1 Deposizione assistita da fasci ionici

Correlata alla tecnica dell'impiantazione (che non viene descritta, in quanto non produce rivestimento), la *Ion Beam Assisted Deposition* (IBAD) prevede di ottenere strati di ossido di titanio, drogati con argento attraverso deposizione assistita da fasci ionici. Il sistema, visibile in *figura 2.11*, è costituito da tre sorgenti di ioni Kaufman, di cui una è di assistenza; comprende anche un portacampione e due porta-bersagli, tutti girevoli e raffreddati ad acqua. In fase di deposizione i portatarget vengono ruotati, al fine di consentire l'esposizione al fascio, per creare uno strato uniforme sul substrato [83].

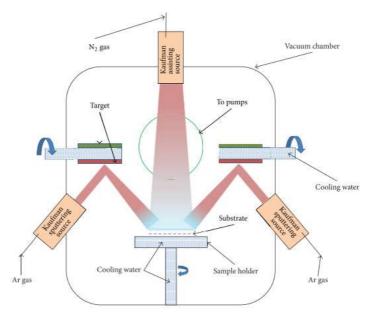


Figura 2.11- Schema del Ion Beam Assisted Deposition. [F34]

La tecnica è applicata in atmosfera di ossigeno su substrati metallici, deponendo film sottili [84]. Questi hanno solitamente scala nanometrica, in quanto i parametri di deposizione, come la corrente del fascio, l'energia del raggio e il flusso di ioni, possono essere facilmente controllati. L'argento metallico viene introdotto nello strato di ossido (costituito da TiO, Ti₂O₃ e TiO₂) durante il processo IBAD [85] [86].

Ciò avviene proprio in uno studio di Zhang et al, il quale, a seguito dell'applicazione del rivestimento di ossido di titanio dopato con argento (con uno spessore pari a 600 nm) registra un aumento notevole della tensione superficiale e dell'energia per concentrazioni di Ag più elevate. L'argento era presente allo stato metallico e l'analisi sul titanio ha

confermato la presenza di TiO, Ti₂O₃ e TiO₂. Indipendentemente dall'evaporazione tassi di titanio e argento, il flusso di ossigeno non ha influenzato significativamente la composizione [85].

È stata inoltre impiegata la deposizione del fascio di ioni su titanio in uno studio di Bai et al. per ottenere un rivestimento di idrossiapatite drogata con Ag, ottenendo una crescente cristallinità dalla parte superiore alla base del rivestimento. Le nanoparticelle d'argento di diametro pari a circa 5-30 nm sono state disperse attraverso lo spessore. La parte meno cristallina del rivestimento si scioglie rapidamente in soluzione, mentre la parte più cristallina porta alla stabilità dello strato superficiale e agisce come un deposito d'argento. Di conseguenza, il rilascio in acqua ha inizialmente portato ad un valore elevato (da 0.4 a 0.8 ppm in 24 ore e da 0.78 a 1.70 in 172 ore, a seconda del contenuto di argento introdotto) e poi è diminuito (fino a 15 giorni). L'introduzione del 3% in peso di argento ha permesso di ottenere una superficie antibatterica contro *S. Aureus* e biocompatibile per gli osteoblasti [86].

2.2.1.2 Tecniche elettrochimiche

Rivestimenti di ossido di titanio ricchi di argento possono essere ottenuti attraverso tecniche di tipo elettrolitico, quali ad esempio l'ossidazione elettrolitica al plasma (Plasma Electrolytic Oxidation).

Tale tecnica consente di ottenere rivestimenti duri, densi e resistenti all'usura, che aderiscono bene su superfici metalliche. Il processo, noto anche come *Micro Arc Oxidation* (MAO) comporta la crescita di un film di ossido sulla superficie, per via dell'applicazione di un campo elettrico (la cui intensità è maggiore del campo dielettrico dell'ambiente). Le proprietà del coating dipendono non solo dal substrato, ma anche dall'elettrolita adoperato: ad esempio rivestimenti con alumina (con il 3% di porosità) possono essere spessi fino a 130 micron, ma in base all'elettrolita è possibile arrivare anche a 600 micron [87]. Nella *figura 2.12* è mostrato un esempio schematico di tale processo.

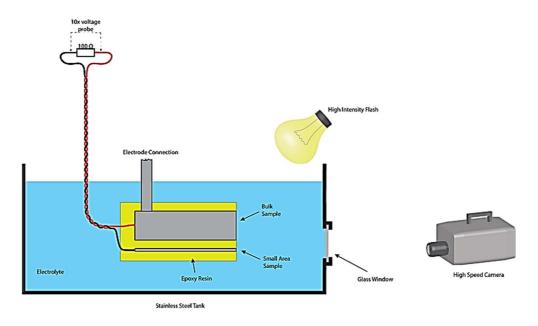


Figura 2.12 - Schema del processo PEO. [F35]

Nell'anodizzazione convenzionale lo strato di ossido cresce sulla superficie per applicazione di un potenziale elettrico, mentre il materiale è immerso in un bagno di elettrolita. Questo è costituito solitamente da una soluzione alcalina, come KOH; è elettricamente connesso con il contenitore in acciaio, il quale funge da contro-elettrodo.

La tecnica PEO è simile all'anodizzazione, ma applica potenziali più elevati (oltre i 200 V), i quali generano scariche che portano a reazioni locali del plasma. Con il modificarsi delle condizioni di temperatura e di pressione, muta anche la struttura dell'ossido, il quale subisce melting, melt-flow, risolidificazione, sinterizzazione e densificazione. Il coating ottenuto è in pratica una conversione chimica del substrato nel suo ossido, che cresce all'interno ed all'esterno del metallo. Si forma così un rivestimento dotato di adesione ottima e di ottime proprietà meccaniche.

Nanoparticelle di argento, di diametro pari a 7-25 nm, sono state introdotte in un elettrolita con acetato di calcio/glicerofosfato di calcio e poi depositate su leghe di titanio, ottenendo superfici in grado di mostrare un elevato potere antibatterico in 12 h [88] [89]. Necula et al. hanno rilevato presenza di particelle in tre diverse collocazioni:

- Fuse con la superficie dell'ossido (con alcune particelle che emergono dal film);
- o Fuse nelle pareti dei pori;

Intrappolate lungo tutto lo spessore della matrice di ossido [89].

È stato inoltre rilevato un aumento della rugosità e della bagnabilità, a seguito del rivestimento: ciò è riconducibile non solo alla modifica topografica della superficie, ma che alla presenza di pori su di essa che consente ai liquidi di penetrare [90].

In un ulteriore studio di Necula et al. la tecnica PEO è stata applicata a superfici in lega di titanio Ti-6Al-4V, immerse in un elettrolita contenente Ca, P e Ag e precedentemente rivestite con plasma spray (tecnica discussa nel *capitolo 2.2.1.7*). Si ottiene uno strato di ossido di titanio con micro e nano porosità (diametro pari a 0.07-5 μ m) tra loro interconnesse. Il rapporto Ca/P si rivela similare a quello dell'idrossiapatite e le nanoparticelle sono disperse sulla superficie ed all'interno dei pori [91].

Nella *figura 2.13* è indicato il processo di crescita dello strato di ossido sulla superficie precedentemente trattata al plasma spray.

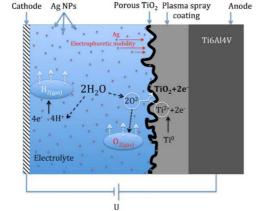


Figura 2.13 - Processo elettrochimico di crescita dello strato poroso in titanio. [F36]

La tecnica PEO è anche nota come Anodic Spark Deposition. Uno studio di Gasquères et al. ha applicato tale rivestimento su una lega di titanio Ti-6Al-4V, immersa in elettrolita acquoso; dalle analisi topografiche si nota il coating denso. L'argento è stato rilevato sotto forma di piccole particelle metalliche (di dimensioni sotto i 200 nm), distribuite in

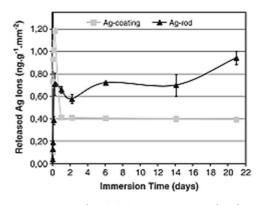


Figura 2.14 - Grafico del rilascio di argento. [F37]

uno strato spesso 100 µm. Il rilascio degli ioni, testato in PBS e mostrato nel grafico in

figura 2.14, presenta un massimo dopo 24 h (1.2 ng *g⁻¹*mm⁻²) e poi rimane costante per 15 giorni, assestandosi sul valore di 0.4 ng*g⁻¹*mm⁻². Contro il ceppo batterico *S. Epidermidis* si rivela molto efficace, in quanto dopo 12 h di incubazione è in grado di uccidere tutte le specie in coltura [88].

La deposizione elettroforetica (EPD) può essere inoltre applicata per assemblare nanoparticelle, in quanto consta di un processo relativamente semplice, versatile ed è meno costoso rispetto ad altre tecniche, pur consentendo il rivestimento su substrati dalla forma complessa. Durante il processo, viene applicata una corrente continua ad una soluzione di polimeri con gruppi ionizzabili o ad una sospensione colloidale di polimeri con gruppi ionizzabili, i quali possono anche incorporare materiali solidi. I gruppi ionizzabili incorporati nel polimero sono formati dalla reazione di un acido e da una base per formare un sale.

La carica particolare, positiva o negativa, che è impartita al polimero dipende dalla natura chimica del gruppo ionizzabile (se è acido avrà carica negativa, se basico sarà positiva). Si distingue il processo in anodico o catodico in base alla carica del substrato da rivestire: se il materiale attira gruppi positivi si parla di processo catodico, mostrato in *figura 2.15*, altrimenti, in presenza di anioni, si ha un meccanismo di tipo anodico [92].

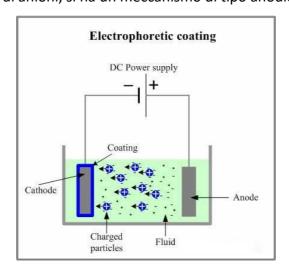


Figura 2.15- Schema di deposizione tramite la tecnica elettroforetica di tipo catodico. [F38]

Con la EPD, su TiO₂ da una stabile sospensione colloidale di tipo organico si eseguono rivestimenti per applicazione di un campo elettrico.

Pochi studi sono stati effettuati con sospensioni acquose. Tra questi, in una ricerca di Santillàn et al. nanoparticelle composite di ossido di titanio (di diametro pari a 23 nm) e di argento (con dimensione pari a 4 nm) sono state ottenute attraverso reazione nucleofilica¹³ e depositate sulle superfici di titanio, con una soluzione composta dal 1.03 wt% di solidi e dal 6 vol% di etanolo. Si è perciò ottenuto un rivestimento nanocomposito (TiO₂-Ag), i cui risultati indicano che H⁺ dall'etanolo fornisce stabilizzazione e si ha la formazione di uno strato di idrossiapatite sulla superficie già dopo una settimana durante i test di bioattività in vitro in SBF. Le proprietà meccaniche sono accettabili, in quanto paragonabili ai valori riportati in letteratura (HV≈ 210 kg/mm², E≈ 29 GPa e Kic≈ 0.86 Mpa*m^{0.5}). Il grado di bioattività diminuisce qualitativamente, all'aumentare del contenuto di Ag all'interno del coating. Ciò è probabilmente dovuto alla disponibilità di gruppi Ti-OH, che porta alla formazione del legame Ti-O-Ag [93].

Adottando poi il Plasma Electrolytic Process, il quale è una combinazione di PEO e tecnica elettroforetica, su substrati di titanio commercialmente puro, si possono ottenere coating compositi, spessi circa 83 µm e formati da ossido e da argento arricchito con HAp

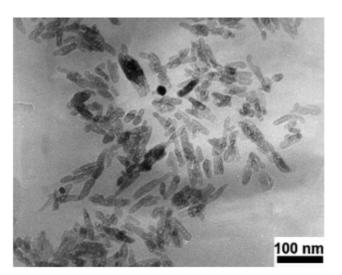


Figura 2.16- Nanoparticelle di AG-HAp visibili al TEM. [F39]

riassorbimento degli osteoclasti) [94].

(nanoparticelle di lunghezza pari a 60-70 nm e larghezza pari a 15-20 nm, visibili in *figura*

2.16). Quest'ultimo è stato ottenuto per sintesi alle microonde, al fine di acquisire un comportamento di tipo antibatterico, senza però alterare la bioattività. Questa è stata testata contro E. Coli.

Il coating ottenuto ha dimostrato migliore resistenza alla corrosione sia pH fisiologico che acido (simulando il

¹³ In una sostituzione nucleofilica avvengono due processi: la rottura del legame preesistente e la formazione di un nuovo legame. Le principali varianti legate a tale maccanismo sono associate a cambiamenti nel tempo dei due processi; tali reazioni possono quindi essere a due o ad uno stadio.

77

Combinando con la tecnica di Micro Arc Oxidation (MAO) con il magnetron sputtering su superfici in titanio, Zhang et al. studiano la morfologia superficiale, la microstruttura, la composizione chimica e lo stato chimico degli strati di ossido di titanio contenenti argento. La concentrazione di Ag nel rivestimento era pari a 13.9 wt. %, ma i rivestimenti hanno subìto durate differenti tempi di ossidazione (2, 5 e 8 minuti). L'attività antibatterica è stata testata su *E. Coli*; si è notato un picco dopo 24 h, in cui si è notato come tutti gli agenti patogeni presenti fossero stati uccisi [95].

2.2.1.3 Scambio ionico

L'argento è stato introdotto su superfici di titanio attraverso un processo di scambio ionico, dopo la formazione di uno strato di titanato di sodio in una soluzione di NaOH, svolta con lo scambio tra ioni Na⁺ e Ag⁺ [96] [97].

Il titanato nanostrutturato è in grado di formare spessi film superficiali, reagendo con NaOH: in particolare il titanato di sodio sviluppa una struttura a rete porosa, reagendo a 60°C con la soluzione di idrossido. I suddetti composti hanno dimostrato un'abilità eccellente nella formazione di apatite e questa abilità è attribuita allo scambio ionico. Pertanto, modificando il composto in titanato di argento si dovrebbe aumentare l'antibattericità della superficie [96].

Sulla base di ciò acetato [96] e nitrato [97] d'argento sono stati considerati come fonti sia di ioni Ag⁺, che di nanoparticelle. In uno studio di Inoue et al., un rilascio costante di ioni è stato osservato in varie soluzioni dopo 24 h, come mostrato in *figura 2.17*.

TABLE I Amount of Eluted Silver Ions in Various Solutions of 1' and 2'

Sample	Physiological Saline	PBS(+)	PBS(-)	Fetal Bovine Serum
1'	510 ppb	360 ppb	380 ppb	64,000 ppb
2'	300 ppb	320 ppb	440 ppb	82,000 ppb

Figura 2.17- Tabella che presenta i rilasci in soluzione salina, PBS e siero fetale bovino. [F40]

Il valore significativamente più elevato si nota nel siero e tale risultato può essere attribuito all'alta affinità fra gli ioni di Ag e le proteine presenti in esso. È stato inoltre

testato il comportamento antibatterico contro *MRSA* e *S. Aureus*, prima e dopo l'introduzione del metallo. In uno studio di Lee et al. si è notato come un elevato numero di batteri si riducesse nella soluzione con argento. In *figura 2. 18* è mostrato l'alone di inibizione del test in vitro [97].

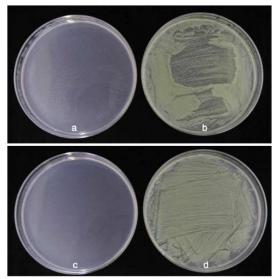


Figura 2.18- Test di inibizione su: (a) campione trattato in NaOH 0,2 M dopo il processo di scambio ionico d'argento, (b) campione trattato in NaOH 0,2 M, (c) campione trattato in NaOH 1,0 M dopo il processo di scambio ionico d'argento, (d) campione trattato nel NaOH 1,0 M. [F41]

Inoltre, in uno studio di Miola et al, è sono stati introdotti ioni di argento su coating ceramici e vetroceramici, precedentemente depositati con plasma spray in aria (APS) su substrati in titanio grado 5 e acciaio 316L. In *figura 2.19* è mostrata l'interfaccia tra i due strati [98].

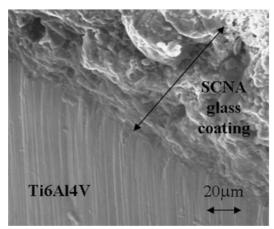


Figura 2.19- Interfaccia tra il substrato ed il rivestimento [F42]

Adattando il contenuto del metallo, mutando la quantità dello scambio ionico, si varia di conseguenza l'attività antibatterica. È stato testato il rilascio di ioni argento in SBF fino a 4

μg/mm². È stata inoltre ottenuta una riduzione di aderenza batterica pari al 95%-100%, con aloni di inibizione pari a 2-5 mm contro *S. Aureus*. Si dimostrano essere rivestimenti bioattivi (promuovono la precipitazione idrossiapatite nel fluido corporeo simulato) e biocompatibili (per le cellule degli osteoblasti) [98].

2.2.1.4 Tecnica sol-gel

La tecnica sol-gel è applicata al fine di preparare nanoparticelle composite di biossido di titanio¹⁴ e di argento [99], polveri [100] [101] o rivestimenti. Tale processo costituisce in origine uno dei principali metodi per fabbricare ossidi di metalli, le cui fasi sono riassunte nella *figura 2.20*.

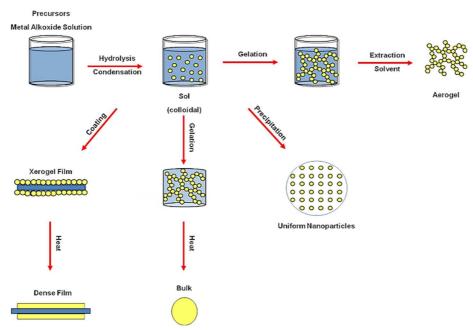


Figura 2.20 - Schematizzazione del processo sol-gel, comprendente i risultati ottenibili. [F43]

Il processo prevede la sintesi di soluzioni colloidali (sol) che costituiscono i precursori per la successiva formazione di un *gel* (un reticolo inorganico continuo con una fase liquida interconnessa) attraverso reazioni di idrolisi e condensazione. Eseguendo post-trattamenti termici di essiccamento e solidificazione, si elimina la fase liquida dal gel, promuovendo una ulteriore condensazione ed incrementando le proprietà meccaniche.

_

¹⁴ Il biossido di titanio è uno dei più importanti materiali inorganici ad alto indice di rifrazione, stabilità chimica e attività fotocatalitica. È adoperato in molti campi diversi.

Il sol è costituito da particelle sospese in un liquido, aventi diametro convenzionalmente compreso tra 1 nm e 1 μ m e viene tipicamente ottenuto a partire da precursori quali metalloidi o sali (ad esempio cloruri, nitrati, acetati).

Tipici precursori adoperati si presentano in forma di $M(OR)_n$, MX_n , $R'-M(OR)_{n-1}$, dove M è un centro metallico e n è il suo stato di ossidazione; X e OR sono invece comuni gruppi uscenti presenti in sali metallici o alcossidi metallici (ad esempio l'anione cloruro negli alogenuri metallici), mentre R' è un qualsiasi gruppo organico legato al centro metallico attraverso legami covalenti o tramite leganti di coordinazione (M = Ti, Zr...). In primo luogo, si ha idrolisi di un alcossido e la deprotonazione di una molecola d'acqua

$$M - OR + H_2O \rightarrow M - OH + ROH$$

collegata al centro metallico, portando alla formazione di un idrossido:

La specie così formata è in grado di reagire con altri centri metallici, tramite reazioni di condensazione, la quale avviene in due modi possibili:

- 1. Tramite ossolazione, con la formazione di un poliossometallato in soluzione acquosa: $M-OH+XO-M\to M-O-M+X-OH$, dove X = H o R;
- 2. Per olazione, con la formazione di un ponte idrossido: $M-OH+XO-M\to M-(OH)-M-OX$, dove X = H o R.

Nella maggior parte dei processi sol-gel, la struttura inorganica è formata da successive idrolisi e condensazioni. La struttura, la connettività e la morfologia della rete inorganica finale sono influenzate ampiamente dal contributo relativo delle 3 reazioni [102].

Per quanto riguarda l'uso di tale tecnica nel comporre rivestimenti, da letteratura si nota come si usino in concomitanza con metodiche, quali lo spin-coating¹⁵ ed il dip-coating.

Il primo può essere adoperato su supporti siliconici, come dimostrato dallo studio di Yu et al: in esso sono stati indagati film spessi di TiO₂ depositati su wafer, con diversi contenuti di argento (i campioni avevano composizioni molari di Ti⁴⁺ e Ag pari a 0:0, 50:1, 20:1, 10:1 e 5:1, identificati rispettivamente con SGO, SG1, SG2, SG3, SG4 e SG5). L'interazione tra i grani di ossido e le nanoparticelle d'argento formano più etero-giunzioni, come Ag/anatase nei film nanocompositi multifase. Tali rivestimenti, semplici da fabbricare e a

-

¹⁵ Lo spin-coating è una procedura utilizzata per depositare pellicole sottili uniformi su substrati piatti.

basso costo, mostrano una eccellente antibattericità contro *E. Coli*, anche per periodi di osservazione lunghi, come mostrato nella *figura 2.21*.

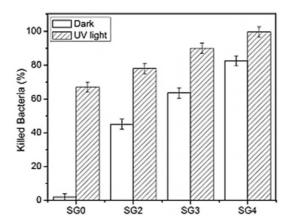


Figura 2.21-Tasso di uccisione dei batteri al buio per un'ora e sotto la luce UV, per quanto riguarda i campioni a diverse concentrazioni molari di Ti⁴⁺ e di Aq. [F44]

La medesima tecnica può anche essere utilizzata su supporti di titanio [103], mentre il dip-coating, che consta nella deposizione di un film solido per immersione in soluzione, ritiro ed essicamento, è stato adoperato su vetro [104]. Con quest'ultima metodica, unitamente al processo sol-gel, si ottengono superfici come quella mostrata in *figura* 2.22, nel quale sono visibili le nanoparticelle di argento all'interno del film.

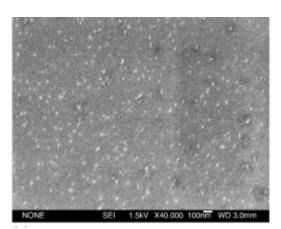


Figura 2.22- Immagine al SEM della superficie che mostra il film. [F45]

I film sono facilmente ottenibili controllando la microstruttura attraverso la porosità, con apparati semplici ed economici. Forme più o meno complesse e grandi, come tubi cilindrici, possono essere rivestite in un unico passaggio [104].

In uno studio di Batebi et al. su substrati di titanio è posto un coating a base di argento e fluoro-idrossiapatite, di cui è mostrata

un'immagine ingrandita al SEM nella figura 2.23.

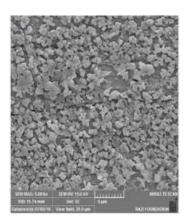


Figura 2.23- Rivestimento sol-gel a base di argento/fluoroidrossiapatite. [F46]

I risultati ottenuti in tale studio sono i seguenti:

- La piccola quantità di ioni d'argento non ha alcun effetto sulla struttura dell'idrossiapatite, ma potrebbe diminuire la sua stabilità termica e comporta la formazione di β-tricalcio fosfato;
- o In presenza di fluoro, le dimensioni cristalline sono diminuite;
- Attività antibatterica dei rivestimenti contro il batterio gram-negativo E. Coli,
 aumentata con crescente quantità di fluoruro [105].

Nella maggior parte della letteratura [106] [107], come precursori di TiO₂ e Ag, sono adoperati rispettivamente isopropossido di titanio e nitrato d'argento. Durante il processo sol-gel, l'argento viene introdotto in forma ionica (AgNO₃) e convertito in nanoparticelle tramite il processo di calcinazione: gli ioni di Ag sono più larghi rispetto a quelli di Ti e perciò non riescono ad entrare nella matrice e sono ridotte a nanoparticelle per trattamenti termici. Sono inoltre efficaci nell'inibire la crescita dei grani di TiO₂ [107]. Le prove di rilascio ionico in acqua hanno dimostrato che il principale contributo si verifica nella prima ora (0.4 ppm) e continua per un massimo di 1 giorno (0.26 ppm), con un rilascio quasi completo dopo 7 giorni (0.005 ppm). L'attività antibatterica dei compositi sol-gel TiO₂-Ag è stata verificata contro *E. Coli*, con un alone di inibizione pari a 2.5-7 mm [106]. È stato evidenziato anche un miglioramento dell'attività fotocatalitica di TiO₂, dovuto all'aggiunta di argento [106] [107].

In uno studio svolto in vivo su coniglio, nel sito chirurgico infetto per via di una introduzione locale di batteri (*S. Aureus*), sono stati eseguiti test in vitro sulle viti di titanio, rivestite o meno tramite tecnica sol-gel di nanoparticelle TiO₂-Ag. È stato

osservato come il rivestimento resista all'attrito ed appaia inalterato dopo l'inserimento all'interno dell'osso. I risultati hanno rivelato l'efficacia per le viti rivestite nel ridurre la formazione di biofilm, senza aver accumulo di argento nei tessuti (cornea, reni, fegato o cervello analizzati 28 giorni dopo impianto) [108].

2.2.1.5 Physical vapor deposition

La deposizione fisica del vapore (PVD) descrive una varietà di metodi di deposizione del vuoto che possono essere usati per produrre i film sottili e rivestimenti. Il PVD è caratterizzato da un processo, in cui il materiale passa da una fase condensata ad una fase di vapore e poi di nuovo ad una fase condensata a film sottile. I più comuni processi PVD sono sputtering ed evaporazione. In *tabella 2.2* sono presentate alcune tecniche, appartenenti alla categoria.

Tabella 2.2- Tabella che riassume le tecniche che possono essere riunite all'interno della PVD. [T6]

TECNICA	DESCRIZIONE		
DEPOSIZIONE AD ARCO CATODICO	Un arco elettrico ad alta potenza si scarica sul target, da cui scaturisce il materiale, poi depositato tramite vapore altamente ionizzato sul substrato.		
PVD A FASCIO ELETTRONICO	Il materiale da depositare viene riscaldato ad alta pressione, mediante bombardamento elettronico in alto vuoto e viene trasportato per diffusione, per poi condensare sul materiale.		
DEPOSIZIONE A VAPORE	Il materiale da depositare è riscaldato ad un'alta pressione di vapore dal riscaldamento elettrico di resistenza dentro alto vuoto.		
DEPOSIZIONE A LASER PULSATO	Un laser ad alta potenza consente l'ablazione del materiale dal bersaglio in vapore.		
DEPOSIZIONE CON SPUTTERING	Una scarica al plasma bombarda il materiale, il quale emette particelle sotto forma di vapore per la deposizione.		
DEPOSIZIONE AD IMPULSO ELETTRONICO	Un fascio di elettroni pulsato altamente energico consente l'ablazione del materiale dal target, che genera un flusso al plasma in condizioni di non equilibrio.		

I rivestimenti, attraverso queste tecniche sino ad ora elencate, sono più duri e più resistenti alla corrosione rispetto ai rivestimenti applicati dal processo galvanico. La

maggior parte dei rivestimenti hanno alta resistenza termica e buona resistenza all'urto, ottima resistenza all'abrasione e sono così durevoli che le finiture protettive non sono quasi mai necessarie.

Tecnologie specifiche possono imporre vincoli; ad esempio alcune tecnologie PVD in genere funzionano a temperature molto elevate e in vuoto. Perciò richiedono una particolare attenzione da parte del personale operativo, richiedendo un sistema di raffreddamento dell'acqua per dissipare grandi carichi di calore.

In uno studio di Ewald et al. dei campioni cilindrici in titanio di grado 2 vengono rivestiti con un coating misto di titanio ed argento per 30 minuti e ad una potenza varabile (112 W- 900 W) attraverso PVD. Il coating presenta uno spessore pari a 2 μm e possiede un contenuto di argento pari a 0.7-9%. Il rilascio di argento in PBS è risultato pari a 0.5 – 2.3 ppb per tempi pari a 3, 5, 7 e 10 giorni; è stata inoltre dimostrata una potenza antimicrobica significativa contro lo *S. Epidermidis* e *K. Pneumoniae*, come visibile nella *figura 2.24*, attraverso un'incubazione di 24 h a 37°C. Allo stesso tempo, nessun effetto citotossico è rilevato su osteoblasti e sulle cellule epiteliali [109].

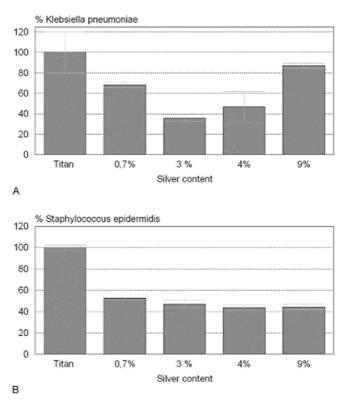


Figura 2.24 - Adesione di ceppi batterici su superfici argentifere, per quanto riguarda K. Pneumoniae (significativamente ridotta (p < 0.05%) su superfici contenenti 3% d'argento) e S. Epidermidis (p < 0.01%). [F47]

2.2.1.6 Sputtering

La deposizione mediante sputtering è una tecnica di deposizione fisica di film sottili, che consiste nella rimozione di materiale da un target, per depositarlo su un substrato. Tale tecnica deriva dal fenomeno fisico per cui gli ioni incidenti su una superficie provocano collisioni a cascata sul target; una volta raggiunto il materiale, l'energia delle particelle è più elevata di quella superficiale (> 5 eV) e vengono espulsi atomi, che vanno in fase gassosa¹⁶ [110].

La tecnica sopracitata è stata utilizzata su vari substrati quali vetri, ceramici, metalli e polimeri [111] per la deposizione di rivestimenti antibatterici Ad esempio, ha consentito di depositare un rivestimento di ossido di titanio, contenente nanoparticelle d'argento, usando target compositi Ag-TiO₂ [112][113], o target in Ag e Ti in un'atmosfera reattiva [114] [115]. L'introduzione dell'argento modifica la struttura cristallina del film: come visibile in *figura 2.25*, si osservano infatti alcuni picchi dovuti alla presenza del rutilo per

2.5 h e 20% Ag.

La bagnabilità delle superfici e l'attività fotocatalitica risultano migliorate a seguito dell'introduzione dell'argento, per via dell'aumento della concentrazione di ioni O²⁻ e Ti³⁺. Si ottiene una superficie più idrofilica, anche all'aumentare del tempo di irradiazione.

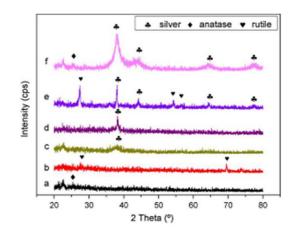


Figura 2.25- Risultati XRD di film appena depositati: (a) puri, con percentuale di Ag pari a (b) 2.5 vol.%, (c) 5.0 vol.%, (d) 10.0 vol.%, (e) 20.0 vol.%, e (f) 40.0 vol.%. [F48]

Una ricerca di Song et al. consente di

ottenere superfici rivestite, nelle quali il pattern di deposizione varia, come mostrato in *figura 2.26*, e possiede buone proprietà meccaniche (una durezza di 15–24 GPa e un coefficiente di attrito di 0.1–0.25). Dapprima è stato depositato un interlayer di titanio

¹⁶ Se l'energia è molto più elevata (qualche keV) le particelle bombardanti penetrano in profondità e il processo diviene la impiantazione ionica; se al contrario l'energia è minore di 5 eV gli atomi rimbalzano sulla superficie o rimangono sulla superficie e poi lentamente, specialmente se sono atomi di gas nobili, vengono desorbiti e tornano nella fase vapore.

puro, con uno spessore di 100 nm, per aumentare la forza di adesione tra il rivestimento e il substrato. Dopo di che, un film di Ti/O, spesso 200 nm, è stato sintetizzato, usando magnetron sputtering, seguito da uno strato di ossido di titanio depositato a pressione costante. Infine, ossido di titanio ed argento formano un layer nanocomposito (200 nm di spessore), fabbricato con la rotazione di un supporto del substrato ad una velocità costante di 20 rpm [114].

L'attività antibatterica è stata valutata contro *S. Aureus*, e i risultati hanno mostrato un calo significativo del numero di colonie contate nella piastra di agar. Piccoli cambiamenti nella quantità di rilascio di ioni d'argento possono essere collegati con l'efficacia antibatterica [115].

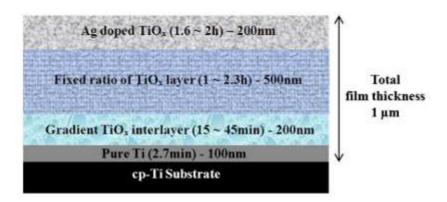


Figura 2.26- Pattern di deposizione, con indicazione dei tempi di rivestimento e spessore ottenuto. [F49]

In uno studio di Huang et al. è stata effettuata la deposizione di un coating a base di TaN-Ag su substrati di titanio, adoperando target di Ta e Ag. L'argento (presente in percentuale fino a 21.4 %) è stato introdotto nel rivestimento del TaN in forma di nanoparticelle di diametri compresi fra 15 e 53 nm. Una efficace azione antibatterica è stata dimostrata contro *S. Aureus* (il composto con più alto contenuto di argento mostra l'effetto antibatterico più significativo, visibile in *figura 2.27*) accanto ad una buona biocompatibilità per i fibroblasti [116].

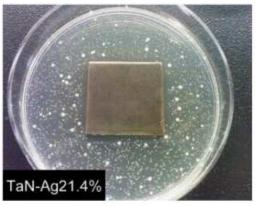


Figura 2.27- Viability test, il quale mostra una ridotta crescita di CFU rispetto agli altri campioni. [F50]

La tecnica dello sputtering, è stata impiegata anche per la deposizione di pellicole sottili (lo spessore è pari a circa 600 nm) di idrossiapatite (HAp) ed idrossiapatite drogata con argento (Ag-HAp, con percentuali di Ag pari a 0.5 e 1.5 wt %) su substrati di titanio, precedentemente acidati al plasma, come mostrato nella *figura 2.28*. In tale studio, opera di Trujillo et al., è stata osservata un'aderenza ottimale del rivestimento, provata dal tape test, mentre si nota un certo dissolvimento in PBS (la riduzione di Ag si attesta a 0.15-0.25 wt % dopo 4 settimane in PBS). La quantità di argento contenuta nel coating, riduce l'adesione sia di *S. Epidermidis* (Gram-positivo) che di *P. Aeruginosa* (Gram-negativo), ma l'effetto ne risulta diminuito dopo 48 h, probabilmente per la delaminazione parziale del rivestimento nel terreno di coltura [117].

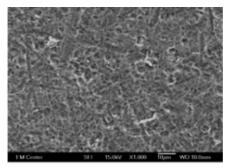


Figura 2.28- Foto al FESEM del rivestimento risultante. [F51]

Inoltre, in uno studio di Ferraris et al., è stato applicato su acciaio 304L tramite cosputtering a radiofrequenza un rivestimento composto da matrice in silice con nanoparticelle di argento al suo interno. I coating, che hanno subìto trattamenti termici a 150°, 300°, 375°, 450°, mostrando proprietà antibatteriche anche a seguito del riscaldamento a temperatura più alta: le superfici cosi elaborate hanno dimostrato di essere sufficienti ad eliminare batteri, presenti sulla superficie. Nel caso più estremo si rileva la migliore adesione del rivestimento al substrato, sia in condizioni asciutte che umide. La maggior parte dell'argento (> 90%) è rimasta all'interno del rivestimento, come si nota dalla *figura 2.29*, anche a seguito dell'esposizione della superficie all'acido acetico anche dopo 10 giorni di esposizione a 40°C; similmente si ottiene dopo l'esposizione ripetuta a 100°C [118]. Il medesimo rivestimento è stato inoltre applicato su diversi substrati ulteriori, quali silice, vetro e polimeri, oltre ad acciaio e titanio, in uno studio di Balagna et al., confermando le ottime proprietà antibatteriche [111].

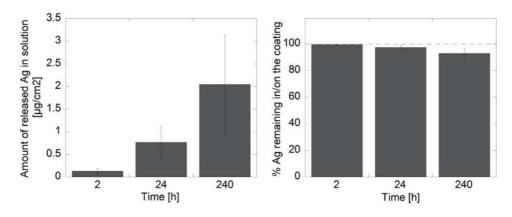


Figura 2.29 - Rilascio di argento in soluzione (sinistra) e percentuale di argento rimanente sul rivestimento (destra) da substrati in acciaio AISI 304L, dopo immersione in acido acetico a $40 \circ C$ per 2, $24 \circ 240 \circ C$ [F52]

Rivestimenti a base di ZrO₂ e di ZrO₂ drogata con argento o rame sono stati depositati su substrati di titanio, per mezzo di magnetron sputtering. In uno studio di Huang et al., l'argento ed il rame sono stati depositati sotto forma di nanoparticelle sulla superficie. La zirconia sputterata si trova nella forma monoclinica con il rame, mentre diventa tetragonale, dopo l'aggiunta dell'argento. A seguito di ciò si riscontra un aumento dell'idrofobia della superficie (α è pari 95 °, rispetto al 80° di ZrO₂): questo fenomeno è stato collegato con l'attività antibatterica, comprovata per entrambi i metalli contro *S. Aureus* e *A. Actinomycetemcomitans*, con un effetto più pronunciato per l'argento (a circa 70% di riduzione batterica per ZrO₂ drogata con Cu e 97% di riduzione per quella drogata con Ag su entrambi i ceppi). Dalla *figura 2.30* si può notare l'efficacia del rivestimento, misurata attraverso il metodo di colorazione a fluorescenza: l'intensità di fluorescenza si rivela più bassa per la superficie di ZrO₂-Ag, che comporta un minor numero di batteri aderenti. Tale rivestimento ha mostrato l'effetto antibatterico a breve termine più

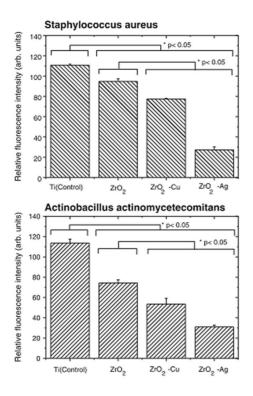


Figura 2.30- Intensità di fluorescenza relative dei batteri aderenti sulle superfici. [F53]

significativo contro *S. Aureus*. È stata comunque rilevata una moderata riduzione dell'adesione batterica anche per i coating di zirconia puri, rispetto al titanio nudo [119]. Infine, in uno studio di Kim et al., si propone un efficiente metodo efficiente per la fabbricazione di uno strato di argento nanostrutturato e stabilizzato su superfici di titanio. Esso si basa su due fasi: la prima coinvolge lo sputtering al plasma indotto sul target e la seconda effettua lo sputtering dell'argento, sulla superficie nanostrutturata precedentemente ottenuta, come mostrato nella seguente *figura 2.28*. L'adesione si rivela

ottima e l'attività antibatterica verso *Escherichia Coli* e *Staphylococcus Aureus* molto efficace a 12 ore dalla coltura. Non è presente una grave citotossicità per le cellule dei fibroblasti fino a 10 giorni [120].

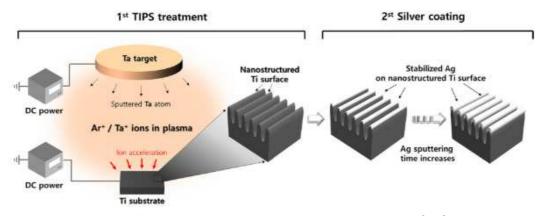


Figura 2.31- Illustrazione schematica del processo adottato a due step. [F54]

2.2.1.7 Plasma spray

La deposizione tramite plasma spray è stata sviluppata come tecnologia atta alla realizzazione di rivestimenti. Nella *figura 2.32* è mostrato uno schema del processo.

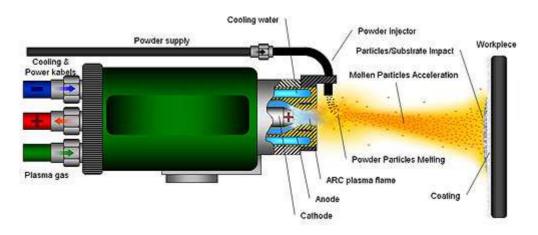


Figura 2.32-Schema di un processo al plasma spray. [F55]

Il materiale da depositare tipicamente è impiegato sotto forma di polvere, ma a volte anche come liquido o sospensione; esso è introdotto nel getto del plasma, emanato da una torcia. Nel getto, nel quale la temperatura raggiunge i 10000 K, il materiale è fuso, in quanto tra il nucleo e la parete dell'ugello circostante esistono gradienti di temperatura. Il materiale fuso è spinto verso il substrato da rivestire. Le goccioline fuse toccando il substrato (a temperatura inferiore) si appiattiscono, solidificano rapidamente e formano un deposito; solitamente esso rimane aderente al substrato, sotto forma di rivestimento. La posizione e l'angolo di iniezione dipendono dal design della torcia del plasma, così come le proprietà del materiale. Vi sono un gran numero di parametri tecnologici che influenzano l'interazione delle particelle con il getto di plasma e il substrato e quindi le proprietà finali del rivestimento. Questi parametri includono il tipo di materiale da depositare, la sua granulometria, la composizione del gas del plasma, la portata, l'input di energia e la distanza percorsa [121].

A causa della granulometria variabile, mediante plasma spray si ottengono anche rivestimenti porosi. I rivestimenti ottenuti con questa tecnica sono densi (10-40%) e

rugosi; presentano un range tipico di Rt^{17} pari a 80-180 μ m, su substrati di titanio. Gli spessori sono solitamente superiori ai 50 micron [122].

I sistemi di plasma spray possono essere categorizzati secondo vari criteri, illustrati nella tabella 2.4.

Tabella 2.3-Tabella che illustra alcune discriminanti del processo di plasma spray. [T7]

	Criteri di distinzione per sistemi di plasma spray							
1	1 GENERAZIONE DEL Corrente continua (DC)		Corrente a radio frequenza (RF)	/				
		L'energia è trasferita attraverso una corrente diretta o un arco elettrico ad elevata potenza.	L'energia è trasferita per induzione, dovuta ad un avvolgimento, nel quale scorre corrente alternata.					
2	MEZZO DI FORMAZIONE DEL PLASMA	Plasma stabilizzato con gas (GSP)	Plasma stabilizzato con acqua (WSP)	Plasma ibrido				
		Il plasma è formato da un gas, come argon, idrogeno, elio or dei mix.	Il plasma si forma dall'acqua, attraverso evaporazione dissociazione o ionizzazione. Possono essere usati altri liquidi.	Il plasma è generato da una combinazione di gas e liquidi (tipicamente argon e acqua).				
3	AMBIENTE IN CUI AVVIENE LO SPRAY	Atmospheric Plasma Spraying (APS)	Controlled Atmosphere Plasma Spraying (CAPS)	Variazioni del CAPS				
		È effettuato in aria.	È effettuato in una camera chiusa oppure riempita con gas inerte.	Sono ad esempio: high-pressure plasma spraying (HPPS), low- pressure plasma spraying (LPPS), vacuum plasma spraying (VPS).				

Tramite la tecnica del plasma spray sono stati ottenuti rivestimenti su substrati di titanio [123]. All'interno di uno studio di Li et al., L'argento metallico e l'ossido d'argento, dovuto all'ossidazione sviluppata nel processo di deposizione dell'aria, erano omogeneamente distribuiti sulla superficie. L'introduzione dell'argento, visibile nella *figura 2.33*, non ha alterato la bagnabilità o la biocompatibilità del rivestimento di TiO₂.

_

¹⁷ Rt indica l'altezza massima del profilo superficiale.

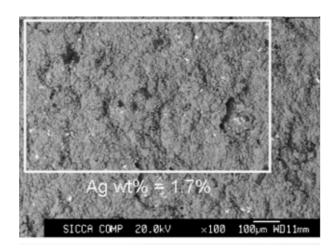


Figura 2.33- Contenuto e distribuzione dell'argento sulla superficie rivestita. [F56]

Il rilascio dell'Ag in acqua è risultato massimo dopo 24 h (pari a circa 0.11 μg/ml*cm²) ed è lentamente continuato per 28 giorni. È stata perciò osservata stata osservata un'azione antibatterica efficiente contro *E. Coli* [123].

È stato poi applicato, in uno studio di Chen et al., un rivestimento in titanio tramite Vacuum Plasma Spray (VPS)¹⁸ su substrati in Ti-6Al-4V; in seguito il materiale è stato trattato in NaOH ed in una soluzione di calcificazione contenente Ca, PO₄, Na ed Ag, al fine di ottenere uno strato di idrossiapatite arricchito con argento sulla superficie (contenuto d'argento da 1.50 a 5.15 wt %). L'attività antibatterica dei rivestimenti è stata verificata contro *E. Coli, P. Aeruginosa* e *S. Aureus* (la riduzione batterica superiore a 95% è stata registrata per tutti i rivestimenti contro i batteri esaminati, come visibile in *figura* 2.34) [124].

	Antibacterial ratio (%)			
	CA	CA1	CA2	CA3
Escherichia coli	0	98.00	99.00	100
Pseudomonas aeruginosa	0	94.40	99.00	100
Staphylococcus aureus	0	63.30	95.32	100

Figura 2.34- Tassi di riduzione batterica. [F57]

Infine, diversi rivestimenti, quali HAp, Ag₂O-HAp, SrO-HAp e Ag₂O-HAp-SrO, sono stati depositati su titanio commercialmente puro con tecnica plasma spray a radio-frequenza;

¹⁸ Tramite VPS, è possibile creare strati porosi con elevata riproducibilità, al fine di migliorare le proprietà quali resistenza all' attrito, resistenza termica, conduttività elettrica di superficie, untuosità, resistenza coesiva delle pellicole.

è stata ottenuta una buona adesione, visibile nella *figura 2.35*, a fronte dei 16 MPa richiesti per l'idrossiapatite da normativa ASTM standard C633.

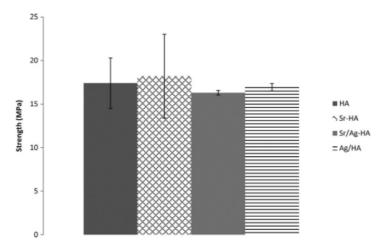


Figura 2.35- Forza di adesione dei campioni. [F58]

Un tasso di rilascio simile di Ag in PBS è stato osservato per i rivestimenti di SrO-HAp, dopo 7 giorni di immersione (a circa 0.8 ppm a 24 h e 2 ppm dopo 7 giorni). Mentre alcuni segni di citotossicità sono stati notati per Ag-HAp, buona biocompatibilità per gli osteoblasti è stato invece osservata per Ag-Sr-HAp. Sembra infatti che lo stronzio sia in grado di ridurre e bilanciare l'effetto tossico dell'argento sulle cellule. Entrambi i rivestimenti si rivelano antibatterici contro il *P. Aeruginosa* (riduzione quasi completa dopo 24 h) [125].

