POLITECNICO DI TORINO

Corso di Laurea Magistrale in Ingegneria Biomedica

Tesi di Laurea Magistrale

Vetri e Vetroceramici Bioattivi per Applicazioni Dentali



Relatori

Prof. Francesco Baino

Prof.essa Enrica Vernè

Candidato:

Pierpaolo Perazzi

Marzo 2021

INDICE

A1 / /	
Abstract	

Capitolo 1

Il Dente: Caratteristiche	, Implantologia e	Rigenerazione	2
---------------------------	-------------------	---------------	---

1.1 Anatomia e struttura del dente	2
1.1.1 Smalto	
1.1.2 Dentina	
1.1.3 Polpa dentale	
1.1.4 Il Parodonto	6
1.2 Impianti dentali	8
1.2.1 Caratteristiche di un impianto dentale	9
1.2.2 Materiali per implantologia dentale	11
1.3 Strategie di rigenerazione dentale	15
1.3.1 Cellule staminali dentali e fattori di crescita	16
1.3.2 Biomateriali e scaffold	17
1.3.3 Altri approcci	19

Capitolo 2

Caratteristiche	e	Tecnologie	di	Produzione	per	Vetri	e	Vetroceramici
Bioattivi in Inge	egi	neria Tissuta	le				••••	21

2.1	aratteristiche generali dei vetri2	1
2.2	etri Bioattivi2	3

2.2.1 Principali caratteristiche dei vetri bioattivi	24
2.2.2 Bioglass [®]	25
2.2.3 Definizione e classificazione del concetto di Bioattività	
2.2.4 Meccanismo di bioattività	
2.3 Metodi per la produzione di vetri bioattivi	
2.3.1 Melt-quenching	
2.3.2 Tecnica sol-gel	
2.4 Scaffold	
2.5 Tecnologie di produzione per scaffold a base di vetri e vetroceramic	ci
bioattivi	
2.5.1 Metodi convenzionali	
2.5.2 Tecniche di additive manufacturing	40
2.6 Coating	44
2.7 Compositi	46

Capitolo 3

Vetri e Vetroceramici Bioattivi in Odontoiatria e Medicina Dentale......48

3.1 Vetri e vetroceramici bioattivi in odontoiatria	48
3.2 Ipersensibilità dentinale	51
3.3 Coating	53
3.4 Cementi vetroionomerici	56
3.5 Scaffold per la rigenerazione dei tessuti dentali	57
3.6 Vetri e vetroceramici bioattivi per applicazioni ai tessuti duri	
del cavo orale	60

Capitolo 4

Materiali e Metodi .	
----------------------	--

4.1 Scaffold (vetro 1d)	64
4.2 Vetri sol-gel	68
4.3 Caratterizzazioni	71
4.3.1 Diffrattometria a raggi X (XRD)	72
4.3.2 Microscopia a Scansione Elettronica (SEM) e Spettroscopia a Dispersione di Energia (EDS)	73
4.3.3 Analisi BET (Brunaueer-Emmett-Teller)	75
4.3.4 Test Meccanici	76
4.3.5 Prove di bioattività <i>in vitro</i>	77

Capitolo 5

Risultati e Discussioni	
5.1 Scaffold macroporosi	78
5.1.1 Diffrattometria a raggi X (XRD)	78
5.1.2 Microscopia a Scansione Elettronica (SEM) e Spettroscopia a Dispersio	one
di Energia (EDS)	80
5.1.3 Test di bioattività	82
5.1.4 Test Meccanici di compressione	84

5.2 Vetri sol-gel	
5.2.1 Diffrattometria a raggi X (XRD)	
5.2.2 Analisi BET	

Capitolo 6

Conclusioni

Bibliografia	
Ringraziamenti	

Abstract

L'ingegneria tissutale (TE) rappresenta quella branca della medicina rigenerativa che opera nell'ottica di ristabilire, rigenerare o migliorare le funzioni fisiologiche di tessuti malati o danneggiati, tramite l'uso combinato di segnali chimici (fattori di crescita), cellule vitali (staminali o differenziate) e scaffold, in grado di supportare la formazione e la crescita di nuovo tessuto. Lo sviluppo e lo studio di questa disciplina nel settore odontoiatrico si deve alla recente identificazione della capacità dei vetri e vetroceramici bioattivi di instaurare interazioni positive sia con i tessuti duri che con quelli molli. Nella pratica clinica i vetri/vetroceramici bioattivi costituiscono una classe di materiali amorfi/ parzialmente cristallini adatti alla produzione di strutture tridimensionali (scaffold) capaci di stimolare i processi di guarigione e rigenerazione tissutale, offrendo un supporto temporaneo per la proliferazione, il differenziamento e la crescita di nuovo cellule che degradi con opportuni tempi di riassorbimento.

Il seguente lavoro di tesi ha lo scopo di realizzare biomateriali in forma di polvere e scaffold porosi da utilizzare in applicazioni di odontoiatria rigenerativa. Gli scaffold sono stati sintetizzati attraverso il metodo della spugna polimerica (*sponge replication*), partendo da vetri in forma di polvere appartenenti al sistema CaO – MgO – SiO₂ – P₂O₅ – Na₂O – CaF₂ (vetro 1d), ottenuti tramite il metodo del *melt-quanching*. Parallelamente, sono state effettuate sintesi *sol-gel* di polveri vetrose, derivanti dal sistema binario SiO₂-CaO, drogate con ioni litio (SiO₂-CaO-Li₂O) rispettivamente al 2% e 5 % in peso. In particolare, quest'ultima famiglia di metodi ha evidenziato un grande potenziale in ambito biomedico in quanto permette di realizzare materiali con porosità intrinseche alla nanoscala ed elevata area superficiale favorendo, di conseguenza, una migliore risposta cellulare.

Sia gli scaffold macroporosi che le polveri *sol-gel* sono state caratterizzati attraverso Diffrattometria a Raggi X (XRD) per valutare l'eventuale presenza di fasi cristalline nucleate in seguito al processo di sinterizzazione. Inoltre, gli scaffold sono stati sottoposti ad analisi di Microspia a Scansione Elettronica (SEM) per esaminarne la morfologia, Spettrometria a Dispersione di Energia (EDS) per determinarne le composizioni ed a test meccanici per valutarne le caratteristiche meccaniche in termini di resistenza a sforzi di compressione (carico di rottura delle trabecole porose) e modulo di Young(E). Sulle polveri *sol-gel* sono state condotte analisi di adsorbimento-desorbimento di azoto seguite da BET per stimarne le caratteristiche di tessitura nano-porosa.

In seguito, gli scaffold sono stati sottoposti al test di bioattività *in vitro* secondo il protocollo di Kokubo, immergendo i campioni in SBF (Simulated Body Fluid) rispettivamente per 48h, una settimana e due settimane. Tale test è stato svolto per verificare la bioattività dei campioni analizzati, attraverso la formazione di uno strato di idrossicarbonapatite (HCA) sulla loro superficie, monitorando contestualmente il pH della soluzione.

Entrambe queste tipologie di materiali hanno dimostrato di possedere un notevole potenziale per applicazioni in odontoiatria, sia per la rigenerazione dell'osso alveolare (scaffold macroporosi) sia in un contesto terapeutico più ampio riguardante le varie strutture del parodonto (ad esempio gli ioni litio possono avere effetto antibatterico e stimolare la rigenerazione del cemento dentale).

Capitolo 1

Il Dente: Caratteristiche, Implantologia e Rigenerazione

Il seguente capitolo ha lo scopo di illustrare le caratteristiche strutturali del dente, la sua anatomia, l'istologia dei tessuti molli e di quelli duri, l'architettura di un impianto dentale, considerato come trattamento d'elezione per la sostituzione di un dente naturale, malato o mancante, con uno sintetico nonché alcune delle strategie più utilizzate per la rigenerazione degli elementi del cavo orale. In particolare, ci si è soffermati sui principali materiali per implantologia, il titanio e la zirconia, elencandone pregi e difetti, introducendo una classe di materiali innovativi con l'abilità di formare legami chimici con l'osso: i vetri bioattivi. Infine, l'ultima sezione tratta le principali strategie di rigenerazione dentale tra le quali si annoverano le cellule staminali dentali, potenti strumenti da utilizzare come "mattoncini" per risanare i tessuti danneggiati e l'impiego degli scaffold, strutture tridimensionali che offrono un sostegno momentaneo a supporto delle cellule e delle loro funzioni vitali.

1.1 Anatomia e struttura del dente

I denti sono organi mineralizzati estremamente duri situati all'interno del cavo orale nei mammiferi e deputati alla masticazione del cibo. Si ancorano all'osso alveolare (mandibolare per l'arcata superiore e mascellare per quella inferiore) tramite strutture chiamate radici, che possono essere singole o multiple. A livello istoanatomico, i denti sono costituiti da tessuti duri, lo smalto e la dentina, e da tessuti di sostegno, chiamati tessuti parodontali composti da: cemento, osso alveolare, legamento parodontale e gengiva nello strato più esterno [1]. Inoltre, al loro interno sono formati dalla polpa dentale, un tessuto connettivo altamente vascolarizzato ed innervato che fornisce nutrienti e capacità sensoriali alle cellule costituenti la dentina (**Figura 1.1**) [2][3].



Figura 1.1: Sezione longitudinale di un elemento dentale[2]

1.1.1 Smalto

Lo smalto è la più dura struttura calcificata presente nel corpo umano; riveste esternamente la corona dentale ed ha lo scopo di proteggere il dente da eventuali danni esterni di tipo chimico-fisico[4]. Viene prodotto da particolari cellule specializzate, chiamate ameloblasti, ed è costituito per il 96% in peso da materiale inorganico, formato da grandi cristalli di idrossiapatite (HA) che si organizzano in prismi ordinati in fasci paralleli (**Figura 1.2**)[5]. Il restante 4% del tessuto è formato da fibre organiche ed acqua, e l'intera struttura rispecchia un'architettura gerarchica dalla nano alla macroscala[6][7].



Figura 1.2: Disposizione dei prismi[5]

I prismi di HA presentano un diametro di circa 4μ m e sono separati tra loro da una sostanza interprismatica, intessuta anch'essa da cristalli di idrossiapatite[8]. La matrice organica dello smalto di un dente maturo è composta principalmente da proteine generate durante il processo dell'amelogenesi, chiamate enameline e amelogenine, da carboidrati, citrato e lipidi[5]. Il contenuto di acqua, che si aggira attorno al 3% in peso del tessuto, facilita lo scambio ionico e molecolare tra materiale organico e minerale[9].

Sebbene lo smalto sia un materiale estremamente duro, con una durezza di poco inferiore a quella dell'acciaio, è al tempo stesso molto fragile e può fratturarsi lungo l'asse longitudinale dei prismi nel caso in cui venga meno lo strato di dentina sottostante, che dona elasticità alla struttura. Considerando le sue caratteristiche fisiche, lo smalto gode di buone proprietà di translucenza conferitegli dall'elevato grado di cristallinità e di una bassa conducibilità termica che permette di schermare la polpa da variazioni di temperatura improvvise[10]. È inoltre caratterizzato da un'eccellente resistenza alla compressione esercitata da muscoli masticatori, da elevati valori di durezza e dal modo in cui sono orientati i cristalli di HA, disposti secondo un'organizzazione compatta e con l'asse longitudinale parallelo all'asse maggiore dei prismi (**Figura 1.3**[11])[5].



Figura 1.3: Struttura ed organizzazione dello smalto dentale[11]

Tuttavia, questo tessuto è soggetto a solubilizzazione da parte degli acidi, con conseguente demineralizzazione e formazione di carie che non è in grado di riparare autonomamente, essendo un tessuto non-vivente[12].