2.2.1.8 Tabella riassuntiva

Viene di seguito riportata la *tabella 2.4* che riassume tutte le tecniche fino ad ora elencate.

Tabella 2.2- Tabella che riassume le tecniche, con relative applicazioni, sino ad ora citate. [T8]

CAPITOLO DI RIF.	TECNICA	STATO CHIMICO AG	RILASCIO	BATTERI	BIOCOMPATIBILITA'	RIF.
2.2.1.1	Deposizione assistita da fasci ionici (IBAD)	Nanoparticelle	< 10 ppb cm² in 70 giorni	Riduzione di S. Aureus, E. Coli, con 3 wt% e 6.5 wt% di Ag.	In presenza di osteoblasti, si ha solo con il 3 wt% di Ag.	[85] [86]
2.2.1.2	Ossidazione elettrolitica al plasma (PEO)	Nanoparticelle	Non riportato	Efficacia totale su <i>S. Aureus,</i> dopo 24h.	Non riportato	[89] [90] [91]
2.2.1.2	Anodic Spark Deposition (ASD)	Nanoparticelle	In PBS picco dopo 24 h, e poi si mantiene costante per 15 giorni (0.4 ng * g ⁻¹ * mm ⁻²).	Dopo 18 h, nessun batterio di <i>S.</i> <i>Epidermidis è</i> sopravvissuto.	Non riportato	[88]
2.2.1.2	Elettroforesi	Nanoparticelle TiO2-Ag	Non riportato	Non riportato	Non riportato	[93]
2.2.1.2	Processo elettrolitico al plasma (PEP)	HAp arricchita di Ag	Non riportato	Effetto batteriostatico elevato con <i>E.</i> <i>Coli,</i> dopo 24 h.	Non riportato	[94]
2.2.1.2	Micro-Arc Oxidation (MAO) e magnetron sputtering	Nanoparticelle	Non riportato	Totale uccisione dopo 24 h dei batteri di <i>E.</i> <i>Coli</i> .	Non riportato	[95]
2.2.1.3	Scambio ionico	Nanoparticelle /ioni	300–510 ppb in soluzione salina, 320– 440 pp. in PBS e 64000– 82000 ppb in FBS, dopo 24 h per titanato di sodio con Ag	Valori di riduzione batterica R pari a 6.7 contro S. a Aureus, Meticillin Resistant Staphylococcu s Aureus (MRSA).	Non riportato	[96] [97]
2.2.1.3	Scambio ionico e plasma spray in aria (APS)	Nanoparticelle /ioni	Oltre i 4 µg/mm² in SBF	Riduzione di <i>S.</i> <i>Aureus</i> del 97.3%.	Confermata, in presenza di fibroblasti.	[98]
2.2.1.4	Sol-Gel	Nanoparticelle /ioni	Massimo dopo 1 h (0.4 ppm) in acqua per nanoparticel le di Ag in coating di TiO ₂	Riduzione del 76% di <i>E. Coli</i> dopo 6 h; <i>S.</i> <i>Aureus</i> .	Non riportato	[105] [106] [107] [108]

2.2.1.5	Physical Vapor Deposition	Nanoparticelle	0.5-2.3 ppb in PBS	Riduzione di adesione del 64% di K. Pneumoniae del 52% di S. Epidermidis.	Riduzione dell'attività di osteoblasti e cellule epiteliali, confermando l'assenza di citotossicità.	[109]
2.2.1.6	Magnetron co-sputtering	Nanoparticelle	Saliva artificiale, PBS (massimo dopo 24 h)	Diminuzione di CFU di E. Coli e S. Aureus, dopo 3h e 24h.	Confermata, in presenza di fibroblasti.	[114] [115]
2.2.1.6	RF co- sputtering	Nanoparticelle in matrice di silice	Acido acetico (massimo dopo 240 h), latte artificiale (picco pari a 0.27 µg/cm²)	S. Aureus forma un alone di 5 mm, attestando azione antibatterica.	Non riportato	[118] [111]
2.2.1.6	Ion Beam sputtering	Nanoparticelle e HAp	Non riportato	Riduzione della crescita di P. Aeruginosa, S. Epidermidis	Non riportato	[117]
2.2.1.6	Magnetron sputtering pulsato	Nanoparticelle + ZrO2	Non riportato	Riduzione dell'adesione di S. Aureus, A. Actinomycete mcomitans	Non riportato	[119]
2.2.1.6	Magnetron sputtering in due step	Nanoparticelle stabilizzate	Non riportato	Riduzione di specie di E. Coli, P. Aeruginosa, S. Aureus	Confermata fino a 10 giorni per fibroblasti.	[120]
2.2.1.7	Air Plasma spray	Ag metallico ed in forma di ossido	In SBF per 28 giorni (massimo dopo 24 h, 0.11 µg/ (ml * cm²))	Riduzione del 100%, dopo 24 h, di <i>E. Coli</i> .	Confermata, in presenza di osteoblasti	[123]
2.2.1.7	Vacuum Plasma spray	Ag metallico	In SBF per 28 giorni (massimo dopo 24 h, 0.4 ppm)	Riduzione contro E. Coli, P. Aeruginosa e S. Aureus >90%	Non riportato	[124]
2.2.1.7	Vacuum Plasma spray	AgO/SrO con HAp	In PBS fino a 7 giorni (2 ppm)	Elevata efficacia contro P. Aeruginosa.	Qualche effetto citotossico su osteoblasti.	[125]

Capitolo 3. Caratterizzazione di superfici antibatteriche ed antiadesive

3.1 Tecniche di caratterizzazione fisico-chimica

Vi sono molte tecniche differenti che possono essere adoperate per la caratterizzazione fisico-chimica delle superfici antibatteriche, con l'applicazione di rivestimenti; le più comunemente usate sono presentate nella tabella sottostante. Esse consentono una caratterizzazione superficiale sufficientemente completa [126] dal punto di vista della morfologia, della rugosità, dell'interazione con i mezzi fluidi, della composizione chimica e della resistenza meccanica. Tali caratterizzazioni sono fondamentali per una completa descrizione delle superfici in oggetto e sono alla base della comprensione dei meccanismi di interazione delle superfici con cellule e batteri.

Tabella 3.1-Tabella che riassume le caratteristiche delle tecniche di analisi superficiale, con relativa utilità in ambito antibatterico. [T9]

TECNICA	CARATTERISTICHE UTILITA' NELLA CARATTERIZZAZIONE DI SUPERFICI ANTIBATTERICHE		
Profilometria ottica	Misura della rugosità, attraverso un fascio di luce	Il valore di Ra al di sotto del quale si contrasta la formazione del biofilm batterico è pari a 0.2 μm. Si hanno effetti maggiori di fissazione ossea con valori di Ra compresi tra 200-2000 nm e 2 μm: al di sotto della soglia inferiore le cellule aderiscono in vitro, ma nessun mutamento è osservato in vivo.	
Profilometria a contatto	Misura della rugosità, attraverso il contatto con una punta di diamante	Il valore di Ra al di sotto del quale si contrasta la formazione del biofilm batterico è pari a 0.2 μm. Si hanno effetti maggiori di fissazione ossea con valori di Ra compresi tra 200-2000 nm e 2 μm: al di sotto della soglia inferiore le cellule aderiscono in vitro, ma nessun mutamento è osservato in vivo.	
Bagnabilità	Misura dell'angolo di contatto	Superfici idrofobiche (con angolo di contatto superiore a 90°) e con bassa energia superficiale comportano una più elevata colonizzazione batterica.	
Spettroscopia IR	Analisi qualitativa/quantitativa tramite assorbimento a infrarossi	Rilevamento e quantificazione degli analiti presenti sulle superfici antibatteriche.	

Spettroscopia di assorbimento UV/Vis	Analisi qualitativa/quantitativa tramite assorbimento nel visibile	Si effettuano analisi sia quantitative sia, pur con maggior difficoltà, qualitative; si effettuano anche studi cinetici, in caso di biomolecole aggraffate alla superficie.
Spettroscopia Raman e SERS Analisi qualitativa/quantitativa tramite scattering Raman		Tecnica di analisi superficiale non distruttiva, che consente il rilevamento e quantificazione degli analiti presenti sulle superfici antibatteriche.
Spettroscopia XPS	Analisi qualitativa/quantitativa tramite assorbimento a raggi x	Consente di studiare la chimica superficiale dei materiali antibatterici, con o senza trattamenti. È versatile ed adottabile con ogni tipo di substrato.
Spettroscopia EDS	Analisi qualitativa tramite emissione di raggi x	Tecnica non distruttiva e molto veloce, consente di studiare materiali stabili in condizioni di bassa pressione e che siano buoni conduttori elettrici. Si rivela ideale quindi per materiali antibatterici a base metallica.
Microscopia a scansione elettronica (SEM)	Analisi morfologica attraverso un fascio di elettroni, riflesso dal campione.	Consente di analizzare morfologicamente i rivestimenti, osservando il campione ad alta risoluzione. È versatile ed adottabile con ogni tipo di substrato (anche quelli non conduttivi, purché opportunamente ricoperti).
Microscopia a trasmissione elettronica (TEM)	Analisi morfologica attraverso un fascio di elettroni, che attraversa il campione.	Consente di analizzare morfologicamente i rivestimenti, purché essi siano sottili. Consente una elevatissima risoluzione.
Microscopia a forza atomica (AFM)	Analisi morfologica attraverso una puntina e la forza atomica tra essa ed il campione.	Consente di ottenere un reale profilo tridimensionale della superficie, senza eccessivi vincoli dettati da lenti e fasci di particelle.
Tape test	Analisi meccanica distruttiva che verifica l'adesione del rivestimento.	Semplice e veloce, permette di verificare in maniera abbastanza obiettiva l'adesione del rivestimento sulla superficie.
Nanoindentazione	Analisi meccanica distruttiva che determina la durezza del rivestimento.	Consente di ricavare oltre alla durezza, anche altre proprietà meccaniche, dando un riscontro dei mutamenti subiti dal substrato a seguito del rivestimento.
Test di rilascio	Analisi in vitro di rilascio di un particolare elemento	Consente di ottenere valori di rilascio attendibili e precisi; è essenziale per determinare un corretto rilascio, che non oltrepassi la soglia di citotossicità
Risonanza plasmonica di superficie localizzata	Analisi superficiale attraverso adsorbimento plasmonico	È adoperata per strutture metalliche di dimensioni nanometriche, in misurazione dell'adsorbimento di materiale su superfici metalliche planari o su superfici di nanoparticelle di metallo.
Diffrazione a raggi X	Analisi chimica per diffrazione	La presenza di nanocluster d'argento metallici e/o di altre fasi cristalline può essere rilevata.

3.2 Tecniche di caratterizzazione antibatterica

L'adesione batterica e la conseguente formazione di biofilm su superfici di impianti e dispositivi biomedici comportano per la maggior parte il fallimento degli stessi. Poichè il trattamento antibiotico sistematico è spesso inefficace, vi è un bisogno urgente di materiali e rivestimenti antimicrobici [16].

Tuttavia, il termine "antibatterico" ha, in letteratura, interpretazioni distinte e può comprendere meccanismi diversi di azione, quali ad esempio il rilascio antimicrobico di particelle (quelle metalliche in quantità controllate sono efficaci) o farmaci, citotossicità per contatto con gli agenti patogeni o mancanza di adesione per i batteri. I biomateriali così dotati richiedono perciò diversi metodi di valutazione in vitro.

Ai test, adoperati per la caratterizzazione delle superfici antibatteriche, citate nel *capitolo* 3.2, si aggiungono una miriade di metodi disponibili in letteratura, usati a discrezione degli autori [127].

Le prove di valutazione standard industriali disponibili (come si può notare in *Tabella 3.2*) sono destinate principalmente a valutare l'efficacia antimicrobica di prodotti non medicali, quali disinfettanti chimici e antisettici per alimenti e elettrodomestici (EN 13697), plastica antibatterica (organizzazione internazionale per la standardizzazione, ISO 22196) o per il settore tessile. Vi è inoltre da aggiungere che le superfici metalliche, specifiche in questa trattazione, non siano soggette a metodiche apposite.

Tabella 3.2- Prove di valutazione standard industriali ed area di applicazione prevista. Gli acronimi indicano: American Association of Textile Chemists and Colorists (AATCC), American Society for Testing and Materials (ASTM), European Standard (EN), International Standard Organisation (ISO), Japanese Industrial Standard (JIS) e Schweizerische Normen Vereinigung (SN). [T10]

STANDARD	AREA DI APPLICAZIONE
AATCC 30 Antifungal Activity Assessment of Textile Materials	Tessuti

AATCC 90	
Antibacterial Activity Assessment of Textile Materials	Tessuti
AATCC 100	T!
Assessment of Antibacterial Finishes on Textile Materials	Tessuti
AATCC 147	Tanaviti
Antibacterial Activity Assessment of Textile Materials	Tessuti
ASTM E2149	
Standard Test Method for Determining the Antimicrobial Activity of	Tessuti
Antimicrobial Agents Under Dynamic Contact Conditions	
ASTM E2180-07	
Standard Test Method for Determining the Activity of incorporated Antimicrobial	Materiali non-porosi
Agent(s) in Polymeric or Hydrophobic Materials	
ASTM E2722	
Standard Test Method for Using Seeded-Agar for the Screening Assessment of	Tessuti
Antimicrobial Activity in Fabric and Air Filter Media	
EN 1104	
Paper and Board Intended to come into Contact with Foodstuffs – Determination	Carta
of the Transfer of Antimicrobial Constituents	
ISO 16869	
Assessment of the Effectiveness of Fungistatic Compounds in Plastic	Plastiche
Formulations	
ISO 20645	Tessuti
Textile Fabrics – Determination of Antibacterial Activity	1033411
ISO 20743	
Textiles – Determination of Antibacterial Activity of Antibacterial Finished	Tessuti
Products	
ISO 22196	Materiali non-porosi
Plastics – Measurement of Antibacterial Activity on Plastics Surfaces	Waterian Hori porosi
JIS L 1902	Tessuti
Testing for Antibacterial Activity and Efficacy on Textile Products	ressuti
JIS Z 2801	Materiali non-porosi
Antimicrobial Products - Test for Antibacterial Activity and Efficacy	aterial flori porosi
SN 195920	Tessuti
Textile Fabrics – Determination of the Antibacterial Activity	. 233411
SN 195924	Tessuti
Textile Fabrics; Determination of the Antibacterial Activity	1 00000

3.2.1 Definizione di antibattericità

Un'azione definita "antimicrobica" è, secondo la norma ISO 20743," l'attività di un elemento antibatterico, adoperata per prevenire o mitigare la crescita di batteri, per ridurne il numero o per uccidere gli stessi". Lo standard industriale giapponese (JIS) definisce "l'antibattericità", all'interno del JIS Z 2801, come "la condizione che inibisce la crescita di agenti patogeni sulla superficie di un prodotto" [127].

Si nota come nel primo caso si accenni sia all'inibizione che all'uccisione batterica, mentre nella seconda definizione ci si concentri solo sull'inibizione del loro sviluppo sulla superficie. Di fatto, però, nessuna distinzione è attuata nei due casi ed entrambe le organizzazioni giudicano l'efficacia dei prodotti antimicrobici in base alla differenza nel valore logaritmico dei conteggi delle cellule vitali tra i prodotti antimicrobici ed i controlli inerti, a seguito dell'incubazione con gli agenti patogeni.

Si fa riferimento in particolare alla seguente formula:

$$A = \log\left(\frac{C_t}{C_0}\right) - \log\left(\frac{T_t}{T_0}\right),$$
 Eq. 1

nella quale C_0 e T_0 sono i valori del controllo e del campione di prova prima dell'incubazione, mentre C_t e T_t costituiscono il numero di batteri ottenuti tipicamente a seguito di 16-24 h in presenza dell'agente patogeno del controllo e del campione di prova rispettivamente. Idealmente, i primi due parametri dovrebbero essere uguali, anche se questo è difficile da raggiungere quando si valutano le superfici non adesive. In condizioni ideali, l'eq. 1 si riduce alla sua forma più nota:

$$A = \log\left(\frac{C_t}{T_t}\right).$$
 Eq. 2

I metodi standard più adoperati basano l'efficacia antimicrobica sul valore ottenuto dall'eq. 2. I parametri di attività antimicrobica possono anche essere valutati sulla base di differenze statisticamente elevate, ma esse appaiono significative solo quando differiscono per più di due unità logaritmiche o, linearmente parlando, più del 99%.

3.2.2 Metodi che si basano sull'alone di inibizione

Nei metodi con alone di inibizione, i campioni sono posizionati con il lato antimicrobico verso il basso su una piastra di agar con una coltura di microrganismi. I possibili agenti antimicrobici, liberati dal campione, si diffondono nell'agar, portando alla formazione di un gradiente di concentrazione fuori dal materiale. Finché la quantità rilevata in agar è superiore alla Concentrazione Minima Inibente (MIC), può essere osservata una zona in cui la crescita batterica è inibita; la larghezza della stessa è misurata e presa a riferimento

come valore di efficacia antimicrobica. Gli aloni di inibizione sono calcolati in direzioni o posizioni diverse, a seconda della geometria del campione.

Tipicamente, è applicato un tempo di incubazione pari a 24-48 h, dopo il quale la larghezza della zona di inibizione è misurata, come valore dipendente dalla quantità di antimicrobico liberato e dalla suscettibilità del ceppo batterico. Il metodo non restituisce un valore netto di attività antimicrobica, ma è stato suggerito come una zona di inibizione con una larghezza minima di 10-15 mm indichi un significato clinico potenziale [128].



Figura 3.1- Schema principalmente adottato dal metodo che si basa sull'alone di inibizione. [F59]

Si hanno diverse varianti del processo precedentemente descritto, tra cui il trasferimento regolare dei campioni ad una piastra di agar appena inoculata per studiare la cinetica di rilascio antimicrobico. Altre metodiche includono l'uso di stampi 3D per valutare la superficie antimicrobica su dispositivi reali o miniaturizzati.

La variante più adoperata è il metodo Kirby-Bauer, altrimenti noto come test di sensibilità antibiotica o test di diffusione su disco in agar. Adottando tale tipo di analisi, una coltura batterica è posta uniformemente su una piastra. Un disco filtrante di carta, impregnato con il composto da testare, viene quindi collocato sulla superficie dell'agar; il composto si diffonde dalla carta filtrante nell'agar. La concentrazione del composto sarà più alta accanto al disco, e diminuirà all'aumentare della distanza. Se il composto è efficace contro i batteri ad una certa concentrazione, nessuna colonia crescerà dove la concentrazione nell'agar è maggiore o uguale alla concentrazione effettiva. Si crea così una zona di inibizione [129].

Venkateswarlu et al. studiano l'azione antibatterica di idrossiapatite con o senza argento depositata su TiO₂, con il metodo sopracitato.

L'agar Mueller-Hilton¹⁹ è stato posto in capsule petri, le quali in seguito sono state inoculate uniformemente con il ceppo batterico *E. Coli*. I campioni sono stati collocati nelle piastre di agar, in presenza di *E. Coli*. ed incubate a 37°C per 24 h. Sono state esaminate le zone di inibizione della crescita batterica, attorno ai campioni [94].

Uno studio di Batebi et al. adotta nuovamente il test di diffusione su dischi con agar, combinandolo in un secondo momento con lo spread-plate test, metodo di sospensione (appartenente cioè al *capitolo 3.3.3*). Il test di diffusione su agar è stato eseguito per testare *E. Coli* su substrati metallici, rivestiti tramite tecnica sol-gel. L'agar MH è stato collocato nelle capsule petri, in modo tale da formare strati spessi 4 mm. I contenitori sono stati in seguito incubati per 24 h a 37°C e successivamente sono stati esaminati per un primo conteggio delle CFU. In seguito, 100 ml di microrganismi sono stati aggiunti, per attivarne la crescita. È stata preparata una sospensione di polveri, che vanno a costituire il campione, in soluzione fisiologica (0.9%) e dimetilsolfossido (15% in volume), mentre i dischi, formati da carta filtro, sono stati immersi nelle sospensioni dei campioni e poi posti a uguale distanza nelle piastre di agar ed incubati per 24 h a 37°C. L'attività antibatterica è stata misurata come zona dell'inibizione (di dimensione millimetrica) intorno ai dischi [105].

Per quantificare la prova antibatterica, le colture durante la notte sono state diluite in soluzione fisiologica. Il 2% in volume di esse è stato usato per inoculare delle provette, contenenti 7 ml di soluzione salina (PBS) a pH modificato (7.4). In seguito, 2 ml di ogni polvere campione sono stati aggiunti alle provette, che poi sono state incubate per 24 h a 37°C in un agitatore. Un campione non inoculato è stato preparato come controllo. Il numero di batteri è stato valutato dopo 6 e 24 h di incubazione. Dopo diluizioni seriali, 100 µl di sospensione sono stati miscelati con 20 ml di agar e versati in una capsula petri sterile. Dopo 24 h di incubazione a 37°C, il numero di *E. Coli* vitali è stato nuovamente conteggiato. La percentuale di riduzione di microrganismi (R) è stata calcolata utilizzando l'eq. 3, come segue:

.

¹⁹ Il Mueller - Hinton agar, composto dai idrolisato acido di caseina, infusione di manzo, amido solubile e agar batteriologico, rappresenta un terreno in grado di soddisfare le più comuni esigenze nutrizionali della maggior parte dei batteri; tuttavia specie più esigenti, quali *Neisseria Gonorrhoeae* e *Streptococcus Pneumoniae*, devono essere coltivati in Mueller - Hinton arricchito con sangue (cotto) e micronutrienti [130].

$$R = \frac{C_0 - C}{C_0} \times 100,$$
 Eq. 3

dove C₀ è il numero medio delle CFU nel controllo e C quello corrispondente di colonie ai campioni con apatite nello stesso periodo di tempo [105].

Ferraris et al. hanno adottato il test KB, con l'agar MH, su *S. Aureus* (ATCC 29213), seguendo lo standard NCCLS M2-A9, per valutare l'attività antibatterica campioni in acciaio inox, rivestiti da un film di silice contenente nanocluster di Ag mediante sputtering. Per valutare la sopravvivenza dei batteri (di concentrazione iniziale pari a circa 10⁸ CFU/ml), sono stati effettuati test di vitalità, incubando i campioni con gli stessi in piastre di agar. I batteri adesi sono stati rimossi dopo 4 h a 37°C e contati (si tratta in questo caso di un test di adesione, di cui si tratterà meglio nel *capitolo* 3.3.5) [14].

Ulteriori studi effettuano analisi di tipo qualitativo e quantitativo (di cui un esempio è mostrato in *figura 3.2*): in una ricerca di Yu et al. l'attività antibatterica contro *E. Coli* è stata determinata dal metodo di inibizione, nel primo caso, e da uno studio sotto raggi UV a bassa intensità per quanto riguarda la seconda metodica [106].

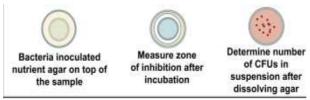


Figura 3.2- Schema indicativo di analisi di tipo qualitativo e quantitativo. [F60]

La zona di inibizione è il metodo più comunemente usato [111]. Può anche essere usato per testare l'uccisione per contatto o la mancanza di adesione, studiando la crescita batterica direttamente sul campione. Diverse prove di valutazione standard industriali si riferiscono all'analisi della zona di inibizione, in cui l'agar inoculato viene versato su una superficie antimicrobica, un impianto o un dispositivo prima della solidificazione, come ad esempio nell'ASTM 2180 [106].

Anche se la coltura in agar costituisce un *gold-standard* nella valutazione antimicrobica, il metodo ha come difetto che non tutti i ceppi batterici sono coltivabili, per cui le zone di inibizione dipendono dal tasso di diffusione degli antimicrobici su agar.

3.2.3 Metodiche di sospensione

In metodi di sospensione come ASTM E2149, un numero noto di microorganismi (in genere *E. Coli* e *K. Pneumoniae*) all'interno di una sospensione è esposto alla presenza di un campione, che rilascia agenti antimicrobici, per periodi di tempo definiti (24 h), a seguito dei quali vengono contate le CFU e confrontate con quelle sul controllo. I campioni sono quindi collocati in provette di vetro coperte, contenenti un volume definito di un mezzo di sospensione microbica. Dopo la crescita, avvenuta durante la notte sotto agitazione, tramite vortex o ultrasuoni, a 37°C, i campioni sono tratti fuori dal terreno, al fine di facilitare il conteggio delle CFU. I risultati del processo appena descritto e mostrato indicativamente in *figura 3.3*, forniscono una misurazione quantitativa dell'attività antimicrobica per i materiali, portando all'uso di ASTM E2149 per il controllo di qualità di routine e test di screening. ASTM E2149 fornisce anche la possibilità di bagnare completamente un substrato e viene spesso utilizzato quando si confrontano le prestazioni tra substrati idrofobici e idrofili.



Figura 3.3- Schema indicativo dei passaggi di un test di sospensione. [F61]

È inoltre possibile attraverso questa tecnica, valutare l'adesione dei microrganismi sulla superficie, a seguito del distacco per incubazione in vortex o ultrasuoni. Lo svantaggio consta tuttavia nel fatto che i microrganismi si trovano in stato planctonico, nel quale sono molto più suscettibili agli antimicrobici rispetto a quelli che si sviluppano all'interno del biofilm. Anche se le misure di densità ottica sono svolte anche per valutare l'attività antimicrobica, la tecnica citata riflette sia i batteri vivi e che quelli morti, senza alcuna distinzione.

Uno studio di Miola et al. effettua tale metodica, testando il ceppo batterico *S. Aureus* su campioni in acciaio e titanio rivestiti con plasma spray e drogati con argento. È stato

preparato un brodo batterico, mettendo in sospensione il ceppo batterico in *blood-agar*²⁰ e lasciandolo incubato per 24 h a 37°C, al fine di ottenere la crescita di colonie. Sciogliendone alcune in una soluzione fisiologica (di cui è stata valutata la torbidità) e ponendo il risultato in piastre di agar, i campioni contenenti argento sono stati collocati all'interno delle capsule ed incubati per 24 h a 35°C. Successivamente, le soluzioni hanno subìto un lavaggio in soluzione fisiologica e un passaggio al vortex a 50 Hz, al fine di quantificare le CFU. La percentuale di riduzione dei batteri è stata calcolata con la formula seguente, simile all'eq. 3:

$$R = \frac{CFU_0 - CFU_{Ag}}{CFU_0} \times 100,$$
 Eq. 4

dove CFU₀ è il numero di colonie contate sulla piastra, contenente la soluzione dei campioni non trattati e CFU_{Ag} è il numero di batteri contati sui campioni drogati con argento; questa formula è stata usata sia per i batteri fatti aderire che per quelli fatti proliferare [98].

In uno studio di Akens et al. un biofilm di *S. Aureus* è stato studiato su superfici metalliche attraverso il metodo di sospensione tradizionale. Le colture del batterio sono state diluite in tryptic soy broth²¹ con 0.25% di glucosio (brodo TSBG), ad una concentrazione di 10⁵ CFU/ml. Esse sono state incubate su un agitatore, con 10 ml di TSBG diluito in piastre a 37°C e 70 rpm per 2 giorni. Alla fine dell'esperimento, ogni piastra è stata sonicata per 10 min in acqua a temperatura ambiente. Una volta diluito il biofilm, è stato messo in incubazione con il materiale per 24 h, a seguito delle quali sono state conteggiate le CFU, ed è stato calcolato il fattore di diluizione [26].

Metodi di sospensione sono anche adottati secondo la modalità descritta in ASTM E2149, per valutare dispositivi antibatterici tramite contatto diretto con gli agenti patogeni. In una tal applicazione, una superficie è disposta in un volume di sospensione sotto agitazione, come accade in uno studio di Secinti et al [108]. L'uccisione batterica per via dell'adesione alla superficie del campione è enumerata tramite le riduzioni del numero di

106

²⁰ Con tale termine si identifica un mezzo di coltivazione microbica, composto da una base proteica, agar, NaCl, con l'aggiunta per il 5% di sangue di mammiferi, tipicamente di pecora.

²¹ Il Tryptic Soy Broth (o TSB) è un terreno di arricchimento liquido, usato per le procedure qualitative dei test di sterilità e per la coltura di microrganismi aerobi non eccessivamente esigenti. In microbiologia clinica, il terreno può essere usato per la sospensione, l'arricchimento e la coltura di ceppi isolati su altri terreni.

batteri vitali in sospensione. Un ampio confronto sperimentale dei metodi orientati alla valutazione dei dispositivi antibatterici di uccisione per contatto diretto ha dimostrato che questo metodo non è adatto per la valutazione di tali superfici, in quanto il trasporto di massa verso la superficie è scarsamente controllato e di solito in ridotte quantità [127].

In uno studio di Bennani et al. batteri di *C. Albicans* sono stati coltivati a 37°C su agar; il conteggio delle CFU è stato condotto in sospensione, dopo la coltura di due giorni in 20 μl di agar. Si è ottenuto un primo valore, con cui confrontare quello finale ricavato su polvere di titanio. Questa, sospesa in 3.6 ml di brodo e con aggiunta dell'agente patogeno, ha subìto agitazione per due giorni a temperatura ambiente. Il tempo di contatto tra il batterio ed il substrato è stato poi ridotto al tempo di sedimentazione (10 minuti). L'adesione è stata valutata attraverso il sale di tetrazolio MTT (1.7 mg/ml in soluzione di fosfato Sabouraud a pH 7.40). L'assorbanza è stata poi misurata attraverso uno spettrofotometro a 570 Nm ed i batteri residui sono stati osservati al microscopio dotato di epifluorescenza [28].

In un articolo, pubblicato da Ewald et al., per l'analisi delle proprietà antimicrobiche dei rivestimenti tramite PVD in titanio/argento, i campioni sono stati esposti a *Staphylococcus Epidermidis* (RP62A, ATCC 35984) e a *Klebsiella Pneumoniae* (3091). I microrganismi sono stati coltivati in brodo LB (1% p/v Triptone, 0.5% p/v estratto di lievito, 0.5% p/v NaCl) a 37°C. I campioni in titanio sono stati collocati in 24 capsule, ricoperte da 1 ml di sospensione batterica in fase di crescita, ed incubate con rotazione per 24 h a 37°C. I microrganismi adesi sono stati disidratati in etanolo per 5 min, mentre i campioni sono stati essiccati all'aria ed incubati per 15 min con 1 ml di colorante verde, diluito in TBS (10 mM Tris-HCl, pH 7.4; 140 mM NaCl). I microorganismi adesi sono stati quantificati valutando la fluorescenza [109].

La tecnica di diffusione su piastra è un metodo di isolamento e di enumerazione dei microrganismi in una coltura mista e distribuita uniformemente. Attraverso tale metodica è più agevole quantificare i batteri in soluzione. La tecnica prevede l'utilizzo di una pipetta che inietta una piccola quantità di batteri sospesi in una soluzione su una piastra, la quale deve essere asciutta e a temperatura ambiente, in modo che l'agar possa assorbire i batteri più facilmente.

Nello specifico si effettua una serie di diluizioni da un campione, per poi spipettare 0.1 ml dalla corrispondente soluzione al centro della superficie di una piastra di agar. Si stende il campione uniformemente, adoperando una bacchetta di vetro sterile e ruotando accuratamente la capsula petri allo stesso tempo, come mostrato in *figura 3.4*. Si incuba la piastra a 37°C per 24 h e si calcolano le CFU presenti sul campione. Si moltiplica quindi per il fattore di diluizione appropriato, per determinare il numero di CFU/ml nel campione originale [131].

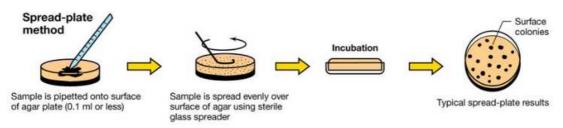


Figura 3.4- Schema di svolgimento dello Spread-Plate Test. [F62]

Adottando il metodo sopra citato, Song et al. studiano l'attività antibatterica contro S. Aureus (SA, ATCC 6538). I campioni metallici, rivestiti tramite magnetron sputtering, sono stati immersi in un brodo ed è stata impostata una concentrazione iniziale microbica pari a 1.0×10^5 (CFU)/ml. Il brodo con i campioni è stato incubato a 37° C per 24 h. A seguito di ciò, è stato diluito con acqua deionizzata di un fattore di 10^5 , ed inoculato su una piastra di coltura con agar. Questa è stata incubata a 37° C per 24 h, e poi il numero di batteri (in CFU) è stato contato e fotografato [115].

Kim et al. indagano l'attività antimicrobica contro *E. Coli* e *S. Aureus*. Le sospensioni batteriche inoculate su ogni campione sono state incubate a 37°C per 12 h. La vitalità di batteri sui campioni è stata esaminata utilizzando un kit di vitalità batterica; la colorazione è stata eseguita utilizzando una miscela contenente pari quantità di SYTO 9 e ioduro di propidio per 15 min nel buio ed osservata dal microscopio a scansione laser. È stata, come nel caso precedente, adottata la tecnica di diffusione su piastra: i campioni sono stati risciacquati con 1 ml di PBS subito dopo l'incubazione e sono stati trasferiti in 3 ml di PBS fresco in provette sterilizzate, poi passate al vortex per un minuto, al fine di staccare tutti i batteri morti dalla superficie. I microrganismi ancora vivi sono soggetti invece a diluizioni ed alla diffusione su una piastra di agar LB, che è stata quindi incubata a

37°C per 12 h. Infine, le singole colonie sono state conteggiate manualmente utilizzando un microscopio ottico [120].

Il plate-counting è stato infine impiegato per analizzare *Escherichia Coli, Pseudomonas Aeruginosa* e *Staphylococcus Aureus*, in uno studio di Chen et al. Un volume di 0.1 ml di ogni ceppo (1 × 10⁶ CFU/ ml) è stato inoculato sulla superficie dei campioni e con essi posti in incubazione per 24 h a 37°C. L'inoculo raccolto è stato diluito in una soluzione salina fisiologica (PBS) a rapporti di volume 10:1, 10:2 e 10:3. Queste serie di diluizione sono state poi depositate su piastre di agar e coltivate a 37°C per un periodo di 48 h. Il numero di colonie formate sull'agar è stato contato e, valutando tre piastre per tipo di campione, si è ottenuto un valore medio. Il rapporto antibatterico K è stato calcolato con la seguente formula, ripresa dalla eq.3:

$$K = \frac{(A-B)}{A} \times 100,$$
 Eq. 5

Dove A è il numero medio della CFU per il campione di controllo, e B è il numero medio di colonie di batteri per il campione soggetto al test. [124]

3.2.4 Metodi che riguardano il rapporto area/volume

I metodi di sospensione sono generalmente effettuati su rapporti tra piccole aree e volumi di fluido, che, in attesa di applicazione clinica, non costituisce sempre uno scenario realistico clinico. Ciò può avere un effetto notevole nella valutazione dei dispositivi antibatterici. È stata quindi sviluppata una varietà di metodi che permettono di lavorare in condizioni di elevato rapporto area/volume.

In JIS Z 2801 o ISO 22196, i rapporti area/volume alti sono istituiti accoppiando una sospensione microbica nel mezzo, pari allo 0.2%, tra una superficie campione e una superficie di copertura, limitando la sospensione attraverso forze capillari a circa 250 µm di spessore. Dopo l'incubazione per 24 h, i batteri sono recuperati mediante sonicazione o lavaggio sia del materiale campione che della copertura, e successivamente coltivati su piastre di agar seguite da enumerazione, come mostrato in *figura 3.5*.



Figura 3.5- Schema del procedimento del test che si basa sul rapporto area/volume. [F63]

Zhang et al. hanno adottato il metodo JIS Z 2801:2000, per constatare in vitro l'attività battericida del rivestimento a base di Ag-TiO2, depositato attraverso processo MAO su titanio. In tale studio, il batterio E. Coli è stato selezionato come batterio di prova, mentre i campioni non trattati sono stati usati come controllo. Tutti i substrati sono stati in ogni caso prima sterilizzati in autoclave a 121 °C per 30 minuti. 100 μl di sospensione batterica, contenente una concentrazione microbica pari a 10⁵, sono stati depositati tramite gocce sulla superficie del campione. Dopo un periodo di incubazione a 37°C per una durata indicata pari a 6 h, 12 h e 24 h, 50 μl soluzione sono stati prelevati ed inoculati su una piastra, contenente agar. Le colonie derivate dallo sviluppo nella seconda capsula, corrispondenti a batteri ancora in vita, sono state contate dopo incubazione per 24 h. Tramite microscopio a fluorescenza, inoltre, è stata indagata la vitalità dei batteri sui campioni esaminati: gli agenti patogeni sono stati rimossi e messi in contatto con la superficie del campione per 15 min al buio, adottando dei coloranti (15 μl di un mix di arancio di acridina e bromuro di etidio). Sotto fluorescenza sono stati rilevati in verde i batteri ancora vivi, mentre quelli morti, con cioè membrane danneggiate, hanno mostrato una tonalità arancione [95].

Un ulteriore studio di Song et al. ha eseguito test di attività antibatterica contro *S. Aureus* (SA, ATCC 6538). Ogni campione è stato inoculato con 100 ml di sospensione batterica e successivamente coperto da un film di polietilene. Dopo il contatto, mantenuto per 3 e 24 h, ogni esemplare è stato diluito con 1 ml di brodo nuovo e sonicato, al fine di staccare i batteri dal campione. Il processo è stato effettuato per tre volte, per poi ottenere valori mediati e deviazioni standard [114].

L'attività antibatterica dei rivestimenti in titanio ed in titanio dopato con argento, prodotti tramite plasma spray da Li et al., è stata esaminata con il metodo del conteggio batterico, adoperando *E. Coli* (ATCC 25922). La soluzione dei batteri con una concentrazione di 10⁶ CFU/ml è stata depositata tramite gocce sui campioni ad una densità di 0.05 ml/cm². Le superfici sono state in seguito ricoperte da un film in polietilene asettico e incubati a 37°C per 24 h. Quindi, la soluzione batterica è stata raccolta e inoculata su un terreno di coltura agar standard a 37°C per 24 h; i batteri attivi sono stati conteggiati [123].

È stato inoltre sviluppato un sistema all-in-one dalla PetrifilmTM (3M, St. Paul, MN, USA), originariamente adoperato nel settore alimentare. Si tratta di un sistema commerciale, pronto all'uso, costituito da un sottile strato di agar, collocato su un foglio trasparente, che deve essere ripiegato su una superficie campione in presenza di un piccolo volume di liquido batterico di quantità pari a 20 – 50 µl (mostrato in figura 3.6). Durante il tempo di incubazione, fino a 48 h a 37°C, si sviluppano le colonie batteriche. Oltre alle sostanze nutrienti, la pellicola è caricata con un colorante blu (cloruro di tetrazolio), per visualizzare le colonie batteriche che possono conseguentemente essere enumerate ed usate per quantificare l'attività antimicrobica. La combinazione dell'agar e del colorante in un metodo all-in-one evita il lavaggio o la sonicazione e comporta uno spreco relativamente scarso. La possibilità di enumerare i batteri implica l'applicabilità di tale metodo, eccetto nei casi in cui si hanno alte concentrazioni o con attività antimicrobica bassa (in tali casi infatti il colorante si spande su tutta la superficie del campione). Questo svantaggio può essere evitato per alte concentrazioni, diluendo la sospensione batterica da cui sono prese le particelle per l'inoculazione. Il piccolo volume, imposto dal metodo, comporta il contatto diretto dei batteri con il campione, rendendo il test non solo adatto a materiali che rilasciano antimicrobici, ma anche negli altri due casi. È stato consigliato che, quando un tale metodo viene adoperato per la valutazione tramite uccisione per contatto diretto, ci si accerti, adottando ad esempio un metodo a base di alone di inibizione, che non vi siano componenti antimicrobici fuori del campione, in quanto ciò potrebbe facilmente interferire con i meccanismi di antibattericità [127].

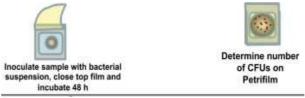


Figura 3.6 - Schematizzazione del sistema all-in-one, sviluppato dalla Petrifilm™. [F64]

In una modifica di JIS Z 2801, un filtro inoculato battericamente è posto su una superficie di uccisione per contatto sulla quale è posizionata una gocciolina da 20 µl contenente 1% di TSB; a seguito di ciò il procedimento è simile al test JIS Z 2801. Questa cosiddetta "stampa" di batteri su un campione, adottata per stabilire un contatto diretto con la superficie, è stata anche prescritta nella ISO 20743, dove una forza standard di 4 N viene applicata per premere il filtro sulla superficie campione. Il metodo modificato di JIS tuttavia, ha mostrato circostanze più favorevoli per lo sviluppo batterico nell'ambiente riparato del filtro. Tale processo è mostrato schematicamente nella *figura 3.7*.

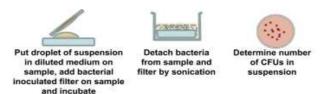


Figura 3.7 - Fasi del metodo JIS Z 2801 modificato. [F65]

Tale metodica è stata adottata ad esempio in uno studio di Necula et al. per valutare l'attività battericida di campioni in titanio, rivestiti con TiO2-Ag tramite tecnica PEO, contro MRSA. Tutti i campioni sono stati sterilizzati in etanolo, sciacquati con acqua deionizzata e conservati sotto luce ultravioletta per 15 minuti, prima dell'inoculazione dei batteri. La coltura del ceppo batterico è stata preparata, aggiungendo 1-5 colonie da una piastra in 5 ml di TSB. La sospensione è stata quindi messa in incubazione a 37°C ed in rotazione per circa 2 h; successivamente è stata diluita con TSB ad una densità ottica di 0.03, valore corrispondente a 10⁷ CFU/ml. I dischi filtranti in nitrocellulosa, di diametro pari a 18 mm (cioè, leggermente inferiore a quello dei campioni di titanio) sono stati collocati su una piastra di blood-agar. Una quantità pari a 20 µl di coltura batterica diluita, contenenti 2*10⁵ CFU, è stato pipettata sui filtri. Il mezzo è stato assorbito dall'agar mentre i batteri di MRSA sono stati conservati sul filtro, come visibile dallo schema in figura 3.8. In seguito, una quantità pari a 20 μl di TSB 1% in 10 mM di fosfato, è stata pipettata centralmente sulla superficie di ogni campione di titanio e un disco filtrante è stato posto accuratamente in cima, favorendo il contatto con i batteri; tutti i pezzi sono stati collocati singolarmente in capsule petri ed incubati a 37°C per 24 h in atmosfera umida.

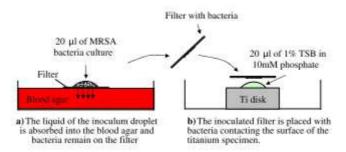


Figura 3.3.2- Schemi indicativi di due passaggi essenziali nel metodo modificato JIS Z 2801: se il diametro del filtro è inferiore a quello del disco, tutti i batteri verranno in contatto con la superficie. [F66]

Dopo l'incubazione, ogni disco di titanio, con il filtro corrispondente, è stato disposto in 5 ml di TSB, sonicato per 30 s e passato al vortex per 1 minuto. Sono state effettuate sette diluizioni seriali, a seguito delle quali 10 μl di sospensione non diluita e le quantità derivate dalle stesse sono state pipettate in piastre contenenti *blood-agar*. Sono state quindi incubate a 37°C ed il numero di CFU risultanti è stato contato il giorno seguente. Questi passaggi sono stati svolti in triplicato [90].

Il test giapponese standard industriale modificato (JIS Z 2801) è stato anche eseguito, come test antibatterico, da Inoue et al. Per approssimare un ambiente di infezione simile ad un organismo effettivo, del siero bovino inattivato (0.4 ml) è stato utilizzato come solvente di sospensione batterica per il batterio MRSA. Una sospensione batterica (0.4 ml) è stata depositata su un campione di dimensioni pari a 50 x50x2 mm, coperto con un film di polietilene (40x40 mm), e messa in coltura a 37°C per 24 h. Il campione è stato poi lavato ed il conteggio delle CFU è stato effettuato. Il test antibatterico è stato eseguito tre volte per ciascuno dei campioni, per ottenere valori medi dei conteggi. Il valore dell'attività antibatterica (R) è stato quindi calcolato, secondo la formula riportata in eq.6, che rimanda alla eq.2:

$$R = \log\left(\frac{B}{A}\right) - \log\left(\frac{C}{A}\right) = \log\left(\frac{B}{C}\right),$$
 Eq. 6

dove A, B e C sono le medie di MRSA subito dopo l'inoculazione, dopo 24 h per un campione non rivestito (usato come controllo) e dopo 24 h per uno rivestito [96].

Per valutare i dispositivi di uccisione per contatto verso aerosol batterici, è stata proposta la spruzzatura, di cui sono mostrati gli step in *figura 3.9*. Questo metodo è stato

particolarmente applicato per valutare superfici, che impediscono l'aumento della contaminazione da parte di patogeni aerobi. Dopo aver spruzzato una sospensione batterica diluita sui campioni, questi vengono successivamente essiccati in aria per 2 min a temperatura ambiente; in seguito le capsule con agar, di dimensioni della superficie spruzzata, sono poste a contatto con i campioni e coperte con parafilm per evitarne l'essiccazione durante l'incubazione notturna. Le colonie batteriche sviluppate sulle superfici del campione nell'agar sono contate tramite controllo visivo, senza alcuna ulteriore elaborazione dei campioni [127].

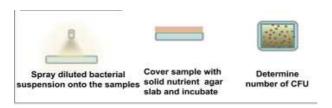


Figura 3.9- Fasi della spruzzatura, adoperata in caso di uccisione per contatto. [F67]

In un ampio confronto, per valutare i metodi di uccisione per contatto contro ceppi batterici Gram-positivi e Gram-negativi, è stato concluso che i metodi all-in-one ed il JIS Z 2801 sono più adatti a questo scopo, purché siano integrati con un test basato sull'alone di inibizione [127].