1.1.2 Dentina

La dentina è un tessuto connettivo avascolare mineralizzato che costituisce la parte portante del dente e può essere considerata come un composito naturale, composto da una fase minerale di cristalli di idrossiapatite ed una matrice organica, principalmente a base di collagene[13]. Questo tessuto viene prodotto dagli odontoblasti della polpa dentale, cellule altamente specializzate, secondo un processo chiamato "dentinogenesi"[14]. A livello composizionale, la dentina è formata per il 70% in peso da componenti inorganiche e minerali che la rendono un materiale leggermente più duro del tessuto osseo ma più morbido rispetto allo smalto, per il 20% da materiale organico e solo per il 10% d'acqua[13]. Il collagene di tipo I è la componente principale della matrice organica, ma sono presenti anche tracce di collagene di tipo III e V. Inoltre, si registra all'interno del tessuto anche la presenza di piccole percentuali di proteoglicani, proteine non-collagenose prodotte dagli odontoblasti, che ricoprono un ruolo importante nella mineralizzazione della dentina, e lipidi[15].

Morfologicamente, la dentina è organizzata uniformemente in particolari strutture chiamate tubuli dentali che si estendono radialmente dall'interfaccia polpa-dentina, più interna, fino a quella smaltodentina, più esterna[13]. Il loro diametro si assottiglia progressivamente spostandosi verso la periferia del dente: in prossimità della camera pulpare presentano un diametro di 2.5 μ m mentre, nei pressi nella giunzione amelo-dentinale, si riduce fino a circa 1 μ m (**Figura 1.4**[10])[16].



Figura 1.4: Tubuli dentinali visti in sezione trasversale[10].

Anche il numero di tubuli è influenzato dalla distanza dalla polpa dentale: la loro concentrazione è maggiore nella zona della dentina profonda, dove aumenta il numero di odontoblasti e diminuisce lo spessore di materiale inorganico interposto tra i tubuli, per poi ridursi nei pressi della giunzione dentino cementale (DEJ)[1] [10]. Ciascun tubulo presenta delle ramificazioni ed escrescenze laterali che, nelle aree a bassa densità tubulare portano alla formazione di sistemi cunicolari simili a quelli formati dall'organizzazione degli osteociti nel tessuto osseo.

A seconda della fase in cui la dentina si genera, vengono utilizzati termini diversi per identificarla. Nella fase eruttiva del dente si distinguono due tipi di dentina: la dentina mantellare, ovvero lo strato più esterno della dentina presente anche nella parte coronale del dente, con uno spessore che varia tra i 5-20 µm, che risulta poco mineralizzata ma molto elastica e quindi in grado di dissipare forze e pressioni di carico, e la dentina primaria, la più abbondante ed importante tra i vari tipi di dentina, che costituisce il corpo del dente, conferendogli forma e dimensioni idonee[13]. Quest'ultima, a differenza della dentina mantellare, si forma rapidamente e possiede una matrice collagenosa più compatta, generata interamente dagli odontoblasti. A seguito della maturazione della radice, l'apposizione della dentina diventa più lenta ed irregolare; in questa fase il tessuto dentinale prende il nome di dentina secondaria, che continua a svilupparsi per tutta la vita del dente. L'ultimo tipo di dentina, la dentina terziaria, si forma in risposta a stimoli esterni di erosione, abrasione o traumi generici e ha la funzione fisiologica di proteggere la polpa, isolandola, tramite inspessimento dello strato di dentina che ricopre la camera pulpare[17][18].

1.1.3 Polpa dentale

La polpa dentale è un tessuto molle molto vascolarizzato e non mineralizzato situato all'interno della camera pulpare dei denti, indispensabile per garantirne vitalità [13]. Si tratta di un tessuto altamente cellularizzato, in cui ogni cellula svolge una funzione ben precisa, ed è costituito principalmente da odontoblasti, cellule del sistema immunitario, neuroni, cellule endoteliali, fibroblasti e matrice extracellulare[19]. I macrofagi, insieme alle altre cellule del sistema immunitario, hanno la funzione di proteggere il dente da microorganismi estranei ed agenti patogeni. Gli odontoblasti, cellule specializzate della polpa, e le cellule mesenchimale non differenziate, che sotto opportuni stimoli possono differenziare in cellule che formano la dentina, hanno l'abilità di produrre dentina. Questa capacità consente alla polpa di formare una barriera, depositando dentina terziaria sulla superficie della camera pulpare, in grado di proteggerla da irritazioni e pericoli fisici, e di compensare almeno parzialmente la perdita di tessuto dentale provocato da usura o carie[13]. I fibroblasti, le cellule maggiormente presenti nel tessuto della polpa, svolgono la funzione di generazione e mantenimento della matrice pulpare, costituita da collagene di tipo I, II, e sostanza amorfa[20].

La polpa, inoltre, si compone di numerosi vasi sanguigni, tra cui venule e arteriole, che forniscono il giusto apporto di nutrienti e ossigeno alla dentina circostante, ripulendo al tempo stesso l'ambiente dai prodotti di scarto, e da una fitta rete neurale che protegge il dente da eventuali stimoli dannosi, come il dolore che si propaga attraverso il forame apicale del dente[19]. Questo sistema di sensori e nervi autonomi controlla i meccanismi difensivi, chemorecettivi e vasomotori[13]. A livello fisiologico, la polpa ricopre un ruolo fondamentale nella gestione dei meccanismi difensivi contro le invasioni batteriche all'interno dei tubuli dentinali, fluidi dentinali e processi odontoblastici al fine di preservare le prestazioni di salute e funzionali dei denti[13].

1.1.4 Il parodonto

Il parodonto è una struttura complessa di origine mesenchimale con la duplice funzione di mantenere il dente ancorato all'osso mandibolare e di preservare l'integrità dei tessuti coinvolti durante la fase di masticazione. Si compone di tessuto epiteliale (gengiva), tessuto connettivo (legamento paradontale) e tessuto mineralizzato (cemento radicolare ed osso alveolare), come mostrato in **Figura 1.5**[21][22][23].



Figura 1.5: Illustrazione qualitativa del parodonto[21]

L'osso alveolare, insieme al cemento radicolare, costituisce l'apparato di attacco dei denti, il cui scopo è quello di distribuire in maniera omogenea le forze generate durante la fase di masticazione. La genesi di questo tessuto avviene contemporaneamente alla formazione degli elementi dentali e risulta costituito sia da cellule provenienti dal follicolo dentale sia da cellule non coinvolte nel processo dell'odontogenesi. Le pareti degli alveoli, a diretto contatto con il legamento parodontale, sono ricoperte da uno strato di osso corticale mentre la superficie compresa tra gli alveoli è alloggiata da osso trabecolare. Inoltre, come agli tipi di tessuto osseo, è soggetto a continuo rinnovamento in risposta ad esigenza biologico-funzionali. Per questo motivo, quando la radice del dente viene persa, a causa della cessazione del carico masticatorio trasmesso dal dente, l'osso alveolare tende a riassorbirsi progressivamente fino a scomparire[24][25][26]. Ciò può verificarsi anche a causa dell'azione collettiva di specie batteriche che, proliferando in maniera incontrollata nel cavo orale, possono innescare processi infiammatori cronici, chiamati parodontite. Questa patologia, se non curata tempestivamente, conduce alla graduale distruzione del legamento parodontale e dell'osso alveolare, provocando la mobilità del dente che perde il suo ancoraggio fisiologico, oltre a modificazioni significative della funzione masticatoria. Nei casi più estremi si arriva alla perdita del dente con conseguenti problemi estetici e funzionali[27].

Il legamento parodontale è un tessuto connettivo vascolarizzato situato tra il cemento radicolare e l'osso alveolare, in grado di garantire un solido ancoraggio della radice dentale all'interno dell'alveolo, permettendo di resistere agli sforzi ciclici esercitati dei muscoli masticatori. Inoltre, la capacità di agire come recettore sensoriale assicura il corretto posizionamento della mascella e della mandibola durante la masticazione. Analogamente agli altri tessuti connettivi del corpo, il legamento parodontale è costituito da cellule (osteoblasti, osteoclasti, fibroblasti, cellule epiteliali, macrofagi, moniciti, cellule mesenchimali non differenziate, cementoblasti ed odontoclasti) e componenti extracellulari (collageniche e non collageniche). Il compartimento extracellulare è formato quasi interamente da fasci di fibre di collagene (I, III, XII) incorporati all'interno di materiale amorfo, noto come sostanza fondamentale, con piccole percentuali di glicosamminoglicani, proteoglicani e ALP (fosfatasi alcalina). Circa il 70% della sostanza fondamentale è composta da acqua con effetti significativi che si riflettono sull'abilità del dente nel sopportare stress ciclici e carichi consistenti[24].

La gengiva è quella porzione di parodonto, disposta intorno ai denti, che ricopre il processo alveolare. Si tratta di un tessuto di tipo molle che ha origine dal solco gengivale libero, connesso alla corona dentale, e si estende fino alla linea muco-gengivale. Può essere divisa in due sottocategorie: gengiva libera e gengiva aderente. La prima costituisce la porzione gengivale che circonda il dente mentre la gengiva aderente, come dice il nome stesso, si ancora saldamente al cemento radicolare e all'osso alveolare tramite fasci fibrosi, dimostrandosi immobile rispetto ai tessuti adiacenti. A livello fisiologico, svolge la funzione di proteggere il parodonto dall'ambiente esterno ed è contraddistinta da un intenso e frequente ricambio degli strati più superficiali, in modo da prevenire un accumulo eccessivo di batteri o microrganismi patogeni[28][25]. Cosi come i tessuti più profondi del parodonto, anche la gengiva può essere colpita dall'azione nociva di batteri, innescando processi infiammatori noti che gengivite. Questa patologia si manifesta sottoforma di gonfiore, arrossamento, edemi o sanguinamento e, se non trattata opportunamente, può aggravarsi dando origine a parodontiti[27].

Il cemento è un tessuto connettivo mineralizzato prodotto da cellule specializzate chiamate cementoblasti, che ricopre l'intera superficie anatomica della radice del dente [29]. Diversamente dagli altri tessuti del parodonto, il cemento non subisce processi di rimodellamento e, fra i tessuti duri, è quello più facilmente soggetto ad usura per abrasione a causa del suo minor grado di calcificazione[30]. La funzione principale del cemento è quella di assicurare un solido ancoraggio alla superficie della radice per le fibre di collagene del legamento paradontale, garantendo una robusta e stabile connessione tra dente e pareti dell'alveolo[13]. Si compone per 45-50% in peso da cristalli di idrossiapatite e fosfati di calcio amorfo mentre il restante 50-55% è costituito da matrice organica ed acqua. Il materiale organico è formato essenzialmente da collagene di tipo I, ma presenta anche piccoli contenuti di collagene di tipo III e proteine(circa il 10%) (**Figura 1.6**)[13].

A livello biologico, è il tessuto dentale con caratteristiche più simili a quelle dell' osseo, nonostante dipenda dai processi nutrizionali del legamento parodontale, a causa di una vascolarizzazione assente[30]. Istologicamente, si distinguono due tipi di cemento, quello acellulare e quello cellulare che ricoprono rispettivamente la metà coronale e la metà apicale della radice del dente, e tra i quali non esiste un confine chiaro [31].



Figura 1.6: Sequenza dei principali tessuti che compongono il dente[13].

1.2 Impianti dentali

L'obiettivo dell'odontoiatria moderna è quello di ristabilire le normali funzioni estetiche, fonetiche e di salute riguardanti malattie o infortuni del sistema stomatologico del paziente. A tal scopo gli impianti dentali, considerati come una radice artificiale del dente, sono i dispositivi ideali per sostituire la perdita di uno o più essi a causa di parodontiti, infezioni croniche o altri tipi di lesioni[32]. Si tratta di impianti metallici biocompatibili che vengono ancorati chirurgicamente nella zona dell'osso traumatizzato, della mandibola o della mascella, al di sotto della gengiva, in modo da supportare una corona artificiale laddove non sia più presente il dente naturale, favorendo al tempo stesso processi di osteointegrazione[32].