3.2.5 Metodi basati sull'adesione

L'adesione dei batteri ad una superficie è uno dei primi step nella formazione di biofilm. I metodi per studiare l'adesività batterica iniziale coinvolgono solitamente l'adesione dei batteri da una sospensione fluida statica o fluente. Nei sistemi statici, il trasporto di massa di microrganismi in presenza di superfici avviene per lo più attraverso la sedimentazione, mentre nei sistemi di perfusione la diffusione contribuisce al trasporto di massa. Poiché l'aderenza implica un contatto intimo tra i batteri ed i substrati, l'adesione alla base di tali metodi è adatta per valutare i casi di uccisione per contatto.

Le analisi statiche di adesione, di cui sono visibili le fasi in *figura 3.10*, sono relativamente facili da effettuare. In alcuni test, sui campioni è depositata una gocciolina di una

sospensione batterica attraverso la quale i batteri sedimentano sulla superficie, in condizioni di agitazione lieve. Dopo un periodo di tempo specifico in cui si verifica l'adesione batterica, ad esempio 1-4 h, viene valutato il numero di agenti patogeni aderenti vivi, dapprima lavando accuratamente tutti i microrganismi non adesi, e quindi raccogliendo quelli adesi per sonicazione. Successivamente si contano le CFU. Usando una colorazione live/dead dei batteri adesi, il rapporto dei batteri uccisi può essere determinato tramite microscopia di fluorescenza [116].

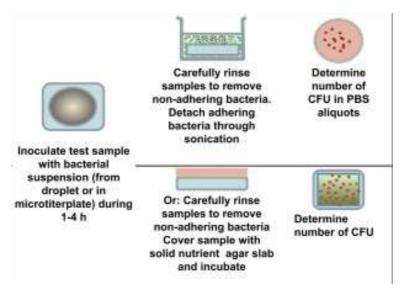


Figura 3.10- Step di diverse metodiche con cui si eseguono test di adesione. [F68]

In uno studio di Rodriguez-Hernandez, gli autori indagano l'adesione del ceppo batterico *S. Sanguinis* a superfici rugose in titanio. L'adesione microbica ai solventi (MATS), adottata in tale caso, è un metodo semplificato per caratterizzare le proprietà di donatore/accettore di elettroni di cellule microbiche, che a sua volta è un buon parametro usato per predire l'adesione batterica a superfici solide in un ambiente acquoso. I batteri, dopo essere stati raccolti durante la fase di crescita, sono stati centrifugati a 4000 rpm per 15 min a 4°C, lavati con PBS 19 e infine risospesi nuovamente in PBS 19. Sono stati adoperati tre diversi solventi: cloroformio, esano ed etere dietilico. 3 ml di sospensione batterica sono stati collocati in nove tubi di vetro e sono stati aggiunti 400 µl del corrispondente solvente. Dopo 10 min di incubazione a temperatura ambiente, i campioni sono stati passati al vortex per un minuto e lasciati a riposo per 15 min. La fase acquosa allora è stata rimossa e la relativa densità ottica (A₁) è stata misurata. L'adesione media ai solventi è stata calcolata, secondo la seguente formula:

$$(1 - A_1/A_0) \times 100,$$
 Eq. 7

dove A₀ è la densità ottica della PBS. I dischi in titanio sono stati introdotti in provette contenenti 1 ml di coltura batterica (concentrazione pari a circa 10⁹ CFU/ml) ed incubate per 2 h a 37°C. Per quantificare le CFU, i campioni sono stati lavati due volte, introdotti in nuove piastre con 1 ml di soluzione. Dopo l'applicazione del vortex per 5 min, sono stati effettuati i conteggi [29].

In una ulteriore ricerca, Trujillo et al. effettuano test antibatterici contro ceppi Grampositivi, quali S. Epidermidis (SE RP62A), e gram-negativi, come P. Aeruginosa (PA 01). Le colture di entrambi sono state effettuate ad una concentrazione di 5×10^4 cellule/ml in TSB, in piastre in seguito incubate a 37°C a 125 rpm. I batteri sono stati fatti aderire ai substrati immersi per 8, 24, 32, e 48 h. Ad ogni tempo sperimentale i campioni sono stati rimossi, lavati due volte con PBS e disposti in una nuova piastra, contenente 1.5 ml di PBS. I campioni sono stati soggetti a sonicazione, adoperando un ago sonicatore per 10 s su entrambi i lati, tre volte per campione. La soluzione è stata poi diluita e macchiata con STYO 9 e ioduro di propidio ²², e filtrata attraverso una membrana in policarbonato nero di 0.2 µm di diametro. Attraverso un microscopio è stato possibile contare le cellule sulla membrana (il conto microscopico è stato effettuato tramite il software ImageJ); tramite una miscela appropriata di SYTO 9 e ioduro di propidio, batteri viventi, con membrane cellulari intatte, presentavano macchia fluorescente verde, mentre quelli morti possedevano una macchia rossa. Inoltre, per ogni substrato sono stati effettuati i conteggi delle CFU, da cui è stata tratta la media. I fattori di diluizione per ciascun campione sono stati basati sul volume finale diviso per il volume delle cellule batteriche [117].

In alternativa, dopo un attento lavaggio dei batteri non adesi, il campione può essere ricoperto da una lastra di agar nutriente e poi incubato. Nessuna procedura per rimuovere i batteri è necessaria in questo caso, e singoli batteri vitali che aderiscono alla superficie crescono in colonie, per cui possono essere facilmente contati. Lo svantaggio delle analisi statiche è che l'enumerazione richiede il lavaggio di batteri non aderenti, il che implica che la rimozione della fase del fluido al di sopra del substrato dovrebbe essere svolta molto attentamente, al fine di prevenire la rimozione accidentale di batteri adesi.

²² È un colorante, che modifica il tono di tutti i batteri della popolazione, mentre lo ioduro di propidio può solo penetrare i batteri che hanno le membrane danneggiate.

Ciò accade in uno studio di Huang et al. Dopo aver impiegato un metodo di colorazione a fluorescenza su una sospensione di 500 µl di *S. Aureus*, aggiunta alla superficie dei campioni rivestiti tramite sputtering di ZrO₂-Ag e ZrO₂-Cu, per quantificare l'adesione batterica alle superfici, gli autori hanno valutato i tassi di sopravvivenza batterica sui materiali. Ciò è stato effettuato attraverso prove di vitalità batterica sulle piastre di agar. I campioni sono stati disposti su piastre sterili, e poi sovrapposti ed immersi in 8 ml di agar LB (composto da 5 g di brodo LB, 1.6 g di agar e 193 ml di acqua deionizzata), contenente *S. Aureus*. Dopo averli asciugati in aria per 30 min a temperatura ambiente, le piastre sono state incubate a 37°C per 16 h e le colonie batteriche visibili sul campione di titanio non rivestito e su quello rivestito sono stati rilevate e contate [119].

Per studiare l'efficacia antibatterica del rivestimento sui campioni, adoperati in uno studio di Gasquères, è stato indagato il ceppo gram positivo di *S. Epidermidis*. I microrganismi sono stati coltivati in brodo a 37°C per 12-16 h (cultura notturna), e diluito a 10⁶ CFU/ml. 1 ml di coltura è stato incubato con *rods* rivestite per 3 h, 12 h e 18 h a 37°C in condizioni statiche. I batteri aderenti sono stati staccati attraverso sonicazione per 10 minuti nella soluzione. Il conto delle CFU è stato effettuato, a seguito di diluizioni seriali su piastre di agar, incubate a 37°C. Sono state poi calcolate la media e la deviazione standard, al fine di ottenere valori statisticamente validi [88].

L'interfaccia liquido-aria è in grado di esercitare alte forze di distacco sui batteri d'adesione che comportano la loro rimozione. I metodi statici di adesione sono applicati prevalentemente nei test su superfici rilascianti sostanze antimicrobiche o di uccisione per contatto, ma sono meno adatte in casi antiadesivi, per la mancanza di controllo delle condizioni di trasporto di massa e delle forze di flusso. I metodi di perfusione di flusso, di cui sono mostrati due esempi in *figura 3.11*, non solo permettono di controllare il trasporto di massa, ma offrono anche la possibilità di calcolare accuratamente le forze di flusso del fluido sui batteri aderenti e di perfezionarle.

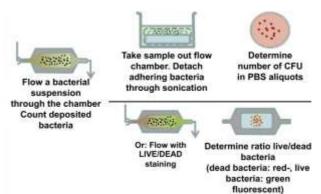


Figura 3.11 - Step indicativi del metodo a perfusione di flusso. [F69]

Esistono diversi modelli di tali sistemi, di cui la camera di flusso parallela è il più comune; le forze di flusso del fluido e il trasporto di massa sono relativamente facili da calcolare, se combinati con l'osservazione in situ dei batteri adesi. I lavaggi possono essere completamente evitati, rendendo il metodo estremamente adatto per valutare dispositivi antimicrobici non adesivi, ai quali i batteri di solito aderiscono molto debolmente. I sistemi di perfusione di flusso sono inoltre altamente adatti nel valutare le superfici di uccisione per contatto, nel cui caso il flusso della sospensione batterica, dopo la fase di adesione, è passato ad un flusso dei mezzi nutrienti, consentendo soltanto ai batteri sopravviventi di svilupparsi e formare un biofilm. Questi vengono rimossi e analizzati per il conteggio delle CFU e la colorazione Live/Dead. Alternativamente, dopo la fase di adesione e dopo aver risciacquato i batteri non aderenti, la camera può essere iniettata con la colorazione Live/Dead, dopo la quale la microscopia a fluorescenza può essere applicata direttamente per ottenere l'efficacia antimicrobica del campione, senza esporre batteri aderenti ad un'interfaccia di liquido-aria. I sistemi di perfusione di flusso sono meno adatti per valutare le superfici che rilasciano antimicrobici, in quanto le sostanze antibatteriche liberate vengono rapidamente lavate fuori dal sistema [127].

3.2.6 Metodi basati sul biofilm

I metodi basati sul biofilm sono in sostanza simili a quelli basati sull'adesione, ma sono effettuati su periodi molto più lunghi di tempo e coinvolgono la presenza di nutrienti. I metodi basati sul biofilm possono contare su molti sistemi diversi, che comprendono tutti i comuni sistemi di perfusione statica e di flusso, i dispositivi modificati Robbins, i reattori

a goccia, tra cui il reattore a profondità costante, reattori a biofilm Rotary e dispositivi microfluidici [132].

Tutti i metodi basati su biofilm devono iniziare con uno step di adesione, prevalentemente effettuato con un basso contenuto di nutrienti in sospensione. Ciò elimina la necessità da parte dei batteri planctonici di aderire ad una superficie. Nel successivo step, la disponibilità di nutrienti può essere facilmente controllata in sistemi di spostamento di flusso, per evitare l'insorgenza di manufatti.

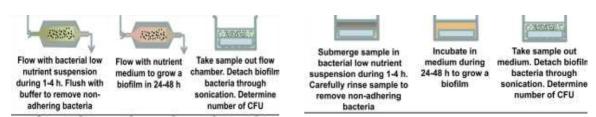


Figura 3.12 - Step di alcune metodologie che si basano sullo sviluppo del biofilm. [F70]

I metodi basati su biofilm, di cui sono mostrati due esempi in *figura 3.12*, raramente producono una completa eradicazione del biofilm, ma il meglio che può essere realizzato è una ridotta quantità di biofilm oppure una crescita ritardata. Nel caso di superfici che liberano antimicrobici, l'inibizione dello sviluppo o l'uccisione dipende fortemente dall'accumulo degli antimicrobici liberati nel biofilm; ciò comporta la necessità di una struttura adeguata del biofilm, che previene il lavaggio degli antimicrobici. Poiché le superfici da uccisione per contatto portano raramente alla necrosi di tutti i batteri adesi, i metodi basati sul biofilm mostreranno comunque la crescita dello stesso su tali superfici [127].

3.2.7 Tabella riassuntiva

Si riassumono le tecniche di caratterizzazione antibatterica, sino ad ora descritte nella seguente *tabella 3.3*.

Tabella 3.3-Riassunto delle tecniche più diffuse nel campo dei test antibatterici. [T11]

CAPITOLO	SUPERFICIE TESTATA	CEPPO BATTERICO	METODOLOGIA	CONCENTRAZIONE INIZIALE BATTERI	TEMPO DI TEST	RIF. NORMATIVO	RIF. BIBLIOGRAFICO
3.2.2	Titanio, rivestito con TiO₂+HAp, con o senza argento	E. Coli	Metodo Kirby-Bauer	Non riportato	24 h a 37°C	Non riportato	[94]
3.2.2	Titanio e acciaio, rivestiti tramite tecnica sol-gel	E. Coli	Metodo Kirby-Bauer, Spread- Plate test	10 ⁴ -10 ⁶ CFU/mI	24 h a 35°C	Non riportato	[105]
3.2.2	Acciaio 316L, rivestito da un film di silice contenente nanocluster di Ag mediante sputtering	S. Aureus	Metodo Kirby-Bauer	10 ⁸ CFU/ml	24 h a 35°C	NCCLS M2-A9	[118]
3.2.2	Titanio, rivestito con Ag-TiO _{2,} con metodo sol-gel	E. Coli	Alone di inibizione e conto delle CFU	10 ⁶ CFU/ml	24 h a 35°C	Non riportato	[106]
3.2.3	Acciaio e titanio, rivestiti con plasma spray e drogati con argento	S. Aureus	Metodo di sospensione, con incubazione in vortex a 50 Hz	5*10 ⁵ CFU/ml	24 h a 37°C	NCCLS M2-A9	[98]
3.2.3	Acciaio e titanio	S. Aureus	Metodo di sospensione tradizionale	10⁵ CFU/ml	48 h a 37°C	Non riportato	[26]
3.2.3	Polvere di titanio	C. Albicans	Metodo di sospensione, con uso di MTT, per valutare l'adesione batterica	Non riportato	48 h a 37°C	Non riportato	[28]
3.2.3	Titanio, rivestito tramite PVD con TiO₂-Ag	S. Epidermidis, Klebsiella Pneumoniae	Test di sospensione e quantificazione tramite fluorescenza	Non riportato	24 h a 37°C	Non riportato	[109]
3.2.3	Acciaio e titanio, rivestiti tramite magnetron sputtering	S. Aureus	Spread-Plate test	10⁵ CFU/ml	24 h a 37°C	Non riportato	[115]
3.2.3	Titanio, trattato con plasma sputtering a due step	E. Coli, S. Aureus	Spread-Plate test, con un kit di vitalità batterica	4*10 ⁵ CFU/ml	12 h a 37°C	Non riportato	[120]
3.2.3	Titanio, trattato con Vacuum Plasma Spray	E. Coli, P. Aeruginosa e S. Aureus	Spread-Plate test	10 ⁶ CFU/ml	2 4h a 37°C	Non riportato	[124]

3.2.4	Titanio rivestito tramite MAO con Ag-TiO2	E. Coli	Rapporto area/volume E microscopia a fluorescenza	10 ⁵ CFU/ml	6 h, 12 h e 24 h a 37°C	JIS Z 2801:2000	[95]
3.2.4	Titanio rivestito tramite magnetron co-sputtering con Ag-TiO ₂	S. Aureus	Rapporto area/volume	Non riportato	3 h, 24 h a T ambiente	Non riportato	[114]
3.2.4	Titanio, rivestito tramite plasma spray con Ag-TiO ₂	E. Coli	Rapporto area/volume e conteggio batterico	10 ⁶ CFU/ml	24 h a 37°C	Non riportato	[123]
3.2.4	Titanio, rivestito tramite tecnica PEO con Ag-TiO ₂	MRSA	Rapporto area/volume, con metodica modificata	2*10 ⁵ CFU/ml	2 h a 37°C	JIS Z 2801 modificata	[90]
3.2.4	Titanio, ricoperto da uno strato poroso di titanato di argento	MRSA	Rapporto area/volume, con metodica modificata	Non riportato	24 h a 37°C	JIS Z 2801 modificata	[96]
3.2.5	Titanio rugoso	S. Sanguinis	Adesione microbica ai solventi (MATS) e conteggio delle CFU	10 ⁹ CFU/ml	2 h a 37°C	Non riportato	[29]
3.2.5	Titanio, rivestito tramite sputtering con uno strato di HAp-Ag	S. Epidermidis, P. Aeruginosa	Test di adesione e microscopia per il conteggio delle CFU	5*10 ⁴ CFU/ml	8 h, 24 h, 32 h, e 48 h a 37°C	Non riportato	[117]
3.2.5	Acciaio e titanio, rivestiti tramite sputtering di ZrO ₂ -Ag e ZrO ₂ -Cu	S. Aureus	Prova di vitalità batterica su piastre di agar	10 ⁶ CFU/ml	16 h a 37°C	Non riportato	[119]
3.2.5	Lega di titanio, rivestita tramite ASD	S. Epidermidis	Test di adesione e, dopo il distacco tramite sonicazione, conto delle CFU	10 ⁶ CFU/ml	3 h, 12 h e 18 h a 37°C	Non riportato	[88]

3.3 Tecniche di caratterizzazione di biocompatibilità

L'impianto di un qualsiasi dispositivo medico nel corpo comporta una procedura chirurgica che introduce una ferita, seguita da un processo di guarigione e un contatto a lungo termine con il tessuto corporeo. Tra le diverse interazioni tra la superficie dell'impianto e il corpo del paziente, l'aspetto più importante è che il materiale deve restare a stretto contatto con il tessuto corporeo, senza causare danni al paziente. Per garantire ciò, deve essere intrapresa una sequenza di test specifici, prima che qualsiasi nuovo dispositivo medico possa essere dichiarato idoneo all'uso umano da parte dell'organizzazione sanitaria interessata. La biocompatibilità consta in questo: si ha una misura di come sicuro e compatibile un dispositivo medico, come un impianto, possa essere con un sistema biologico [133].

Williams diede una definizione completa del concetto, sostenendo come: "la biocompatibilità si riferisce alla capacità di un biomateriale di svolgere la sua funzione desiderata in relazione ad una terapia medica, senza suscitare e indesiderabili effetti locali o sistemici nel ricevente o nel beneficiario di tale terapia, ma generando la risposta benefica o tissutale più appropriata in tale situazione specifica e ottimizzando le prestazioni clinicamente rilevanti di tale terapia." [134].

3.3.1 Normative per la valutazione biologica

L'organizzazione internazionale per la standardizzazione (ISO) ha redatto una serie di standard per la valutazione biologica dei dispositivi medici (ISO 10993). I test di biocompatibilità devono essere conformi alla norma ISO 10993 per la registrazione dei dispositivi medici in Europa, Asia e Stati Uniti. ISO 10993 è costituito da 20 parti, le quali coprono una vasta gamma di procedure di test specifiche, di indagini fisico-chimiche del dispositivo volte ad indagare la sua interazione con le cellule e il corpo. I test richiesti dipenderanno dall'uso specifico del dispositivo medico e dal tempo di contatto con il corpo umano.

Le principali parti della norma ISO 10993 sono riassunte di seguito:

- UNI EN ISO 10993-1:2010 (Valutazione biologica dei dispositivi medici Parte 1: Valutazione e prove all'interno di un processo di gestione del rischio): essa è la versione ufficiale della norma europea EN ISO 10993-1 (ed. ottobre 2009). La norma descrive:
 - I principi generali che regolano la valutazione biologica dei dispositivi medici all'interno di un processo di gestione del rischio;
 - La classificazione generale dei dispositivi basata sulla tipologia e sulla durata del loro contatto con il corpo;
 - L'individuazione di tutti i dati disponibili e delle lacune in essi, impostata sulla base di un'analisi dei rischi;
 - Il ritrovamento di dati aggiuntivi necessari per analizzare la sicurezza biologica dei dispositivi medici;
 - La valutazione della sicurezza biologica dei dispositivi medici.

La norma non comprende le prove di materiali e dispositivi che non vengono direttamente o indirettamente a contatto con il corpo del paziente.

- 2. UNI EN ISO 10993-4:2018 (Valutazione biologica dei dispositivi medici Parte 4: Scelta delle prove relative alla interazione col sangue): specifica i requisiti generali per la valutazione delle interazioni tra i dispositivi medici ed il sangue. Inoltre, descrive:
 - Una classificazione dei dispositivi medici destinati al contatto col sangue,
 basata sull'uso previsto e sulla durata del contatto;
 - I principi generali che regolano la valutazione dell'interazione dei dispositivi col sangue;
 - Le prove in conformità alle categorie specifiche, con i principi e alle basi scientifiche di tali prove.
- 3. UNI EN ISO 10993-6:2017 (Valutazione biologica dei dispositivi medici Parte 6:

 Prove relative agli effetti locali dopo l'impianto): la norma specifica i metodi di
 prova per valutare gli effetti locali dei biomateriali a seguito dell'impianto.
- 4. UNI EN ISO 10993-9:2010 (Valutazione biologica dei dispositivi medici Parte 9: Struttura per l'identificazione e la quantificazione dei prodotti potenziali di degradazione): essa rappresenta la versione ufficiale della norma europea EN ISO

- 10993-9 (ed. dicembre 2009), tenendo però conto delle correzioni introdotte il 28 aprile 2010. La norma specifica i principi generali per la valutazione sistematica della biodegradazione potenziale ed osservata dei dispositivi medici.
- 5. UNI EN ISO 10993-11:2018 (Valutazione biologica dei dispositivi medici Parte 11:

 Prove di tossicità sistemica): specifica i requisiti e fornisce una guida sulle
 procedure da seguire per la valutazione del potenziale di tossicità sistemica dei
 dispositivi medici.
- 6. UNI EN ISO 10993-12:2012 (Valutazione biologica dei dispositivi medici Parte 12: Preparazione dei campioni e materiali di riferimento): la norma precisa i requisiti e fornisce una guida sulle procedure da seguire nella preparazione dei campioni e nella selezione dei materiali di riferimento per i dispositivi medici destinati ad essere sottoposti a valutazione biologica.
- 7. UNI EN ISO 10993-15:2009 (Valutazione biologica dei dispositivi medici Parte 15: Identificazione e quantificazione dei prodotti di degradazione da metalli e leghe): la presente norma è la versione ufficiale della norma europea EN ISO 10993-15 (ed. giugno 2009). La norma fornisce linee guida sui requisiti generali relativi alle prove per l'identificazione e la quantificazione dei prodotti di degradazione da dispositivi medici metallici finiti o campioni di materiali corrispondenti pronti per l'impiego clinico.
- 8. UNI EN ISO 10993-16:2018 (Valutazione biologica dei dispositivi medici Parte 16: Concezione di studi tossicocinetici per i prodotti di degradazione e le sostanze rilasciabili): la norma fornisce i principi con cui è svolta l'esecuzione degli studi tossicocinetici relativi ai dispositivi medici. L'appendice A descrive inoltre le considerazioni per includere gli studi tossicocinetici nella valutazione biologica dei dispositivi medici [135].

In generale, questi metodi possono essere suddivisi in:

- ❖ Prove relative al materiale implantare, come ad esempio l'estensione della degradazione nei fluidi biologici o l'identificazione di sostanze che rilasciano.
- Test in vitro che esaminano l'interazione dell'impianto con cellule o microrganismi.
- ❖ Test in vivo su animale che determinano l'effetto dell'impianto sul corpo.

La strutturazione, la deposizione di un rivestimento o altre modifiche della superficie dell'impianto sono parametri cruciali per determinare l'adesione favorevole e la funzione fisiologica delle cellule. La corrosione delle superfici metalliche ed il rilascio di ioni possono influenzare la vitalità cellulare. Entrambi i parametri sono di solito testati utilizzando saggi di citotossicità in vitro e di adesione con cellule ossee o fibroblasti.

Esistono due classi principali di cellule, adoperate in tali test: linee cellulari e cellule primarie. Le prime sono considerate lo standard per una ricerca; sono facili da lavorare e possono essere utilizzate per molti anni. Tuttavia, poiché queste cellule sono in grado di dividersi continuamente, potrebbero non riflettere la vera fisiologia della cellula originale. Al contrario, le cellule primarie devono essere isolate direttamente dal corpo e possono essere mantenute in coltura solo per un periodo di tempo limitato. Ciò le rende difficili e costose da lavorare, ma si ottengono risultati molto più vicini alla situazione reale. Sono spesso adoperati osteoblasti di topo neonatale (MC3T3E1), osteosarcoma umano (SaOS-2 o MG-63), cellule di ratto o fibroblasti di topo L929 [133].

3.3.2 Citotossicità

La citotossicità può essere testata utilizzando una parte o un estratto del materiale oppure l'impianto stesso. Eluenti adatti sono i mezzi di coltura cellulare o fisiologica salina. Tutti i test devono includere un controllo negativo (nel mezzo di coltura) e un controllo positivo (ad esempio, 6% DMSO nel mezzo di coltura). Le cellule devono essere incubate per un periodo minimo di 24 ore. Per testare la citotossicità del materiale in contatto diretto con le cellule, queste ultime vengono applicate sulla superficie dei campioni, precedentemente sterilizzati, e poi incubate per 1-3 giorni. In alternativa, il campione viene accuratamente posizionato sulla parte superiore dello strato cellulare.

Ewald et al. adottano cellule epiteliali 16HBE coltivate nel mezzo di coltura di Dulbecco modificato (DMEM) ed una linea cellulare di osteoblasti umani hFOB, coltivata in DMEM/NUT MIX F-12. I mezzi di coltura sono stati completati con il 10% di siero fetale di vitello, 1% di penicillina e streptomicina, rispettivamente e le cellule messe in un incubatore di CO₂ umidificato al 5% a 37°C. Per i test di biocompatibilità, i campioni sono stati collocati in triplicato su una piastra, le cellule sono state seminate sulle superfici di

titanio rivestite con TiO₂/Ag, con una densità iniziale di 50000 cellule per capsula. Sono state quindi determinate la vitalità delle cellule ed il contenuto proteico totale dei campioni, dopo 3, 5, 7 e 10 giorni di coltura. La proliferazione cellulare è stata determinata dal conteggio, adoperando un analizzatore di cellule elettronico, dopo averle staccate dall'incubazione tramite accutasi ed aver diluito la sospensione con un rapporto 1:100. La vitalità e la proliferazione delle cellule sono state analizzate utilizzando un reagente di proliferazione cellulare (WST 1). Dopo aver incubato le cellule per 30 min con il WST 1 in DMEM a 37°C, l'adsorbimento del surnatante è stato quantificato attraverso uno spettrofotometro [109].

Altri test adottati sono quello in presenza di agar, come mezzo di coltura cellulare, ed il saggio di diffusione su filtro, precedentemente citati per quanto riguarda metodi di analisi di antibattericità. Entrambi sono test di contatto indiretti, in quanto valutano se le sostanze rilasciate dall'impianto possono essere dissolte e muoversi attraverso una barriera sottile (strato di agar o filtro inerte) verso le cellule [133].

Song et al. ricorrono infatti ad un test di diffusione su agar, per valutare la biocompatibilità di superfici in titanio commercialmente puro, che sono state rivestite da argento metallico mediante magnetron sputtering. La citotossicità, valutata su cellule L-929 (una linea cellulare, derivata da fibroblasti del tessuto connettivo del topo), è stata analizzati in conformità con le norme ISO 10993-5 e ISO 7405 [115].

Miola et al. hanno studiato il comportamento biocompatibile di rivestimenti a base di vetro e argento su titanio ed acciaio, utilizzando una linea di cellule di fibroblasti; le cellule sono state coltivate a 37°C in un'atmosfera con il 95% di aria ed il 5% di CO₂ in DMEM, completato con 10% siero bovino fetale, penicillina (100 U ml⁻¹), streptomicina (100 μg ml⁻¹) e L-Glutammina (0.03%). I test di biocompatibilità, qui adoperati, consistono nell'adesione dei fibroblasti e studi di proliferazione, eseguiti utilizzando una densità di cellule di partenza di 10⁴ cellule/cm²; le cellule incubate sono state conteggiate in una fotocamera di Burker dopo essere state rimosse con la soluzione SDS dalla superficie dei campioni, rispettivamente dopo 6 h per valutarne l'adesione e dopo 24 ore di coltura per stimare la proliferazione [98].

Per i campioni trasparenti, il numero di cellule e la loro morfologia possono essere controllate tramite una semplice microscopia ottica: quelle viventi dovrebbero avere la loro forma tipica ed essere ben attaccate e diffuse; di solito esse formano grappoli. Le cellule danneggiate o morenti sviluppano vacuoli, possono ridursi, diventare più tonde in apparenza e, infine, staccarsi dalla superficie.

Per i campioni non trasparenti, le cellule possono essere visualizzate utilizzando un microscopio elettronico a scansione o a epifluorescenza. Per la misurazione quantitativa della citotossicità, i parametri idonei sono l'inibizione della proliferazione cellulare, il numero di cellule morte e vive, la riduzione dei coloranti vitali ed il rilascio di enzimi citoplasmatici a seguito di danni alla membrana cellulare. Il saggio colorimetrico MTT, a base di bromuro di 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolio, misura ad esempio l'attività degli enzimi mitocondriali, la quale non solo riflette il numero di cellule vitali presenti (usate come saggio di proliferazione), ma rispecchia anche il grado di attività mitocondriale, indicando quindi la tensione cellulare o le cellule morenti (usate come test di citotossicità). Tecnicamente, questa tecnica agisce per riduzione del tetrazolio giallo, per via dell'azione dell'enzima mitocondriale succinato-deidrogenasi, attivo soltanto nelle cellule vive, in formazano insolubile viola. La variazione di colore può essere misurata, adoperando uno spettrofotometro.

Huang et al. esaminano la proliferazione di fibroblasti gengivali umani (HGF), attraverso un test MTT. Le cellule sono state coltivate in piastre, in presenza dei campioni in titanio rivestiti con TaN e TaN-Ag. La sostanza adoperata per il saggio era un sale di 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniletrazolo, che si è trasformato in un prodotto viola, a causa dei mitocondri vitali nelle cellule viventi. 3 ml di cellule HGF sono stati seminate ad una densità pari a 2×10⁴ cellule/ml, ed incubate a 37°C in atmosfera con 5% CO₂ per 72 h (valore a cui è stata attribuita la completa proliferazione). L'assorbanza (anche detta densità ottica) del colorante viola è stata quantificata misurando con uno spettrofotometro a 570 Nm. La misura così ricavata rifletteva il livello di vitalità cellulare e valori superiori hanno mostrato più cellule viventi sul campione (in questo caso di titanio con strato di TaN-Ag), che ha presentato una migliore biocompatibilità [116].

Song et al. adoperano un MTT, per valutare la citotossicità in vitro di superfici sputterate con ossido di titanio e argento. È stata impiegata la linea cellulare di fibroblasti L-929. Tutte le procedure di saggio sono state condotte sulla base della norma ISO 10993-5 e le condizioni di estrazione sono state seguite dal metodo ISO 10993-12 [114].

Lo studio di Flelding et al. ha come oggetto la compatibilità testata con una linea cellulare di osteoblasti umani hFOB 1.19. Le cellule sono state seminate sui campioni in piastre da 24 pozzetti ad una densità di 10⁴ cellule/ml; il mezzo di coltura adottato era una miscela 1:1 del mezzo F12 di Ham e di Dulbecco modificato (DMEM/F12), con 2.5 mM di L-Glutammina (senza fenolo rosso), completato con il 10% di siero bovino fetale e 0.3 mg/ml di G418. Le colture sono state mantenute a 34°C sotto un'atmosfera del 5% di CO₂, come consigliato dall'ATCC per questa particolare linea cellulare. Il mezzo è stato cambiato ogni 2 giorni per tutta la durata dell'esperimento; i campioni per i test sono stati rimossi dalla coltura dopo 3 giorni di incubazione. Tutti i campioni per la scansione al SEM sono stati fissati con 2% di paraformaldeide e 2% glutaraldeide durante la notte a 4°C. Dopo un rivestimento d'oro i campioni sono stati osservati dalla microscopia elettronica a scansione di emissioni di campo (FESEM) per la morfologia cellulare. Il test MTT è stato adoperato per valutare la proliferazione cellulare. Una soluzione di 5 mg/ml è stata preparata da MTT, diluendolo in PBS filtrato. Una soluzione MTT al 10% è stata quindi aggiunta a ciascun campione in piastre da 24 pozzetti; dopo 2 h di incubazione è stata aggiunta una soluzione di solubilizzazione di 1 ml, composta da 10% Triton X-100²³, HCl e isopropanolo. Il surnatante risultante è stato trasferito su una piastra e rilevato da un fotometro a 570 Nm [125].

Altri coloranti correlati al MTT, sono XTT (2,3-bis-(2-metossi-4-nitro-5-sulfofenil)-2h-tetrazolio-5-carbossimetilene), MTS (3-(4,5-dimetiltiazolo-2-il) -5-(3-carbossimetossifenil) -2-(4-sulfofenil)-2h-tetrazolio), e WSTS (sale di tetrazolio idrosolubile). Questi saggi colorimetrici forniscono valori medi di molte migliaia di cellule, ma non danno alcuna informazione sulle cellule prese singolarmente.

In uno studio di Kim et al., la biocompatibilità in vitro dei campioni in titanio rivestiti con un processo a due step, che si basa sulla tecnica dello sputtering e che consente di

-

²³ Il Triton X-100 è un tensioattivo non ionico, che ha un gruppo idrofilo di ossido di polietilene ed un gruppo lipofilico, di tipo idrofobico.

ottenere uno strato nanostrutturato di argento stabile, è stata valutata, adoperando una linea di cellule fibroblasti (L929) e confrontando i risultati con il materiale non rivestito. Le cellule sono state innanzitutto seminate sui campioni ad una densità di 5x10⁴ cellule/ml, per effettuare un test di attacco cellulare e coltura in un mezzo essenziale minimo alfa per i test di proliferazione cellulare. Le cellule, integrate con il 10% di siero bovino fetale, sono state poi messe in un incubatore umidificato con 5% di CO₂ a 37°C. Dopo 12 h di incubazione, la morfologia delle cellule attaccate su ciascun campione è stata osservata al FESEM. I campioni sono stati immersi in esametil-di-silazano per 10 minuti, seguiti dall'essiccazione in aria. La proliferazione cellulare è stata esaminata, adoperando in triplice copia, per ogni condizione, un saggio MTS, a seguito di 5 e 10 giorni di coltura, con il mezzo cambiato ogni giorno. Le cellule coltivate hanno reagito con MTS per 2 h. La colorazione ottenuta è stata quantificata utilizzando un microlettore a 490 nm [120].

Per testare adeguatamente la biocompatibilità, i saggi Live/Dead, che usano un paio di fluorofori sono la scelta migliore. Il principio generale è che uno di questi possa entrare nella cellula vivente (membrana intatta), mentre l'altro non riesca: il secondo colorante può entrare solo se la membrana cellulare è compromessa indicando un morto o una cellula morente; questo di solito poi si lega al DNA nei nuclei cellulari. Un esempio è l'omodimero calceina AM-etidio nel il saggio ETHD-1 che mostra le cellule viventi in verde, mentre quelle morte emettono fluorescenza rossa [133].

I reagenti alamarBlue ed alamarBlue HS funzionano come indicatore di salute cellulare, adoperando cellule viventi per misurare quantitativamente la proliferazione di varie linee cellulari umane e animali e permettendo di stabilire la citotossicità relativa degli agenti all'interno di varie classi chimiche. La resazurina, il principio attivo di cui sono formati, è un composto non tossico, permeabile alle cellule e di colore blu. Penentrando nelle membrane, essa è ridotta a resorufina, un composto di colore rosso ed altamente fluorescente, consentendo di riconoscere le cellule vitali [136].

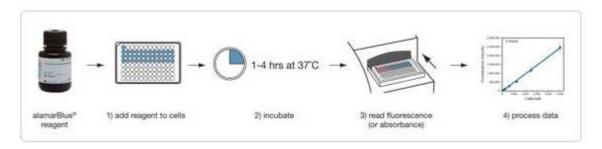


Figura 3.13 - Step applicati dal protocollo alamar $Blue^{TM}$. [F71]

Li et al. adottano tale metodo, di cui sono mostrati gli step in *figura 3.13*, per valutare l'osteotossicità dei rivestimenti in Ti/Ag in vitro. I campioni di rivestimento sono stati sterilizzati tramite irradiazione γ, poi gli osteoblasti MG-63 sono stati seminati su di loro ad una densità di 1000 cellule/cm⁻². Dopo averli coltivati per 1, 3, 5 e 7 giorni in un incubatore di CO₂ al 5% a 37°C, l'adesione e la proliferazione degli osteoblasti sono state misurate con il saggio alamarBlueTM secondo le istruzioni del produttore. Le morfologie cellulari corrispondenti coltivate per 1 e 7 giorni sono state osservate al SEM [123].

3.3.3 Adesione cellulare

Tecniche comuni per caratterizzare l'adesione cellulare sulla superficie implantare includono la quantificazione dell'area di diffusione della cellula, l'analisi delle adesioni focali, la misura di migrazione delle cellule e i saggi di lavaggio. Tali tecniche forniscono informazioni preziose sull'adesione e sono relativamente semplici da eseguire. Non forniscono, tuttavia, una misurazione quantitativa delle forze o delle sollecitazioni coinvolte nell'adesione cellulare. Ci sono due classi generali di saggi di forza quantitativa, adoperati al fine di indagare l'adesione delle cellule: la prima è la microscopia a forza di trazione, la quale consente di quantificare le sollecitazioni indotte al di sotto ed attorno a una cellula aderente al substrato, tracciandone lo spostamento. Le misure così ottenute hanno sino ad ora fornito informazioni rilevanti su come le cellule raccolgono i vari stimoli e rispondono ai loro ambienti meccanici e chimici. La seconda classe misura invece la forza di adesione delle cellule, quantificando la forza o lo sforzo necessario per staccare una cellula da un substrato, fornendo un valore diretto (non possibile nella prima tipologia) [137].

I saggi di adesione, basati sulla tipologia appena citata, possono essere suddivisi in tre categorie generali, a seconda del metodo di carico utilizzato per staccare la cellula:

- 1. Forza centrifuga;
- 2. Sforzo di taglio idrodinamico;
- 3. Micromanipolazione a cellula singola.

I metodi basati sulla forza centrifuga utilizzano centrifughe di laboratorio comuni, al fine di applicare forze normali alla superficie, con sopra le cellule adese, per staccarle. I metodi di taglio idrodinamici impiegano camere a flusso di fluido per applicare sollecitazioni di taglio sulla superficie cellulare. Le comuni configurazioni di questo tipo di saggio includono il disco rotante, la camera di flusso radiale e la camera di flusso parallela a piastre. I metodi di micromanipolazione comportano l'uso di una micropipetta, di un microscopio a forza atomica (AFM) o di uno strumento simile per applicare una forza concentrata su una singola cella per staccarla. Questi approcci di micromanipolazione sono implementati in una serie di configurazioni e possono applicare sollecitazioni normali o di taglio sulla cellula durante il distacco [137].

Tutti questi metodi comportano la misurazione di una sollecitazione che descrive la forza di adesione tra la cellula e la superficie. Esistono ulteriori tecniche, quali la tensione applicata tramite onde laser ed ultrasuoni, che sono state adoperate anche per misurare la forza di adesione; sono, tuttavia, molto meno impiegate rispetto alle metodiche principali.

Vi sono inoltre differenze significative nella natura dei dati che possono essere ottenuti da tali prove, a seconda che le cellule siano testate individualmente o come parte di una popolazione. Negli studi svolti con la seconda modalità, la frazione delle cellule rimaste su una superficie dopo l'applicazione dello stress è quantificata, e da prove ripetute con carichi variabili, è ricavato un valore di forza di adesione al quale il 50% delle cellule si stacca. Questi studi sono utili per misurare gli effetti delle variabili ambientali, come il tipo di proteina della matrice o la concentrazione, sulla forza media dell'adesione delle cellule. Al contrario, gli studi su singola cellula coinvolgono il distacco delle cellule una alla volta e consentono quindi di misurare le caratteristiche delle singole unità, come l'area di diffusione, il fenotipo e la disposizione di adesioni focali. La centrifugazione è stata

utilizzata esclusivamente per analizzare grandi popolazioni, mentre gli approcci di micromanipolazione sono stati utilizzati solo per studiare singole cellule. Metodi di taglio fluido sono i più versatili, in quanto sono applicabili ai due casi in egual modo.

I vari metodi di misurazione della resistenza di adesione applicano diversi tipi di carichi sulle cellule. Esperimenti che si basano sullo sforzo di taglio applicano una sollecitazione quasi uniforme alla superficie esposta della cellula, mentre la centrifugazione adopera una forza normale all'intero corpo cellulare. Le tecniche di micromanipolazione comportano l'interazione di un oggetto solido con la cellula e generalmente applicano forze altamente localizzate. Esse possono essere applicate in diverse direzioni. Una comprensione delle differenze nell'applicazione della forza è importante nella scelta del metodo sperimentale, in quanto alcune cellule possono rispondere a determinati stimoli in modo diverso rispetto ad altri: ad esempio, le cellule endoteliali sono note per la capacità di rispondere meglio a sforzi di taglio, riorganizzando la loro geometria e la disposizione delle componenti adesive. È anche importante riconoscere che i saggi spesso applicano questi carichi in diversi periodi di tempo. Poiché l'adesione è dipendente dalla velocità, occorre considerare la grandezza del carico e la durata [137].

3.3.3.1 Centrifugazione

La centrifugazione impiega un dispositivo girevole per generare una forza centrifuga che rimuove le cellule dal substrato. Poiché la piastra di coltura può essere posizionata lungo direzioni diverse, è possibile misurare sia l'adesione normale che tangenziale. La forza centrifuga utilizzata per staccare le cellule può durare più di 30 minuti ed è in grado di influenzare il comportamento biologico delle cellule [138].

Nel metodo più comune, mostrato in *figura 3.14*, le cellule vengono seminate in una piastra multipozzetto, collocata poi su una centrifuga a benna oscillante; essa è posta in modo tale che la superficie inferiore del pozzo sia normale all'asse di rotazione. Le cellule subiscono quindi una forza che agisce nella direzione normale al fondo della piastra che le allontana dalla superficie.

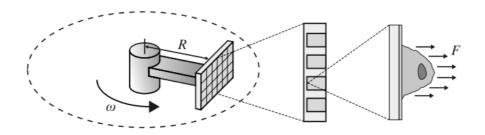


Figura 3.14 - Schema di un tipico saggio di adesione attraverso centrifuga. [F72]

Per valutare la forza di adesione, viene quantificato il numero di cellule prima e dopo l'applicazione del carico nella centrifuga. La frazione che rimane adesa a seguito del saggio può essere determinata misurando la quantità di radiazioni emesse da cellule radiomarcate, quantificando il materiale genetico cellulare, o adoperando una analisi di fluorescenza.

Adoperando piastre con vari pozzetti, molti trattamenti in replica possono essere svolti all'interno di un singolo esperimento. Nei casi in cui viene determinato un valore di forza di adesione, vengono eseguiti test a carichi multipli e la forza necessaria per staccare 50% delle cellule dalla superficie viene segnata come forza di adesione. Il carico applicato in tal senso è la forza esercitata su ogni cellula, dato come:

$$F = (\rho_c - \rho_{mezzo}) * V_c * RCF,$$
 Eq. 8

dove ρ_c è la densità della cellula, ρ_{mezzo} è la densità del mezzo, V_c è il volume della cellula, e RCF è la forza centrifuga relativa in unità di g. Valori tipici si attestano sui 1.07 g/cm³ e 1.00 g/cm³ per la densità cellulare e del mezzo rispettivamente. La RCF è determinata dalle dimensioni e dalla velocità della centrifuga e viene calcolata, adoperando la formula in eq. 9:

$$RCF = \frac{R*\omega^2}{g},$$
 Eq. 9

dove R è il raggio dal centro del rotore alla piastra, ω è la velocità angolare in rad/s, e g è l'accelerazione gravitazionale. Valori RCF tipici sono compresi tra 20g e 3000g, con forze su singole celle che vanno da 1 a 2000 pN. La sollecitazione normale media applicata all'interfaccia cella-substrato, (σ = F/A), dipende dall'area di diffusione della stessa, A, e

dalla forza applicata sulla cella, F. I tempi di applicazione del carico nelle prove centrifughe in genere vanno da 5 a 10 minuti. Mentre il tipo di carico di cui sopra è quello più comunemente usato nei saggi centrifughi, si trovano anche configurazioni alternative che applicano forze sulla cellula che agiscono parallelamente alla superficie ed utilizzano ultracentrifughe con RCF alti, come 110000g (forze ~ 100 nN) [137].

Uno studio di Tateishi et al. adotta tale metodologia per misurare la forza di adesione di cellule di fibroblasti di topo (L-929), coltivate su materiali bioceramici, come l'allumina. Le cellule sono state inoculate su piastre di allumina non rivestite e rivestite con fibronectina. La forza di adesione, rivelatasi maggiore nel secondo caso, è stata misurata caricando le cellule adese con forza centrifuga verticale alla superficie del materiale. Sono state inoltre misurate le aree e la morfologia delle cellule sui due substrati, utilizzando un metodo di analisi delle immagini [139].

3.3.3.2 Sforzo idrodinamico

Il metodo idrodinamico utilizza il flusso di fluido per generare una forza di taglio che stacca le cellule dal substrato. È possibile misurare solo la forza di adesione tangenziale in caso di colonie e anche di cellule singole, il che richiede un'ulteriore modellazione precisa della geometria cellulare e delle proprietà meccaniche per calcolare l'effettiva sollecitazione tangenziale esercitata sulle cellule [138].

I saggi a sforzo idrodinamico sono ampiamente utilizzati e comportano l'applicazione di sollecitazioni di taglio, per mezzo di un flusso di fluido monitorato. Le tre implementazioni più diffuse di questo concetto sono il disco rotante, la camera a flusso radiale e la camera di flusso a piastra parallela. Altre tecniche che si basano su sollecitazioni indotte dal flusso, come il *jet impingement* e le camere di taglio a cono e piastre, sono meno diffuse. In tutti i metodi idrodinamici, il flusso viene generalmente mantenuto in regime laminare (privo cioè di turbolenza, con un numero di Reynolds²⁴ ridotto). Ciò consente di calcolare la sollecitazione di taglio sulla cellula in base ai parametri di flusso attraverso relazioni relativamente semplici.

_

 $^{^{24}}$ Re = ρUDμ, dove ρ è la densità di massa del fluido, U è la velocità media, D è la dimensione caratteristica e μ è la viscosità del fluido. Quando Re diventa sufficientemente grande (la soglia esatta dipende dalla geometria di prova), il flusso non è più laminare.