Ad oggi, in clinica, per la sostituzione della corona dentale sono maggiormente impiegati impianti realizzati in titanio o sue leghe date dalla sua in combinazione con elementi ceramici, in quanto il titanio è considerato il materiale con le migliori caratteristiche di compatibilità biologica verso i tessuti umani. Per questo motivo gli impianti in titanio ricoprono una vasta area di applicazioni oltre

che nel settore dentale anche in quello maxillo-facciale, cardiovascolare e soprattutto ortopedico[32]. Tuttavia, una delle più importanti sfide della medicina rigenerativa corrente e delle varie discipline ad essa correlate, è quella di progettare e sviluppare modelli porosi tridimensionali (scaffold) in grado di riprodurre efficientemente l'architettura, la morfologia e le caratteristiche meccaniche dei materiali naturali favorendo contemporaneamente la rigenerazione dei tessuti viventi *in situ* [33]. A tal fine, negli ultimi anni molti studi hanno posto l'attenzione sulla realizzazione di diversi tipi di vetri e vetroceramici bioattivi per applicazioni nel settore della medicina orale, grazie alla loro abilità di instaurare legami chimici con l'osso e stabilire reazioni biologiche positive all'interfaccia ossotessuto[34]. Questi materiali sono considerati particolarmente attraenti nel campo dell'ingegneria tissutale grazie alla versatilità delle loro proprietà fisiche, morfologiche e texturali che possono essere manipolate variando opportunamente composizione chimica e processi di realizzazione dei biomateriali, consentendo fenomeni di adesione cellulare, rivascolarizzazione, differenziamento di cellule staminali mesenchimali ed attività enzimatica[35].

1.2.1 Caratteristiche di un impianto dentale

Un impianto dentale è un dispositivo medico chirurgico utilizzato per ristabilire le normali funzioni meccaniche ed estetiche legate alla perdita o alla mancanza congenita di uno o più denti. Si tratta di dispositivi protesici fissi, che possono essere inseriti sia nel tessuto osseo mascellare che mandibolare, composti generalmente da tre componenti principali: una vite endossea o "fixture", un componente intermedio che attraversa il tessuto gengivale chiamato "abutment" e la "corona artificiale" che costituisce la vera e propria protesi dentale visibile[36].In particolare:

- La vite endossea è l'elemento dell'impianto che viene inserito direttamente nell'osso mascellare con il fine di accelerare il fenomeno dell'osteointegrazione. Le più utilizzate in ambito clinico presentano una forma cilindrica, con filettatura, fori e scanalature, o troncoconica, ad imitazione della radice dei denti naturali, ed hanno lo scopo di supportare le corone artificiali, ponti e nei casi più gravi anche arcate complete. Inoltre, per favorire ulteriormente il processo di osteoconduzione, le viti vengono sottoposte a trattamenti superficiali come anodizzazione o trattamento plasma spray, al fine di ottenere una rugosità nanometrica. Un altro procedimento adoperato per facilitare la connessione con il tessuto osseo è la deposizione di uno strato di microcristalli di idrossiapatite [37]–[39].
- L'abutment è l'elemento che attraversa il tessuto gengivale, motivo per cui spesso viene chiamato componente transmucosa, ed ha lo scopo principale di connettere la vite endossea alla protesi dentaria. Commercialmente, si può trovare secondo due diverse configurazioni: può essere integrale alla vite endossea andando a formare una struttura non separabile, oppure separato da questa, connettendosi tramite opportuni sistemi di ancoraggio e consentendo un controllo modulare in base a singole esigenze specifiche. Ad oggi, si tende ad utilizzare abutment che abbiano un diametro inferiore rispetto a quello della cavità dove devono essere inseriti, per ridurre la perdita dell'osso imposta dall'intervento chirurgico[40].
- La corona artificiale è il componente più esterno dell'impianto dentale ed è l'elemento che occupa lo spazio vuoto lasciato dalla mancanza di uno o più denti naturali con lo scopo di ristabilire una normale visione estetica della bocca(Figura 1.7)[36].



Figura 1.7 : Componenti principali di un impianto dentale[36]

L'installazione di un impianto dentale si rende necessaria quando la carenza di uno o più denti ostacola la normale attività masticatoria, pregiudica l'aspetto estetico andando a modificare il sorriso, compromette le funzionalità fonetiche fisiologiche o potrebbe provocare lo spostamento verso la zona di vuoto da parte dei denti sani adiacenti [36]. La mancanza di uno o più denti, che in odontoiatria prende il nome di "gap dentale" è spesso causata da patologie dell'organo orale quali carie gravi, ascessi dentali e parodontite severa che, quando non vengono curate in maniera opportuna, richiedono l'estrazione dei denti interessati(**Figura 1.8** [41]–[43])[44]. Il "gap dentale" può anche derivare dalla vecchiaia.

Gli impianti dentali permettono di sopperire ai problemi sopraelencati andando, in primis, a ripristinare la normale funzione masticatoria e fonetica correlata alla presenza di cavità dentali, ristabilire il consueto aspetto estetico della bocca del paziente, a prevenire lo sposamento dei denti dovuto alla presenza di zone di vuoto ed inoltre a favorire una corretta distribuzione dei carichi sulla dentatura[35][44].



Figura 1.8: Esempi di patologie dentali che se non curate opportunamente richiedono l'estrazione del dente o dei denti interessati. Partendo da sinistra si possono osservare in successione: Ascesso dentale, parodontite severa e carie [41]–[43].

Tuttavia, per motivi legati ad una scorretta sterilizzazione o a causa di scarsa igiene orale anche nel caso impianti già osteointegrati, può generarsi un'infezione batterica, chiamata perimplantite, che attacca i tessuti circostanti all'impianto (osso alveolare e gengiva) conducendo ad un progressivo riassorbimento osseo che, se non trattato opportunamente, può portare al fallimento dell'impianto stesso[45][46]. La **tabella 1.1** offre una classificazione della malattia perimplantare in base a due differenti parametri parodontali:

- i) Profondità di sondaggio (PD): distanza tra margine gengivale e livello di attacco clinico (ad esempio giunzione smalto cemento) [47];
- ii) Perdita di massa ossea rispetto alla lunghezza dell'impianto[48].

Tipologia	Caratteristiche
Lieve	PD>4 mm, perdita di massa ossea <25% rispetto alla lunghezza dell'impianto
Moderata	PD>6 mm, perdita di massa ossea compresa tra il 25% ed il 50% rispetto alla lunghezza dell'impianto
Avanzata	PD>8 mm, perdita di massa ossea >50% rispetto alla lunghezza dell'impianto

 Tabella 1.1: classificazione malattia perimplantare [48]

Le possibili complicazioni derivanti dall'inserimento di un impianto osteointegrato come opzione terapeutica insieme alla mancanza di trattamenti standardizzati contro l'insorgere di patologie perimplantari, hanno attirato l'attenzione di molti studiosi al fine di ricercare strategie alternative e maggiormente performanti[48].

1.2.2 Materiali per implantologia dentale

Titanio

Il materiale prevalentemente impiegato per la realizzazione di impianti dentali è il titanio puro (Ti), commercialmente disponibile secondo quattro gradi di purezza in base al contenuto di ossigeno, carbonio, e ferro[49].

A differenza degli altri biomateriali utilizzati in ambito protesico, come gli acciai o le leghe Co-Cr, il titanio presenta ottimali caratteristiche meccaniche, di biocompatibilità e di supporto per il differenziamento e la crescita di cellule osteogeniche [50][51]. Il Ti, infatti, possiede un'elevata

resistenza meccanica, un'eccellente inerzia, un basso modulo elastico e, soprattutto, una notevole resistenza alla corrosione dovuta alla formazione spontanea di uno strato di diossido di titanio (Ti0₂) sulla sua superficie che previene fenomeni di ossidazione[51]. Queste caratteristiche rendono molto rara l'insorgenza di reazioni avverse da parte del tessuto ospite ben adattandosi, per questo motivo, all'utilizzo in ambito odontoiatrico.

Inoltre, è stato ampiamente dimostrato che questo metallo possiede proprietà di osteointegrazione ovvero la capacità di formare legami diretti all'interfaccia tra osso ed impianto senza che vi sia la formazione di uno strato di tessuto fibroso interposto, denominato capsula fibrotica, che peggiora sensibilmente la fissazione biomeccanica costringendo, nella maggior parte dei casi, all'espianto. Per favorire un migliore potenziale di osteointegrazione è necessario che il biomateriale sia in possesso di un'opportuna composizione chimica nonché di determinate caratteristiche superficiali quali idrofilicità e rugosità. Per questo motivo il Ti viene spesso sottoposto a trattamenti superficiali come l'anodizzazione, metodi plasma-spray o attacchi chimici con acido nitrico (HNO₃) o solforico (H₂SO₄) che permettono di raggiungere una rugosità alla micro-scala, fondamentale per consentire alle cellule ossee di aderire meglio e resistere maggiormente agli sforzi di taglio[52][49].

Limiti del titanio

- Il titanio presenta un modulo elastico molto alto rispetto (c.a 110 GPa) a quello dell'osso corticale (c.a 14 GPa), il che può condurre a problemi di stress-shielding. In questo caso l'osso non riceve i carichi a cui è fisiologicamente sottoposto poiché il metallo scuda una parte di esso riparandolo dalle sollecitazioni. Ciò comporta una riorganizzazione della normale distribuzione dei carichi portando ad un progressivo riassorbimento dell'osso attorno all'impianto che se non trattato tempestivamente causa problemi di mobilizzazione fino al fallimento e alla rimozione dell'impianto[53].
- 2) Il titanio può causare reazioni allergiche ed in alcuni casi anche ipersensitività dentinale con conseguente fallimento dell'impianto[53].
- Il titanio può rilasciare ioni metallo nei i tessuti circostanti con effetti sulle gengive che posso andare in contro a retrazione e presentare sfumature grigie con notevoli danni estetici (metallosi)[54].

Zirconia

In seguito alla necessità di trovare materiali alternativi privi di componenti metalliche e alle limitazioni intrinseche di quelli già esistenti, la zirconia ha trovato un impiego via via crescente in ambito medico ed odontoiatrico[55].

Si tratta di un materiale ceramico bioinerte, ricavato dallo zircone, che gode di un'elevata tenacità, eccellenti proprietà chimiche e notevole resistenza meccanica. In clinica orale si adoperano principalmente la zirconia tetragonale parzialmente stabilizzata con ittrio (Y-TZP), parzialmente stabilizzata con ossido di magnesio (Mg-PSZ) e l'allumina rinforzata con zirconia (ZTA), per la

realizzazione di corone, ponti, abutments, perni, impianti e per la sostituzione di molari e premolari [55][56].

Gli impianti in zirconia, infatti, cercano di superare i limiti imposti dall'utilizzo del titanio. Innanzitutto, gli "abutments" in zirconia mostrano una colorazione molto simile a quella del dente naturale, senza creare effetti avversi in termini di traslucenza, e conservando al tempo stesso ottime proprietà meccaniche e potenziale osteointegrativo. Tuttavia, per garantire un livello di osteointegrazione paragonabile a quello del titanio, generalmente è necessario sottoporre la zirconia a trattamenti superficiali in grado di modificarne la morfologia fino ad ottenere un grado di rugosità dell'ordine dei micron, fondamentale per assicurare l'adesione e la proliferazione cellulare. Inoltre, essendo bioinerte, non causa alcun impatto immunologico o tossico verso i tessuti adiacenti e, a differenza del titanio, non provoca ipersensitività.

Dalla **Figura 1.9** [53] è possibile notare un grado di guarigione ossea a contatto con la superficie di un impianto in zirconia significativamente migliore rispetto ad uno in titanio, confermando per entrambi i casi un ottima biocompatibilità[57]. In aggiunta, la zirconia presenta resistenza a flessione e tenacità doppie rispetto all'allumina, materiale ampiamente utilizzato per applicazioni di restauro dentale grazie ad elevata biocompatibilità ed ottime proprietà tribologiche, che gli consentono di resistere ai carichi fisiologici ad opera dei muscoli masticatori.