La sollecitazione di taglio su una parete del canale indotta dal flusso di un fluido newtoniano è data da:

$$\tau = \left. \mu \frac{du(y)}{dy} \right|_{y=0}$$
 Eq. 10

dove u (y) è la velocità di flusso e y è la direzione normale alla parete. Nei saggi idrodinamici, la forza di adesione è perciò tipicamente definita come la sollecitazione da taglio a parete che provoca la disconnessione del 50% della popolazione iniziale di cellule aderite. Tuttavia, in alcuni casi, la forza di adesione può essere misurata direttamente, in quanto la configurazione della piastra parallela è adatta all'osservazione diretta di singole cellule attraverso microscopia (purché vengano utilizzati materiali trasparenti nella costruzione della camera).

3.3.3.2.1 Metodo del disco rotante

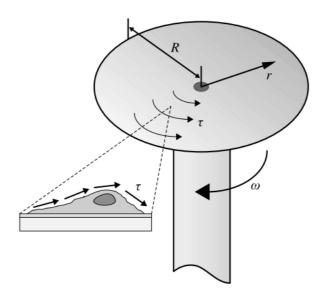


Figura 3.15 - Schematizzazione del saggio a disco rotante. [F7**3**]

Nel metodo del disco rotante, rappresentato in *figura 3.15*, le cellule sono seminate su piastre circolari di vetro o di un altro materiale di interesse (diametro tipico 10 – 50 mm), che vengono poi fissate su un disco, che ruota a velocità che vanno da 500 a 3000 rpm. Un vantaggio fondamentale del metodo del disco rotante è che viene generata una

sollecitazione di taglio che varia linearmente con la posizione radiale sul disco, quindi un intervallo di sollecitazioni viene applicato alla popolazione di cellule in un singolo esperimento, come dimostrato dalla seguente equazione:

$$\tau = 0.800 * r(\rho\mu\omega^3)^{1/2},$$
 Eq. 11

Dove r è la posizione radiale lungo il substrato, μ è la viscosità, ρ è la densità della soluzione, e ω è la velocità angolare.

Gli esperimenti in genere durano non più di 10 minuti e le frazioni aderenti sono generalmente quantificate utilizzando la microscopia, conteggiando il numero di cellule prima e dopo la rotazione manualmente o tramite un software automatizzato.

In uno studio di Kokkinos et al, sono state utilizzate cellule del midollo osseo umano, ottenute per aspirazione dalla diafisi femorale di pazienti sani maschi e femmine, di età compresa tra 50 e 70 anni. Le cellule, utilizzate per gli esperimenti, sono state seminate ad una concentrazione di 10⁵ cellule/cm² sulla superficie dei campioni di idrossiapatite, sotto forma di dischi. Prima della semina delle cellule, i dischi in HAp sono stati immersi per 30 minuti in soluzioni di BSA e di PBS, a concentrazioni di 10 μg/ml. In seguito, i campioni sono stati incubati a 37 °C in un'atmosfera di aria umidificata del 5% di CO₂ per 2 h e sono stati successivamente sottoposti a sollecitazione di taglio per 5 e 10 minuti a 210 giri/min. Le cellule sono state fissate in glutaraldeide, colorate mediante blu di metilene e osservate con un microscopio [140].

Elineni et al. hanno adoperato la stessa metodologia su substrati in vetro, al fine di indagare la regolazione della forza di adesione delle cellule in base alle dimensioni ed alla posizione delle aderenze focali (FA). Il conteggio delle cellule in varie posizioni radiali sul substrato è stato utilizzato per quantificare la forza di adesione dopo l'esposizione a un flusso idrodinamico creato dalla rotazione in una soluzione di viscosità e densità note, utilizzando un dispositivo a disco rotante. Il substrato con le cellule seminate su di esso, è stato montato sulla piattaforma, in una concentrazione molare di 2 mM di destrosio in DPBS, e fatto ruotare, al fine di applicare forze idrodinamiche ben definite sulle cellule aderenti. La sollecitazione di taglio applicata τ (forza/area) varia linearmente dal centro del disco verso la periferia, secondo l'eq. 11. Dopo la rotazione per 5 minuti, le restanti

cellule aderenti sono state fissate in 3.7% di formaldeide, permeabilizzate con 0.1% Triton X-100, e sottoposte a colorazione per l'identificazione del nucleo. Il numero di cellule aderenti è stato conteggiato in posizioni radiali specifiche, utilizzando un microscopio a fluorescenza. Esso è stato quindi normalizzato rispetto al numero di cellule al centro del substrato, dove è stata applicata una sollecitazione di taglio trascurabile, al fine di calcolare la frazione delle cellule aderenti f, secondo l'eq. 12:

$$f = \frac{1}{(1 + e^{[b(\tau - \tau_{50}]})}.$$
 Eq. 12

Il profilo di distacco è stato quindi ottenuto in forma di una curva sigmoide. La sollecitazione di taglio per il 50% di distacco (τ_{50}) è stata utilizzata come forza di adesione media delle cellule. È stato osservato che la ridistribuzione della FAs, a seguito della sollecitazione, ha migliorato significativamente la forza di adesione delle cellule. Inoltre, la dimensione delle FAs periferiche non governava direttamente la forza di adesione [141].

3.3.3.2.2 Camera di flusso radiale

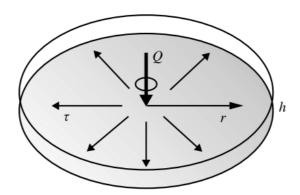


Figura 3.16 -Schema indicativo di una camera a flusso radiale. [F74]

In contrasto con il disco rotante, i metodi con la piastra radiale e parallela richiedono che il fluido scorra in una camera sopra le cellule su un substrato stazionario. Le tecniche di flusso radiale dirigono il flusso verso l'esterno dal centro di una camera circolare su un substrato seminato con le cellule, come visibile in *figura 3.16*. Se la camera è fatta di

materiali otticamente trasparenti, gli eventi di distacco possono essere monitorati tramite microscopia.

Anche in questo caso la camera di flusso radiale applica un intervallo di forze a una popolazione di cellule in un singolo esperimento. Nella configurazione della camera di flusso radiale più comune, il flusso di ingresso è diretto verso l'esterno dal centro della camera. La velocità media del fluido, e quindi la sollecitazione di taglio, diminuisce con la distanza radiale aumentando in modo non lineare, secondo la seguente formula:

$$\tau = \left| \frac{3\mu Q}{\pi h^2 r} - \frac{3\rho Q^2}{70\pi^2 h r^3} \right|,$$
 Eq. 13

Dove Q è il flow rate e h l'altezza della camera.

Il numero di Reynolds per il metodo a flusso radiale ha un valore critico pari a 2000 e l'altezza della camera più piccola utilizzata è di 200 μ m, e il raggio massimo della stessa è tipicamente sull'ordine dei centimetri. La sollecitazione di taglio massima che può essere generata per i tempi brevi con altezze tipiche è inferiore a ~ 20 Pa. Pertanto, il metodo è in genere applicabile nei casi in cui le cellule aderiscono per tempi brevi, tipicamente per meno di 10 minuti e le frazioni aderenti sono determinate dall'analisi delle immagini microscopiche [137].

In uno studio di Goldstein et al. sono state misurate attraverso tale metodo la forza di adesione e la dinamica di distacco di fibroblasti 3T3 (CCL92), coltivati su monostrati self-assembly. La RFC, in combinazione con un microscopio invertito, ha consentito l'osservazione in situ di cellule aderenti esposte ad un range di sollecitazione di taglio, dipendente a livello spaziale. Il fluido è entrato assialmente attraverso un ingresso di 2.03 mm di diametro e scorreva radialmente attraverso un gap di altezza pari a 200 μ m tra una superficie trasparente in PMMA e un supporto di vetro rivestito da metallo su cui è stato posto il SAM.

Una sospensione di 0.5 ml di cellule (con una densità di semina di circa 40 cellule/mm²) è stata iniettata con una siringa a monte della camera. Poiché il volume di mantenimento tra la porta di iniezione e la camera era di circa 0.5 ml, una seconda siringa è stata utilizzata per trasportare le cellule all'interno, con una velocità di circa 50 μ l/s. Le cellule si sono sistemate sul SAM entro un minuto. Successivamente, esse hanno aderito per 30

minuti a temperatura ambiente (un tempo sufficiente per l'adesione e la formazione di contatti prefocali, ma abbastanza breve per cui le cellule potessero rimanere approssimativamente sferiche), prima dell'esposizione al flusso, introdotto in un secondo momento ruotando una valvola a 3 vie. Una portata volumetrica costante è stata sostenuta per 5 minuti (sufficiente a raggiungere modelli di stato pseudo-stazionari di distacco delle cellule) prima che il flusso fosse interrotto.

In tale studio sono stati applicati modelli per la meccanica dei fluidi, distribuzioni di probabilità riguardanti la forza di adesione e la cinetica di distacco. L'analisi di questi modelli ha indicato una regione esterna in posizione radiale coerente con un flusso strisciante, una regione intermedia influenzata da smorzamento inerziale, ed una regione interna dominata da effetti di ingresso assiali. Inoltre, variando il numero di Reynolds nell'ingresso tra 630 e 1480 (corrispondenti a portate volumetriche tra 0.9 e 2.1 ml/s) non ha influenzato la forza media di adesione. L'analisi delle dinamiche di distacco ha rivelato tre fasi temporali:

- Rapido distacco delle cellule al passaggio del flusso, coerente con un modello cinetico omogeneo di primo ordine;
- Tasso di distacco dipendente dal tempo durante i primi 30 sec. di esposizione al taglio idrodinamico, coerentemente con il modello cinetico eterogeneo di primo ordine, proposto da Dickinson e Cooper;
- 3) Distacco trascurabile, indicativo dello stato pseudo-stazionario dopo 60 secondi di flusso [142].

3.3.3.2.3 Camera di flusso a piastra parallela

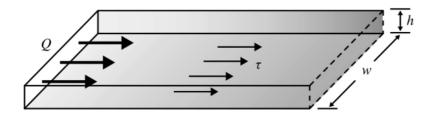


Figura 3.17 - Schema della camera di flusso a piastra parallela. [F75]

Le camere di flusso a piastre parallele (di cui uno schema è mostrato in *figura 3.17*) sono state ampiamente utilizzate per caratterizzare la forza di adesione delle cellule. Il flusso in questi sistemi è ben definito e le camere possono essere montate su un microscopio per consentire l'osservazione diretta delle cellule durante i test. Le camere sono di solito costruite con una sottile guarnizione di gomma tra due piastre e mettendo all'interno un substrato seminato con cellule.

Il flusso è azionato mediante pressione idrostatica da un serbatoio rialzato, con una pompa automatizzata per il ricircolo; le pompe possono essere utilizzate indipendentemente per guidare il flusso. Per una determinata portata, la sollecitazione di taglio della parete sarà costante lungo la lunghezza del canale oltre la lunghezza d'ingresso, ma può variare in base alla larghezza a seconda delle dimensioni del canale, secondo l'equazione seguente:

$$\tau = \frac{6\mu Q}{wh^2}$$
 Eq. 14

Dove h << w. Il flusso si mantiene laminare fino a Re ≈ 2300.

Il sistema di piastre parallele si rivela flessibile e adatto allo studio di adesione svolto su un'ampia gamma di superfici da studiare [137].

Uno studio di Gao et al. ha adottato oltre al test la metodica sopra descritta per indagare l'adesione di cellule provenienti dalla vena ombelicale umana, denominate ECV-304, su substrati a base di fibrina di seta (modificati con alcol polivinilico per ottenerne di diverso tipo), per misurare le forze di distacco durante la fase iniziale di adesione. Le cellule ECV-304 sono state coltivate su piastre rettangolari con all'interno i campioni per 2.5-3.5 h prima di essere posizionate nella camera di flusso parallela. I cambiamenti del

comportamento cellulare, sotto il flusso laminare, sono stati registrati dal computer in modo continuo, applicando una sollecitazione di taglio pari a 30.7 N/m². Tutti gli esperimenti sono stati effettuati a 20°C e completati entro 1 h. L'affinità cellulare di diversi materiali è stimata, in tal modo, dalla frazione delle cellule rimanenti, le quali possono essere conteggiate, adoperando un software di elaborazione delle immagini [143].

3.3.3.3 Micromanipolazione a cellula singola

Il metodo di micromanipolazione utilizza un micromanipolatore per misurare direttamente la forza di distacco di una cellula, come il microscopio a forza atomica (AFM) e l'aspirazione con micropipetta (MA).

3.3.3.1 Citodistaccamento

Per quanto riguarda l'AFM, si possono misurare sia i punti di forza di adesione normali che quelli tangenziali, e la quantificazione viene eseguita tramite il calcolo della deformazione dei cantilever (in questo caso il micromanipolatore). Per misurare la forza di adesione tangenziale, deve essere adoperato un supporto per tenere verticalmente il substrato; quest'ultimo viene successivamente spostato verso l'alto, e la cellula viene gradualmente raschiata dal cantilever. Per la misurazione della forza di adesione normale, un pezzo di materiale è tipicamente attaccato o incollato al cantilever e la forza di adesione a breve termine è misurata [138].

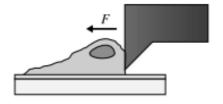


Figura 3.18- Schema del test di citodistacco, in cui si nota la sonda che preme sulla cellula applicando una forza di rimozione tangenziale. [F76]

Nello specifico nel test, di cui è mostrato uno schema in *figura 3.18*, la deviazione della sonda viene misurata da un segnale laser, che viene riflesso e monitorato, utilizzando un fotorivelatore. Le immagini di deformazione della sonda vengono acquisite otticamente durante il processo di distacco delle cellule ed elaborate per determinare il valore di deformazione. La forza è quindi calcolata, adoperando la deformazione misurata al distacco, x, e la rigidità della sonda, k, nella seguente formula:

$$F = Kx$$
.

Il processo richiede una calibrazione rigorosa o una modellazione per determinare la rigidità della sonda. Il tasso di carico può essere variato all'interno di un certo range, ma i tassi impiegati generalmente sono $1-20~\mu\text{m/s}$ e le misurazioni di forza vanno da 1 nN a 1 μ N [137].

3.3.3.2 Aspirazione con micropipetta

L'aspirazione delle micropipetta è un metodo ampiamente utilizzato per la misurazione delle proprietà meccaniche delle singole cellule ed è stato impiegato negli ultimi anni per misurare la forza di adesione in particolar modo delle cellule di spreading [137].

Il sistema MA utilizza una micropipetta per applicare una pressione negativa sulle cellule; una volta che la forza di aspirazione è sufficiente per superare quella di adesione, la cellula verrà staccata dal substrato, mentre la micropipetta si allontana dal substrato, come visibile dalla *figura 3.19*. Se la punta della micropipetta è perpendicolare al substrato, la forza di adesione può essere calcolata tramite il diametro della punta e la pressione negativa. Questo approccio si traduce in una valutazione più diretta della forza di adesione normale [138].

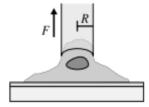


Figura 3.19 - Schema della tecnica che si basa sull'aspirazione tramite micropipetta. [F77]

Le micropipette adottate in genere possiedono un raggio interno sull'ordine dei micrometri e sono utilizzate per creare una forza di aspirazione sulla membrana cellulare. La forza impartita sulla cellula per aspirazione è pari a:

$$F = \pi R^2 \Delta P$$
 Eq. 16

dove R è il raggio interno della micropipetta e ΔP è la pressione di aspirazione. La dimensione della stessa e la direzione del suo movimento determinano il tipo di carico, quindi la dimensione e l'angolo tra la sonda e la cellula devono essere misurati per un'adeguata analisi della forza [137].

L'aspirazione tramite micropipette è stata adoperata in uno studio di Wang et al. per studiare cellule staminali mesenchimali, derivate dal midollo osseo di ratto (rBMSCs), coltivate su substrato di vetro ed incubate per 30, 60, 90, 120, 150, e 180 minuti, e di cui sono state caratterizzate la morfologia e la forza di adesione.

Il sistema consisteva in un microscopio, un micromanipolatore, un manometro a U ed un dispositivo di monitoraggio. Il diametro della punta di ogni micropipetta è stato misurato tramite un'immagine microscopica prima del test ed è stato utilizzato per calcolare la forza di adesione (senza adoperare componenti laterali). Le pipette sono state poi riscaldate da una lampada e piegate a 90°, mentre l'altra estremità delle stesse è stata collegata al manometro, riempito di inchiostro rosso per dimostrare la pressione negativa. La punta della micropipetta è stata allineata con il centro della cella per staccare simultaneamente l'intera cellula e per prevenire il peeling ai confini, come mostrato in figura 3.20. Per le cellule leggermente asimmetriche, la punta era allineata con il centro approssimativo della metà superiore (che era approssimativamente semi-sferica) [138].

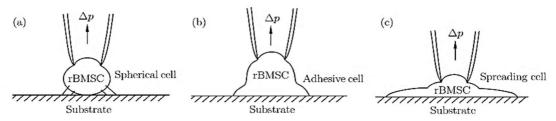


Figura 3.20 - Posizione della micropipetta rispetto alle cellule, definite come (a) sferiche, (b) adesive e (c) di spreading. [F78]

La pressione negativa è stata gradualmente aumentata fino a quando la cellula è stata rimossa verticalmente dal substrato dalla forza di aspirazione, e la corrispondente pressione negativa è stata quindi registrata come la pressione di distacco ΔP . La forza di adesione è stata quindi calcolata, adottando la formula descritta dall'eq. 16.

La morfologia cellulare è stata definita come sferica (senza e poi con filopodi visibili), adesiva e di spreading, in corrispondenza delle tre fasi di adesione. Le cellule sferiche rappresentano lo stadio primario; la forza di adesione delle cellule sferiche variava da 10.05 a 51.95 nN, con un valore medio pari a 30.81 ± 11.66 nN; i diametri delle cellule avevano un range di 16-32 μ m, con un valore medio di 22.53 ± 5.32 μ m. Le distribuzioni di diametro per i gruppi senza e con filopodi si sono rivelate simili, ma le seconde hanno mostrato una maggiore forza di adesione (37.59 ± 8.73 nN) rispetto alle cellule senza filopodi (23.06 ± 9.85 nN).

Le cellule adesive rappresentano la fase di trasformazione del processo di attaccamento al substrato. La forza di adesione variava da 11.31 a 101.79 nN, con un valore medio di 61.50 \pm 24.88 nN. Il 75% delle cellule presentava diametri che vanno da 25 a 35 μ m, con un valore medio di 29.46 \pm 7.43 μ m.

Le cellule di spreading rappresentano il completamento dell'adesione iniziale e l'inizio dell'effettivo attecchimento cellulare al substrato. La forza di adesione variava da 59.38 a più di 150 nN. Alcune di tali cellule, i cui diametri erano superiori a 50 µm, hanno mostrato una resistenza di adesione molto elevata e uno spessore sottile, ma la membrana cellulare, non resistendo ad un'alta pressione negativa, si è rotta, prima che la cellula si stesse effettivamente staccando. Anche se i diametri delle cellule di diffusione hanno mostrato risultati eterogenei, la tendenza ha indicato che la forza di adesione è aumentata con i diametri delle cellule.

Riassumendo, le cellule di tipo sferico hanno mostrato quindi una bassa resistenza all'adesione; quelle adesive presentavano un rapido aumento della forza di adesione, a fronte di diametri relativamente costanti. La forza di adesione è poi aumentata, in maniera proporzionale con l'aumento del diametro, nelle cellule di spreading. Questi risultati suggeriscono come la forza di adesione possa essere rapidamente valutata esaminando la morfologia [138].

Gao et al. hanno selezionato delle cellule uniformi in forma rotonda da una serie di cellule di tipo endoteliale (dovuta alla presenza di antigene correlato al fattore VII), provenienti dalla vena ombelicale umana, su superfici campione a base di fibrina di seta, per misurare le forze di distacco durante la fase iniziale di adesione. Sono stati studiati gli effetti delle dimensioni cellulari, della quantità, del tempo di semina e della temperatura di semina. Per effettuare ciò sono state adoperate micropipette come descritto sopra, e per scopi di confronto, sono stati condotti anche i saggi della camera di flusso in parallelo e della MTT per misurare l'interazione tra substrato e il numero di cellule. Tale studio suggerisce come questo metodo sia rapido ed efficace, al fine di confrontare la forza di adesione delle cellule su diverse superfici [143].

3.3.3.4 Tecniche ulteriori

La sequenza che conduce all'adesione e allo spreading delle cellule fornisce qualche parametro importante per la caratterizzazione aggiuntiva. Vi sono diversi componenti cellulari che possono essere visualizzati, utilizzando, ad esempio, specifici anticorpi fluorescenti marcati con colorante. Spesso vengono adoperati come target le fibre di actina, che segnano la morfologia delle cellule, la vinculina, una proteina coinvolta in fase di adesione focale, e il DNA, per visualizzare i nuclei cellulari. In questo modo, diversi gradi di adesione e diffusione cellulare possono essere chiaramente distinti.

Il saggio più sofisticato valuta la proliferazione cellulare, la riorganizzazione del citoscheletro dell'actina, la dissoluzione/rinnovo dei punti di adesione focali e la migrazione. Qui, le cellule vengono coltivate sulla superficie dell'impianto, quindi un gap aperto viene creato rimuovendo le cellule attraverso il monostrato cellulare confluente. Il tempo per le cellule di chiudere questa "ferita" da proliferazione, diffusione e spostamento è monitorato [133].

3.3.4 Tabella riassuntiva

In *tabella 3.4* vengono riassunte le metodiche, sino ad ora citate, per caratterizzare la biocompatibilità e l'adesione cellulare, in riferimento ai rivestimenti trattati nel *capitolo 2*

Tabella 3.4-Tipologie di caratterizzazioni di biocompatibilità adottate più comunemente, in riferimento agli studi precedentemente presentati. [T12]

TIPOLOGIA DI TEST	MODALITA' DI ESECUZIONE	MATERIALE	IN VIVO/IN VITRO	CELLULE ADOPERATE	RIF. NORMATIVO	RIF. BIBLIOGRAFICO
Citotossicità	Test nel mezzo di coltura direttamente sul campione.	Titanio, rivestito con TiO ₂ -Ag tramite PVD	In vitro	Linee cellulari epiteliali 16HBE e di osteoblasti hFOB 1.19	ISO 10993, ISO 7405:1997	[109]
Citotossicità	Test di diffusione su agar	Cp-Ti, rivestito con DC magnetron sputtering	In vitro	Linee cellulari di fibroblasti L-929	ISO 10993-5, ISO 7405	[115]
Citotossicità	Saggio MTT	Titanio, rivestito tramite sputtering con TaN-Ag	In vitro	Fibroblasti gengivali umani HGF	Non riportato	[116]
Citotossicità	Saggio MTT	Titanio, rivestito con TiO ₂ -Ag tramite sputtering	In vitro	Linea cellulare di osteoblasti L-929	ISO 10993-5, ISO 10993-12	[114]
Citotossicità	Saggio MTS	Titanio, rivestito con TIPS e Ag-sputtering	In vitro	Linee cellulare di fibroblasti L-929	Non riportato	[120]
Citotossicità	Test nel mezzo di coltura direttamente sul campione e saggio MTT	Titanio, rivestito con plasma spray di uno strato di Ag-HA	In vitro	Osteoblasti umani hFOB 1.19	Non riportato	[125]
Citotossicità	Test alamarBlue™	Nanoparticelle di argento	In vitro	Osteoblasti MG- 63	Non riportato	[123]
Adesione/Citotossicità	Test di adesione Test di proliferazione	Titanio ed acciaio, rivestiti tramite plasma spray di vetro drogato con argento	In vitro	Linea cellulare di fibroblasti	Non riportato	[98]
Adesione/Citotossicità	Non riportato	Titanio, rivestito tramite sol-gel con argento	In vivo	Cellule ossee in vivo	Non riportato	[108]

Capitolo 4. Materiali e metodi adoperati in fase sperimentale

4.1 Substrati

Il rivestimento è stato applicato su substrati metallici (forniti e lucidati a specchio da Intrauma S.p.A.) quali acciaio inossidabile AISI 316L, titanio commercialmente puro (grado 4) e titanio in lega V-6Al-7Nb (grado 5), di cui sono riassunte le proprietà principali in tabella 4.1 [144] [145].

Tabella 4.1- Substrati adoperati e loro caratteristiche. [T13]

N.	MATERIALE	COMPOSIZIONE CHIMICA (IN %WT)	CARATTERISTICHE MECCANICHE	CARATTERISTICHE FISICHE	FOTO
1	Acciaio AISI 316L	C: 0.03; Mn: 2; P: 0.045; S: 0.015; Si: 1; Cr: 16.5- 18.5; Ni: 10-13; Mo: 2-2.5; altro: 0.11.	Resistenza: 570-590 Mpa; snervamento: 280-290 Mpa; elasticità: 55%.	Densità: 7.9 kg/dm3; modulo di Young: 200 MPa; conducibilità termica: 15 W/m°C; resistenza elettrica: 0.73 μΩm.	
2	Titanio gr. 4	C: 0.4; N: 0.06; C: 0.10; Fe:0.5; Ti.	Resistenza: 680-700 Mpa; snervamento: 520-560 Mpa; elasticità: 15-35%.	Densità: 4.51kg/dm3; modulo di Young: 106 MPa; conducibilità termica: 4.1 W/m°C; resistenza elettrica: 0.55 μΩm.	
3	Titanio gr. 5 ASTM F136	V: 3.5-4.5; Al: 5.5-6.5; C: 0.08 (max); Fe: 0.25; N: 0.06; O: 0.13; Ti.	Resistenza: 900- 1500 Mpa; snervamento: 795- 920 Mpa; elasticità: 15-35%.	Densità: 4.4 g/cm3; modulo di Young: 110 MPa; conducibilità termica: 2 W/m°C; resistenza elettrica: 1.75 μΩm.	

4.2 Preparazione e lavaggio dei campioni

I campioni sono stati lavati dapprima con etanolo (C_3H_6O) e passati per 5 minuti in ultrasuoni; successivamente hanno subìto due lavaggi in acqua ultrapura (dapprima fredda e poi a 60°) per 10 minuti ciascuno, al fine di rimuovere le contaminazioni superficiali. Al termine di tali fasi, i campioni sono stati fatti asciugare sotto cappa a flusso laminare.

4.3 Rivestimento dei campioni

Lo sputtering è una tecnica di deposizione fisica di film sottili, che consiste nella rimozione di materiale da un target, per depositarlo su un substrato. Tale metodica deriva dal fenomeno fisico per cui gli ioni incidenti su una superficie provocano collisioni a cascata sul target; una volta raggiunto il materiale, l'energia delle particelle è più elevata di quella superficiale (> 5 eV) e vengono espulsi atomi, che vanno in fase gassosa.²⁵

Le particelle primarie, necessarie perché avvenga lo sputtering possono essere fornite in diversi modi, quali sorgenti di ioni, materiali radioattivi o un acceleratore: in questo caso si adotta un plasma. il plasma è un gas ionizzato (generato dall'azione di un'elevata differenza di potenziale), solitamente si utilizza argon in quanto inerte (non reagisce con gli elementi da depositare) e non influenza quindi l'applicazione del rivestimento [97]. Dall'urto avviene la ionizzazione e tramite un nuovo elettrone generato si instaura un processo a catena. Gli ioni Ar⁺ caricati positivamente, che formano la corrente di plasma appena generata, vengono accelerati verso il catodo negativo (dove c'è il target) e possiedono una quantità di moto sufficiente da estrarre atomi dal materiale bersaglio, che si diffonderà in tutta la camera e, quindi, anche sul substrato. Gli atomi espulsi collidono con il substrato formando un film estremamente sottile.

In genere la formazione del rivestimento consiste in cinque processi successivi:

1. Trasporto del materiale (precursore) sino alla superficie,

148

²⁵ Se l'energia è molto più elevata (qualche keV) le particelle bombardanti penetrano in profondità e il processo diviene la impiantazione ionica; se al contrario l'energia è minore di 5 eV gli atomi rimbalzano sulla superficie o rimangono sulla superficie e poi lentamente, specialmente se sono atomi di gas nobili, vengono desorbiti e tornano nella fase vapore.

- 2. Assorbimento dei precursori,
- 3. Diffusione superficiale,
- 4. Nucleazione e crescita di isole,
- 5. Crescita del film continuo.

La *figura 4.1* riporta un esempio indicativo di cosa accade all'interno della camera, nella quale viene dapprima creato il vuoto, attraverso l'uso di una pompa rotativa (collegata all'esterno) ed una pompa per il vuoto (si attiva quando si ferma la precedente) e poi avviene il rivestimento a pressione mantenuta a livelli particolarmente bassi ($10^{-2} - 10^{-6}$ Pa).

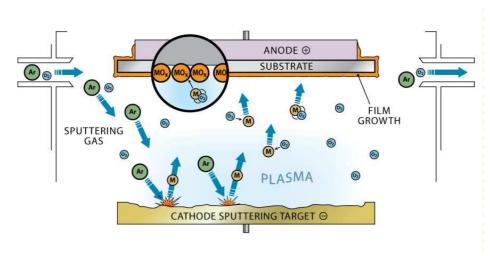


Figura 4.1- Schema di cosa avviene all'interno della camera per lo sputtering. [F79]

Poiché l'emissione degli atomi si propaga per tutta la camera, tutte le superfici esposte all'interno di essa vengono rivestiti allo stesso modo, consentendo una copertura omogenea. Il metodo è applicabile a qualsiasi tipo di materiale, in quanto non richiede elevate temperature; perciò è possibile adoperare metalli, polimeri e ceramici indistintamente, applicando quindi anche materiali con basso melting point [107] (tale aspetto non vale invece per le altre tecniche di Physical Vapor Deposition, nelle quali la deposizione si genera applicando una vaporizzazione termica). Mentre l'evaporazione deve necessariamente essere effettuata dal basso verso l'alto, lo sputtering può essere effettuata anche dall'alto verso il basso, questo permette di evitare che polvere si depositi sui substrati nel processo di deposizione.

Vi sono molte varianti dello sputtering, illustrate nella tabella 4.2.

Tabella 4.2- Tabella che riassume le modalità diverse con cui si applica lo sputtering. [T14]

TECNICA	FONTE DI ALIMENTAZIONE	PLASMA	CARATTERISTICHE
DC Sputtering	Corrente continua	Ioni di Argon	Permette di evaporare solo film conduttori.
DC Sputtering Magnetron	Corrente continua	Ioni di Argon	Esso rende più efficiente lo sputtering, poiché intrappola in un campo magnetico, in prossimità del campione, gli elettroni secondari emessi dal target e li utilizza per ionizzare il gas inerte della scarica generando una corrente di ioni in prossimità della superficie aumentando la resa del processo.
RF Sputtering	Corrente alternata	Ioni di Argon	L'uso della RF permette di mantenere il plasma senza ricorrere all'emissione termoionica. Consente di operare a pressioni relativamente basse del gas, che riducono le inclusioni di impurità e la non riproducibilità del film. Non è necessario usare un terzo elettrodo, evitando perciò contaminazioni da filamento e la sua eventuale rottura.
Ion-Beam Sputtering	Sorgente di ioni esterna	Ioni di Argon	Viene in generato creato un gradiente di pressione tra la sorgente di ioni e la camera dove è posto il campione: cioè creando una sovrappressione nella camera della sorgente rispetto alla camera da vuoto e estraendo il gas nella camera da vuoto. Con una tecnica di questo genere si riducono le contaminazioni e dà la possibilità di lavorare in Ultra Alto Vuoto (UHV). La tecnica non si presta a depositare grandi superfici e inoltre richiede una continua manutenzione.
Sputtering reattivo	Reazione chimica	Gas inerte	Si fabbricano ossidi e nitruri. La composizione del film può essere controllata variando la composizione della miscela di gas.

In presenza di più target, visibili in *figura 4.2*, si parla di Co-Sputtering. In tal caso le modalità di deposizione sono:

- Layer by layer, nella quale il materiale finale avrà una successione di strati alternati (A-B-A);
- Mixed, con cui i materiali sono depositati allo stesso tempo.

Anche se per alcuni processi di deposizione di metalli la tecnica di sputtering in DC presenta caratteristiche di migliore controllo dei parametri di processo, con l'uso della



Figura 4.2- I target adoperati dal co-sputtering. [F80]

possibile inclusione di impurità.

radiofrequenza è possibile aumentare la carica negativa del target. Applicando un potenziale AC ²⁶ ad un elettrodo in plasma, si estrae una maggior corrente elettronica che ionica che agisce perciò come un raddrizzatore. L'uso della RF consente di mantenere il plasma senza ricorrer all'emissione termoionica. Inoltre, è possibile operare a pressioni relativamente basse e ciò riduce la

L'efficienza dell'intero processo dipende molto dalla frequenza: a frequenze troppo basse (decine di kHz) la differenza di comportamento tra ioni ed elettroni non è rilevante, quindi bisogna aumentare di molto la tensione del campo per fare avvenire la scarica a plasma. A frequenza più elevate (qualche MHz) gli ioni non riescono più a seguire la variazione del campo elettrico e il processo di sputtering a RF diventa più efficiente.

Nel presente lavoro di tesi è stato utilizzato un co-sputtering in modalità "mixed" al fine di ottenere la dispersione omogenea dei nanocluster di argento nelle diverse matrici.

Sono stati utilizzati due target: uno per la matrice in silice (Franco Corradi™ s.r.l., purezza al 99.9%) e uno di argento (Sigma–Aldrich™, purezza al 99.99%) in modalità pulsata, attraverso il dispositivo Microcoat™ MS450 (McKinney, TX, USA). Le matrici in allumina e in zirconia sono state depositate, adoperando un dispositivo KVS (Kenosistec, Binasco (MI), Italia), considerando un target per la matrice e uno per l'argento.

Nelle tabelle seguente sono riassunti i parametri adottati per le deposizioni effettuate nel lavoro.

²⁶ Alternating Current: comporta l'uso di una corrente elettrica che anziché essere costante, inverte la polarità nel tempo.

Tabella 4.3- Parametri relativi ai target applicati. [T15]

N.	Catodo	Diametro Ø (inch)	Potenza (W)	Tensione (V)	Modalità
1	Silice	6	200	250	RF
2	Argento	1	1	35* 10 ⁻³	DC

N.	Catodo	Diametro Ø (inch)	Potenza (W)	Tensione (V)	Modalità
1	Allumina	3	200	450	RF
2	Argento	3	10	37	RF

N.	Catodo	Diametro Ø (inch)	Potenza (W)	Tensione (V)	Modalità
1	Zirconia	3	200	380	RF
2	Argento	3	20	42	RF

È possibile notare come con le due deposizioni successive la modalità, per quanto riguarda l'argento, sia passata da DC a RF: essendo un metallo e quindi un materiale conduttivo, vanno bene entrambe. Tuttavia, nel secondo caso l'efficienza è inferiore e ciò consente una minor deposizione.

Tabella 4.4 - Parametri relativi alla pressione interna ed al tempo impiegato. [T16]

Fasi	Pressione (bar)	Tempo (min)	
Formazione vuoto	10 ⁻⁶	60	
Deposizione	5.5*10 ⁻⁶	40	

Fasi	Pressione (bar)	Tempo (min)	
Formazione vuoto	10 ⁻⁶	90	
Deposizione	6.3*10 ⁻⁶	60	

Fasi	Pressione (bar)	Tempo (min)
Formazione vuoto	10 ⁻⁶	40
Deposizione	6.3*10 ⁻⁶	60

4.3 Tecniche di caratterizzazione

Sono stati innanzitutto effettuati i test, volti a caratterizzare fisicamente e chimicamente i rivestimenti depositati sui substrati. Alcune misure sono state effettuate prima e dopo l'applicazione del coating, al fine di effettuare un confronto.

4.3.1 Bagnabilità

La bagnabilità è il processo che porta a contatto un liquido ed una superficie solida. Ciò avviene in presenza di una fase gassosa o di un'altra fase liquida, immiscibile con la prima, descrivibili in entrambi i casi con il termine generale di fluidi. Se la misura è effettuata con acqua, tale tecnica si rivela utile al fine di determinare l'idrofobicità/idrofilicità della superficie in esame.

L'angolo di contatto θ si forma tra l'interfaccia liquido-vapore e solido-liquido. È determinato dal bilanciamento tra le forze di adesione e di coesione. La tendenza di una goccia ad appiattirsi sulla superficie aumenta al diminuire dell'angolo di contatto, come visibile in *figura 4.3*.

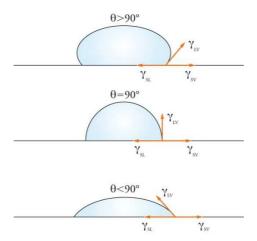


Figura 4.3 - Configurazione della goccia al variare dell'angolo di contatto. [F81]

L'equazione di Young è adoperata come espressione dell'angolo di contatto in condizione di equilibrio ed è pari a:

$$\gamma_{LG}\cos(\theta) = (\gamma_S - \gamma_{SL}) - (\gamma_S - \gamma_{SG}) \cong \gamma_{SG} - \gamma_{SL}.$$
Eq.17

Il grado di bagnabilità è quindi dipendente dalla tensione superficiale del liquido e dalle varie energie di interfaccia. L'angolo di contatto è compreso fra 0° (bagnabilità completa o

perfetta) e 180° (assenza di bagnabilità). Una bagnatura favorevole, o idrofilicità nel caso dell'acqua, corrisponde ad un ridotto angolo di contatto: questo comporta che il fluido ricopra una grande porzione di superficie. Al contrario, una bagnatura non favorevole (o idrofobicità, con acqua) si riferisce al caso in cui il liquido, non avendo particolare affinità chimica con l'interfaccia solida, forma su di essa delle gocce compatte, cioè con elevato angolo di contatto [146].

Il modo più semplice per misurare l'angolo di contatto è il metodo del goniometro, che consente all'utente di misurare visivamente θ. Una gocciolina è depositata tramite una siringa tarata sopra la superficie in esame ed una telecamera ad alta risoluzione cattura l'immagine dal profilo o dalla vista laterale. L'immagine, di cui un esempio è mostrato in *figura 4.4*, può quindi essere analizzata sia ad occhio (con un goniometro) o più frequentemente viene misurata utilizzando un software di analisi delle immagini. Questo tipo di misura è indicato come *misura di angolo di contatto statico*.

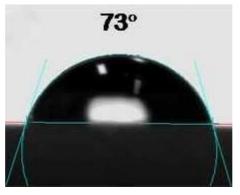


Figura 4.4- Misura di angolo di contatto statico. [F82]

L'angolo di contatto è influenzato non solo dalla chimica superficiale, ma anche dalla rugosità. Infatti, l'equazione di Young assume che la superficie in esame sia omogenea e priva di rugosità. In caso contrario, la gocciolina è catalogabile in uno stato di Wenzel (bagnatura omogenea), in uno stato di Cassie-Baxter (bagnatura eterogenea) o in uno stato intermedio [147].

Il vantaggio di tale metodo, oltre alla sua natura relativamente semplice, è il fatto che su una superficie solida sufficientemente estesa possono essere depositate goccioline multiple in varie posizioni sul campione per determinare l'eterogeneità. La riproducibilità di valori particolari dell'angolo di contatto rifletterà l'eterogeneità delle proprietà

energetiche della superficie. Ciò non è ovviamente attuabile se il campione non ha dimensioni sufficienti.

Nel presente lavoro la bagnabilità delle superfici, prima e dopo il rivestimento, è stata studiata mediante la misura dell'angolo di contatto statico, utilizzando come fluido acqua ultrapura. Per ogni misura è stata utilizzata una goccia di 5 μ l depositata sulla superficie per mezzo di una micro-pipetta. Sono state depositate tre gocce di acqua su ciascuna superficie (ottenendo nove valori per substrato); tramite un DSA-100 (KRÜSS GmbH, Amburgo, Germania) è stata svolta la misura dell'angolo θ tra la parte superiore della goccia ed il piano del substrato con il metodo *sessile drop*. I dati ricavati sono stati rielaborati, raccogliendone la media e la deviazione standard in grafici su Excel.

4.3.2 Misure di rugosità

Il profilometro è uno strumento di misura, adoperato per la determinazione della rugosità di una superficie. Esistono tecniche di tipo ottico e a contatto/pseudocontatto.

Un profilometro ottico lavora senza contatto e può dare molte delle informazioni di un profilometro a stilo. Esistono correntemente molte tecniche diverse, come la triangolazione laser, il microscopio confocale (usato per la profilazione di oggetti molto piccoli) e l'olografia digitale [120]. Il sistema adopera fasci di luce, di diversa natura (il più diffuso è il laser), e misura il tempo impiegato nel ritorno degli stessi.

Il profilometro che richiede un contatto, possiede uno stilo di diamante, il quale si muove verticalmente sul il campione e poi lateralmente attraverso lo stesso per misurare le distanze e le forze di contatto specifiche. Il dispositivo misura piccole variazioni della superficie in verticale come funzioni di posizione dello stilo. Un tipico profilometro può rilevare differenze dell'ordine di 10 nm-1 mm.

La posizione in verticale dello stilo di diamante genera un segnale analogico, che viene convertito in segnale digitale, analizzato e mandato al display, come mostrato in *figura 4.5*. Il raggio dello stilo di diamante è in un intervallo di 20 nm-25 μ m, e la risoluzione orizzontale è controllata dalla velocità di scansione e di campionamento del segnale. La forza impressa dallo stilo è in un intervallo da meno di 1 a 50 mg.

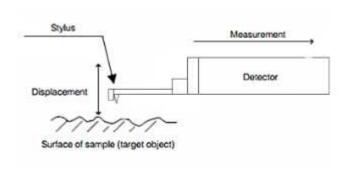


Figura 4.5-Raffigurazione dello stilo che si muove sulla superficie. [F83]

I metodi a contatto e a pseudo-contatto si suddividono in

- Profilometro a stilo (o profilometro meccanico);
- Microscopio a forza atomica;
- Microscopio a effetto tunnel.

Tali metodiche presentano i seguenti vantaggi:

- È un metodo universalmente approvato, in quanto gran parte degli standard di precisione delle superfici nel mondo sono ottenuti attraverso profilometri di contatto.
- Indipendenza dalla superficie, poiché il contatto con la superficie si rivela un vantaggio
 in campioni sporchi dove i metodi senza contatto possono dare risposte errate a causa
 degli stessi contaminanti della superficie (il metodo non tiene inoltre conto della
 riflettanza o del colore della superficie, perciò risulta meno limitato di quello ottico).
- La punta dello stilo può essere minore di 20 nm, presentando una risoluzione migliore
- È una tecnica diretta, per cui non servono modelli [149].

Nel presente lavoro di tesi, le misure di rugosità, sui campioni prima e dopo rivestimento, sono state effettuate presso i laboratori del CNR-IMAMOTER di Torino tramite un profilometro Form-Talysurf 120L (Taylor-Hobson, Leicester, UK), dispositivo munito di cantilever e puntina, la quale attraverso una *tapping mode* tocca il campione e ne misura la rugosità media Ra in µ.

4.3.3 Test di rilascio

L'obiettivo di tale test è determinare il rilascio ionico dei rivestimenti testati al fine di monitorare la cessione di ioni antibatterici, l'eventuale degrado del coating e verificare che il valore di rilascio dell'argento non sia superiore alla soglia riportata in letteratura come tossica per le cellule di osteoblasti di embrione di topo (MC3T3- E1) 0.38 mg/l

[55].).

I campioni sono stati posti all'interno di contenitori in 25 ml di acqua ultra-pura a 37°C per diversi tempi sperimentali e collocati in un incubatore Alpha (Bicasa, Bernareggio (MB), Italia), visibile in *figura* 4.6.



Figura 4.6- Incubatrice adoperata per il test di rilascio. [F84]

4.3.3.1 Misura con fotometro portatile

Per un primo set di campioni Il tempo di rilascio considerato è stato pari a 24 h, al fine di ottenere un primo feedback.

In questo caso l'argento è stato quantificato con un fotometro portatile HI 93737 Silver ISM (HANNA Instruments, Woonsocket, USA), riportato in *figura 4.7*, con le specifiche tecniche (visibili accanto) [150], seguendo le direttive EN 50081-1 e EN 50082-1. Esso è un dispositivo portatile che misura l'intensità luminosa, per stabilire il quantitativo di argento in questo caso specifico. La grandezza misurata è funzione della lunghezza d'onda della radiazione che emessa dal fotodiodo, colpisce il campione e viene rilevata da una fotocellula [151].

La misura ottica si basa sulla legge di Lambert-Beer:

$$A = \varepsilon * l * c$$
, Eq. 19

dove l'assorbanza A è direttamente proporzionale al prodotto tra cammino ottico I e concentrazione molare c. ε, invece, indica il coefficiente di estinzione molare. Il colore giallo dei campioni è dovuto ad una banda di assorbimento intorno ai 400 nm, risultato dei plasmoni in superficie.



SPECIFICATIONS

Range 0.000 to 1.000 mg/L (ppm)

Resolution 0.001 mg/L

Accuracy ± 0.005 mg/L ± 10% of reading

Typical EMC ± 0.001 mg/L

Deviation

Light Source Light Emitting Diode @ 555 nm

Adaptation of the 1-(2-pyridylazo)-2naphtol PAN method. The reaction between silver and reagents causes an orange tint

in the sample

Light Detector Silicon Photocell

Environment 0 to 50°C (32 to 122°F); max 95% RH non-condensing

Battery Type/Life 1 x 9 volt/40 hours

Auto-Shut off After 10' of non-use Dimensions 180 x 83 x 46 mm (7.1 x 3.3 x 1.8")

Weight 290 g (10 oz.).

Figura 4.7a- Spettrofotometro. [F85] Figura 4.7b- Specifiche dello spettrofotometro. [F86]

Sono stati adoperati 4 reagenti (HI 93737**A**-0, HI 93737**B**-0, HI 93737**C**-0 e HI 93737**D**-0) aggiunti, secondo lo schema visibile in *figura 4.8*, a due becher: il primo conteneva 25 ml della soluzione di controllo (in questo caso acqua ultra-pura) ed il secondo aveva al suo interno 25 ml di soluzione campione (acqua di rilascio dopo aver tolto il campione del barattolo).

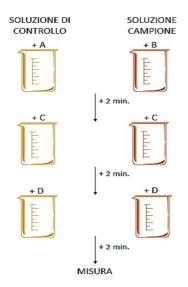


Figura 4.8- Step di somministrazione dei reagenti. [F87]

In un secondo momento è stato applicato un tampone asciutto ai campioni, dopo il rilascio. È stato eseguito ciò per verificare che il rivestimento non si staccasse a seguito dell'immersione e che quindi non lasciasse tracce sul bastoncino di carta cotonato.