Il biomateriale mostra anche buone prestazioni in termini di resistenza alla corrosione, il che, insieme ad un'ottima stabilità dimensionale, biocompatibilità e buona radiopacità, lo rendono una buona alternativa di materiale non metallico da impiegare in campo dentistico[58]–[61][62].



Figura 1.9: Rapporti di contatto tra osso/materiale e osso/tessuto fibroso per impianti in titanio e zirconia. (Si noti come la zirconia presenti una guarigione ossea significativamente maggiore)[53].

Limiti della zirconia

Sebbene la zirconia evidenzi eccellenti proprietà di osteointegrazione, biocompatibilità e sia da considerare adeguata per la realizzazione di impianti dentali, restano comunque diverse limitazioni riguardo l'uso di questo materiale in clinica[53].

La zirconia senza l'impiego di trattamenti superficiali presenta una superficie troppo smussata, troppo liscia e per questo non è in grado di favorire un'osteointegrazione che sia sufficiente per un'applicazione clinica, a differenza del titanio che può essere impiegato anche senza procedure di irruvidimento superficiale[63]. In aggiunta, questi trattamenti incrementano notevolmente la complessità ed i costi manifatturieri andando ad inficiare ed intaccare l'integrità meccanica e strutturale dell'impianto[64]. Un ulteriore limitazione è legata al fatto che, non essendo ancora stati condotti esperimenti di lunga durata, ci sono dubbi sulla stabilità a lungo termine del materiale a causa di fratture e della suscettibilità intrinseca all'invecchiamento, oltre alla certezza dell'impossibilità di realizzare impianti integrali in zirconia a causa della fragilità del materiale ceramico[56].

Vetri e vetroceramici bioattivi

I vetri ed i vetroceramici bioattivi, rispettivamente caratterizzati da una struttura completamente amorfa e che presentano sia una fase amorfa che una o più fasi cristalline, sono materiali utilizzati principalmente per applicazioni di riparazione ossea ma, nell'ultimo secolo, la loro struttura bioattiva è stata investigata anche per l'uso dentale[35].

Si distinguono dalle altre macro-famiglie di biomateriali esistenti per il fatto che sono in grado di indurre una risposta fisiologica attiva quando interagiscono con i tessuti viventi, formando un forte e solido legame tra tessuto ed osso[33][65].

I metalli hanno un'elevata resistenza all'usura, forza e duttilità; tuttavia, il loro alto grado di corrosione e la scarsa biocompatibilità sono caratteristiche indesiderate per i tessuti viventi. Inoltre, l'alta diffusione degli ioni metallo può provocare reazioni allergiche nell'ospite[35]. I materiali ceramici generalmente godono di buone proprietà di biocompatibilità oltre che elevata resistenza alla corrosione ed alla compressione. Sfortunatamente, questa classe di materiali risulta particolarmente fragile, poco tenace, altamente densa e con una bassa resistenza alla frattura[35].

A differenza di questi materiali, i vetri bioattivi, quando immersi nei fluidi biologici, hanno la capacità di formare uno strato di idrossiapatite attraverso la diffusione di ioni calcio e sodio tra la loro superfici ed i fluidi biologici circostanti, mimando la fase minerale dell'osso naturale e favorendo un legame all'interfaccia che sia stabile[65]. Inoltre, la possibilità di essere combinati con fasi polimeriche o altri tipi di fasi, consente di produrre materiali compositi in grado di superare, almeno parzialmente, gli svantaggi legati alle scarse proprietà meccaniche dei materiali ceramici[66]. L'osso alveolare, analogamente alle altre tipologie di tessuti ossei, può andare in contro a consistenti perdite di massa che posso essere risanate utilizzando sostitutivi biologici attivi. Proprio per questo motivo, gli scienziati si stanno muovendo verso la sperimentazione di vetri bioattivi con composizioni che siano sempre più adatte ad applicazioni di tipo dentale[67].

I vetri ed i vetroceramici bioattivi attualmente sono impiegati in odontoiatria come rivestimento per impianti metallici, innesti ossei, riempitivi e come materiali per restauro. Il vantaggio principale nell'utilizzo di questa classe di materiali sta nel fatto che l'interazione tra i vetri ed i tessuti biologici non provoca risposte infiammatorie avverse nel paziente, non sono materiali citotossici e tantomeno innescano la risposta immunitaria tipicamente causata dalla presenza di un corpo estraneo[65].

Inoltre, molti studi rilevano che determinate composizioni di vetri bioattivi possono essere combinate con farmaci anti-osteoporotici per accelerare il processo di formazione dello strato di idrossiapatite e perciò migliorare il potere bioattivo del vetro[67]. Ci sono evidenze benefiche anche riguardo la combinazione tra vetri bioattivi e bifosfonati come riempitivi per riparazioni chirurgiche di difetti ossei[68].

1.3 Strategie di rigenerazione dentale

I denti umani ed i tessuti orofacciali sono responsabili di un numero elevato di funzioni che ogni persona svolge quotidianamente, oltre che ad aspetti di carattere prettamente estetico: dalla masticazione alla fonazione, dalla respirazione alle capacità di espressione facciali ed emotive[6]. Nonostante gli elementi dentali godano di ottime proprietà meccaniche, come un'elevata resistenza all'abrasione ed un'architettura che sopravvive nel tempo, così come gli altri tessuti del cavo orale, sono particolarmente suscettibili all'attacco di batteri e microorganismi che possono indurre stati infiammatori o provocare infezioni, a danni di tipo traumatico, a malattie congenite, ed altri tipi di attacchi chimico-fisici[69].

Ogni difetto di grandi dimensioni che si trovi in prossimità della polpa, necessita di essere trattato urgentemente per evitare che l'intero tessuto pulpare vada in necrosi. I traumi che si verificano a causa di elementi patogeni, indotti dalla masticazione o anche in maniera accidentale, sono i più frequenti e spesso comportano la distruzione della barriera endoteliale che protegge il microambiente del cavo orale[6]. Sebbene questo tipo di patologie dentali non creino pericoli di vita e siano in gran parte prevedibili, fatta eccezione per le neoplasie, sono caratterizzate da un'altissima prevalenza, colpendo oltre 3.5 miliardi di persone in tutto il mondo[70].