4.3.3.2 Misura con spettrometria di massa

Ulteriori campioni sono stati nuovamente posti all'interno di contenitori in presenza di acqua ultra-pura a 37°C per diverso tempo e collocati in una incubatrice Alpha (Bicasa, Bernareggio (MB), Italia). I tempi di rilascio ora considerati sono stati di 24 h, 3d, 7d, 14 d, 21d e 28 d.

Il rilascio di argento è stato valutato questa volta attraverso un dispositivo ICP-MS.

La spettrometria di massa a plasma accoppiato induttivamente è una tecnica analitica molto sensibile, in grado di determinare diverse sostanze inorganiche metalliche e non, presenti in concentrazioni anche molto piccole, quali le parti per miliardo (ppb). Essa combina l'uso di una torcia al plasma ICP, per produrre la ionizzazione, e di uno spettrometro di massa, per la separazione e rivelazione degli ioni prodotti.

I campioni sono introdotti all'interno di un tubo centrale della torcia attraverso un flusso di argon, che funge da carrier. L'analita subisce quindi l'evaporazione della fase liquida, a cui segue la vaporizzazione e l'atomizzazione dei solidi presenti. Gli atomi prodotti

subiscono successivamente la perdita dell'elettrone legato con minore forza, formando ioni con singola carica positiva.

I nebulizzatori sono studiati appositamente per i campioni liquidi, quali ad esempio le soluzioni, ma possono comunque essere adoperati con materiali più densi e semisolidi. La nebulizzazione può essere ottenuta tramite l'utilizzo di diversi dispositivi tra i quali spiccano quelli pneumatici e a ultrasuoni con diverse varianti. L'aerosol prodotto viene spesso trattato in modo da ottenere gocce molto piccole e di dimensione pressoché omogenea facendolo passare in una apposita camera.

L'ablazione laser è un metodo di introduzione del campione utilizzato meno comunemente. In questo metodo un fascio laser viene fatto incidere sul campione creando del materiale ablato che viene introdotto nel plasma. Questo metodo è particolarmente utile nel caso di campioni solidi, anche se la calibrazione con standard può risultare non particolarmente accurata. La tecnica in questo caso si indica con LA-ICP-MS.

L'introduzione avviene tramite la camera di nebulizzazione (spray chamber), della quale esistono varie forme e modelli. Le camere sono raffreddate mediante l'utilizzo di celle di Peltier, che consentono un raffreddamento intorno ai 5 °C che evita la formazione di ossidi e la migliore aspirazione dei componenti organici volatili.

Lo spettrometro di massa effettua la separazione massa/carica degli ioni in condizioni di vuoto. Tale vuoto viene creato e mantenuto da una serie di pompe. Il primo stadio sfrutta comunemente una pompa rotativa, che rimuove la maggior parte del gas e permette di raggiungere pressioni di 133 Pa, mentre quelli successivi sono volti a generare un vuoto ancora più spinto tramite pompe turbomolecolari.

Il fascio di ioni viene guidato. I metodi utilizzati a tale scopo variano in funzione della strumentazione utilizzata. Alcuni utilizzano semplici piatti indirizzanti, mentre altri sfruttano metodi più complessi quali i quadrupoli, esapoli o ottupoli per guidare gli ioni.

Negli ultimi anni i produttori hanno immesso sul mercato molti strumenti che utilizzano una cella di collisione o una cella di reazione dinamica in cui il fascio di ioni viene fatto collidere con dei gas a pressione relativamente bassa. Queste collisioni causano delle reazioni che alterano la natura stessa del fascio ionico, generalmente rimuovendo o

attenuando le interferenze che potrebbero influire sull'analisi. Il campione passa infine verso l'analizzatore massa/carica ed il rivelatore.

La tecnica ICP-MS può essere utilizzata in analisi ambientali di campioni di acqua (o di altro tipo) oppure in test tossicologici, quale la determinazione della concentrazione urinaria di metalli tossici.

È possibile effettuare anche l'analisi elementare, con un intervallo di elementi chimici determinabili compresi tra la massa atomica del litio fino a quella dell'uranio (in teoria tra 7 e 250 unità). Si possono rivelare concentrazioni dell'ordine dei ng/l. Diversamente dall'assorbimento atomico, che può misurare un solo elemento per volta, la ICP-MS consente invece la determinazione simultanea degli elementi con il conseguente vantaggio di velocizzare tale tipo di analisi [152].

4.3.4 Tape test

Il tape test è un tipo di analisi distruttiva il cui scopo è valutare l'adesione del rivestimento al substrato, applicando e rimuovendo in un secondo momento un nastro adesivo su una griglia incisa sul campione [153].

Secondo la norma ASTM D3359-97, è possibile svolgere il test il due modi:

- Modo A: si incide dapprima una "X" sul campione; si applica poi il nastro, facendo in modo che aderisca bene sulla superficie e si stacca in un secondo momento, al fine di vedere quanto del rivestimento è rimasto su di esso;
- 2. Modo B: si incide una griglia sul materiale, su cui si applica anche in questo caso il nastro; una volta rimosso si valuta cosa è rimasto sullo stesso [153].

Una volta effettuata l'incisione su una delle due metà del campione, si toglie l'eventuale polvere rimasta con una spatola e si applica il nastro. Una volta rimosso secondo un angolo il più vicino possibile a 180°, il risultato è confrontato con la tabella, visibile in *figura 4.9*, la quale classifica l'aderenza in una scala da 1 a 5.

Tale metodica è semplice e rapida ma può avere una moderata variabilità legata all'operatore. Il nastro dovrebbe essere rimosso il più vicino possibile a 180° ed in maniera rapida: se l'angolo varia, la forza richiesta muta anche di una notevole quantità. [153].

Nel presente lavoro il tape test è stato eseguito secondo il metodo B ed il risultato è stato confrontato con la tabella, visibile in *figura 4.9*.

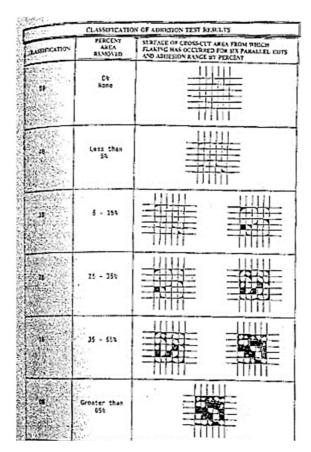


Figura 4.9- Tabella di confronto per i risultati. [F88]

4.3.5 Microscopio a scansione elettronica (SEM)

Il SEM è un tipo di microscopio elettronico ed in quanto tale, non sfrutta la luce come sorgente di radiazioni, ma un fascio di elettroni primari focalizzati che colpiscono il campione. Il fascio è generato da una sorgente elettronica e passa poi attraverso una serie di lenti elettromagnetiche e viene deflesso da una lente obbiettivo. Quest'ultima,

oltre a rifocalizzare ulteriormente il fascio, impone allo stesso una deflessione controllata, in modo da permettere la scansione di tutte le aree del campione. Il SEM opera in vuoto spinto (con pressioni inferiori a 10^{-3} Pa), per cui il campione deve essere posto su uno stub, una base conduttiva, in modo da poter allontanare dalla zona di analisi ogni possibile accumulo di carica che renderebbe impossibile l'osservazione. Campioni non conduttivi possono comunque essere osservati al SEM operando rivestimenti metallici nanometrici, ad esempio in cromo, il quale non interagisce con il substrato analizzato. Il microscopio, illustrato in *figura 4.10*, si rivela fondamentale per comprendere la morfologia della superficie e consente di avere un primo di feedback del rivestimento antibatterico.

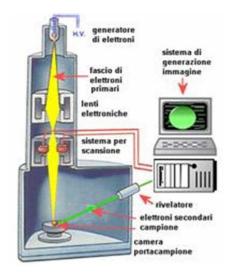


Figura 4.10- Schematizzazione di un SEM. [F89]

La sorgente elettronica, adoperata nel SEM e definita alternativamente *Gun*, genera il fascio tramite estrazione di elettroni e accelerazione degli stessi. La maggior parte delle sorgenti di questo tipo funzionano per effetto termoionico, con poche eccezioni (esistono anche quelle che fruttano fenomeni quantistici come l'emissione di campo).

Le sorgenti sono comunemente caratterizzate da una serie di grandezze che ne misurano le prestazioni e le capacità:

- d_0 (è il diametro del fascio all'estrazione. La risoluzione sarà maggiore tanto più piccolo è il d_0 .);
- ΔE_{est} (è la massima differenza di energia degli elettroni estratti. Valori elevati possono portare ad aberrazioni cromatiche dopo focalizzazione.);
- *B* (brillanza, parametro legato all'intensità del fascio. Talvolta valori elevati possono portare a fenomeni di rifrazione.).

I vari tipi di sorgenti e le loro caratteristiche peculiari sono riassunte in tabella 4.4.

Tabella 4.5- Sorgenti adoperate all'interno dei microscopi SEM. [T17]

Sorgente	Caratteristiche	d ₀ [μm]	ΔE_{est} [eV]	B [A·cm ⁻² ·srad ⁻¹]
Termoionica in W	È composta da un filamento di tungsteno. Ha prestazioni medio-basse ma costi ridotti.	20-30	1-3	0.3-2*105
Termoionica in Lab6	È costituita da un monocristallo in esaboruro di lantanio, il quale consente di ottenere una risoluzione più elevata della sorgente precedente, oltre che brillanza e vita media maggiori. Forma una corrente elettronica, capace di generare raggi x caratteristici per effettuare microanalisi chimiche. Richiede però un vuoto più spinto di almeno 10-6 mbar.	10-20	0.5-2	1-10*10 ⁵
Puntuale fredda FE	Ha prestazioni superiori rispetto alle sorgenti termoioniche; richiede però pressioni estremamente basse (<10 ⁻⁸ Pa) non supportabili strutturalmente da tutti i sistemi. È caratterizzata da una punta in tungsteno con geometria a cuspide e un raggio di raccordo estremamente piccolo. Risente di instabilità nell'emissione, rendendola poco adatta alla microanalisi.	0.002 - 0.005	0.2-0.5	10 ⁸ -10 ⁹
Puntuale termica FE	Sfrutta entrambi gli effetti. Ha prestazioni inferiori alla cold FE, ma ha elevate correnti di fascio, permettendo un'elevata efficienza in microanalisi.	0.025 -0.05	0.5	10 ⁷ -10 ⁸

Per quanto riguarda le lenti elettromagnetiche, esse sono costituite da un pezzo toroidale avvolto da spire che creano un campo magnetico in grado di interagire e deflettere gli elettroni del fascio. Tra l'una e l'altra sono interposte delle aperture, che filtrano gli elettroni riducendo le dimensioni del fascio. L'ultima, che funge da obbiettivo, è caratterizzata da un sistema di bobine che permette la deflessione dell'asse del fascio, realizzando la scansione.

Le interazioni tra elettrone e campione vengono lette da appositi rivelatori. A seconda della natura dello stesso, energia e lunghezza d'onda permettono di ricavare informazioni utili all'analisi del campione. Il risultato è un'immagine in bianco e nero ad elevata risoluzione e grande profondità di campo, che ha caratteristiche simili a quelle di una normale immagine fotografica. Per questa ragione le immagini SEM sono immediatamente intelligibili ed intuitive da comprendere; appaiono inoltre quasi tridimensionali anche quando ritraggono oggetti relativamente grandi.

Tenuto conto che si hanno molteplici tipologie di elettroni emessi dalla superficie in esame, all'interno dei SEM convenzionali, l'osservazione del campione può avvenire principalmente in due modalità: per rilevazione degli elettroni secondari o per rivelazione di quelli retrodiffusi.

La rivelazione degli elettroni secondari permette un'osservazione ad alta risoluzione del campione. Il ristretto volume di interazione consente una risoluzione fino a 5 nm, con una profondità di campo elevata, la quale permette di mettere a fuoco superfici fortemente rugose e tridimensionali. Ciò permette l'osservazione di campioni massivi tridimensionali sia ad alti che a bassi ingrandimenti, creando immagini con una forte tridimensionalità.

Nel momento in cui il volume di provenienza possieda elevate dimensioni, l'osservazione risulta di scarsa risoluzione. Tuttavia, l'interazione tramite elettroni retrodiffusi consente di differenziarli in funzione del numero atomico Z, con cui gli stessi atomi hanno interagito. Sul monitor le fasi con Z più elevato compariranno più chiare, mentre quelle costituite da atomi con Z più piccolo più scure; così facendo è possibile riconoscere le diverse fasi e costituenti del campione, con una perdita rilevante di risoluzione e della tridimensionalità dell'immagine fornita dall'osservazione degli elettroni secondari [159].

Attraverso la spettroscopia a dispersione di energia (EDS) è inoltre possibile identificare la composizione elementale dei materiali. Poiché il fascio di elettroni del FE-SEM, adoperato per scansionare la superficie del campione, comporta la fluorescenza a raggi X degli atomi presenti in esso, l'energia di ogni fotone è caratteristica dell'elemento che lo ha prodotto. Il sistema di microanalisi EDS rileva i raggi X e li identifica per energia, contrassegnando automaticamente gli elementi responsabili dei picchi di questa distribuzione. In genere i dati EDS vengono confrontati con gli standard noti o generati dal computer per produrre un'analisi quantitativa completa che mostri la composizione del campione. È inoltre possibile produrre mappe delle distribuzioni degli elementi su aree di interesse e tabelle di composizione semiquantitativa [155].

I campioni, sulle cui superfici era stato svolto parzialmente il tape test, sono stati poi esaminati dal FE-SEM Merlin (Zeiss, Oberkochen, Germania). Nonostante i substrati fossero metallici, è quindi composti da materiali conduttivi, data la natura non conduttiva

dei loro rivestimenti, sono stati rivestiti con un sottile strato di cromo, di spessore, pari a 7 nm. Tramite un EDS è stato poi possibile ottenere informazioni sulla composizione chimica. È stata adoperata per avere la conferma della presenza di argento all'interno della matrice ed il quantitativo dello stesso.

4.3.6 Diffrazione a raggi X

La tecnica della diffrazione di raggi X si basa sullo scattering elastico coerente: il fenomeno macroscopico della diffrazione nasce infatti dalla somma coerente di tutte le onde elettromagnetiche diffuse dagli atomi che si trovano lungo una stessa famiglia di piani reticolari. Per manifestarsi, richiede la presenza di un ordine reticolare, come si ha ad esempio nei cristalli.

A seconda della natura del campione sotto esame si divide in diffrazione su cristallo singolo (SC-XRD, single crystal X-ray diffraction) e diffrazione di polveri (XRPD, X-ray powder diffraction). La prima tecnica è in grado di dare informazioni tridimensionali sulla densità elettronica e sui moti termici di ogni atomo che costituisce il cristallo: tuttavia, la difficoltà di ottenere cristalli singoli e la complessità dell'analisi dei dati la rendono una tecnica non routinaria. È perciò più diffusa la XRPD, molto più veloce ed economica, che permette di quantificare le varie componenti di un campione solido, e di ricavare anche informazioni sulla struttura cristallina e sulla dimensione dei cristalliti [156].

In generale, entrambe le tecniche possono in linea di principio fornire le seguenti informazioni, mostrate in *tabella 4.6*:

Tabella 4.6- Tabella che riassume i risultati caratteristici di ogni tecnica. [T18]

SC-XRD	XRPD
Caratteristiche dell'unità di ripetizione de (costanti reti	
Gruppo spaziale della sostanza (anche s	se è più difficile nel caso di XRPD).
Connettività chimica dell'unità asimm strutturale che nessuna operazione d l'identità, può rimand	i simmetria del cristallo, tranne
Moto termico degli atomi o ioni (molto p	oiù dettagliato nel caso di SC-XRD).

L'analisi della densità degli elettroni (solo se i dati di diffrazione sono di ottima qualità).	Il riconoscimento e lo studio quantitativo delle fasi del campione.
Lo studio dettagliato di transizioni di fase (a livello dello spostamento di singoli atomi).	Lo studio della granulometria del campione.
In condizioni molto favorevoli, lo studio di reazioni chimiche che avvengono in stato solido.	Lo studio di transizioni di fase che riguardino grandi variazioni strutturali.

La presenza di nanocluster d'argento metallici e/o di altre fasi cristalline può essere rilevata mediante diffrazione di raggi X [111].

Le analisi in laboratorio sono state condotte in modalità angolo radente sui rivestimenti delle tre diverse tipologie depositate sul substrato di acciaio, considerato come modello.

4.3.7 Potenziale zeta

Il potenziale zeta, o potenziale elettrocinetico (indicato come potenziale ζ) è il potenziale generato in seguito alla formazione di un doppio strato elettrico. Esso è responsabile dei fenomeni elettrocinetici e della stabilità dei colloidi [157].

Il comportamento di carica all'interfaccia solido-liquido sono spiegati, adoperando il modello del doppio strato elettrico o elettrochimico, visibile in *figura 4.11*.

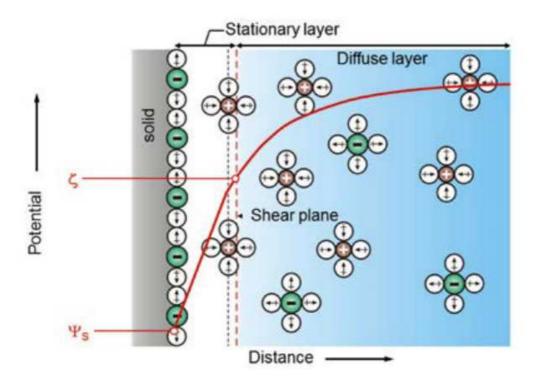


Figura 4.11 - Modello Electrochemical Double Layer (EDL), adoperato per la caratterizzazione del potenziale zeta. [F90]

A contatto con una soluzione acquosa, una superficie solida sviluppa una carica superficiale, che dipende dai gruppi funzionali che essa espone. La superficie solida caricata provoca una distribuzione di carica interfacciale diversa dalla distribuzione della carica nella fase liquida. La carica superficiale dà ulteriore aumento ad un potenziale superficiale, che decade con la crescente distanza dalla superficie solida. Il modello EDL distingue tra uno strato stazionario e uno strato diffuso mobile, che consente di compensare la carica superficiale. Il cosiddetto modello Stern può essere esteso da una sottostruttura dello strato stazionario, cioè dai piani di Helmholtz interni ed esterni. Poiché però il potenziale zeta è definito come il potenziale all'esterno dello strato stazionario (cioè tra questo e lo strato mobile), la sua sottostruttura può essere trascurata. Il limite, noto come "piano di taglio", indica la posizione dello scivolamento della fase liquida in movimento rispetto alla fase liquida stazionaria durante la misurazione elettrocinetica. La sua posizione al largo della superficia solida è responsabile del potenziale zeta e dipende sia dal potenziale superficiale (carica superficiale) che dalle proprietà del liquido (quali il pH ad esempio) [158].

Facendo scorrere una soluzione acquosa attraverso un sistema capillare, viene generata una risposta elettrica. A seconda dell'elettronica di misura corrispondente, questa risposta può essere rilevata come una tensione CC (potenziale di streaming) o una corrente continua (corrente di streaming).

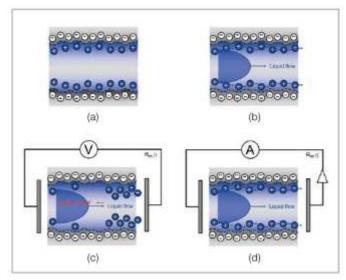


Figura 4.12-Schema di come avviene la misura nelle due modalità. [F91]

Un capillare tra superfici solide viene riempito con una soluzione acquosa, come mostrato in *figura 4.12* (a). Al contatto dell'acqua con il materiale solido, viene generata una carica superficiale ed immediatamente compensata da ioni di carica opposta (controioni) nella soluzione acquosa. Un equilibrio di questo doppio strato elettrochimico è un requisito per una misurazione affidabile del potenziale di streaming. Durante lo scorrimento della soluzione acquosa attraverso il capillare, le forze di taglio agiscono sui controioni, compensando la carica superficiale e spostano questi nella direzione del flusso di liquido, come mostrato in *figura 4.12*(b).

Per la misurazione del potenziale di streaming, viene utilizzato un circuito elettronico con un'elevata resistenza interna. Si ottiene una separazione di carica tra l'ingresso e l'uscita del capillare che determina la pressione, come visibile in *figura 4.12*(c); essa introduce una forza elettrica che contrasta il flusso del liquido. Si ha una corrente di ritorno delle cariche, che compensa parzialmente quella nella direzione del flusso. La separazione netta della carica porta ad una differenza di potenziale elettrico, rilevata tra gli elettrodi situati su entrambe le estremità del capillare.

Per la misurazione della corrente viene applicato un circuito elettronico differente con una bassa resistenza interna. Il flusso della soluzione acquosa di nuovo provoca movimenti nelle cariche, che vengono spostate verso l'elettrodo all'uscita del capillare, come mostrato in *figura 4.12*(d). Provocano una corrente elettrica; all'interfaccia dell'elettrodo viene misurata la cosiddetta corrente di streaming [158].

La separazione di carica e quindi il potenziale e la corrente di streaming dipendono dalla velocità di taglio all'interfaccia solido-liquido, che è determinata dalla dimensione del capillare e dalla portata volumetrica della soluzione acquosa. Il numero di ioni presenti nella soluzione acquosa (determinato dalla forza ionica, concentrazione di soluto o conducibilità elettrolitica) influisce sulla formazione della separazione di carica e quindi sulle grandezze in uscita. A bassa resistenza ionica, sono disponibili meno ioni per sostituire le cariche, mentre a valori maggiori si ottiene solo una piccola separazione di carica e la forza elettrica che introduce la corrente di ritorno si avvicina alla forza meccanica del flusso di liquido. Infine, la geometria del capillare può influenzare il potenziale e la corrente di streaming.

Per i solidi con una superficie piana viene comunemente applicata la modalità di misurazione tangenziale. Due campioni sono montati uno di fronte all'altro con le superfici piane di fronte al canale di streaming, cioè una fessura capillare.

Le equazioni fondamentali che correlano i fenomeni elettrocinetici del potenziale di streaming e la corrente di streaming al potenziale zeta sono state derivate da Hermann von Helmholtz e Marjan von Smoluchowski. Per i materiali solidi con una superficie planare, si applica l'equazione seguente, per il calcolo del potenziale zeta:

$$\zeta = \frac{\mathrm{dI}_{\mathrm{str}}}{\mathrm{d}\Delta p} \times \frac{\eta}{\varepsilon \times \varepsilon_0} \times \frac{L}{A}.$$
 Eq. 20

Qui il coefficiente di corrente di flusso misurato $dI_{str}/d(\Delta p)$ è correlato alla costante L/A del canale (il divario tra i campioni solidi adiacenti): L è la lunghezza del canale di fessura rettangolare formata tra due superfici piane ed A è la sua sezione trasversale, A = W x H, con larghezza del canale W e altezza del gap H. η e (ϵ x ϵ_0) rappresentano la viscosità ed il coefficiente dielettrico dell'elettrolita.

La corrente nell'eq. 20 può essere sostituita dal potenziale di flusso utilizzando la legge di Ohm, risultando quindi:

$$\zeta = \frac{dU_{str}}{d\Delta p} \times \frac{1}{R} \times \frac{\eta}{\epsilon \times \epsilon_0} \times \frac{L}{A}$$
 Eq. 21

dove R è la resistenza all'interno del canale.

L'applicazione dell'approccio HS (Helmholtz e Smoluchowski) richiede una conoscenza esatta della geometria del canale, cioè la costante di cella L/A. L'altezza del gap H per la fessura rettangolare è calcolata dalla portata del volume misurato del liquido che passa attraverso il canale e dalla pressione differenziale generata. In pratica il potenziale zeta di campioni planari di geometria nota deve essere calcolato solo dallo attraverso la modalità di corrente, poiché:

- o richiede un solo parametro misurato ($dI_{str}/d\Delta p$) invece di due ($dU_{str}/d\Delta p$, R), che riduce la misurazione;
- o In caso di campioni conduttori di elettricità (come i metalli), viene influenzata la misura della resistenza cellulare R [162].

Sono state condotte misure di potenziale zeta su campioni dei tre rivestimenti in studio. È stato considerato l'acciaio come substrato modello; la misura dovrebbe risultare indipendente dal substrato in quanto interessa solo i primi strati superficiali del materiale. Lo strumento utilizzato per le misure è l'analizzatore elettrocinetico Surpass (Anton PaarTM, Graz, Austria), che è mostrato in *figura 4.13*. le misure sono state effettuate con titolazione dell'elettrolita (KCl 0.001 M) mediante aggiunta di HCl 0.05M e NaOH 0.05M, per pH acido e basico rispettivamente, mediante l'unità di titolazione automatica dello strumento. Le misure forniscono l'andamento del potenziale zeta in funzione del pH e il punto isoelettrico, cioè il pH in cui la densità di carica elettrocinetica assume 0 C/m² e quindi $\zeta = 0$ mV.

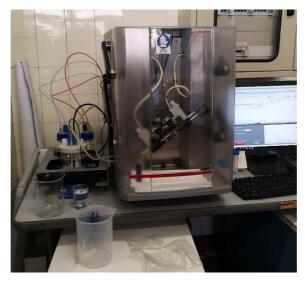


Figura 4.13- Dispositivo adoperato in laboratorio per la misurazione del potenziale zeta. [F92]

4.3.8 Test antibatterico

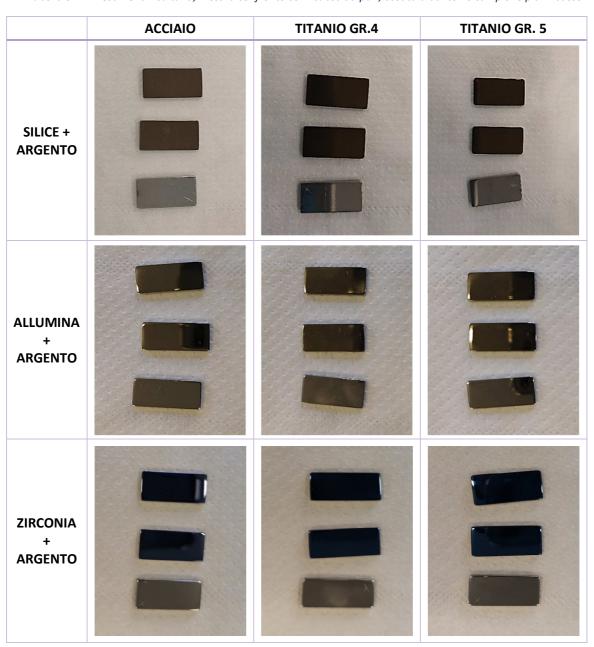
Per valutare le proprietà antibatteriche, alcuni campioni sono stati sottoposti al test dell'alone di inibizione, in accordo con il National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS M2-A9). Sono stati testati batteri.

Capitolo 5. Risultati

5.1 Osservazioni macroscopiche

In *tabella 5.1* è mostrato l'aspetto macroscopico dei rivestimenti ottenuti, confrontati con i substrati puri, costituiti dai campioni collocati più in basso.

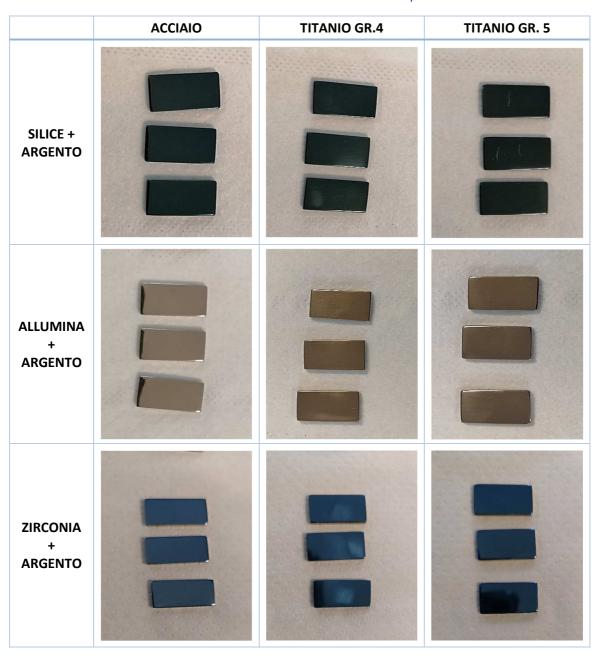
Tabella 5.1- Rivestimenti risultanti, messi a confronto con i substrati puri, costituiti dal terzo campione più in basso.



Visivamente i campioni presentano colorazione diversa, in base alla matrice adoperata. La zirconia ad esempio comporta un colore bluastro, mentre rimane sulle tonalità del marrone, più o meno marcata, negli altri casi.

Vengono di seguito riportati i rivestimenti svolti durante la seconda deposizione, effettuati con gli stessi parametri dei precedenti.

Tabella 5.2- Rivestimenti risultanti dalla seconda deposizione.



I rivestimenti, visibili in *tabella 5.2*, nominalmente identici ai precedenti, possiedono colorazioni leggermente diverse, nel caso della silice. Si passa infatti dal marrone al verdeblu della seconda deposizione: probabilmente ciò è dovuto ad effetti di riflessione della luce. Anche l'allumina presenta una tonalità leggermente diversa, rispetto ai campioni della tornata precedente, portando ad un grigio caldo-marrone. La zirconia pare invece immutata.

5.2 Bagnabilità

Nelle seguenti *figure 5.1, 5.2* e *5.3* sono mostrati i grafici che illustrano la differenza di angolo di contatto, prima e dopo il rivestimento. Il controllo adoperato nei tre casi è il medesimo e viene ripetuto per 3 volte al fine di ottenere un confronto diretto.

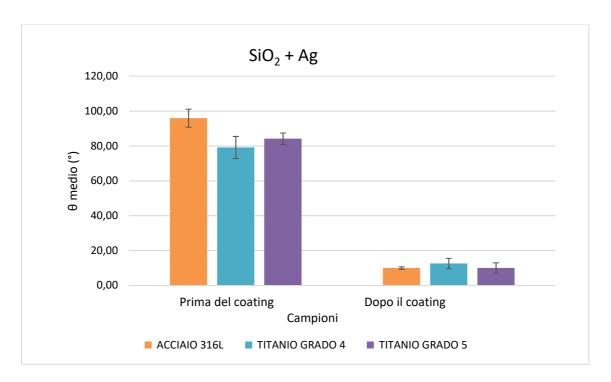


Figura 5.1- Grafico che illustra l'angolo di contatto, misurato prima e dopo il rivestimento in silice ed argento.

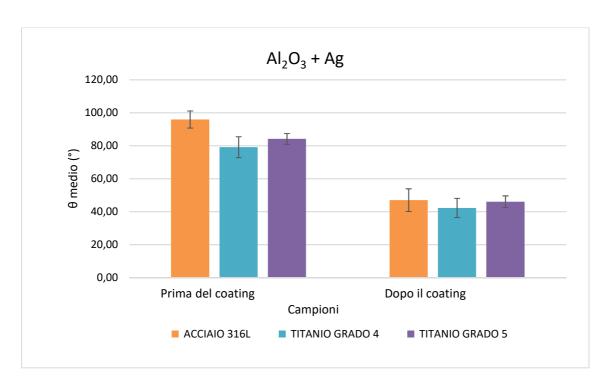


Figura 5.2- Grafico che illustra l'angolo di contatto, misurato prima e dopo il rivestimento in allumina ed argento.

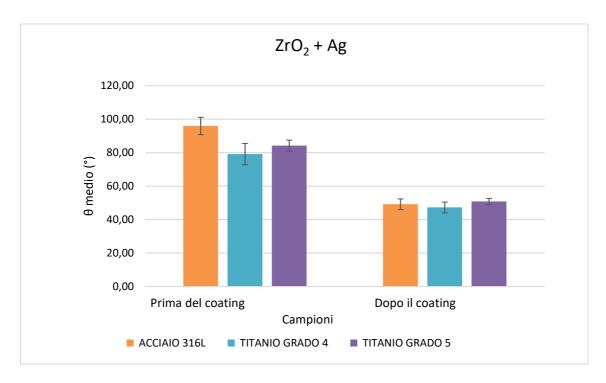


Figura 5.3- Grafico che illustra l'angolo di contatto, misurato prima e dopo il rivestimento in zirconia ed argento.

I risultati confermano quanto visto in letteratura da Meng et al. [112], che riporta studi su film nanostrutturati Ag-TiO₂ (con frazione in volume d'argento pari a 0-40%) depositati su substrati di silicio e quarzo mediante magnetron sputtering: si può notare infatti per tutti i

campioni una netta diminuzione del valore dell'angolo di contatto, dovuta alla presenza del rivestimento ed in particolar modo all'argento. Ciò comporta una netta idrofilicità delle superfici, a fronte di una idrofobicità non eccessiva dei campioni iniziali. Tale differenza è più notevole in particolar modo nel caso della silice, con la quale si raggiungono valori medi finali pari a 10° , per via della presenza di gruppi ossidrili sula superficie; in presenza di allumina e zirconia la diminuzione è evidente, ma meno netta (Δ =44°, rispetto al Δ =76° della silice).

La maggior idrofilicità ottenuta si può considerare promettente in merito al comportamento delle superfici rispetto all'adesione batterica, in quanto, è riportato in vari studi [15] [17] che l'idrofobicità consente un miglior attecchimento dei microrganismi, per via del legame che si instaura con la superficie; il fenomeno risulta ridotto nel momento in cui l'angolo di contatto diminuisce.

5.3 Rugosità

Le *figure 5.4, 5.5* e *5.6* illustrano la differenza di rugosità superficiale, prima e dopo il rivestimento, nel caso dei tre substrati. Sono indicate sia le misure parallele al lato lungo che quelle parallele al lato corto.

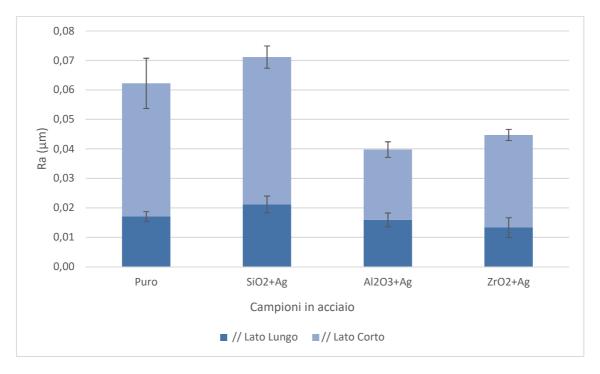


Figura 5.4- Grafico che illustra la rugosità, misurata prima e dopo i rivestimenti, sui campioni di acciaio.

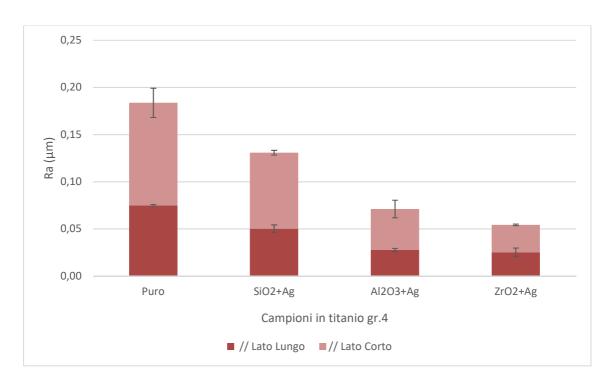


Figura 5.5- Grafico che illustra la rugosità, misurata prima e dopo i rivestimenti, sui campioni di titanio grado 4.

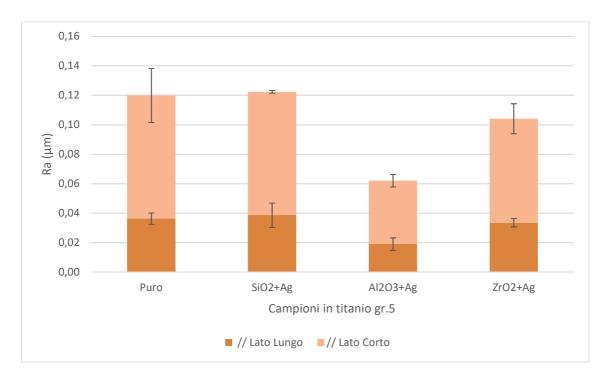


Figura 5.6- Grafico che illustra la rugosità, misurata prima e dopo i rivestimenti, sui campioni di titanio grado 5.

I valori di rugosità dei campioni rivestiti sono in tutti i casi analoghi o inferiori rispetto a quelli dei substrati. Nella silice si notano differenze poco rilevanti; le più elevate si attestano a riduzioni del 33% e del 26%, rispettivamente per i campioni testati parallelamente al lato corto ed al lato lungo di titanio di grado 4.

Allumina e zirconia presentano, invece, andamenti simili. La prima ha notevoli riduzioni di rugosità (il valore massimo è constatato per il titanio grado 4), soprattutto per quanto riguarda la misura parallela al lato corto, mentre la seconda presenta diminuzioni meno importanti sui campioni di acciaio e di titanio di grado 5 (il titanio commercialmente puro continua a presenta un divario maggiore, pari al 66% e al 73%, nei due casi). In tutti i casi la rugosità media risulta inferiore a $0.2~\mu m$, valore riportato in letteratura come limite per non indurre un aumento dell'adesione batterica [9]. Inoltre, tale valore rientra nel range riportati per garantire una certa adesione cellulare (poiché è compreso tra i 200-2000 nm e i $2~\mu m$ [47].). Questi risultati evidenziano come i campioni rientrino perfettamente nei range, definiti in fase di programmazione del lavoro in termini di rugosità superficiale.

5.4 FESEM

Sono di seguito riportati i risultati ottenuti con il FESEM. In prima battuta vengono mostrate le immagini, che illustrano la morfologia del coating a diversi ingrandimenti.

Tabella 5.3- Immagini al FESEM a diversi ingrandimenti per quanto riquardi i campioni in acciaio rivestiti con silice.

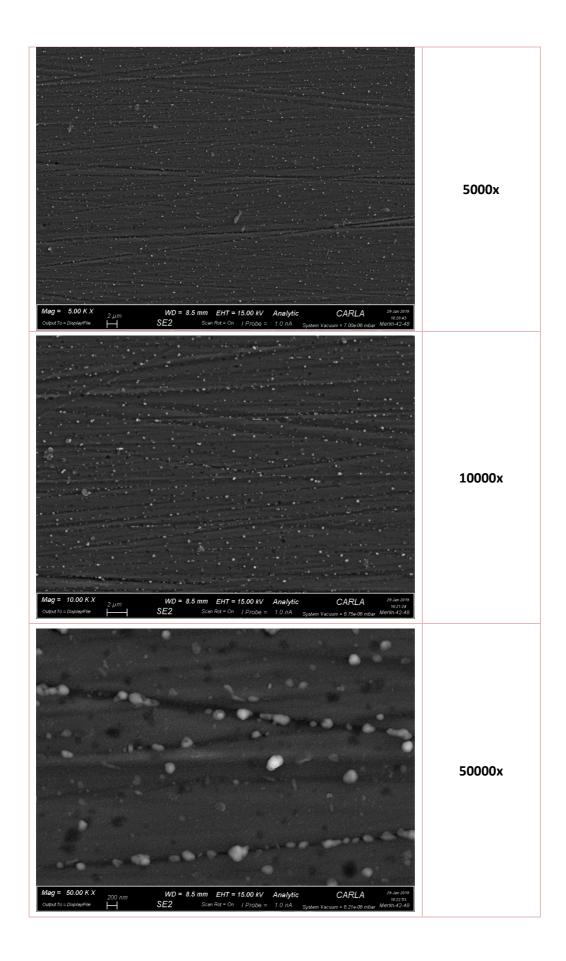
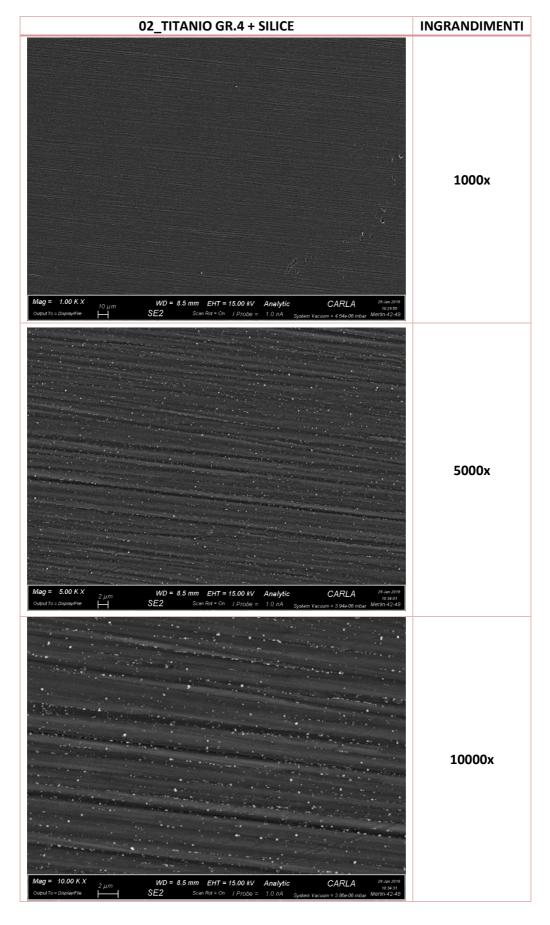


Tabella 5.4- Immagini al FESEM a diversi ingrandimenti per quanto riguardi i campioni di titanio grado 4 rivestiti con silice.



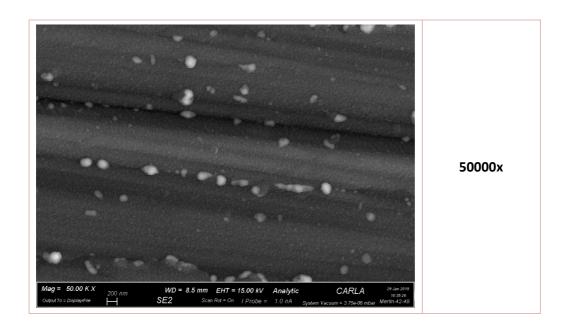
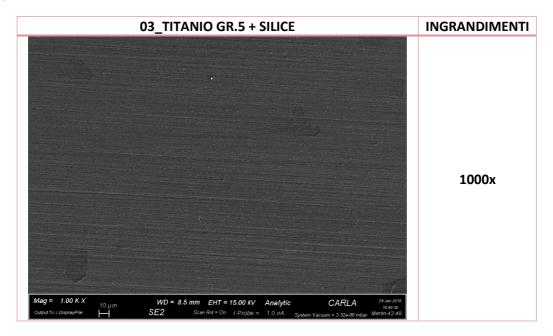
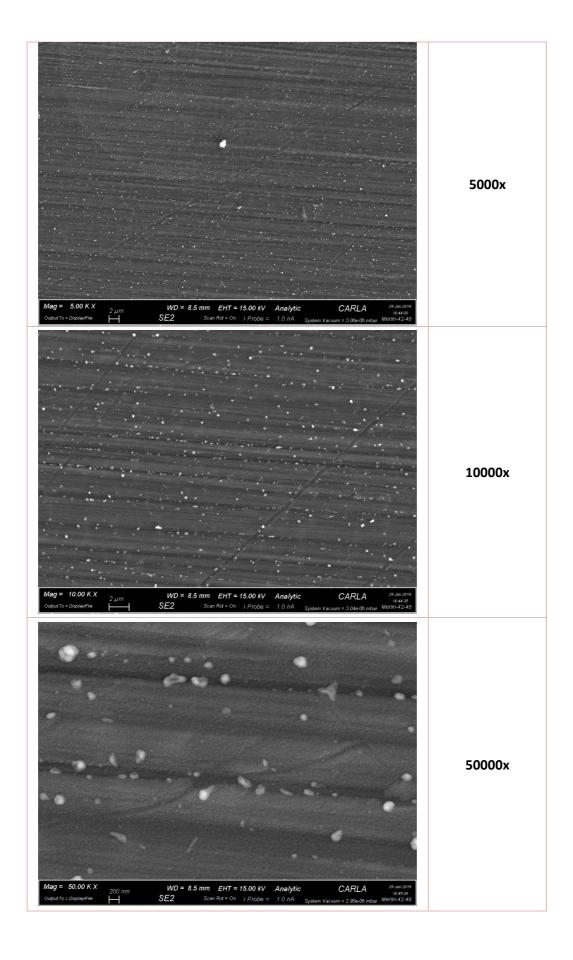


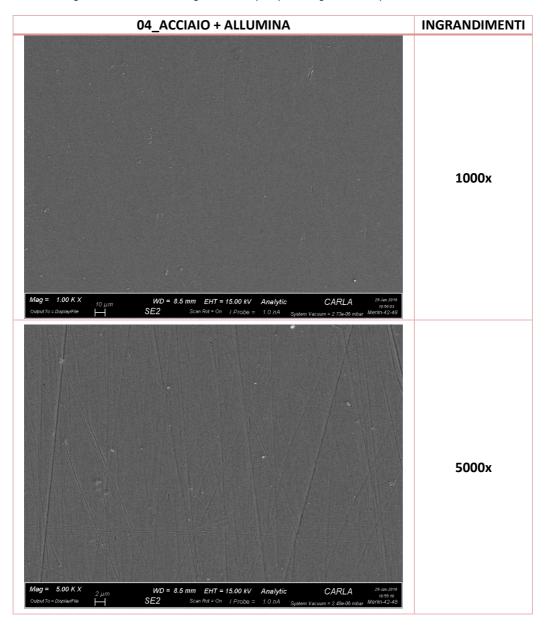
Tabella 5.5- Immagini al FESEM a diversi ingrandimenti per quanto riguardi i campioni di titanio grado 5 rivestiti con silice.





Le *tabelle 5.3, 5.4 e 5.5* mostrano le immagini al SEM dei rivestimenti a base di silice, depositati sui tre substrati. Ad ingrandimenti di 50000x, ma fin dai 5000x, si possono osservare dei precipitati chiari attribuibili a nanoclusters di argento (poi confermato dalle analisi EDS, presenti del *capitolo 5.4.1*). Essi appaiono ben distribuiti all'interno della matrice. Il coating appare simile a quello esaminato (del medesimo tipo su acciaio) in uno studio di Ferraris et al. [118], nel quale sono ben visibili le nanoparticelle di argento inglobate all'interno del rivestimento.

Tabella 5.6- Immagini al FESEM a diversi ingrandimenti per quanto riguardi i campioni in acciaio rivestiti con allumina.



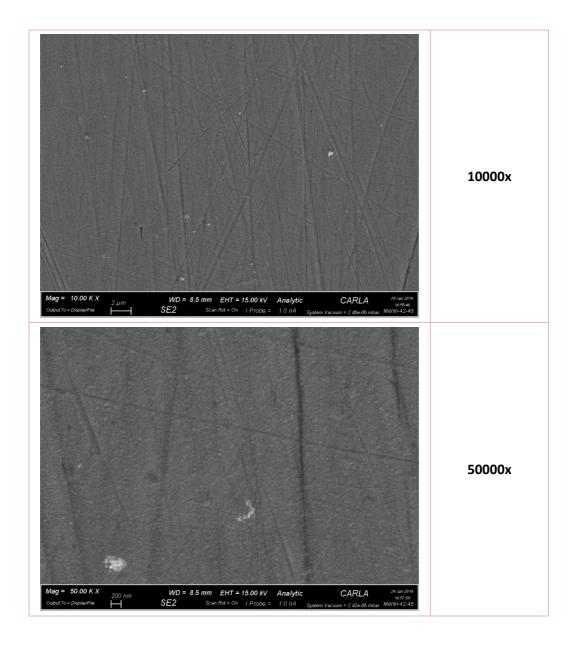
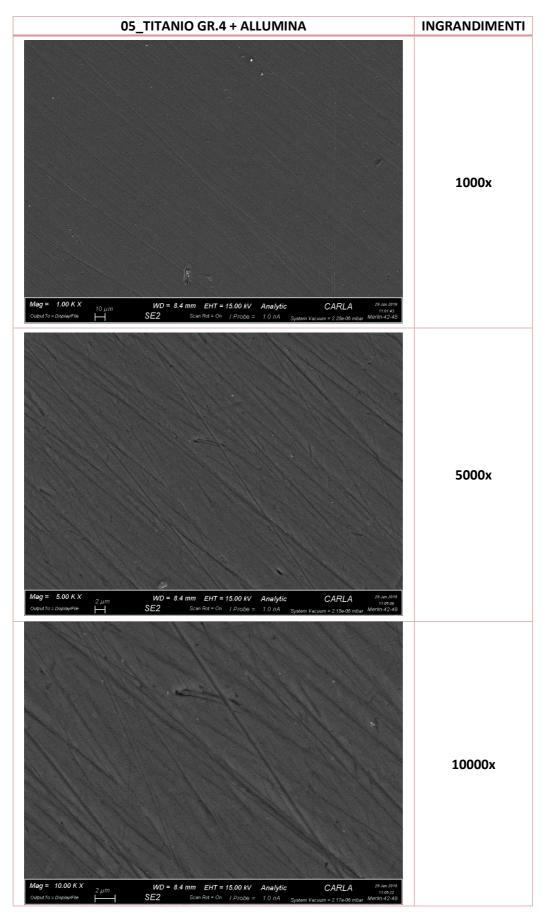


Tabella 5.7- Immagini al FESEM a diversi ingrandimenti per quanto riguardi i campioni in titanio grado 4 rivestiti con allumina.



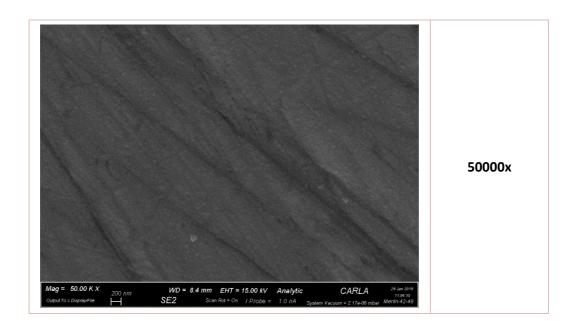
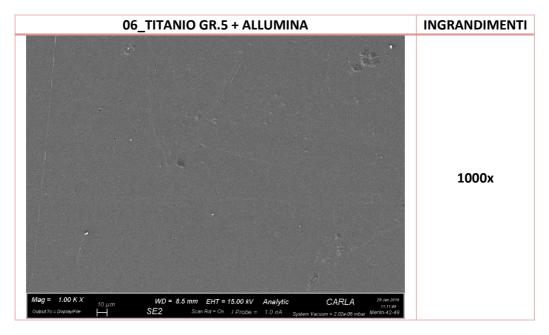
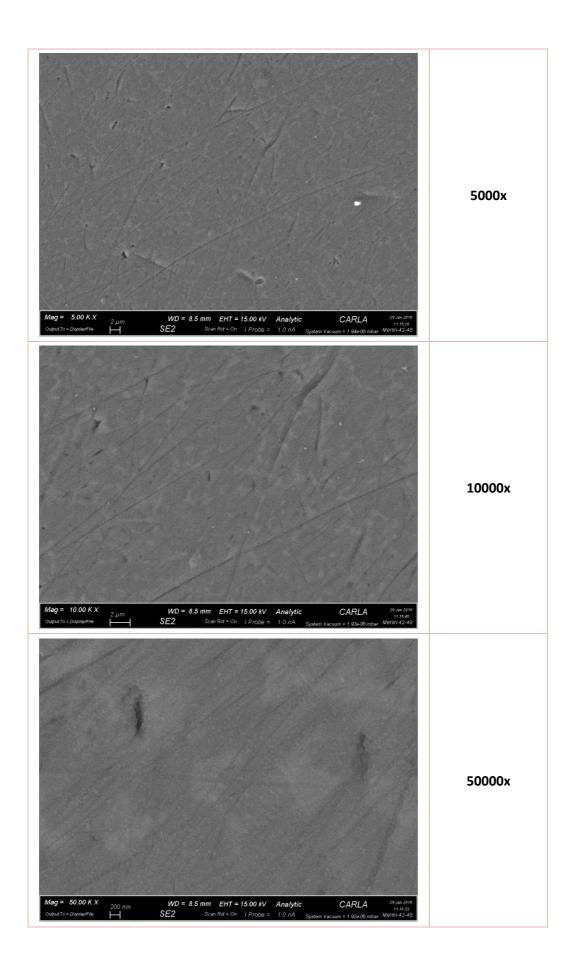


Tabella 5.8- Immagini al FESEM a diversi ingrandimenti per quanto riguardi i campioni in titanio grado 5 rivestiti con allumina.

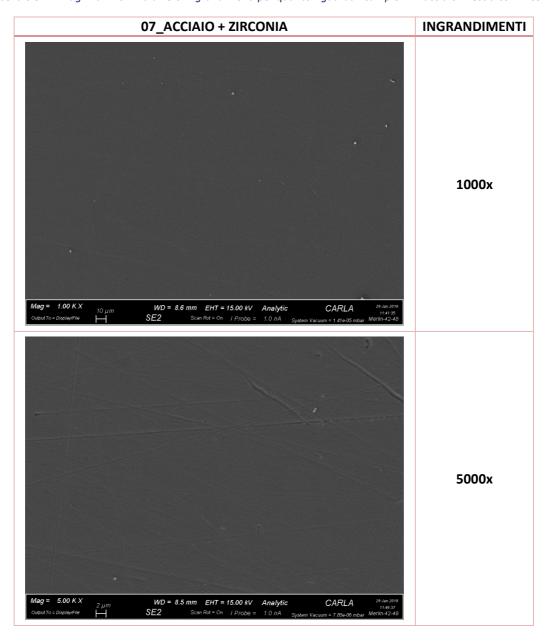




Nelle *tabelle 5.6, 5.7* e *5.8*, che presentano le immagini al SEM dei rivestimenti a base di allumina, mostrano risultati ben diversi: il coating appare abbastanza omogeneo e non mostra chiaramente la presenza di nanocluster, anche a 50000x. In particolar modo qualche agglomerato più chiaro è visibile su acciaio e titanio di grado 4, mentre nell'ultimo caso non si nota quasi nulla.

Dalle *Tabelle 5.9, 5.10* e *5.11*, è riscontrabile un andamento simile anche nel caso della zirconia. È presente qualche agglomerato più evidente sono nel caso del titanio 4, mentre sugli altri due substrati si nota poco.

Tabella 5.9- Immagini al FESEM a diversi ingrandimenti per quanto riguarda i campioni in acciaio rivestiti con zirconia.



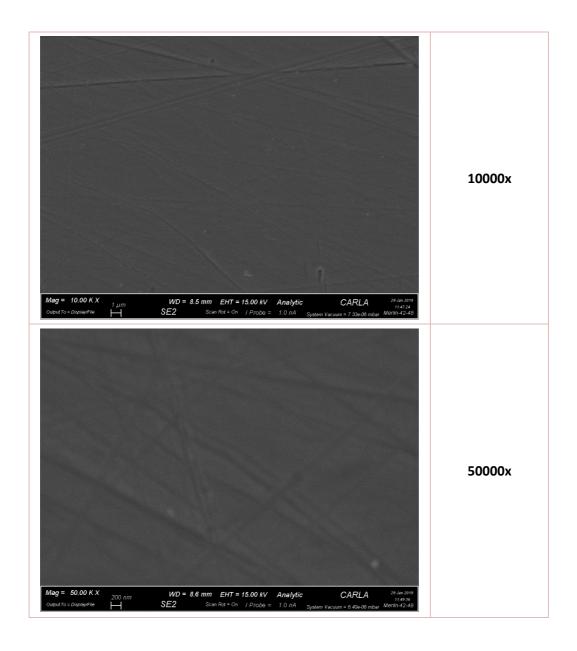
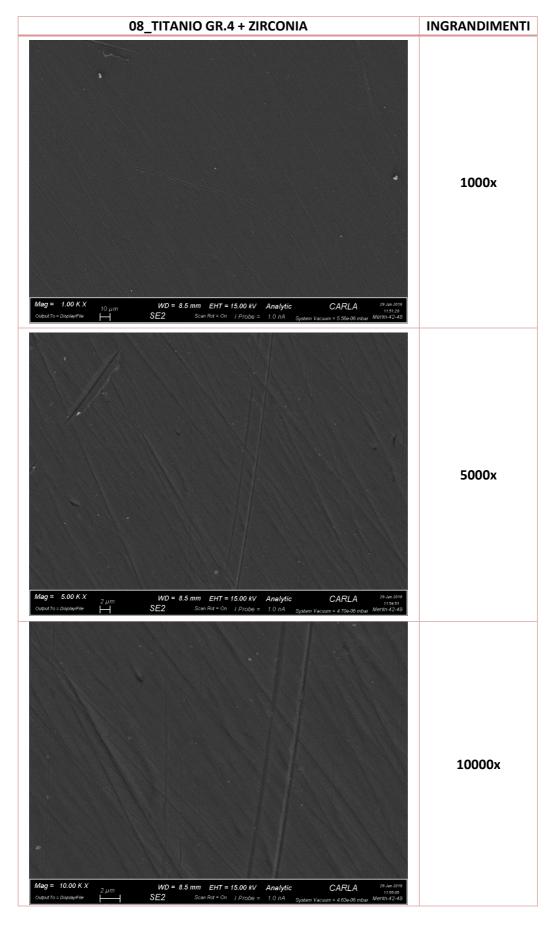


Tabella 5.10- Immagini al FESEM a diversi ingrandimenti per quanto riguarda i campioni in titanio grado 4 rivestiti con zirconia.



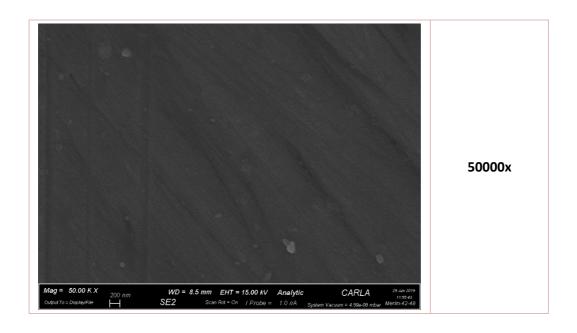
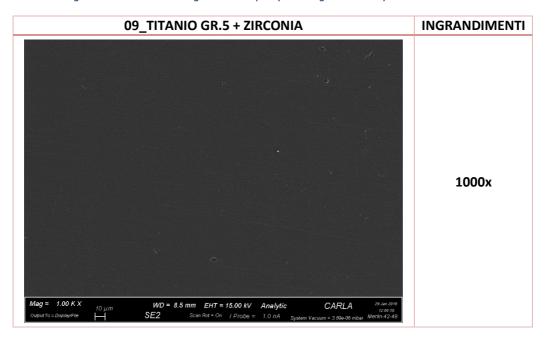
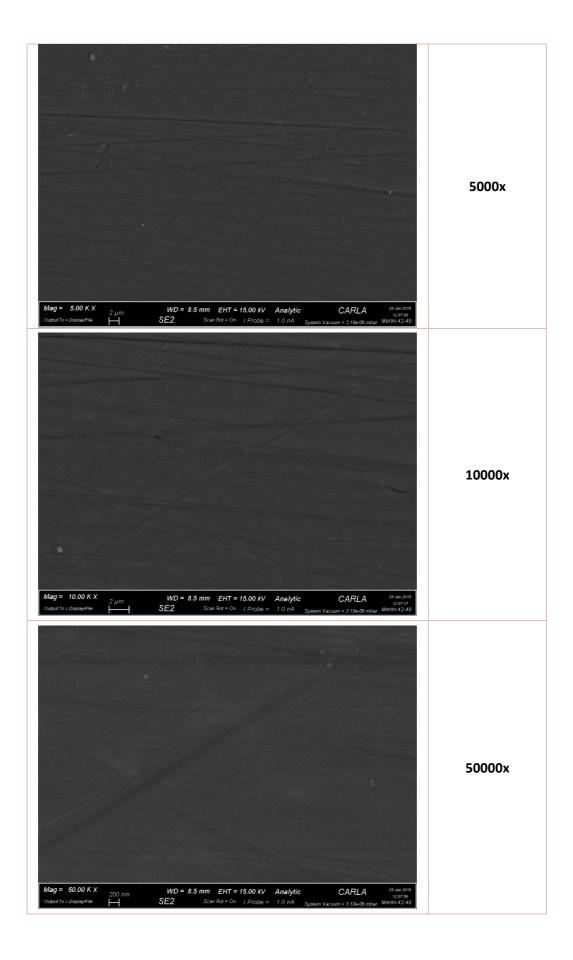


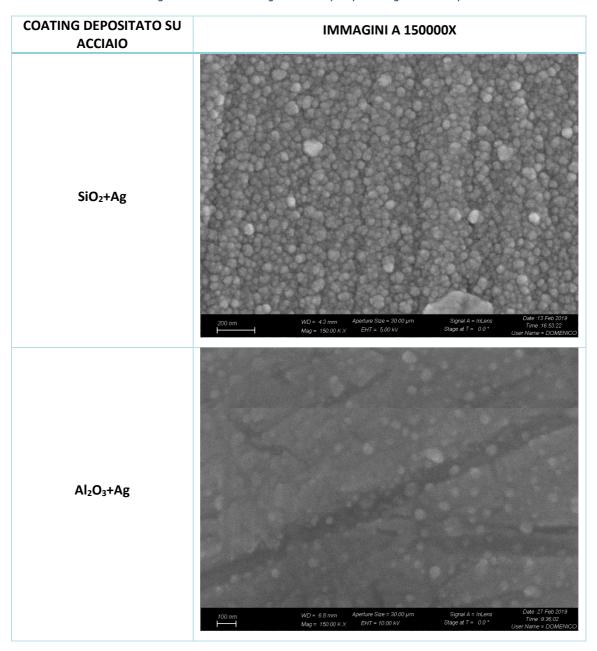
Tabella 5.11- Immagini al FESEM a diversi ingrandimenti per quanto riguarda i campioni in acciaio rivestiti con zirconia.

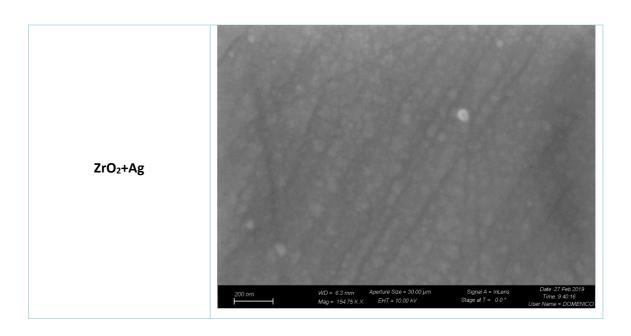




Vengono inoltre riportate le immagini, ottenute con il SEM ad alti ingrandimenti, visibili nel caso dell'acciaio in *tabella 5.12*.

Tabella 5.12- Immagini al FESEM ad alti ingrandimenti per quanto riguarda i campioni in acciaio.





Le osservazioni ad elevati ingrandimenti (150000x) mettono in evidenza la struttura "ad isole" tipica dei rivestimenti ottenuti mediante sputtering per tutte le matrici analizzate, anche se in maniera più spiccata nel caso della silice.

5.4.1 EDS

In seguito, vengono mostrati in *tabella 5.13-5.15* le composizioni (% atomiche) dei campioni e i rapporti di concentrazione atomica tra argento ed elemento caratteristico della matrice (silicio, alluminio e zirconio) per i diversi rivestimenti analizzati. Tali valori sono stati ricavati in base alle analisi EDS effettuate su area ad ingrandimento 1000x.

Tabella 5.13- Composizione chimica e rapporto Ag/Si per quanto riguarda i campioni con il coating a base di silice.

		EDS A	1000x			
SUBSTRATI	ELEMENTI	1_PERCENTUALE ATOMICA (%)	2_PERCENTUALE ATOMICA (%)	MEDIA	DEV. STANDARD	RAPPORTO Ag/Si
	С	0,00	14,17	7,09	10,02	
	0	29,88	26,00	27,94	2,74	
	Si	5,26	4,36	4,81	0,64	
	Mn	1,64	1,74	1,69	0,07	
ACCIAIO	Fe	49,58	42,02	45,80	5,35	0,1538
	Ni	11,24	9,75	10,50	1,05	
	Мо	1,51	1,36	1,44	0,11	
	Ag	0,88	0,60	0,74	0,20	
	Totale	100,00	100,00	100,00	0,00	
TITANIO	0	50,87	50,54	50,71	0,23	0,1954

GR.4	Si	/	1,74	1,74	/	
	Ti	47,02	47,39	47,21	0,26	
	Ag	0,35	0,33	0,34	0,01	
	Totale	100,00	100	100,00	0,00	
	С	5,69	0,00	2,85	4,02	
	0	45,14	46,01	45,58	0,62	
	Al	5,01	5,34	5,18	0,23	
TITANIO	Si	1,59	1,88	1,74	0,21	0.2017
GR.5	Ti	40,5	44,2	42,35	2,62	0,2017
	V	1,74	2,18	1,96	0,31	
	Ag	0,32	0,38	0,35	0,04	
	Totale	100	100	100,00	0,00	

In tabella 5.13 sono riportate le composizioni chimiche (% atomiche degli elementi presenti in superficie) per i rivestimenti silice-argento sui diversi substrati. Il quantitativo di argento risulta intorno allo 0.35% per i rivestimenti su titanio (sia grado 4 che 5) e invece più elevato nei rivestimenti su acciaio (0.74% at). Nella medesima tabella sono riportati i rapporti Ag/Si calcolati per i diversi campioni. È necessario precisare che una certa percentuale atomica di silicio (max 1% circa) è presente già nel substrato per i campioni di acciaio, quindi, considerando che la profondità di penetrazione dell'analisi EDS (dell'ordine del micron) è superiore allo spessore del rivestimento, il valore di tale rapporto non è completamente attendibile per questi campioni. Il rapporto Ag/Si, per quanto riguarda i rivestimenti a base delle tre matrici, presenta valori abbastanza elevati; essi sono conformi a quanto riportato in uno studio del gruppo di ricerca [158] per coating della stessa tipologia su substrati polimerici, risultati antibatterici ma non citotossici.

Tabella 5.14 - Composizione chimica e rapporto Ag/Al per quanto riguarda i campioni con il coating a base di allumina.

		EDS A	EDS A 1000x			
SUBSTRATI	ELEMENTI	1_PERCENTUALE ATOMICA (%)	2_ PERCENTUALE ATOMICA (%)	MEDIA	DEV. STANDARD	RAPPORTO Ag/Al
	С	15,76	0,00	7,88	11,14	
	0	21,36	24,07	22,72	1,92	
	Al	3,8	4,24	4,02	0,31	
ACCIAIO	Si	0,47	0,85	0,66	0,27	0,0137
	Mn	1,77	1,8	1,79	0,02	
	Fe	44,7	54,44	49,57	6,89	
	Ni	10,85	13,05	11,95	1,56	

	Мо	1,18	1,54	1,36	0,25	
	Ag	0,11	0	0,06	0,08	
	Totale	100,00	100,00	100,00	0,00	
	0	45,21	44,25	44,73	0,68	
TITANIO	Al	1,63	1,72	1,68	0,06	
TITANIO GR.4	Ti	53,07	53,97	53,52	0,64	0,0478
GIV. 4	Ag	0,09	0,07	0,08	0,01	
	Totale	100,00	100,00	100,00	0,00	
	0	41,56	42,03	41,80	0,33	
	Al	7,49	7,70	7,60	0,15	
TITANIO	Ti	48,65	48,08	48,37	0,40	0.0000
GR.5	V	2,29	2,18	2,24	0,08	0,0000
	Ag	0,00	0,00	0,00	0,00	
	Totale	100,00	100,00	100,00	0,00	

In *tabella 5.14*, si riporta la composizione chimica dei rivestimenti a base di allumina e argento: la concentrazione di argento varia tra 0 e 0.08%at. I valori sono significativamente inferiori a quanto misurato nei rivestimenti a base silice. La stessa tabella riporta Ag/Al. In questo caso è necessario precisare che una certa percentuale atomica di alluminio è presente già nel substrato per i campioni di Ti di grado 5 (lega Ti6Al4V), quindi, considerando che la profondità di penetrazione dell'analisi EDS (dell'ordine del micron) è superiore allo spessore del rivestimento, il valore di tale rapporto non è completamente attendibile per questi campioni.

In *tabella 5.15*, si riporta la composizione chimica dei rivestimenti a base di zirconia e argento. La concentrazione di argento varia tra 0 e 0.1 %at. I valori sono analoghi a quelli osservati per i rivestimenti a base allumina e significativamente inferiori a quanto misurato nei rivestimenti a base silice. La stessa tabella riporta il rapporto Ag/Zr che risulta in media 0.16.

Tabella 5.15 - Composizione chimica e rapporto Ag/Zr per quanto riguarda i campioni con il coating a base di zirconia.

		EDS A 1000x				
SUBSTRATI	ELEMENTI	1_ PERCENTUALE ATOMICA (%)	2_ PERCENTUALE ATOMICA (%)	MEDIA	DEV. STANDARD	RAPPORTO Ag/Zr
	0	34,98	34,84	34,91	0,10	
	Si	0,66	0,00	0,33	0,47	
ACCIAIO	Mn	1,38	1,59	1,49	0,15	0,0137
	Fe	46,12	46,49	46,31	0,26	
	Ni	10,27	10,64	10,46	0,26	

	Zr	5,21	5,04	5,13	0,12	
	Мо	1,23	1,40	1,32	0,12	
	Ag	0,14	0,00	0,07	0,10	
	Totale	100,00	100,00	100,00	0,00	
	0	54,50	54,01	54,26	0,35	
	Al	0,24	0,23	0,24	0,01	
TITANIO	Ti	43,21	43,66	43,44	0,32	0,0172
GR.4	Zr	1,99	2,09	2,04	0,07	
	Ag	0,07	0,00	0,04	0,05	
	Totale	100,00	100,00	100,00	0,00	
	0	51,82	51,91	51,87	0,06	
	Al	4,72	4,77	4,75	0,04	
TITANIO	Ti	39,67	39,16	39,42	0,36	
TITANIO GR.5	V	1,72	1,87	1,80	0,11	0,0139
GK.5	Zr	2,07	2,24	2,16	0,12	
	Ag	0,00	0,06	0,03	0,04	
	Totale	100,00	100,00	100,00	0,00	

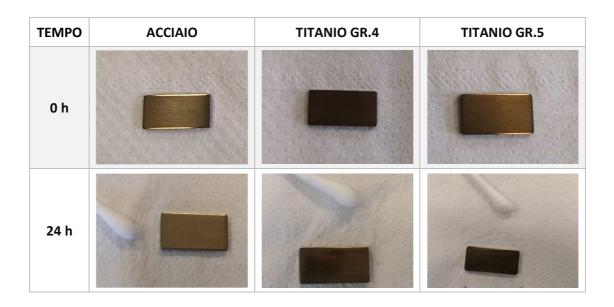
In conclusione, l'analisi della composizione chimica dei rivestimenti mediante EDS conferma quanto visto dalle immagini SEM e indica come i rivestimenti a base di allumina e zirconia contengano meno argento, rispetto a quelli a base di silice. Questo andamento, unitamente ad una maggiore stabilità di queste matrici, va nella direzione (ipotizzata in fase di pianificazione del lavoro) di ottenere rivestimenti antiadesivi a basso rilascio ionico e biocompatibili.

5.5 Test di rilascio in acqua

5.5.1 Misura con fotometro portatile

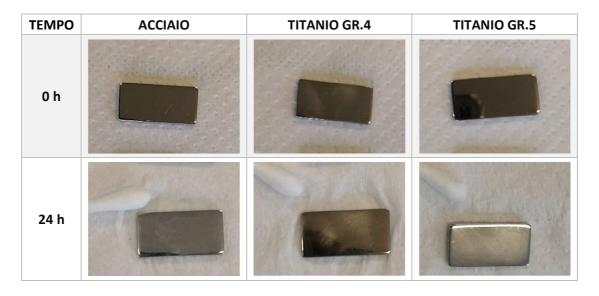
Vengono di seguito riportate le tabelle che riassumono i risultati visivi, muniti di tampone, ed i valori del test di rilascio svolto per un primo periodo di tempo pari a 24 h, al fine di avere una prima prova di stabilità da parte dei coating sul primo set di campioni.

Tabella 5.16- Tabella che confronta i risultati del tampone sui campioni rivestiti con silice ed argento.



In *tabella 5.16*, raffigurante i risultati del rilascio dopo 24 h nel caso del rivestimento a base di silice, il colore del rivestimento pare immutato nei primi due casi, mentre per il titanio di grado 5 si ha un leggero inscurimento del rivestimento. In nessuno dei tre materiali si notano aloni. Inoltre, i tamponi asciutti risultano puliti, confermando un colore che differisce poco dal campione prima del rilascio.

Tabella 5.17- Tabella che confronta i risultati del tampone sui campioni rivestiti con allumina ed argento.



Dalla *tabella 5.17*, nella quale sono presenti i risultati nel caso del rivestimento a base di allumina, si evince come sul tampone non siano presenti tracce di rivestimento. Appaiono tuttavia aloni, in seguito al suo passaggio; il colore, come quanto detto precedentemente, è più chiaro.

Dalla *tabella 5.18*, i cui sono visibili i risultati del rilascio nel caso del rivestimento con zirconia, i colori appaiono sostanzialmente immutati, in tutti i substrati esaminati. Non sono inoltre presenti aloni di alcun tipo.

TEMPO ACCIAIO TITANIO GR.4 TITANIO GR.5

O h

24 h

Tabella 5.18- Tabella che confronta i risultati del tampone sui campioni rivestiti con zirconia ed argento.

È possibile da questi primi risultati di rilascio desumere come la zirconia in particolar modo, possegga una buona stabilità. La silice invece e l'allumina, sin da 24 h, mostrano una stabilità dubbia, di cui è meglio approfondire, aumentando i tempi di rilascio. Il danneggiamento della superficie, nel caso della silice, è confermato in uno studio di Ferraris et al.: pur con una differenza notevole (il mezzo in questo caso è latte e non acqua ultrapura, come adoperato in laboratorio), il medesimo coating (simile anche per parametri adoperati) mostra danneggiamenti dopo 24h [118].

5.5.1.1 Valori di rilascio

Di seguito vengono mostrati i grafici con i valori di rilascio di argento.

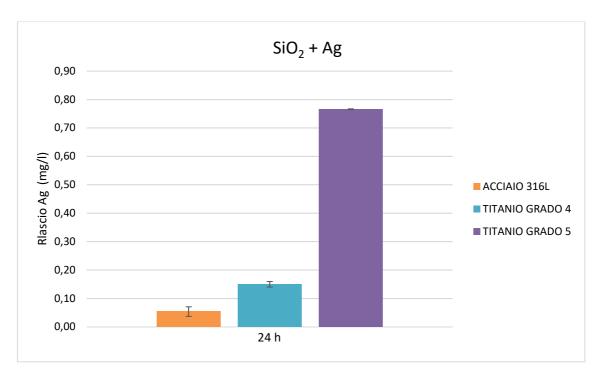


Figura 5.7- Valori di rilascio di argento dopo 24 h, per i rivestimenti a base di silice ed argento.

Dalla *figura 5.7* si evince come i rilasci nel caso della matrice di silice siano abbastanza eterogenei: se acciaio e titanio di grado 4 si mantengono al di sotto della soglia di biocompatibilità, riportata in letteratura (0.38 mg/l) [55], con valori pari a 0.15 mg/l e a 0.05 mg/l, il rivestimento sul terzo materiale si rivela potenzialmente citotossico (0.766 mg/l > 0.38 mg/l).

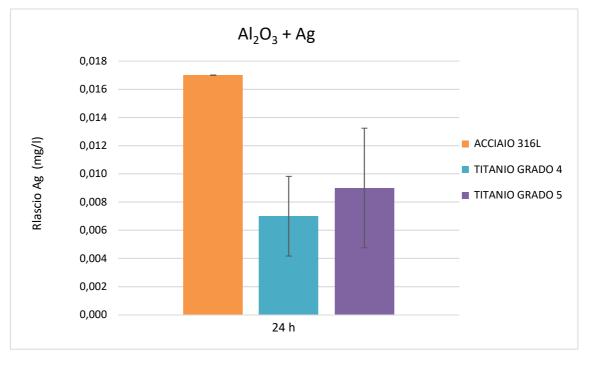


Figura 5.8- Valori di rilascio di argento dopo 24 h, per i rivestimenti a base di allumina ed argento.

Contrariamente a ciò, in *figura 5.8*, si notano rilasci decisamente inferiori nel caso della matrice di allumina. Il valore di picco, riscontrabile nell'acciaio e pari a 0.017 mg/l, si mantiene ampliamente in una zona di sicurezza rispetto alla soglia.

Valori massimi simili, si possono vedere in *figura 5.9*: il titanio di grado 4, in presenza di allumina, rilascia 0.0175 mg/l di argento, a fronte di un minimo nel titanio di grado 5, pari a 0.006 mg/l.

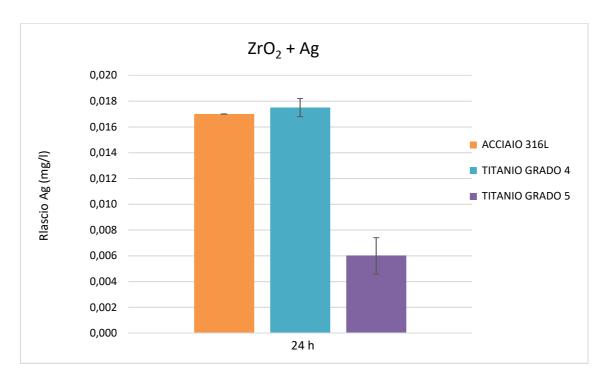


Figura 5.9- Valori di rilascio di argento dopo 24 h, per i rivestimenti a base di zirconia ed argento.

Nel complesso i risultati ottenuti corrispondono a profili diversi. Nel caso della silice, si hanno rilasci maggiori ed in breve tempo; al contrario le matrici di allumina e zirconia mostrano un rilascio più basso nei tempi brevi, con una stabilità maggiore del coating nel secondo caso. Test a tempi maggiori daranno ulteriori informazioni sul comportamento dei rivestimenti.

5.5.2 Misura con spettrometria di massa

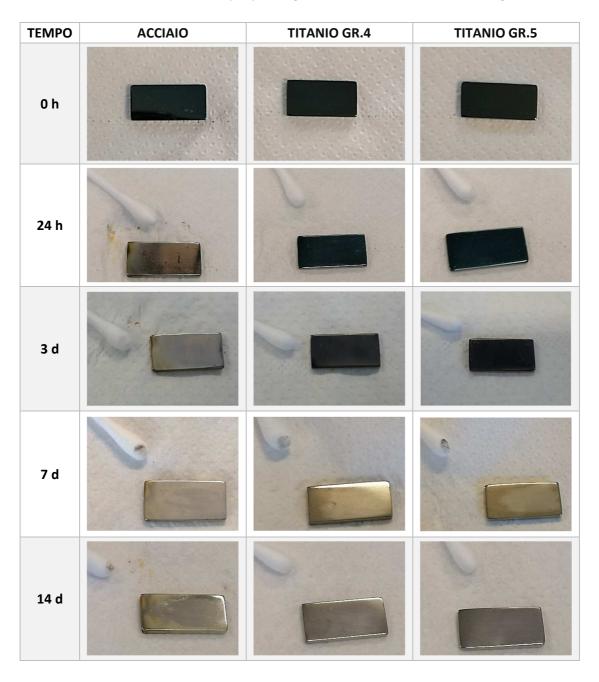
Per il test di rilascio con più tempi diversi, le misure sono state svolte in duplicato. Con le sigle B1 e B2 sono identificati rispettivamente la prima e la seconda tornata di

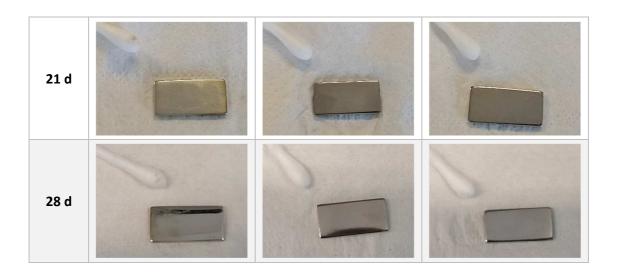
deposizioni. Unitamente al rilascio, sui campioni è stato passato un tampone asciutto per vedere quanto l'eventuale rimozione dello stesso a seguito dell'immersione in acqua.

5.5.2.1 Campioni B1

Vengono di seguito raffigurate le tabelle che riassumono i risultati del tampone asciutto, applicato dopo diversi tempi di rilascio.

Tabella 5.19- Risultati del rilascio per quanto riguarda il rivestimento a base di silice ed argento.





Il campione in acciaio presenta evidenti segni di corrosione, dopo 24 h. Sul motivo non si ha ancora una spiegazione, essendo, almeno in teoria, un materiale inossidabile. In *figura* 5.10 è mostrato il dettaglio del punto da cui è partito il fenomeno.



Figura 5.10-Particolare della zona da cui è partita la corrosione del materiale.

Dalla *tabella 5.19*, nella quale sono mostrati i campioni rivestiti con silice e argento a vari tempi di rilascio, si può notare come il coating si deteriori, fino a scomparire del tutto dopo 14 giorni. Tale risultato conferma quanto visto in Ferraris et al [118]. Inoltre, la silice mostra notevole affinità con l'acqua, in quanto ricca in superficie di gruppi ossidrili; il deterioramento del rivestimento è probabilmente imputabile a questo fenomeno. Per quanto riguarda i tamponi, essi paiono immacolati dopo 24 h, mentre per tempi di rilascio più lunghi, in corrispondenza del danneggiamento del coating graduale, presenta macchie più o meno intenso. Il campione in acciaio continua a corrodersi con il passare del tempo, mentre gli altri materiali mostrano solo un colore più chiaro.

Tabella 5.20- Risultati del rilascio per quanto riguarda il rivestimento a base di allumina ed argento.

TEMPO	ACCIAIO	TITANIO GR.4	TITANIO GR.5
0 h			
24 h			
3 d			
7 d			
14 d			
21 d			
28 d			

Si osserva la comparsa di una macchia sul campione di titanio gr.5 rivestito con Al2O3-Ag, dopo 24 h. In *figura 5.11* è mostrato il dettaglio. La macchia dopo 21 giorni appare meno evidente, fino a scomparire totalmente.



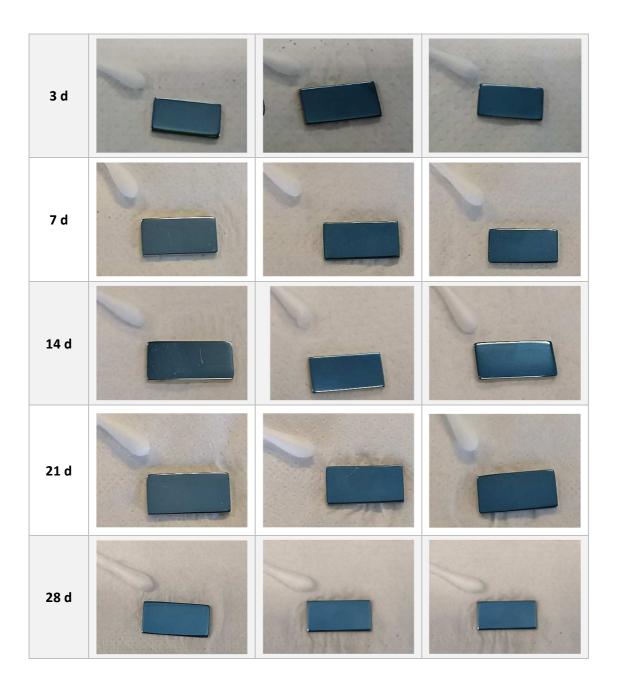
Figura 5.11- Macchia apparsa sulla superficie in titanio.

In *tabella 5.20* sono raffigurati i campioni rivestiti con allumina ed argento a vari tempi di rilascio: il coating si deteriora dopo 28 giorni di immersione in acqua ultrapura. Il colore diminuisce di intensità già dopo 14 giorni nel caso di acciaio e titanio di grado 5, mentre nel caso del titanio di grado 4 dopo 21 giorni il substrato torna alla sua tonalità naturale. Per quanto concerne il tampone secco nel caso del rivestimento con allumina ed argento, i tamponi asciutti risultano puliti durante tutti i tempi di rilascio, fatta eccezione per le 24 h del titanio di grado 5 e qualche lieve traccia sul campione di titanio di grado 4 dopo 7 e 14 giorni.

TEMPO ACCIAIO TITANIO GR.4 TITANIO GR.5

Tabella 5.21- Risultati del rilascio per quanto riguarda il rivestimento a base di zirconia ed argento.

24 h



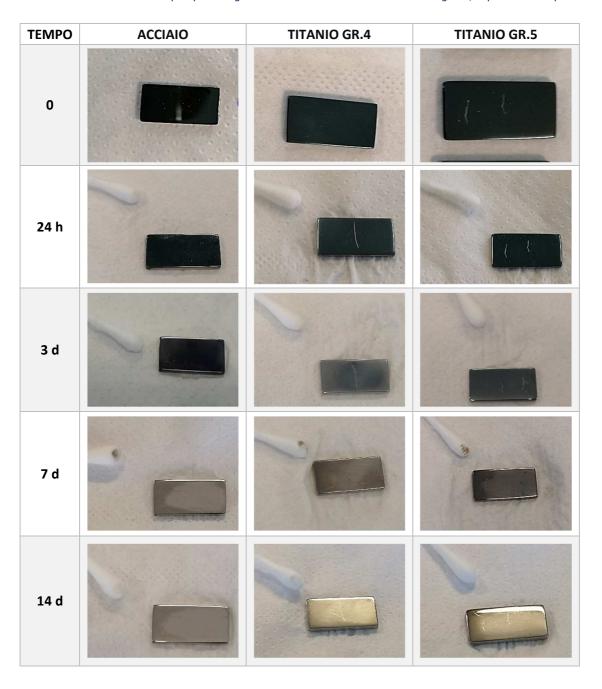
In *tabella 5.21* sono mostrati i campioni rivestiti con zirconia ed argento a vari tempi di rilascio: eccetto qualche alone presente sulla superficie, il coating non mostra segni visibili di deterioramento, mantenendo un colore costante. Si nota, inoltre, come i tamponi siano puliti e non abbiano alcuna traccia di rivestimento. Ciò va a confermare i commenti fatti precedentemente, per quanto riguarda il rilascio: il coating mostra una stabilità superiore alle altre matrici.

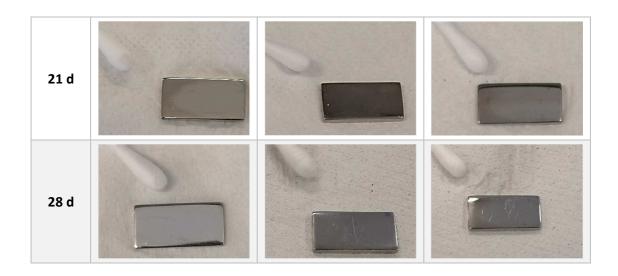
Nel complesso tra le tre matrici, la zirconia mostra la maggior stabilità in acqua ultrapura, seguita da allumina e silice.

5.5.2.2 Campioni B2

Vengono di seguito raffigurate le tabelle che riassumono i risultati del rilascio svolto sui campioni in duplicato, unitamente al tampone asciutto.

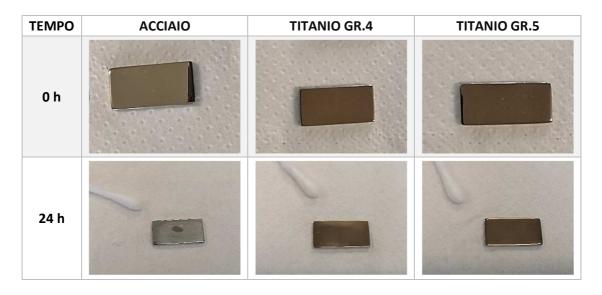
Tabella 5.22- Risultati del rilascio per quanto riguarda il rivestimento a base di silice ed argento, depositato in duplicato.

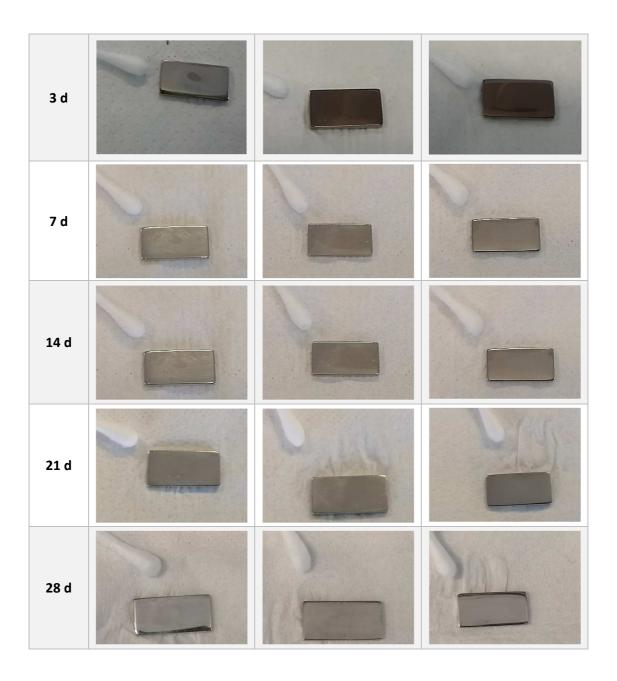




In *tabella 5.22*, dai risultati in duplicato dei campioni rivestiti in silice ed argento, si nota come il coating si schiarisca notevolmente dopo sette giorni, per poi scomparire del tutto dopo 21. Ciò conferma quanto ottenuto precedentemente. Sono inoltre mostrati i risultati del tampone: come visto precedentemente, i tamponi sono macchiati solo dopo 7 giorni, mentre prima non ci sono segni. Ciò fa intuire come la matrice di silice non si deteriori immediatamente, ma gradualmente, presentando un picco elevato dopo 7-14 giorni.

Tabella 5.23- Risultati del rilascio per quanto riguarda il rivestimento a base di allumina ed argento, depositato in duplicato.





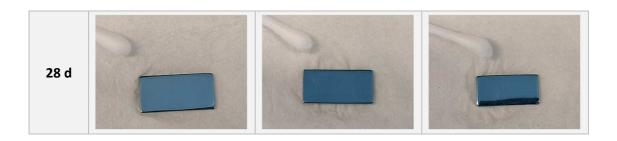
Dalla *tabella 5.23*, che conferma quanto rilevato con i campioni B1, si nota come dopo 7 giorni il coating appaia nettamente più chiaro, fino a scomparire del tutto per la durata complessiva del rilascio. Nel primo caso una piccola macchia scura appariva sulla superficie del titanio di grado 5 e scompariva dopo 21 giorni; una cosa simile accade per l'acciaio in questo caso. Non si conoscono le cause né i motivi di tale aspetto. I tamponi asciutti, anch'essi mostrati in tabella, sono puliti, così come visto in precedenza.

Stesso discorso si può fare nel caso della zirconia: sia nei campioni B1 che nei B2, visibili in tabella 5.24, i tamponi sono puliti e privi di macchie. Si ha, inoltre, una conferma di

quanto constatato per i campioni B1: il coating appare ben conservato e non mostra variazioni di colore.

Tabella 5.24- Risultati del rilascio per quanto riguarda il rivestimento a base di zirconia ed argento, depositato in duplicato.

TEMPO	ACCIAIO	TITANIO GR.4	TITANIO GR.5
0 h			
24 h			
3 d			
7 d			
14 d			
21 d			



Nel complesso i risultati in duplicato confermano quanto visto in precedenza.

5.5.2.3 EDS post-rilascio

In seguito al rilascio in acqua per 28 giorni, i campioni sono stati nuovamente analizzati mediante EDS per valutare la permanenza o rimozione del rivestimento.

Nelle seguenti *tabelle 5.25, 5.26* e *5.27* sono raffigurati i valori ottenuti, in seguito mediati al fine di calcolare i rapporti tra l'elemento principale della matrice e l'argento, misurati in percentuali atomiche (%at).

Tabella 5.25 -Composizione chimica e rapporto Ag/Si per quanto concerne i campioni con il coating a base di silice, dopo 28 giorni di rilascio.

		EDS A	1000x			
SUBSTRATI	ELEMENTI	1_PERCENTUALE ATOMICA (%)	2_PERCENTUALE ATOMICA (%)	MEDIA	DEV. STANDARD	RAPPORTO Ag/Si
	Si	0,96	1,12	1,04	0,11	
	Mn	2,52	2,56	2,54	0,03	
	Fe	76,41	75,48	75,95	0,66	
ACCIAIO	Ni	17,70	18,57	18,14	0,62	0,0000
	Мо	2,41	2,27	2,34	0,10	
	Ag	0,00	0,00	0,00	0,00	
	Totale	100,00	100,00	100,00	0,00	
	Si	0,27	0,13	0,13	0,10	0.000
TITANIO	Ti	99,67	99,87	99,77	0,14	
GR.4	Ag	0,06	0,00	0,03	0,04	0,2308
	Totale	100,00	100,00	100,00	0,00	
	Al	10,50	10,49	10,50	0,01	
	Si	0,19	0,16	0,18	0,02	
TITANIO	Ti	85,62	85,51	85,57	0,08	0,0000
GR.5	V	3,69	3,84	3,77	0,11	
	Ag	0,00	0,00	0,00	0,00	
	Totale	100,00	100,00	100,00	0,00	

In tabella 5.25 sono riportate le composizioni chimiche per i rivestimenti silice-argento sui diversi substrati, in seguito al test del rilascio svolto in acqua ultrapura. Il quantitativo di argento si attesta attorno allo 0.00%at, per quanto riguarda tutti campioni, mostrando valori nettamente inferiori a quelli misurati dopo l'applicazione del rivestimento. Ciò si riflette in rapporti Ag/Si più bassi, a fronte di percentuali di silicio anch'esse inferiori. Ciò conferma il degrado del coating, a seguito dell'immersione in acqua. Nella medesima tabella sono riportati i rapporti Ag/Si calcolati per i diversi campioni. Va inoltre ricordato che una certa percentuale atomica di silicio (max 1% circa) è presente già nel substrato per i campioni di acciaio: poiché i valori ricavati si attestano a tale soglia, è possibile concludere, in accordo con altre metodiche adottate e osservazioni visive, che il coating si sia danneggiato a contatto con un liquido per cui mostra un'alta affinità. Si precisa, inoltre, che rispetto ai campioni pre-rilascio, non vengono individuati gli elementi C e O, appartenenti al coating; ciò da ulteriore conferma del degradarsi del rivestimento.

Tabella 5.26- Composizione chimica e rapporto Ag/Al per quanto concerne i campioni con il coating a base di allumina, dopo 28 giorni di rilascio.

		EDS A	1000x			
SUBSTRATI	ELEMENTI	1_PERCENTUALE ATOMICA (%)	2_PERCENTUALE ATOMICA (%)	MEDIA	DEV. STANDARD	RAPPORTO Ag/Al
	Al	0,70	0,96	0,83	0,18	
	Si	1,09	0,97	1,03	0,08	
	Mn	2,76	2,90	2,83	0,10	
ACCIAIO	Fe	75,74	75,00	75,37	0,52	0.0722
ACCIAIO	Ni	17,62	17,86	17,74	0,17	0,0723
	Мо	2,09	2,19	2,14	0,07	
	Ag	0,00	0,12	0,06	0,08	
	Totale	100,00	100,00	100,00	0,00	
	Al	0,41	0,45	0,43	0,03	
TITANIO	Ti	99,59	99,55	99,57	0,03	0.0000
GR.4	Ag	0,00	0,00	0,00	0,00	0,0000
	Totale	100,00	100,00	100,00	0,00	
	Al	11,84	11,49	11,67	0,25	
TIT 4 4 11 C	Ti	84,32	84,42	84,37	0,07	
TITANIO	V	3,78	4,08	3,93	0,21	0,0026
GR.5	Ag	0,06	0,00	0,03	0,04	
	Totale	100,00	100,00	100,00	0,00	

In tabella 5.26 è presentata la composizione chimica dei rivestimenti a base di allumina e argento, a seguito del test di rilascio. La concentrazione di argento varia tra 0 e 0.06%at. I valori di alluminio sono significativamente inferiori a quanto misurato dopo l'applicazione dei rivestimenti, mentre aumentano quelli di titanio e ferro. Ciò dà la conferma del degradarsi del coating. La stessa tabella riporta Ag/Al, il quale presenta valori nettamente in calo al caso precedente. In tale sede occorre precisare che una certa percentuale atomica di alluminio è presente già nel substrato per i campioni di Ti di grado 5 (lega Ti6Al4V), quindi, considerando che la profondità di penetrazione dell'analisi EDS (dell'ordine del micron) è superiore allo spessore del rivestimento, il valore di tale rapporto non è completamente attendibile per questi campioni. Inoltre, anche in questo caso, così come per i substrati ricoperti con silice, risultano assenti C e O.

Dalla *tabella 5.27*, in cui sono riportati i valori di composizione chimica dei rivestimenti a base di zirconia e argento, dopo i 28 giorni del test di rilascio, si può notare come rispetto ai due casi precedenti non si abbiano grandi variazioni. La concentrazione di argento varia tra 0 e 0.17 %at; i valori sono analoghi a quelli osservati precedentemente al test, così come nel caso dello zirconio. Tali rivestimenti, di cui anche i rapporti Ag/Zr risultano simili a quelli calcolati prima dell'esecuzione del test, sembrano confermare le osservazioni visive, mostrando una stabilità, non riscontrabile nel caso di allumina e silice.

Tabella 5.27- Rapporto Ag/Zr per quanto concerne i campioni con il coating a base di zirconia, dopo 28 giorni di rilascio.

		EDS A	1000x			
SUBSTRATI	ELEMENTI	1_PERCENTUALE ATOMICA (%)	2_PERCENTUALE ATOMICA (%)	MEDIA	DEV. STANDARD	RAPPORTO Ag/Zr
	0	35,32	35,42	35,37	0,07	
	Al	0,00	0,43	0,22	0,30	
	Si	0,71	0,48	0,60	0,16	
	Mn	1,56	1,56	1,56	0,00	
ACCIAIO	Fe	44,27	44,43	44,35	0,11	0,0131
ACCIAIO	Ni	10,24	10,01	10,13	0,16	
	Zr	6,50	6,45	6,48	0,04	
	Мо	1,23	1,20	1,22	0,02	
	Ag	0,17	0,00	0,09	0,12	
	Totale	100,00	100,00	100,00	0,00	
	0	50,49	51,19	50,84	0,49	
TITANIO	Al	0,24	0,20	0,22	0,03	0,0232
GR.4	Ti	46,41	45,73	46,07	0,48	
	Zr	2,82	2,79	2,81	0,02	

	Ag	0,04	0,09	0,07	0,04	
	Totale	100,00	100,00	100,00	0,00	
	0	49,24	48,79	49,02	0,32	
	Al	4,88	4,74	4,81	0,10	
TITANUO	Ti	41,10	41,54	41,32	0,31	
TITANIO GR.5	V	1,82	1,97	1,90	0,11	0,0330
GR.5	Zr	2,86	2,89	2,88	0,02	
	Ag	0,12	0,07	0,10	0,04	
	Totale	100,00	100,00	100,00	0,00	

In conclusione, l'analisi della composizione chimica dei rivestimenti mediante EDS conferma quanto visto dalle osservazioni e dalle altre metodiche adottate per l'analisi a seguito dell'immersione per 28 giorni. I rivestimenti a base di zirconia mostrano una stabilità non riscontrabile negli altri casi, mentre silice ed allumina degradano più facilmente. Tale andamento va nella direzione (ipotizzata in fase di pianificazione del lavoro) di ottenere rivestimenti antiadesivi a basso e lento rilascio ionico e biocompatibili.

Al fine di ottenere una ulteriore conferma di tali andamenti, sono stati calcolati e messi su grafico, come visibile nelle *figure 5.12-5.14*, i rapporti tra la sommatoria delle medie degli elementi presenti sul rivestimento rispetto alla somma delle medie di quelli presenti sul substrato.

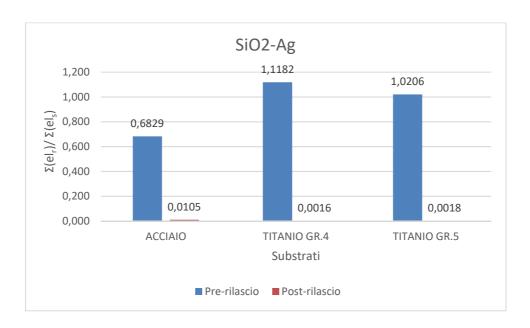


Figura 2.12- Rapporto della percentuale atomica di elementi del rivestimento rispetto a quelli del substrato nel caso della silice.

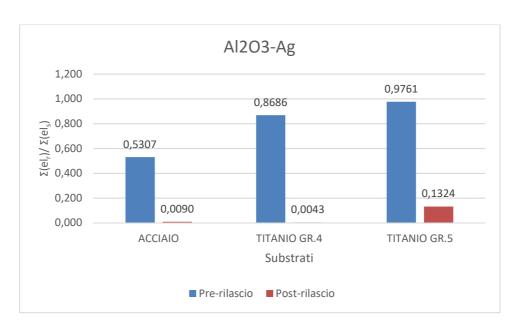


Figura 5.13- Rapporto della percentuale atomica di elementi del rivestimento rispetto a quelli del substrato nel caso dell'allumina.

Sebbene alcuni valori siano meno attendibili, in quanto un elemento può essere presente in entrambi, si ha una indicazione di quanto rivestimento è rimasto, percentuale atomica, sui substrati. Si nota ad esempio che il coating a base di zirconia è l'unico ad essere rimasto praticamente intatto.

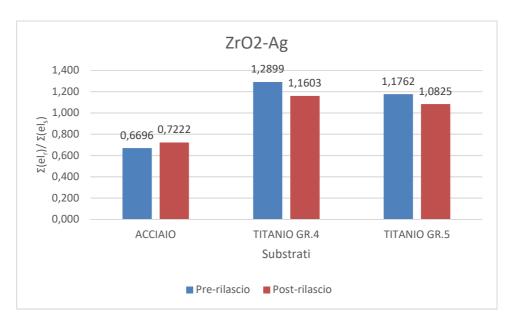


Figura 5.14- Rapporto della percentuale atomica di elementi del rivestimento rispetto a quelli del substrato nel caso della zirconia.

5.5.2.4 Valori di rilascio

Per aver una conferma di stabilità, di seguito vengono mostrati i grafici con i valori di rilascio di argento e di silicio, alluminio e zirconio rispettivamente per le tre matrici, ricavati tramite ICP-MS. Dati i valori presenti nelle *tabelle 5.28, 5.29* e *5.30*, essi sono stati mediati e posti su grafico (con "*" sono indicati i valori scartati, in quanto visibilmente diversi dalla media, mentre con "**" sono segnati i dati negativi che sono stati azzerati, in fase di elaborazione delle medie).

Tabella 5.28- Valori di rilascio per quanto riguarda il rivestimento a base di silice ed argento.

Rilascio di argento [mg/l]

Rilascio di silicio [mg/l]

	24 h	3 d	7 d	14 d	21 d	28 d	24 h	3 d	7 d	14 d	21 d	28 d
A 1	0,0100	0,0029	0,2306	0,1003	0,0817	0,0315	-0,0260 **	0,0546	0,0873	0,1202	-0,0614 **	-0,0952 **
A 2	0,1294	0,2585	0,3540	0,0706	0,0325	0,0153	-0,0487 **	0,0153	0,0732	0,0265	-0,0663 **	-0,1000 **
Ti4 1	0,2012	0,6597	0,3562	0,0339	0,0201	0,0126	-0,0440 **	0,0304	0,1565	0,0328	-0,0598 **	-0,0894 **
Ti4 2	0,7013	0,2657	0,1562	0,0036	0,0109	2,3159 *	-0,0502 **	0,0631	0,1552	0,0471	-0,0912 **	-0,0771 **
Ti5 1	0,5029	0,6425	0,3530	0,0016	0,0108	0,0448	-0,0321 **	0,0508	0,1345	0,0364	-0,0644 **	-0,0834 **
Ti5 2	0,6050	0,4190	0,0215	0,0002	0,0105	0,1803	0,0069	0,0594	0,1177	0,0946	-0,0394 **	-0,0704 **

In *tabella 5.28* sono mostrati i valori di rilascio per i campioni in duplicato rivestiti con silice e argento. È possibile notare come essi presentino una variabilità elevata; inoltre mostrano in generale un andamento che raggiunge picchi più elevati rispetto alle altre matrici. È quindi evidente una elevata instabilità del coating per quanto riguarda il rilascio in acqua ultra-pura.

Tabella 5.29- Valori di rilascio per quanto riguarda il rivestimento a base di allumina ed argento.

Rilascio di argento [mg/l]

Rilascio di alluminio [mg/l]

	24 h	3 d	7 d	14 d	21 d	28 d	24 h	3 d	7 d	14 d	21 d	28 d
A 1	0,0007 *	0,0015	0,0071	0,0003	0,0115	0,0105	0,0054	0,0073	0,0027	0,0009	0,0399	0,0257
A 2	0,0169	0,0024	0,0014	0,0003	0,0117	0,0108	0,0075	0,0070	0,0018	0,0006	0,0384	0,0261
Ti4 1	0,0265 *	0,0080	0,0030	0,0002	0,0106	0,0129	0,0019	0,0066	0,0019	0,0014	0,0478	0,0265
Ti4 2	0,0045	0,0045	0,0020	0,0007	0,0105	0,0128	0,0015	0,0170	0,0025	0,0016	0,0421	0,0301
Ti5 1	0,0135	0,0004	0,0022	0,0028	0,0106	0,0112	0,0070	0,0003	0,0008	0,0030	0,0494	0,0323
Ti5 2	0,0002	0,0016	0,0057	0,0015	0,0121	0,0108	0,0002	0,0087	0,0040	0,0036	0,0532	0,0431

In *tabella 5.29* si possono notare valori inferiori di rilascio di argento rispetto alla silice: molti di questi si presentano come concordi a livello di ordini di grandezza tra i campioni in duplicato. Fanno eccezione in particolar modo i risultati ottenuti durante i primi giorni, mentre mostrano una stabilità maggiore ed una concordanza con il passare del tempo di rilascio. La zirconia, i cui risultati sono mostrati in *tabella 5.30*, mostra valori nettamente inferiori rispetto a silice ed allumina.

Tabella 5.30- Valori di rilascio per quanto riguarda il rivestimento a base di zirconia ed argento.

Rilascio di zirconio [mg/l]

0,0017

0,0056

0,0059

Rilascio di argento [mg/l]

0,0025

0,0109

Midselo di digento [mg/1]									mascio di zircomo [mg/i]					
	24 h	3 d	7 d	14 d	21 d	28 d		24 h	3 d	7 d	14 d	21 d	28 d	
A 1	0,0013	0,0008	0,0010	0,0011	0,0105	0,0110		0,0016	0,0002	0,0003	0,0007	0,0056	0,0061	
A 2	0,0012	0,0001	0,0028	0,0012	0,0120	0,0106		0,0023	0,0000	0,0013	0,0009	0,0075	0,0057	
Ti4 1	0,0023	0,0054	0,0012	0,0009	0,0112	0,0119		0,0005	0,0001	0,0000	0,0003	0,0061	0,0057	
Ti4 2	0,0023	0,0025	0,0012	0,0002	0,0105	0,0109		0,0009	0,0001	0,0000	0,0001	0,0056	0,0056	
Ti5 1	0,0013	0,0055	0,0071	0,0051	0,0150	0,0119		0,0032	0,0004	0,0010	0,0011	0,0062	0,0060	

Tutti i valori si trovano al di sotto della soglia riportata in letteratura come tossica per le cellule di osteoblasti di embrione di topo (MC3T3- E1) 0.38 mg/l [55].

0,0108

0,0003

0,0021

0,0003

Di seguito sono invece riportati i grafici, che mostrano l'andamento del rilascio.

I grafici di rilascio per il rivestimento di silice-argento, visibili nelle *figure 5.15-5.16*, mostrano un andamento diverso: nel caso del silicio si hanno picchi ai 7 d e ai 14 d, come testimoniato anche dai risultati visivi, in cui la superficie appariva più chiara, e dal tampone (con residui su di esso). L'argento invece viene rilasciato subito in gran parte, raggiungendo valori sempre più bassi con l'aumentare del tempo. I risultati confermano quanto visto nello studio di Ferraris et al. [118].

Ti5

0,3283

0,0007

0,0016

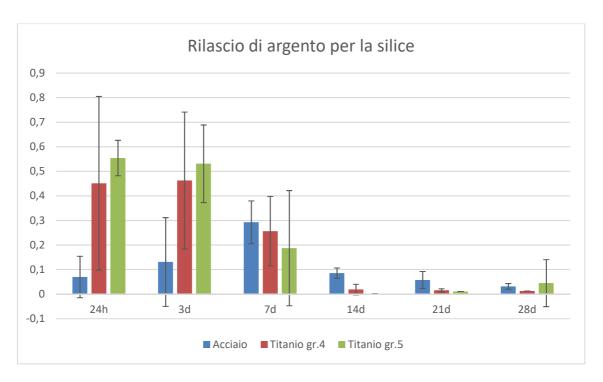


Figura 5.15 - Rilascio di argento per i rivestimenti a base di silice ed argento.

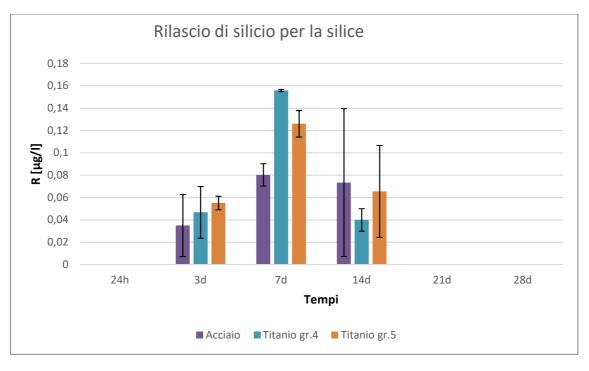


Figura 5.16 - Rilascio di silicio per i rivestimenti a base di silice ed argento.

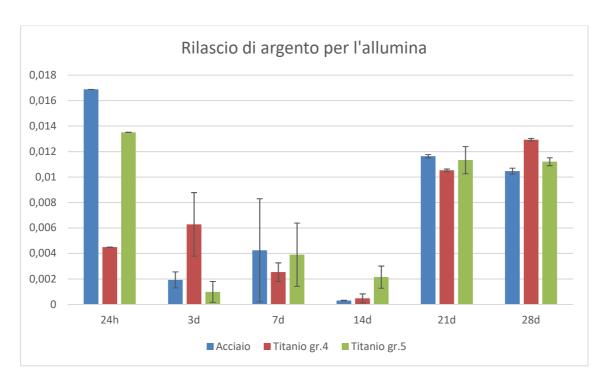


Figura 5.17- Rilascio di argento per i rivestimenti a base di allumina ed argento.

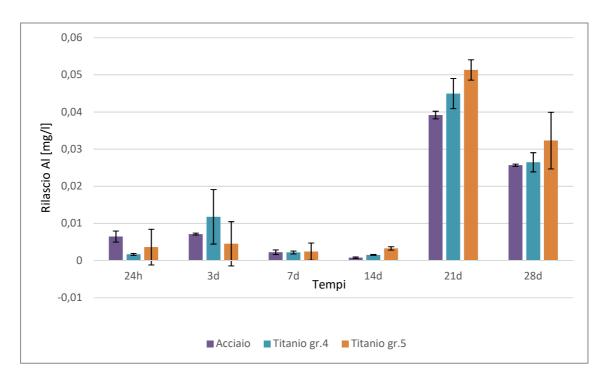


Figura 5.18 - Rilascio di alluminio per i rivestimenti a base di allumina ed argento.

Il rivestimento allumina-argento, i cui risultati sono visibili in *figura 5.17* e *figura 5.18*, mostra un rilascio maggiore di argento nelle prime 24 h, che però si assesta per tempi più lunghi: il profilo è più graduale di quello visto nel caso della silice. La matrice invece

degrada maggiormente da 21 d in poi, mostrando picchi che si assestano su 0.045 mg/l; per tempi di rilascio inferiori i valori sono sotto 0.01 mg/l.

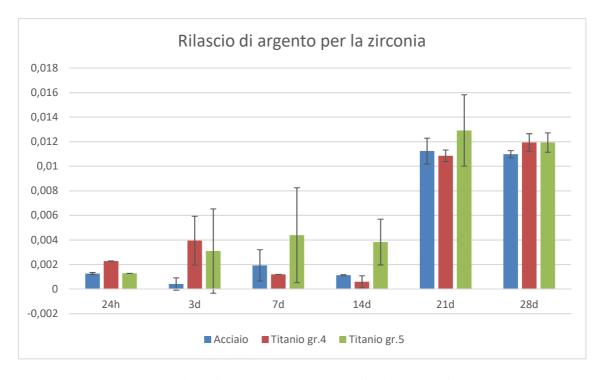


Figura 5.19- Rilascio di argento per i rivestimenti a base di zirconia ed argento.

Il rivestimento zirconia-argento presenta rilasci nel complesso molto bassi e tale andamento si riflette sia sull'argento, il quale mostra un valore nettamente più elevato negli altri solo nelle 24 h (nel caso del titanio di grado 5), mentre si assesta sotto i 0.05 mg/l in tutti gli altri casi, e sia con lo zirconio. Questo mostra picchi per tempi più lunghi, riflettendo un andamento abbastanza costante fino a 14 d, inferiore a 0.007 mg/l.

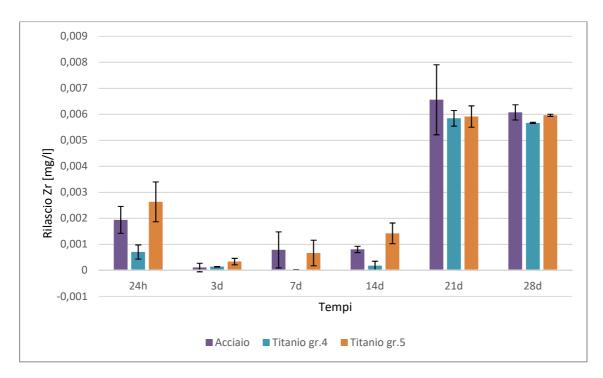


Figura 5.20- Rilascio di zirconio per i rivestimenti a base di zirconia ed argento.

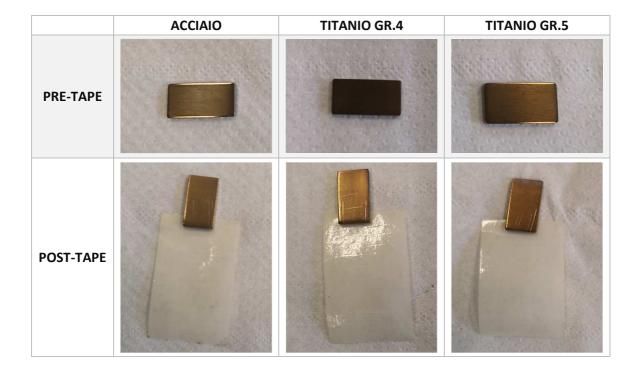
In conclusione, dai dati di rilascio emerge quanto segue:

- I rivestimenti a base silice hanno un rilascio di argento (con picchi a 1 e 3 giorni) e di silicio (con picco a 7 giorni) piuttosto rapidi e superiori rispetto a quelli degli altri rivestimenti. Questo comportamento è imputabile all'elevata affinità della silice per l'acqua che induce un certo degrado del rivestimento, come già osservato in studi precedenti;
- I rivestimenti a base allumina presentano valori di rilascio inferiori rispetto a quelli a base silice con picchi spostati verso i tempi lunghi (21 e 28 giorni) sia per l'argento che per l'alluminio. Si può ipotizzare un degrado ridotto o ritardato del rivestimento;
- I rivestimenti a base zirconia presentano i valori di rilascio più bassi sia per l'argento che per lo zirconio, rispetto agli altri rivestimenti testati. Come per l'allumina i picchi (seppur qui modesti) si registrano ai tempi lunghi (21 e 28 giorni). In accordo con le osservazioni macroscopiche e con i risultati del tampone questi risultati suggeriscono una maggior stabilità dei rivestimenti a base zirconia.

5.6 Tape test

Sono di seguito riportate le tabelle, con i risultati del tape test.

Tabella 5.31- Tabella che confronta i risultati del tape test sui campioni rivestiti con silice ed argento.



Dalla *tabella 5.31,* nella quale sono mostrati i risultati del tape test nel caso della matrice di silice, si evince come il coating si mantenga intatto in tutti i casi. È perciò possibile classificarlo in 5B (ottima adesione) secondo normativa ASTM D3359.

Tabella 5.32- Tabella che confronta i risultati del tape test sui campioni rivestiti con allumina ed argento.

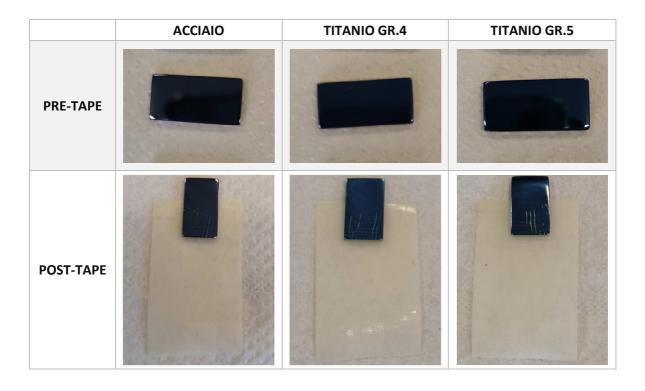




In *tabella 5.32* sono mostrati i risultati del tape test con i coating a base di allumina; dato il colore chiaro ottenuto, molto simile a quello del substrato, è difficile vedere se qualche porzione del rivestimento si è depositata sul nastro. Non è perciò possibile classificare univocamente l'adesione in base alla sola osservazione visiva.

Per quanto riguarda il rivestimento con matrice di zirconia, visibile in *tabella 5.33,* si può osservare che, a seguito del tape test, non si hanno danneggiamenti nel rivestimento né tracce di esso sul nastro. È quindi possibile classificarlo come 5B (ottima adesione) secondo normativa ASTM D3359.

Tabella 5.33- Tabella che confronta i risultati del tape test sui campioni rivestiti con zirconia ed argento. [T43]



5.7 Diffrazione a raggi x

Viene di seguito riportato il grafico ottenuto dall'analisi a diffrazione a raggi X sulle superfici di acciaio, rivestite con silice-argento ed allumina-argento.

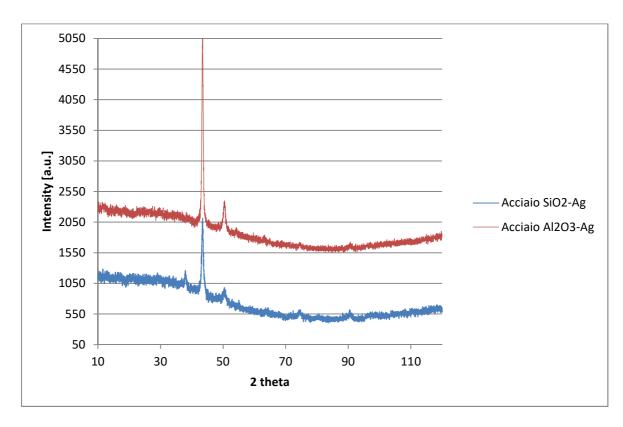


Figura 5.21- Grafico XRD generato dalle superfici rivestite con silice ed allumina.

I picchi presenti nel grafico, illustrato in *figura 5.21*, sono attribuibili al substrato in acciaio. L'intensità di questi segnali rende difficile l'osservazione di eventuali picchi relativi al rivestimento. Considerando l'esiguo spessore dei coating questo tipo di analisi, seppur condotta da angolo radente, non si è dimostrata adatta allo studio dei rivestimenti oggetto di questa tesi. Si può tuttavia notare uno spessore maggiore per la traccia dell'acciaio rivestito con la matrice di allumina.

5.8 Potenziale zeta

Nelle *figure 5.22-5.25* sono riportati i grafici del potenziale zeta in funzione del pH ottenuti dalle misure elettrocinetiche in KCl.

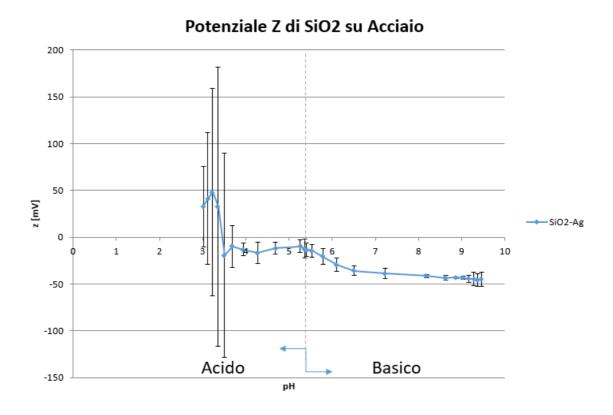


Figura 5.22 - Andamento del potenziale zeta al variare del pH, per del rivestimento silice-argento, depositata su acciaio.

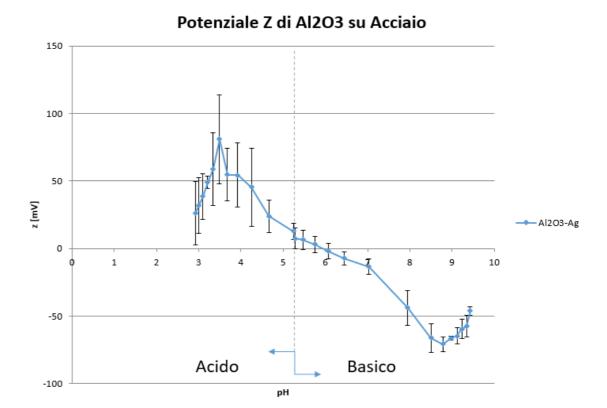


Figura 5.23- Andamento del potenziale zeta al variare del pH, per il rivestimento allumina-argento depositato su acciaio.

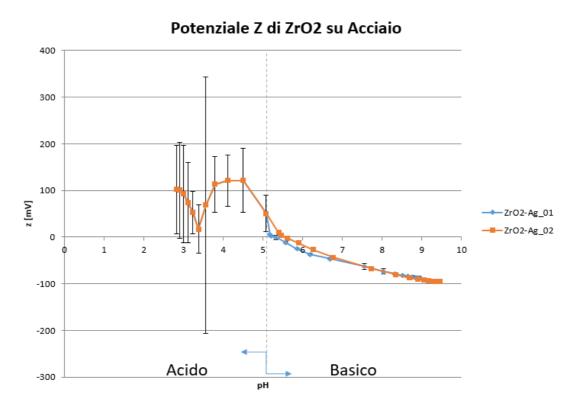


Figura 5.24 - Andamento del potenziale zeta al variare del pH, del rivestimento zirconia-argento, depositato su acciaio.

Nel caso della *figura 5.24* e della *figura 5.25*, le misure in ambiente basico sono state effettuate due volte, in quanto a prima vista parevano valori poco plausibili; tuttavia, la seconda misura ha confermato quanto ottenuto precedentemente in entrambi i casi.

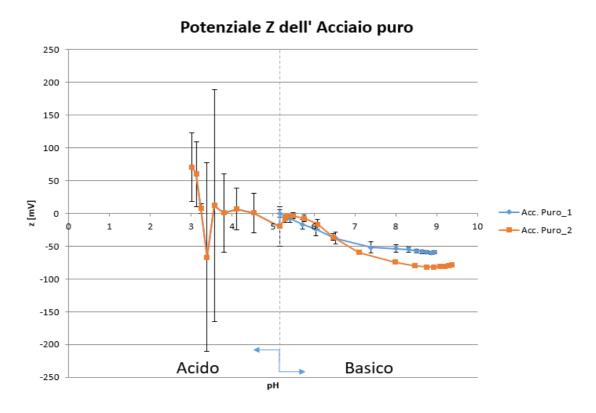


Figura 5.25- Andamento del potenziale zeta al variare del pH, nel caso dell'acciaio puro.

Vengono inoltre mostrati in *tabella 5.34* i valori del punto isoelettrico (IEP) e del potenziale zeta a pH fisiologico, ricavati dalle curve sopra presentate. Essi sono confrontati con i valori ottenuti dai materiali massivi, su cui lo stesso gruppo di ricerca aveva svolto le misure.

Tabella 5.34- IEP e potenziale zeta a pH fisiologico per quanto riguarda le tre matrici adoperate per i rivestimenti, confrontati con valori ottenuti dallo stesso gruppo di ricerca su materiali massivi.

MATRICE	IEP	IEP su materiale massivo	pot. ζ a pH fisiologico [mV]	pot. ζ a pH fisiologico [mV] su materiale massivo		
SILICE	3,45	3,4	-38,9	-24		
ALLUMINA	5,95	4	-43,9	-60		
ZIRCONIA	5,30	3,8	-62,7	-74		
PURO	4,54	/	-51,6	/		

Tutte le superfici testate presentano un punto isoelettrico acido e quindi risultano cariche negativamente a pH fisiologico. Il valore del punto isoelettrico del substrato in acciaio è conforme a quanto riportato in letteratura [159]. Il rivestimento a base silice sposta il valore del punto isoelettrico verso valori più acidi, in accordo con il comportamento acido della silice che ha valori di punto isoelettrico compresi tra 2 e 3 [160]. I rivestimenti a base di allumina e zirconia spostano invece il punto isoelettrico verso valori più elevati, in accordo con i dati riportati in letteratura per allumina e zirconia allo stato di polvere non sinterizzata [160]: queste superfici presentano quindi gruppi funzionali superficiali con comportamento basico. I quantitativi di argento presenti nei coating sono modesti quindi è ragionevole che i punti isoelettrici dei rivestimenti siano vicini a quelli riportati in letteratura per le matrici. I valori di punto isoelettrico e di carica superficiale a pH fisiologico sono confrontabili con quelli misurati in precedenza su rivestimenti analoghi dal gruppo di ricerca [161].

La curva del potenziale zeta rispetto al pH della soluzione per il rivestimento a base silice presenta un evidente plateau, attribuibile alla presenza di gruppi funzionali omogenei a carattere acido (gruppi OH). Questo plateau non è presente per gli altri rivestimenti analizzati né per il substrato. La curva mostra una pendenza molto bassa, indice di una elevata bagnabilità, in accordo con gli angoli di contatto ottenuti. La curva ottenuta sul rivestimento di silice può essere confrontata con una ottenuta nello stesso laboratorio in un lavoro precedente su silice massiva [162]. Le due curve risultano non dissimili, fatto salvo per le elevate deviazioni standard registrate a pH molto acido, di cui al momento però non è chiaro il significato.

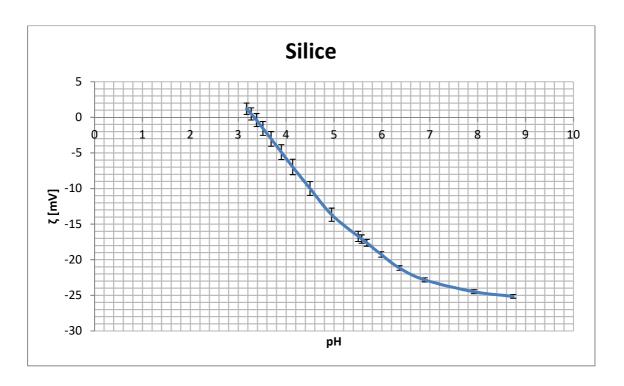


Figura 5.26- Curva del potenziale zeta della silice massiva, ottenuta dallo stesso gruppo di ricerca ed adoperata come confronto.

La curva dell'allumina mostra un plateau in ambiente acido, anche se l'andamento della curva è fortemente disturbato dalle elevate deviazioni standard, in accordo con lo spostamento del PIE verso valori elevati: entrambi gli effetti possono essere legati all'esposizione di gruppi funzionali con comportamento basico. La curva non è dissimile da quella registrata su allumina massiva (svolta dallo stesso gruppo di ricerca), se non per il punto isoelettrico spostato verso valori più basici e il cambiamento di pendenza agli estremi della curva forse ascrivibile ad una maggiore reattività superficiale del materiale in forma di film sottile o a ad un effetto legato all'elevata conducibilità del substrato [162].

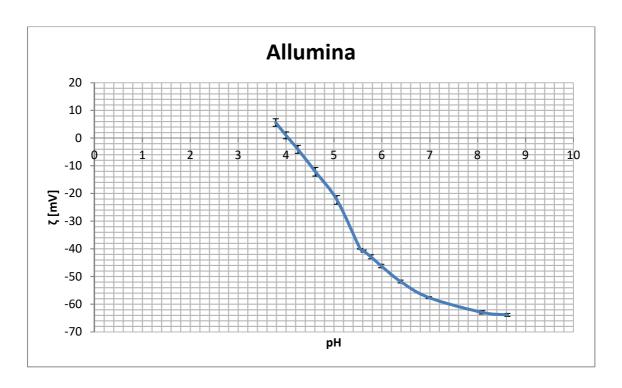


Figura 5.27- Curva del potenziale zeta dell'allumina massiva, ottenuta dallo stesso gruppo di ricerca ed adoperata come confronto.

Anche la zirconia mostra un plateau in campo acido ed un punto isoelettrico spostato verso il campo basico rispetto al materiale massivo [162].

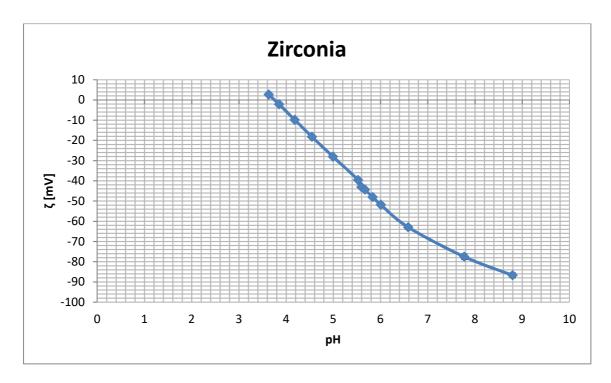


Figura 5.28- Curva del potenziale zeta della zirconia massiva, ottenuta dallo stesso gruppo di ricerca ed adoperata come confronto.

Vengono quindi riportate in *figura 5.29* tutte le curve ottenute, per un più facile confronto, a seguito del quale le superfici non hanno mutato colore e non si sono danneggiate come si può notare in *tabella 5.35*.

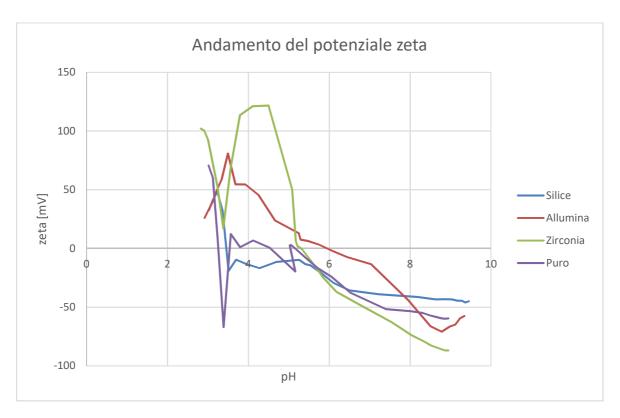
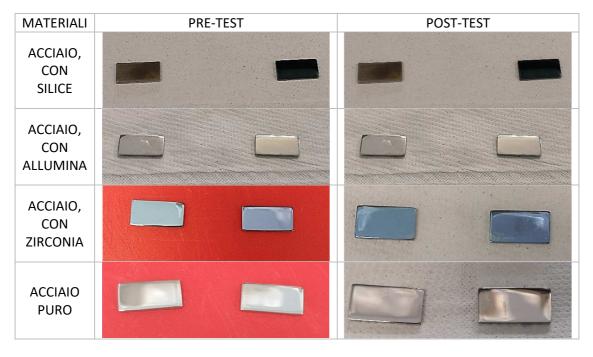


Figura 5.29 - Andamento generale del potenziale zeta sulle quattro superfici esaminate.

Tabella 5.35- Risultati visivi dopo il test del potenziale zeta.



I colori appaiono immutati.

Capitolo 6. Conclusioni

Lo scopo della tesi è stato la realizzazione di rivestimenti inorganici antibatterici e antiadesivi destinati a dispositivi di fissazione temporanea innovativi, per superare le principali problematiche presenti oggigiorno in tale ambito, quali le infezioni e l'eccessiva crescita tissutale.

Sono stati considerati come substrati di acciaio 316L, titanio grado 4 e titanio grado 5, materiali comunemente impiegati nella realizzazione di tali dispositivi. Su tali substrati sono stati depositati, mediante la tecnologia dello sputtering a radio frequenza, rivestimenti a base di varie matrici (silice, allumina e zirconia) e argento. i rivestimenti sono quindi stati analizzati e confrontati dal punto di vista della morfologia, della composizione chimica, della rugosità, della bagnabilità, dell'adesione al substrato, del rilascio ionico e della stabilità in acqua.

Lo spessore ottenuto è stato di circa 150 nm in tutti i casi. La rugosità superficiale si è attestata su valori, sempre inferiori a 0.2 µm, valore riportato in letteratura come soglia, al di sotto della quale una potenziale adesione microbica non viene incrementata, rispetto ad una superficie liscia. Tale valore è potenzialmente correlabile anche con una limitata crescita tissutale. Attraverso il test della bagnabilità, è stato possibile notare una maggiore idrofilicità ottenuta in tutti i campioni rivestiti, rispetto ai substrati nudi, ma in un modo più pronunciato per i rivestimenti a base di silice. I tape test inoltre hanno dimostrato una adesione ottimale del coating al substrato per tutti i casi considerati. Svolgendo inoltre dei test di rilascio è stato possibile indagare la quantità di ioni d'argento e di altri elementi costituenti la matrice in acqua ultrapura; essa si è rivelata, per tutti i materiali testati, al di sotto del limite di citotossicità riportato in letteratura e pari a 0.38 mg/ml. La stabilità è invece dipendente dalla matrice: in particolare la matrice di zirconia ha dimostrato maggiore stabilità ed integrità in lunghi periodi, rispetto agli altri rivestimenti.

BIBLIOGRAFIA

- [1] Campoccia D., Montanaro L., Arciola C. R.: *The significance of infection related to orthopedic devices and issues of antibiotic resistance.* Biomaterials. (2006); 27 (11): 2331-2339.
- [2] D. L. 24 febbraio 1997, n. 37, in materia di "Attuazione della direttiva 93/42/CEE concernente i dispositivi medici".
- [3] https://radiopaedia.org/articles/k-wire.
- [4] Santolini F., Stella M., Chiapale D., Briano S.: *Osteosintesi con fissatore esterno. Le fratture diafisarie dell'arto inferiore.* (2004); 11.
- [5] Admin Yavari S. A., Van Der Stok J., Ahmadi S. M., et al.: *Mechanical analysis of a rodent segmental bone defect model: The effects of internal fixation and implant stiffness on load transfer.* J Biomech. (2014); 47(11): 2700-2708.
- [6] Birringer R. P., Ganot G. S., James B.: *Failure Analysis of Internal Fixation Medical Devices: Overview and Case Studies.* J Fail Anal Prev. (2016); 16(5): 849-857.
- [7] Cerca N., Martins S., Pier G. B., Oliveira R., Azeredo J.: *The relationship between inhibition of bacterial adhesion to a solid surface by sub-MICs of antibiotics and subsequent development of a biofilm.* Res Microbiol. (2005); 156 (5-6): 650-655.
- [8] Bencina M., Mavric T., Junkar I., et al.: *The Importance of Antibacterial Surfaces in Biomedical Applications*. Adv Biomembr Lipid Self-Assembly. (2018); 28: 115-165.
- [9] Ferraris S., Spriano S.: *Antibacterial titanium surfaces for medical implants.* Mater Sci Eng C. (2016); 61: 965-978.
- [10] Nune K. C., Somani M. C., Spencer C. T., Misra R. D. K.: Cellular response of Staphylococcus aureus to nanostructured metallic biomedical devices: surface binding and mechanism of disruption of colonization. Mater Technol. (2017); 32(1): 22-31.
- [11] Burgers R., Witecy C., Hahnel S., Gosau M.: The effect of various topical periimplantitis antiseptics on Staphylococcus epidermidis, Candida albicans, and Streptococcus sanguinis. Arch Oral Biol. (2012); 57: 940-947.
- [12] Watnick P, Kolter R.: *Biofilm, City of Microbes*. J Bacteriol. (2000); 182(10): 2675-2679.

- [13] Fey P. D.: Modality of bacterial growth presents unique targets: how do we treat biofilm-mediated infections? Curr Opin Microbiol. (2010); 13(5): 610-615.
- [14] Esposito S., Leone S.: *Prosthetic joint infections: microbiology, diagnosis, management and prevention.* Int J Antimicrob Agents. (2008); 32: 287-293.
- [15] Hogt A. H., Dankert J., De Vries J. A., Feijen J.: *Adhesion of Coagulase-negative Staphylococci to Biomaterials*. Microbiology. (1983); 129(9): 2959-2968.
- [16] An Y. H., Friedman R. J.: *Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterial surfaces.* J. Biomed. Mater. Res. (Appl. Biomater.). (1998); 43: 338-348.
- [17] Drake D. R. Paul J., Keller J. C.: *Primary bacterial colonization of implant surfaces*. Int J Oral Maxillofac Implants (1999); 14: 226–232.
- [18] Hauck C. R., Agerer F., Muenzner P., Schmitter T.: *Cellular adhesion molecules as targets for bacterial infection*. Eur J Cell Biol. (2006); 85: 235-242.
- [19] Costerton J. W., Montanaro L., Arciola C. R.: *Biofilm in implant infections: Its production and regulation.* Int J Artif Organs. (2005); 28(11): 1062-1068.
- [20] Harris L. G., Richards R. G.: *Staphylococci and implant surfaces: a review.* Int J Care Inj. (2006); 37(2): S3-S14.
- [21] Naves P., del Prado G., Huelves L., et al. *Effects of human serum albumin, ibuprofen and N-acetyl-l-cysteine against biofilm formation by pathogenic Escherichia coli strains*. J Hosp Infect. (2010); 76(2): 165-170.
- [22] Christensen F. B., Dalstra M., Sejling F., Overgaard S., Bünger C.: *Titanium-alloy* enhances bone-pedicle screw fixation: mechanical and histomorphometrical results of titanium-alloy versus stainless steel. Eur Spine J. (2000); 9: 97-103.
- [23] Gasik M.: Understanding biomaterial-tissue interface quality: combined in vitro evaluation. Sci Technol Adv Mater. (2017); 18(1): 550-562.
- [24] Von Eiff C., Peters G., Heilmann C.: *Pathogenesis of infections due to coagulase-negative staphylococci.* Lancet Infect Dis. (2002); 2(11):677–685.
- [25] Liu G. Y., Essex A., Buchanan J. T., et al: *Staphylococcus aureus golden pigment impairs neutrophil killing and promotes virulence through its antioxidant activity*. J Exp Med (2005); 202(2): 209–215.

- [26] Akens M. K., Chien C., Katchky R. N., Kreder H. J., Finkelstein J., Whyne C. M.: *The impact of thermal cycling on Staphylococcus aureus biofilm growth on stainless steel and titanium orthopaedic plates.* BMC Musculoskelet Disord. (2018); 19(260): 1-6.
- [27] Bennani V., Hwang L., Tawse-smith A., Dias G. J., Cannon R.D.: *Effect of Air-Polishing on Titanium Surfaces, Biofilm Removal and Biocompatibility: A Pilot Study.* Biomed Res Int. (2015); 1: 1-8.
- [28] Ahariz M., Courtois P.: *Candida albicans biofilm on titanium: effect of peroxidase precoating.* Med Devices Evid Res. (2010); 33-40.
- [29] Rodriguez-Hernandez A. G., Juarez A., Engel E., Gil F. J.: Streptococcus sanguinis adhesion on titanium rough surfaces: effect of shot-blasting particles. J Mater Sci Mater Med. (2011); 22: 1913-1922.
- [30] Walkowiak-Przybyto M., Klimek L., Okròj W., et al. Adhesion, activation and aggregation of blood platelets and biofilm formation on the surfaces of titanium alloys Ti6Al4V and Ti6Al7Nb. J Biomed Mater. (2012); 100A (3): 768-775.
- [31] Black C. R. M., Goriainov V., Gibbs D., Kanczler J., Tare R. S., Oreffo R. O. C.: *Bone tissue engineering*. Curr Mol Bio Rep. (2015); 1: 132-140.
- [32] http://www.istologia.unige.it/styled-19/page3/page21/page25/styled-4/index.html.
- [33] http://www.treccani.it/enciclopedia/basofilia/.
- [34] Murr L. E.: Strategies for creating living, additively manufactured, open-cellular metal and alloy implants by promoting osseointegration, osteoinduction and vascularization: An overview. J Mater Sci Technol. (2018).
- [35] https://it.wikiversity.org/wiki/II_Tessuto_Osseo#Cellule_ossee.
- [36] http://www.atlanteistologia.unito.it/page.asp?xml=connettivi.Tessuto%20osseo.Os sificazione.
- [37] Young B., Heath J. W, Woodford P.: Weather, Istologia e anatomia microscopica. (2001) Milano, Ambrosiana.
- [38] Verné E.: Materiali per la Bioingegneria. In: Slides a.a. 2017-2018.
- [39] Ask M., Lausmaa J., Kasemo B.: *Preparation and surface spectroscopic characterization of oxide films on Ti6Al4V*. Appl Surf Sci. (1989); 35(3): 283-301.

- [40] Sundgren J. E., Bodö P., Lundström I.: Auger electron spectroscopic studies of the interface between human tissue and implants of titanium and stainless steel. J Colloid Interface Sci. (1986); 110(1): 9-20.
- [41] Chug A., Shukla S., Mahesh L., Jadwani S.: *Osseointegration-Molecular events at the bone-implant interface: A review*. J. Oral Maxillofac. Surgery, Med Pathol. (2013); 25: 1-4.
- [42] Abrahamsson I., Berglundh T., Linder E., Lang N. P., Lindhe J.: *Early bone formation adjacent to rough and turned endosseous implant surfaces. An experimental study in the dog*. Clin Oral Implants Res. (2004); 15(4): 381-392.
- [43] Albrektsson T., Hansson H.A.: An ultrastructural characterization of the interface between bone and sputtered titanium or stainless-steel surfaces. Biomaterials. (1986); 7(3): 201-205.
- [44] Puleo D.A., Nanci A.: *Understanding and controlling the bone-implant interface.*Biomaterials. (1999); 20: 2311-2321.
- [45] Kanagaraja S., Wennerberg A., Eriksson C., Nygren H.: *Cellular reactions and bone apposition to titanium surfaces with different surface roughness and oxide thickness cleaned by oxidation.* Biomaterials. (2001); 22(13): 1809-1818.
- [46] Hayes J. S., Seidenglanz U., Pearce A. I., Pearce S. G., Archer C. W., Richards R. G.: Surface polishing positevely influences ease of plate and screw removal. Eur Cells Mater. (2010); 19: 117-126.
- [47] Hayes J. S., Richards R. G.: Surfaces to control tissue adhesion for osteosynthesis with metal implants: in vitro and in vivo studies to bring solutions to the patient.

 Expert Rev Med Devices. (2010); 7(1): 131-142.
- [48] Boyan B. D., Bonewald L. F., Paschalis E. P., et al. *Osteoblast-mediated mineral deposition in culture is dependent on surface microtopography*. Calcif Tissue Int. (2002); 71(6): 519-529.
- [49] Brown R. N., Sexton B. E., Gabriel Chu T. M., et al. *Comparison of stainless steel and titanium alloy orthodontic miniscrew implants: A mechanical and histologic analysis*.

 Am J Orthod Dentofac Orthop. (2014); 145(4): 496-504.
- [50] Spriano S., Vitale Brovarone C.: *Materiali e Superfici Ingegnerizzate per Applicazione in Medicina*. In: Slides a.a. 2017-2018.

- [51] Deguchi T., Takano-Yamamoto T., Kanomi R., Hartsfield J. K., Roberts W. E., Garetto L. P.: The Use of Small Titanium Screws for Orthodontic Anchorage. Journal of Dental Research (2003); 82(5): 377–381.
- [52] Rai M., Yadav A., Gade A.: Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. Biotechnol Adv. (2009); 27(1): 76-83.
- [53] Ruparelia J. P., Chatterjee A. K., Duttagupta S. P., Mukherj S.: *Strain specificity in antimicrobial activity of silver and copper nanoparticles*. Acta Biomater. (2008); 4: 707-716.
- [54] Ren G., Hu D., Cheng E. W. C., Vargas-Reus M. A., Reip P., Allaker R. P.: Characterisation of copper oxide nanoparticles for antimicrobial applications. Int J Antimicrob Agents. (2009); 33(6): 587-590.
- [55] Heidenau F., Mittelmeier W., Detsch R., et al. *A novel antibacterial titania coating:*Metal ion toxicity and in vitro surface colonization. J Mater Sci Mater Med. (2005)
 ;16(10): 883-888.
- [56] Berger T. J., Spadaro J. A., Chapin S. E., Becker R. O.: *Electrically generated silver ions: quantitative effects on bacterial and mammalian cells.* Antimicrob Agents Chemother. (1976); 9(2): 357-358.
- [57] Kvitek L., Panacek A., Prucek R., et al. *Antibacterial activity and toxicity of silver:*Nanosilver versus ionic silver. J Phys Conf Ser. (2011); 304(1).
- [58] Du W. L., Niu S. S., Xu Y. L., Xu Z. R., Fan C. L.: *Antibacterial activity of chitosan tripolyphosphate nanoparticles loaded with various metal ions.* Carbohydr Polym. (2009); 75(3): 385-389.
- [59] Du W.L., Xu Y.L., Xu Z.R., Fan C.L.: *Preparation, characterization and antibacterial properties against E coli K88 of chitosan nanoparticles loaded copper ions*. Nanotechnology. (2008); 19.
- [60] https://it.wikipedia.org/wiki/Rame#Caratteristiche.
- [61] Chai H., Guo L., Wang X., et al. Antibacterial effect of 317L stainless steel contained copper in prevention of implant-related infection in vitro and in vivo. J Mater Sci Mater Med. (2011); 22: 2525-2535.

- [62] Raffi M., Mehrwan S., Bhatti T. M., et al.: *Investigations into the antibacterial behaviour of copper nanoparticles against Escherichia coli*. Ann Microbiol. (2010); 60(1): 75-80.
- [63] Wu X., Ye L., Liu K., et al.: *Antibacterial properties of mesoporous copper-doped silica xerogels.* Biomed Mater. (2009); 4(4): 1-6.
- [64] Kim Y. H., Choi Y. R., Kim K. M., Choi S. Y.: Evaluation of copper ion of antibacterial effect on Pseudomonas aeruginosa, Salmonella typhimurium and Helicobacter pylori and optical, mechanical properties. Appl Surf Sci. (2012); 258(8): 3823-3828.
- [65] Chatterjee A. K., Chakraborty R., Basu T.: *Mechanism of antibacterial activity of copper nanoparticles*. Nanotechnology. (2014); 25(13): 1-12.
- [66] https://it.wikipedia.org/wiki/Zinco#Applicazioni.
- [67] Zhang L., Jiang Y., Ding Y., Povey M., York D.: *Investigation into the antibacterial behaviour of suspensions of ZnO nanoparticles (ZnO nanofluids).* J Nanoparticle Res. (2007); 9(3): 479-489.
- [68] Sirelkhatim A., Mahmud S., Seeni A. et al.: *Review on zinc oxide nanoparticles:*Antibacterial activity and toxicity mechanism. Nano-Micro Lett. (2015); 7(3): 219-242.
- [69] Raghupathi K. R., Koodali R. T., Manna A. C.: Size-dependent bacterial growth inhibition and mechanism of antibacterial activity of zinc oxide nanoparticles. Langmuir. (2011); 27(7): 4020-4028.
- [70] Padmavathy N., Vijayaraghavan R.: Enhanced bioactivity of ZnO nanoparticles An antimicrobial study. Sci Technol Adv Mater. (2008); 9(3): 1-7.
- [71] https://it.wikipedia.org/wiki/Argento.
- [72] Knetsch M. L. W., Koole L. H.: New strategies in the development of antimicrobial coatings: The example of increasing usage of silver and silver nanoparticles. Polymers (Basel). (2011); 3(1): 340-366.
- [73] Qing Y., Cheng L., Li R., et al.: *Potential antibacterial mechanism of silver nanoparticles and the optimization of orthopedic implants by advanced modification technologies.* Int J Nanomedicine. (2018); 13: 3311-3327.

- [74] Pal S., Tak Y. K., Song J. M.: Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the gram-negative bacterium Escherichia coli. J Biol Chem. (2015); 290(42): 1712-1720.
- [75] Cao H., Qiao Y., Liu X. et al.: *Electron storage mediated dark antibacterial action of bound silver nanoparticles: Smaller is not always better.* Acta Biomater. (2013); 9(2): 5100-5110.
- [76] Huh A. J., Kwon Y. J.: "Nanoantibiotics": A new paradigm for treating infectious diseases using nanomaterials in the antibiotics resistant era. J Control Release. (2011); 156(2): 128-145.
- [77] Kim J. S., Kuk E., Yu K. N., et al. *Antimicrobial effects of silver nanoparticles*. Nanotechnol Biol Med. (2007); 3(1): 95-101.
- [78] Hajipour M. J., Fromm K. M., Ashkarran A. A. et al.: *Antibacterial properties of nanoparticles*. Trends Biotechnol. (2012); 30(10): 499-511.
- [79] Li W.-R., Xie X.-B., Shi Q.-S., Duan S.-S., Ouyang Y.-S., Chen Y.-B.: *Antibacterial effect of silver nanoparticles on Staphylococcus aureus*. Biometals. (2011); 24: 135-141.
- [80] Sondi I., Salopek-Sondi B.: Silver nanoparticles as antimicrobial agent: A case study on E. coli as a model for Gram-negative bacteria. J Colloid Interface Sci. (2004); 275(1): 177-182.
- [81] Rodrigues M. S., Borges J., Gabor C., et al.: Functional behaviour of TiO2 films doped with noble metals. Surf Eng. (2016); 32(8): 554-561.
- [82] Bazaka K., Jacob M. V., Crawford R. J., Ivanova E. P.: Efficient surface modification of biomaterial to prevent biofilm formation and the attachment of microorganisms. Appl Microbiol Biotechnol. (2012); 95: 299-311.
- [83] Shang H., Li J., Shao T.: Mechanical properties and thermal stability of TiAlN/Ta multilayer film deposited by ion beam assisted deposition. Appl Surf Sci. (2014); 310: 317-320.
- [84] https://it.wikipedia.org/wiki/lon_Beam_Assisted_Deposition.
- [85] Zhang F., Wolf G. K., Wang X., Liu X.: Surface properties of silver doped titanium oxide films. Surf Coatings Technol. (2001); 148(1): 65-70.
- [86] Bai X., Sandukas S., Appleford M, Ong J.L., Rabiei A.: *Antibacterial effect and cytotoxicity of Ag-doped functionally graded hydroxyapatite coatings.* J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater. (2012); 100B: 553–561.

- [87] https://www.ccg.msm.cam.ac.uk/research-areas/the-plasma-electrolytic-oxidation-peo-process.
- [88] Gasquères C., Schneider G., Nusko R., Maier G., Dingeldein E., Eliezer A.: *Innovative* antibacterial coating by anodic spark deposition. Surf Coatings Technol. (2012); 206(15): 3410-3414.
- [89] Necula B. S., Apachitei I., Tichelaar F. D., Fratila-Apachitei L. E., Duszczyk J.: *An electron microscopical study on the growth of TiO2-Ag antibacterial coatings on Ti6Al7Nb biomedical alloy.* Acta Biomater. (2011); 7(6): 2751-2757.
- [90] Necula B S., Fratila-Apachitei L. E., Zaat S. A. J., Apachitei I., Duszczyk J.: *In vitro* antibacterial activity of porous *TiO2-Ag composite layers against methicillin-* resistant Staphylococcus aureus. Acta Biomater. (2009); 5(9): 3573-3580.
- [91] Necula B. S., Apachitei I., Fratila-Apachitei L. E., Van Langelaan E. J., Duszczyk J.: Titanium bone implants with superimposed micro/nano-scale porosity and antibacterial capability. Appl Surf Sci. (2013); 273: 310-314.
- [92] https://en.wikipedia.org/wiki/Electrophoretic_deposition.
- [93] Santillán M. J., Quaranta N. E., Boccaccini A. R.: *Titania and titania-silver nanocomposite coatings grown by electrophoretic deposition from aqueous suspensions*. Surf Coatings Technol. (2010); 205(7): 2562-2571.
- [94] Venkateswarlu K., Rameshbabu N., Chandra Bose A., et al. *Fabrication of corrosion resistant, bioactive and antibacterial silver substituted hydroxyapatite/titania composite coating on Cp Ti*. Ceram Int. (2012); 38(1): 731-740.
- [95] Zhang X., Hang R., Wu H., et al.: Synthesis and antibacterial property of Agcontaining TiO2 coatings by combining magnetron sputtering with micro-arc oxidation. Surf Coat Technol. (2013); 235:748-754.
- [96] Inoue Y., Uota M., Torikai T., et al. *Antibacterial properties of nanostructured silver titanate thin films formed on a titanium plate.* J Biomed Mater Res. (2009); 92A: 1171-1180.
- [97] Lee S., Otgonbayar U., Lee J., Kim K., Kim K.: Silver ion-exchanged sodium titanate and resulting effect on antibacterial efficacy. Surf Coat Technol. (2010); 205: S172-S176.

- [98] Miola M., Ferraris S., Di Nunzio S., et al. *Surface silver-doping of biocompatible glasses to induce antibacterial properties. Part II: plasma sprayed glass-coatings.* J Mater Sci Mater Med. (2009); 20: 741-749.
- [99] García-Serrano J., Gómez-Hernández E., Ocampo-Fernández M., Pal U.: Effect of Ag doping on the crystallization and phase transition of TiO2 nanoparticles. Curr Appl Phys. (2009); 9(5): 1097-1105.
- [100] Braconnier B., Páez C. A., Lambert S., et al.: *Ag- and SiO2-doped porous TiO2 with enhanced thermal stability*. Microporous Mesoporous Mater. (2009); 122(1-3): 247-254.
- [101] Chai L.-Y., Wei S.-W., Peng B., Li Z.-Y.: *Effect of thermal treating temperature on characteristics of silver-doped titania*. Trans Nonferrous Met Soc China (English Ed.). (2008); 18(4): 980-985.
- [102] https://it.wikipedia.org/wiki/Processo_sol-gel.
- [103] Mai L., Wang D., Zhang S., Xie Y., Huang C., Zhang Z.: *Synthesis and bactericidal ability of Ag/TiO2 composite films deposited on titanium plate.* Appl. Surf. Sci. (2010); 257: 974–978.
- [104] Blanco E., González-Leal J. M., Ramírez-del Solar M.: *Photocatalytic TiO2 sol-gel thin films: Optical and morphological characterization.* Sol Energy. (2015); 122: 11-23.
- [105] Batebi K., Khazaei B. A., Afshar A.: Characterization of sol-gel derived silver/fluor-hydroxyapatite composite coatings on titanium substrate. Surf Coat Technol. (2018); 352: 522-528.
- [106] Yu B., Leung K. M., Guo Q., Lau W. M., Yang J.: *Synthesis of Ag-TiO2 composite nano thin film for antimicrobial application*. Nanotechnology. (2011); 22(11): 2-11.
- [107] Tomás S. A., Luna-Resendis A., Cortés-Cuautli L. C., Jacinto D.: Optical and morphological characterization of photocatalytic TiO2 thin films doped with silver. Thin Solid Films. (2009); 518(4): 1337-1340.
- [108] Secinti K. D., Özalp H., Attar A., Sargon M. F.: *Nanoparticle silver ion coatings inhibit biofilm formation on titanium implants.* J Clin Neurosci. (2011); 18(3): 391-395.
- [109] Ewald A., Glückermann S. K., Thull R., Gbureck U.: *Antimicrobial titanium/silver PVD coatings on titanium*. Biomed Eng Online. (2006); 5:1-10.
- [110] https://it.wikibooks.org/wiki/Micro_e_nanotecnologia/Microtecnologia/Film_sottili /Sputtering

- [111] Balagna C., Ferraris S., Perero S., et al. Silver *Nanocluster/Silica Composite Coatings Obtained by Sputtering for Antibacterial Applications.* Struct NanocompositesPerspect Futur Appl. (2013):225-247.
- [112] Meng F., Sun Z.: A mechanism for enhanced hydrophilicity of silver nanoparticles modified TiO2 thin films deposited by RF magnetron sputtering. Appl Surf Sci. (2009); 255(13-14): 6715-6720.
- [113] Meng F., Sun Z.: Enhanced photocatalytic activity of silver nanoparticles modified TiO2 thin films prepared by RF magnetron sputtering. Mater Chem Phys. (2009); 118(2-3): 349-353.
- [114] Song D.-H., Uhm S.-H., Kim S.-E., Kwon J.-S., Han J.-G., Kim K.-N.: Synthesis of titanium oxide thin films containing antibacterial silver nanoparticles by a reactive magnetron co-sputtering system for application in biomedical implants. Mater Res Bull. (2012); 47(10): 2994-2998
- [115] Song D.-H., Uhm S.-H., Lee S.-B., Han J.-G., Kim K.-N.: *Antimicrobial silver-containing titanium oxide nanocomposite coatings by a reactive magnetron sputtering*. Thin Solid Films. (2011); 519(20): 7079-7085.
- [116] Huang H.-L., Chang Y.-Y., Lai M.-C., Lin C.-R., Lai C.-H., Shieh T.-M.: *Antibacterial TaN-Ag coatings on titanium dental implants*. Surf Coatings Technol. (2010); 205(5): 1636-1641.
- [117] Trujillo N. A., Oldinski R. A., Ma H., Bryers J. D., Williams J. D., Popat K. C.: Antibacterial effects of silver-doped hydroxyapatite thin films sputter deposited on titanium. Mater Sci Eng C. (2012); 32(8): 2135-2144.
- [118] Ferraris M., Perero S., Ferraris S., et al. *Antibacterial silver nanocluster / silica composite coatings on stainless steel*. Appl Surf Sci. (2017); 396: 1546-1555.
- [119] Huang H.-L., Chang Y.-Y., Weng J.-C., Chen Y.-C., Lai C.-H., Shieh T.-M.: *Anti-bacterial performance of Zirconia coatings on Titanium implants*. Thin Solid Films. (2013); 528: 151-156.
- [120] Kim S., Park C., Cheon K., et al. *Antibacterial and bioactive properties of stabilized* silver on titanium with a nanostructured surface for dental applications. Appl Surf Sci. (2018); 451: 232-240.
- [121] https://en.wikipedia.org/wiki/Thermal spraying#Plasma spraying.

- [122] Spriano S.: *Materiali Per Ortopedia.* In: Materianev e Superfici Ingegnerizzate per Applicazione in Medicina. (a.a. 2017-2018).
- [123] Li B., Liu X., Meng F., Chang J., Ding C.: *Preparation and antibacterial properties of plasma sprayed nano-titania/silver coatings*. Mater Chem Phys. (2009); 118(1): 99-104.
- [124] Chen Y., Zheng X., Xie Y., Ji H., Ding C.: *Antibacterial properties of vacuum plasma sprayed titanium coatings after chemical treatment.* Surf Coatings Technol. (2009); 204(5): 685-690.
- [125] Fielding G. A., Roy M., Bandyopadhyay A., Bose S.: *Antibacterial and biological characteristics of silver containing and strontium doped plasma sprayed hydroxyapatite coatings*. Acta Biomater. (2012); 8(8): 3144-3152.
- [126] Gangadoo S., Taylor-Robinson A., Chapman A.: *Nanoparticle and biomaterial characterisation techniques*. Mater Technol. (2015); 30(5): B44-B56.
- [127] Sjollema J., Zaat S. A. J., Fontaine V., et al.: *In vitro methods for the evaluation of antimicrobial surface designs.* Acta Biomater. (2018); 70: 12-24.
- [128] Darouiche R. O., Mansouri M. D., Raad I. I.: *Efficacy of antimicrobial-impreganted silicone sections from penile implants preventing device colonization in an animal model.* Urology. (2002); 59(1): 303-309.
- [129] https://en.wikipedia.org/wiki/Disk diffusion test.
- [130] http://www.primolevi.gov.it/public/transfert/Borghi/4%5E%20TCA%202013/Terren i%20per%20test%20KIRBY-BAUER/Mueller%20Hinton%20Agar%20m048.pdf
- [131] https://microbiologyinfo.com/wp-content/uploads/2016/10/Spread-Plate-Technique-Principle-Procedure-and-Uses.pdf.
- [132] Coenye T., Nelis H. J.: *In vitro and in vivo model systems to study microbial biofilm formation.* J Microbiol Methods. (2010); 83(2): 89-105.
- [133] Monsees T. K.: Biocompatibility and Anti-Microbiological Activity Characterization of Novel Coatings for Dental Implants: A Primer for Non-Biologists. Front Mater. (2016); 3(August): 1-6.
- [134] Williams D. F.: On the mechanism of biocompatibility. Biomaterials. (2008); 29: 2941–2953.
- [135] http://store.uni.com/catalogo/index.php/norme/root-categorie-ics/11/11-100/11-100-0.html?tpqual%5B0%5D=1a&tpqual_var=99&ttbloc=0.

- [136] https://www.thermofisher.com/it/en/home/references/protocols/cell-and-tissue-analysis/cell-profilteration-assay-protocols/cell-viability-with-alamarblue.html.
- [137] Christ K. V., Turner K.T.: Methods to measure the strength of cell adhesion to substrates. J Adhes Sci Technol. (2010);24(13-14):2027-2058.
- [138] Wang H., Hao Z., Wen S.: Adhesion strength and morphologies of rBMSCS during initial adhesion and spreading. Acta Mech Solida Sin. (2015); 28(5): 497-509.
- [139] Tateishi T., Ushida T.: *Cell Adhesion Strength to Bioceramics and Morphology.*Biomed Eng Conf. (1995):278-281.
- [140] Kokkinos P. A., Koutsoukos P. G., Deligianni D. D.: Detachment strength of human osteoblasts cultured on hydroxyapatite with various surface roughness. Contribution of integrin subunits. J Mater Sci Mater Med. (2012); 23(6): 1489-1498.
- [141] Elineni K. K., Gallant N. D.: Regulation of cell adhesion strength by peripheral focal adhesion distribution. Biophys J. (2011); 101(12): 2903-2911.
- [142] Goldstein A. S., DiMilla P. A.: Application of fluid mechanic and kinetic models to characterize mammalian cell detachment in a radial-flow chamber. Biotechnol Bioeng. (1997); 55(4): 616-629.
- [143] Gao Z., Wang S., Zhu H., Su C., Xu G., Lian X.: Using selected uniform cells in round shape with a micropipette to measure cell adhesion strength on silk fibroin-based materials. Mater Sci Eng C. (2008); 28: 1227-1235.
- [144] http://www.imeco.it/titanio-gradi.html.
- [145] http://www.ravaniacciai.it/aisi_316l/listtables_it_101.aspx
- [146] https://it.wikipedia.org/wiki/Bagnatura#Applicazioni_pratiche.
- [147] Influence of surface roughness on contact angle and wettability. Attension (TN 7).
- [148] https://en.wikipedia.org/wiki/Sessile_drop_technique#Wilhelmy_method.
- [149] https://it.wikipedia.org/wiki/Profilometro.
- [150] Manuale HI 93737 Silver ISM.
- [151] https://it.wikipedia.org/wiki/Fotometro#Funzionamento.
- [152] https://it.wikipedia.org/wiki/ICP-MS.
- [153] ASTM D 3390, Standard Test Methods for Measuring Adhesion by Tape Test, 2009.
- [154] https://it.wikipedia.org/wiki/Microscopio_elettronico_a_scansione.
- [155] https://photometrics.net/energy-dispersive-spectroscopy-eds/.
- [156] https://it.wikipedia.org/wiki/Diffrazione dei raggi X.

- [157] https://it.wikipedia.org/wiki/Potenziale_zeta.
- [158] Muzio G., Miola M., Perero S., et al.: *Polypropylene prostheses coated with silver nanoclusters / silica coating obtained by sputtering: Biocompatibility and antibacterial properties.* Surf Coat Technol. (2017); 319: 326-334.
- [159] Spriano S., Sarath Chandra V., Cochis A., Uberti F., Rimondini L., Bertone E., Vitale A., Scolaro C., Ferrari M., Cirisano F., Gautier di Confiengo G., Ferraris S.: *How do wettability, zeta potential and hydroxylation degree affect the biological response of biomaterials?* Materials Science and Engineering. (2017); C 74: 542-555.
- [160] Kosmulski M.: *PH-dependent surface charging and points of zero charge. IV. Update and new approach.* Journal of Colloid and Interface Science. (2009); 337: 439–448.
- [161] Ur Rehman M.A., Ferraris S., Goldmann W.H., Perero S., Bastan F.E., Nawaz Q., Confiengo G.G.D., Ferraris M., Boccaccini A.R.: *Antibacterial and Bioactive Coatings Based on Radio Frequency Co-Sputtering of Silver Nanocluster-Silica Coatings on PEEK/Bioactive Glass Layers Obtained by Electrophoretic Deposition*. ACS Applied Materials and Interfaces. (2017);9: 32489-32497.
- [162] Spriano S., Sarath Chandra V., Cochis A., et al. *How do wettability, zeta potential and hydroxylation degree affect the biological response of biomaterials?* Mater Sci Eng C. (2017); 74: 542-555.

FONTI DELLE FIGURE

- [F1] Pau M.: Bioingegneria Meccanica. a.a. 2014-2015.
- [F2] http://pictures.doccheck.com/it/photo/15198-chiodo-per-femore-prossimale.
- [F3] https://radiopaedia.org/articles/k-wire.
- [F4] Grant C. A., Schuetz M., Epari D.: *Mechanical testing of internal fixation devices: A theoretical and practical examination of current methods.* J Biomech. (2015); 48(15): 3989-3994.
- [F5] http://www.codicepaleo.com/biofilm/#.
- [F6] Campoccia D., Montanaro L., Arciola C. R.: *The significance of infection related to orthopedic devices and issues of antibiotic resistance.* Biomaterials. (2006); 27(11): 2331-2339.
- [F7] Drake D. R. Paul J., Keller J. C.: *Primary bacterial colonization of implant surfaces*. Int J Oral Maxillofac Implants (1999); 14: 226–232.
- [F8] (a)https://en.wikipedia.org/wiki/Staphylococcus_aureus#/media/File:Staphylococcus_aureus_VISA_2.jpg.
 (b)https://en.wikipedia.org/wiki/Staphylococcus_epidermidis#/media/File:Staphylococcus_epidermidis_biofilm_on_titanium_substrate.tif.
- [F9] Akens M. K., Chien C., Katchky R. N., Kreder H. J., Finkelstein J., Whyne C. M.: *The impact of thermal cycling on Staphylococcus aureus biofilm growth on stainless steel and titanium orthopaedic plates.* BMC Musculoskelet Disord. (2018); 19(260): 1-6.
- [F10] Bennani V., Hwang L., Tawse-smith A., Dias G. J., Cannon R.D.: *Effect of Air-Polishing on Titanium Surfaces, Biofilm Removal and Biocompatibility: A Pilot Study.* Biomed Res Int. (2015); 1: 1-8.
- [F11] Burgers R., Witecy C., Hahnel S., Gosau M.: The effect of various topical periimplantitis antiseptics on Staphylococcus epidermidis, Candida albicans and Streptococcus sanguinis. Arch Oral Biol. (2012); 57: 940-947.
- [F12] Nune K. C., Somani M. C., Spencer C. T., Misra R. D. K.: Cellular response of Staphylococcus aureus to nanostructured metallic biomedical devices: surface binding and mechanism of disruption of colonization. Mater Technol. (2017); 32(1): 22-31.

- [F13] Ahariz M., Courtois P.: *Candida albicans biofilm on titanium: effect of peroxidase precoating.* Med Devices Evid Res. (2010); 33-40.
- [F14] Rodriguez-Hernandez A. G., Juarez A., Engel E., Gil F. J.: *Streptococcus sanguinis adhesion on titanium rough surfaces: effect of shot-blasting particles.* J Mater Sci Mater Med. (2011); 22: 1913-1922.
- [F15] Walkowiak-Przybyto M., Klimek L., Okròj W., et al. Adhesion, activation and aggregation of blood platelets and biofilm formation on the surfaces of titanium alloys Ti6Al4V and Ti6Al7Nb. J Biomed Mater. (2012); 100A (3): 768-775.
- [F16] Walkowiak-Przybyto M., Klimek L., Okròj W., et al. Adhesion, activation and aggregation of blood platelets and biofilm formation on the surfaces of titanium alloys Ti6Al4V and Ti6Al7Nb. J Biomed Mater. (2012); 100A (3): 768-775.
- [F17] sclerosimultipla-clinica.com/cellule-staminali-mesenchimali-terapia.html.
- [F18] Murr L. E.: Strategies for creating living, additively manufactured, open-cellular metal and alloy implants by promoting osseointegration, osteoinduction and vascularization: An overview. J Mater Sci Technol. (2018).
- [F19] https://it.wikipedia.org/wiki/Ossificazione.
- [F20] http://www.bu.edu/histology/p/02401loa.htm.
- [F21] Chug A., Shukla S., Mahesh L., Jadwani S.: *Osseointegration-Molecular events at the bone-implant interface: A review.* J Oral Maxillofac Surgery, Med Pathol. (2013); 25: 1-4.
- [F22] Boyan B. D., Bonewald L. F., Paschalis E. P., et al. *Osteoblast-mediated mineral deposition in culture is dependent on surface microtopography*. Calcif Tissue Int. (2002); 71(6): 519-529.
- [F23] Hayes J. S., Richards R. G.: Surfaces to control tissue adhesion for osteosynthesis with metal implants: in vitro and in vivo studies to bring solutions to the patient. Expert Rev Med Devices. (2010); 7(1): 131-142.
- [F24] Raffi M., Mehrwan S., Bhatti T. M., et al.: *Investigations into the antibacterial behaviour of copper nanoparticles against Escherichia coli*. Ann Microbiol. (2010); 60(1): 75-80.

- [F25] Kim Y. H., Choi Y. R., Kim K. M., Choi S. Y.: Evaluation of copper ion of antibacterial effect on Pseudomonas aeruginosa, Salmonella typhimurium and Helicobacter pylori and optical, mechanical properties. Appl Surf Sci. (2012); 258(8): 3823-3828.
- [F26] Zhang L., Jiang Y., Ding Y., Povey M., York D.: *Investigation into the antibacterial behaviour of suspensions of ZnO nanoparticles (ZnO nanofluids).* J Nanoparticle Res. (2007); 9(3): 479-489.
- [F27] Raghupathi K. R., Koodali R. T., Manna A. C.: Size-dependent bacterial growth inhibition and mechanism of antibacterial activity of zinc oxide nanoparticles. Langmuir. (2011); 27(7): 4020-4028.
- [F28] Padmavathy N., Vijayaraghavan R.: Enhanced bioactivity of ZnO nanoparticles An antimicrobial study. Sci Technol Adv Mater. (2008); 9(3): 1-7.
- [F29] http://slideplayer.it/slide/10273357/.
- [F30] Knetsch M. L. W., Koole L. H.: New strategies in the development of antimicrobial coatings: The example of increasing usage of silver and silver nanoparticles. Polymers (Basel). (2011); 3(1): 340-366.
- [F31] Hajipour M. J., Fromm K. M., Ashkarran A. A. et al.: *Antibacterial properties of nanoparticles*. Trends Biotechnol. (2012); 30(10): 499-511.
- [F32] Ferraris S., Spriano S.: *Antibacterial titanium surfaces for medical implants.* Mater Sci Eng C. (2016); 61: 965-978.
- [F33] Rodrigues M. S., Borges J., Gabor C., et al.: Functional behaviour of TiO2 films doped with noble metals. Surf Eng. (2016); 32(8): 554-561.
- [F34] Shang H., Li J., Shao T.: Mechanical properties and thermal stability of TiAlN/Ta multilayer film deposited by ion beam assisted deposition. Appl Surf Sci. (2014); 310: 317-320.
- [F35] https://www.ccg.msm.cam.ac.uk/research-areas/the-plasma-electrolytic-oxidation-peo-process.
- [F36] Necula B. S., Apachitei I., Fratila-Apachitei L. E., Van Langelaan E. J., Duszczyk J.: Titanium bone implants with superimposed micro/nano-scale porosity and antibacterial capability. Appl Surf Sci. (2013); 273: 310-314.

- [F37] Gasquères C., Schneider G., Nusko R., Maier G., Dingeldein E., Eliezer A.: *Innovative* antibacterial coating by anodic spark deposition. Surf Coatings Technol. (2012); 206(15): 3410-3414.
- [F38] http://www.substech.com/dokuwiki/lib/exe/fetch.php?w=&h=&cache=c ache&media=electrophoretic coating.png.
- [F39] Venkateswarlu K., Rameshbabu N., Chandra Bose A., et al. *Fabrication of corrosion* resistant, bioactive and antibacterial silver substituted hydroxyapatite/titania composite coating on Cp Ti. Ceram Int. (2012); 38(1): 731-740.
- [F40] Inoue Y., Uota M., Torikai T., et al. *Antibacterial properties of nanostructured silver titanate thin films formed on a titanium plate.* J Biomed Mater Res. (2009); 92A: 1171-1180.
- [F41] Lee S., Otgonbayar U., Lee J., Kim K., Kim K.: Silver ion-exchanged sodium titanate and resulting effect on antibacterial efficacy. Surf Coat Technol. (2010); 205: S172-S176.
- [F42] Miola M., Ferraris S., Di Nunzio S., et al. *Surface silver-doping of biocompatible glasses to induce antibacterial properties. Part II: plasma sprayed glass-coatings.* J Mater Sci Mater Med. (2009); 20: 741-749.
- [F43] http://apexwallpapers.com/search/sol-gel-wikipedia.
- [F44] Yu B., Leung K. M., Guo Q., Lau W. M., Yang J.: *Synthesis of Ag-TiO2 composite nano thin film for antimicrobial application.* Nanotechnology. (2011); 22(11): 2-11.
- [F45] Tomás S. A., Luna-Resendis A., Cortés-Cuautli L. C., Jacinto D.: Optical and morphological characterization of photocatalytic TiO2 thin films doped with silver. Thin Solid Films. (2009); 518(4): 1337-1340.
- [F46] Batebi K., Khazaei B. A., Afshar A.: Characterization of sol-gel derived silver/fluor-hydroxyapatite composite coatings on titanium substrate. Surf Coat Technol. (2018); 352: 522-528.
- [F47] Ewald A., Glückermann S. K., Thull R., Gbureck U.: *Antimicrobial titanium/silver PVD coatings on titanium.* Biomed Eng Online. (2006); 5:1-10.
- [F48] Meng F., Sun Z.: A mechanism for enhanced hydrophilicity of silver nanoparticles modified TiO2 thin films deposited by RF magnetron sputtering. Appl Surf Sci. (2009); 255(13-14): 6715-6720.

- [F49] Song D.-H., Uhm S.-H., Lee S.-B., Han J.-G., Kim K.-N.: *Antimicrobial silver-containing titanium oxide nanocomposite coatings by a reactive magnetron sputtering*. Thin Solid Films. (2011); 519(20): 7079-7085.
- [F50] Huang H.-L., Chang Y.-Y., Lai M.-C., Lin C.-R., Lai C.-H., Shieh T.-M.: *Antibacterial TaN-Ag coatings on titanium dental implants*. Surf Coatings Technol. (2010); 205(5): 1636-1641
- [F51] Trujillo N. A., Oldinski R. A., Ma H., Bryers J. D., Williams J. D., Popat K. C.: Antibacterial effects of silver-doped hydroxyapatite thin films sputter deposited on titanium. Mater Sci Eng C. (2012); 32(8): 2135-2144.
- [F52] Ferraris M., Perero S., Ferraris S., et al. *Antibacterial silver nanocluster / silica composite coatings on stainless steel*. Appl Surf Sci. (2017); 396: 1546-1555.
- [F53] Huang H.-L., Chang Y.-Y., Weng J.-C., Chen Y.-C., Lai C.-H., Shieh T.-M.: *Anti-bacterial performance of Zirconia coatings on Titanium implants.* Thin Solid Films. (2013); 528: 151-156.
- [F54] Kim S., Park C., Cheon K., et al. *Antibacterial and bioactive properties of stabilized* silver on titanium with a nanostructured surface for dental applications. Appl Surf Sci. (2018); 451: 232-240.
- [F55] http://www.ep-coatings.co.uk/processes/plasma-spraying/.
- [F56] Li B., Liu X., Meng F., Chang J., Ding C.: *Preparation and antibacterial properties of plasma sprayed nano-titania/silver coatings*. Mater Chem Phys. (2009); 118(1): 99-104.
- [F57] Chen Y., Zheng X., Xie Y., Ji H., Ding C.: Antibacterial properties of vacuum plasma sprayed titanium coatings after chemical treatment. Surf Coatings Technol. (2009); 204(5): 685-690.
- [F58] Fielding G. A., Roy M., Bandyopadhyay A., Bose S.: *Antibacterial and biological characteristics of silver containing and strontium doped plasma sprayed hydroxyapatite coatings*. Acta Biomater. (2012); 8(8): 3144-3152.
- [F59] Sjollema J., Zaat S. A. J., Fontaine V., et al.: *In vitro methods for the evaluation of antimicrobial surface designs.* Acta Biomater. (2018); 70: 12-24.
- [F60] Sjollema J., Zaat S. A. J., Fontaine V., et al.: *In vitro methods for the evaluation of antimicrobial surface designs.* Acta Biomater. (2018); 70: 12-24.

- [F61] Sjollema J., Zaat S. A. J., Fontaine V., et al.: *In vitro methods for the evaluation of antimicrobial surface designs.* Acta Biomater. (2018); 70: 12-24.
- [F62] http://slideplayer.it/slide/9207364/27/images/3/I+metodi+della+conta+vitale+su+p iastra.jpg.
- [F63] Sjollema J., Zaat S. A. J., Fontaine V., et al.: *In vitro methods for the evaluation of antimicrobial surface designs.* Acta Biomater. (2018); 70: 12-24.
- [F64] Sjollema J., Zaat S. A. J., Fontaine V., et al.: *In vitro methods for the evaluation of antimicrobial surface designs.* Acta Biomater. (2018); 70: 12-24.
- [F65] Sjollema J., Zaat S. A. J., Fontaine V., et al.: *In vitro methods for the evaluation of antimicrobial surface designs.* Acta Biomater. (2018); 70: 12-24.
- [F66] Necula B S., Fratila-Apachitei L. E., Zaat S. A. J., Apachitei I., Duszczyk J.: *In vitro* antibacterial activity of porous TiO2-Ag composite layers against methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Acta Biomater. (2009); 5(9): 3573-3580.
- [F67] Sjollema J., Zaat S. A. J., Fontaine V., et al.: *In vitro methods for the evaluation of antimicrobial surface designs.* Acta Biomater. (2018); 70: 12-24.
- [F68] Sjollema J., Zaat S. A. J., Fontaine V., et al.: *In vitro methods for the evaluation of antimicrobial surface designs.* Acta Biomater. (2018); 70: 12-24.
- [F69] Sjollema J., Zaat S. A. J., Fontaine V., et al.: *In vitro methods for the evaluation of antimicrobial surface designs.* Acta Biomater. (2018); 70: 12-24.
- [F70] Sjollema J., Zaat S. A. J., Fontaine V., et al.: *In vitro methods for the evaluation of antimicrobial surface designs*. Acta Biomater. (2018); 70: 12-24.
- [F71] https://www.thermofisher.com/it/en/home/references/protocols/cell-and-tissue-analysis/cell-profilteration-assay-protocols/cell-viability-with-alamarblue.html.
- [F72] Christ K. V., Turner K.T.: Methods to measure the strength of cell adhesion to substrates. J Adhes Sci Technol. (2010);24(13-14):2027-2058.
- [F73] Christ K. V., Turner K.T.: Methods to measure the strength of cell adhesion to substrates. J Adhes Sci Technol. (2010);24(13-14):2027-2058.
- [F74] Christ K. V., Turner K.T.: Methods to measure the strength of cell adhesion to substrates. J Adhes Sci Technol. (2010);24(13-14):2027-2058.
- [F75] Christ K. V., Turner K.T.: Methods to measure the strength of cell adhesion to substrates. J Adhes Sci Technol. (2010);24(13-14):2027-2058.

- [F76] Christ K. V., Turner K.T.: Methods to measure the strength of cell adhesion to substrates. J Adhes Sci Technol. (2010);24(13-14):2027-2058.
- [F77] Christ K. V., Turner K.T.: Methods to measure the strength of cell adhesion to substrates. J Adhes Sci Technol. (2010);24(13-14):2027-2058.
- [F78] Wang H., Hao Z., Wen S.: Adhesion strength and morphologies of rBMSCS during initial adhesion and spreading. Acta Mech Solida Sin. (2015); 28(5): 497-509.
- [F79] https://clearmetalsinc.com/technology/.
- [F81] http://www.treccani.it/enciclopedia/interfasi-caratteristiche-chimico-fisiche_(Enciclopedia-della-Scienza-e-della-Tecnica)/.
- [F82] https://www.researchgate.net/figure/Water-contact-angle-measurement-by-sessile-drop-method-for-a-TS-30-b-TS-B-2-c_fig5_259695738.
- [F83] https://www.keyence.com/ss/products/microscope/roughness/equipment/line_01. jsp.
- [F86] Manuale HI 93737 Silver ISM.
- [F88] ASTM D 3390, Standard Test Methods for Measuring Adhesion by Tape Test, 2009.
- [F89] http://www.minerali.it/imageView.ashx?Image=/images/default.png&type=width&size=200&tName=SciPostSection&Id=bb6c153f-d6ab-47ff-a4e4-acd705377893.
- [F90] Luxbacher T.: *The ZETA Guide: Principles of the Streaming Potential Technique*. (2014).
- [F91] Luxbacher T.: *The ZETA Guide: Principles of the Streaming Potential Technique*. (2014).

FONTI DELLE TABELLE

- [T1] Santolini F., Stella M., Chiapale D., Briano S.: Osteosintesi con fissatore esterno. Le fratture diafisarie dell'arto inferiore (2004); 11.
- [T3] Sundgren J. E., Bodö P., Lundström I.: Auger electron spectroscopic studies of the interface between human tissue and implants of titanium and stainless steel. J Colloid Interface Sci. (1986); 110(1): 9-20.
- [T7] https://en.wikipedia.org/wiki/Thermal_spraying#Plasma_spraying
- [T10] Sjollema J., Zaat S. A. J., Fontaine V., et al.: *In vitro methods for the evaluation of antimicrobial surface designs.* Acta Biomater. (2018); 70: 12-24.
- [T16] https://it.wikipedia.org/wiki/Microscopio_elettronico_a_scansione.
- [T18] https://it.wikipedia.org/wiki/Diffrazione_dei_raggi_X.

RINGRAZIAMENTI

A conclusione di questa tesi desidero ringraziare tutti coloro che in questi mesi ed in questi stupendi, anche se a volte difficili, anni mi sono stati accanto e mi hanno sopportato, spronandomi ogni volta a proseguire sulla mia strada e metterci tutta la grinta e l'impegno che avevo.

Ringrazio le mie relatrici per la loro disponibilità e gli utilissimi consigli. Desidero ringraziare in particolare modo l'Ing. Sara Ferraris, che è stata un punto di riferimento in questi mesi; la sua bravura e la sua inesauribile pazienza hanno costituito un valore aggiunto a questa splendida esperienza. Rivolgo i miei ringraziamenti anche al CNR-Imamoter (Torino), che ha gentilmente collaborato a questo lavoro.

Ringrazio poi tutta la mia famiglia per il sostegno continuo e il supporto fisico e morale che mi hanno regalato sempre e senza alcuna avarizia; l'amore e la gratitudine che provo per voi sono inimmaginabili.

Ringrazio gli amici, dell'università e non, che hanno reso più leggera la vita con caffè, bicchieri di vino e risate; mi avete donato attimi indimenticabili, che solo persone splendide e uniche come voi avrebbero potuto creare. Questi anni senza di voi sarebbero stati nulla.

Ringrazio Dario, per l'amore e la pazienza con cui è riuscito a sopportare questo essere testardo che fa sempre di testa sua e che nonostante gli infiniti difetti, mi accetta per come sono. Ringrazio anche la sua famiglia, che ora è anche un po' mia, per il continuo affetto dimostratomi.

Ringrazio infine chi non c'è più e nonostante ciò continua a vegliare su di me e ad ispirarmi. Mia cara nonna, questa tesi è dedicata a te, ne saresti stata orgogliosa.