Le tecniche e le strategie utilizzate nell'odontoiatria convenzionale (come la riparazione di cavità dentali attraverso riempitivi o materiali per restauro, i trattamenti endodontici, la riabilitazione prostetica e la sostituzione di denti attraverso l'applicazione di impianti), sono soggette a svariate complicazioni biologiche, tecniche ed a reazioni avverse di origine varia che compromettono la loro efficacia terapeutica nel lungo periodo[71]–[74].

Queste problematiche hanno spostato l'attenzione verso l'investigazione e lo sviluppo di metodologie che consentano di ingegnerizzare l'intero tessuto dentale o solo parte di esso. Entrambe queste procedure richiedono l'utilizzo di cellule staminali, di biomateriali all'avanguardia, di strutture tridimensionali bioattive che mimino l'architettura e l'anatomia dei tessuti orali (scaffolds), promuovendo contemporaneamente specifiche attività biologiche, e di fattori di crescita che stimolino in maniera controllata ed ordinata la proliferazione cellulare e la maturazione dei vari componenti dentali[6].

1.3.1 Cellule staminali dentali e fattori di crescita

Negli ultimi anni sono stati compiuti enormi progressi nella conoscenza, utilizzo ed estrazione delle cellule staminali adulte ed embrionali[75]. Le loro caratteristiche di auto-rinnovamento e programmabilità insieme al concetto di "potenza", ovvero la capacità di poter differenziare nei vari lineamenti cellulari, le rendono il candidato perfetto per applicazioni nel settore della medicina rigenerativa ed in odontoiatria[6].

Inoltre, la possibilità di prelevare cellula staminali in fase postnatale per un utilizzo futuro nello stesso paziente, qualora ce ne sia la necessità, elimina totalmente il problema dell'insorgere di una reazione immunitaria avversa e, contemporaneamente, il rischio di trasmissione di microorganismi ed elementi patogeni[75]. L'utilizzo di cellule come le cellule mesenchimali dentali derivanti dai tessuti del cavo orale, offre un grande potenziale per l'odontoiatrica clinica in quanto consente un facile accesso per il chirurgo durante le operazioni di chirurgia orale, con il vantaggio di possedere proprietà immunosoppressive, un'elevata capacità di proliferazione e possibilità di differenziamento nei vari tipi di cellule che compongono il periodonto come, ad esempio, odontoblasti, cementoblasti ed osteoblasti[76].

In particolare, diversi tipi di cellule staminali adulte sono state isolate direttamente dal tessuto dentale, tra cui le cellule staminali della polpa dentale(DPSCs), cellule staminali dei denti decidui esfoliati(SHEDs), cellule staminali del legamento periodontale(PDLSCs), cellule staminali progenitrici del follicolo dentale(DFPCs) e le cellule staminali estratte dalla papilla apicale(SCAPs)[77]–[82] (**Figura 1.10** [6]).



Figura 1.10 [6]: Fonti dentali e tipologie di cellule staminali umane adulte: cellule progenitrici della gemma dentale(TGPCs), cellule staminali mesenchimali derivanti dallo stroma gengivale(GMSCs), cellule staminali del follicolo dentale(DFSCs), cellule staminali della papilla apicale(SCAP), cellule staminali del legamento periodontale(PDLSCs), cellule staminali progenitrici del follicolo dentale(DPSCs), cellule staminali dei denti decidui esfoliate(SHED), cellule staminali dell'epitelio orale(OESCs), cellule staminali del periostio (PSCs), cellule staminali del mdollo osseo(BMSCs), cellule staminali derivanti dalle ghiandole salivari (SGSCs). Quest'ultimo tipo di cellule staminali sono le uniche a non aver evidenziato la capacità di differenziare in tutte le forme di cellule epiteliali.

In particolare, le SHEDs e le DPSCs sono cellule ampiamente utilizzate per le loro caratteristiche di differenziamento multi-lignaggio ed alla semplicità di raccolta che non richiede l'adozione di tecniche invasive e dolorose per il paziente[6]. Anche le cellule staminali pluripotenti indotte(iPS), estratte a partire dalle cellule staminali dentali e fibroblasti, si sono dimostrate strumenti efficaci nella rigenerazione dei vari tessuti dentali[83][84]. Questo particolare tipo di cellule sono di fondamentale importanza per la ricerca scientifica in quanto, prima del loro utilizzo, le uniche cellule disponibili in odontoiatria a possedere capacità di pluripotenza erano le cellule staminali embrionali, il cui utilizzo è stato fortemente limitato da aspetti di tipo etico[6].

Oltre alle cellule staminali, anche i fattori di crescita ricoprono un ruolo fondamentale per la crescita di nuovo tessuto dentale essendo responsabili del controllo del ciclo cellulare e delle segnalazioni chimiche che avvengono tra cellula ed ambiente extracellulare e tra cellula e cellula[85]. In condizioni fisiologiche, sono coinvolti differenti fattori di crescita in modo da controllare ogni fase della rigenerazione tissutale ed il destino delle cellule staminali. Ad esempio, i fattori di crescita intrappolati nella matrice della dentina sono responsabili di un gran numero di processi stimolatori, come la differenziazione degli odontoblasti, che conducono alla formazione della dentina[6]. Visto il gran potenziale di questi strumenti, ad oggi si stanno conducendo molti studi per migliorarne l'efficacia in ambito della rigenerazione ossea e periodontale.

1.3.2 Biomateriali e scaffold

Lo sviluppo di scaffolds e biomateriali nell'ambito dell'ingegneria tissutale e, più in particolare, nel settore dentale ha aperto nuovi campi di ricerca per cercare di contrastare sempre più efficacemente le patologie del periodonto. L'elevata qualità dei biomateriali moderni rende possibile accelerare la rigenerazione grazie alle cellule staminali, promuovendone la proliferazione ed il differenziamento verso tutti i tipi di cellule che popolano il tessuto[86]. Gli scaffolds forniscono un supporto tridimensionale per le cellule, per gli agenti biologici e per i biomateriali in generale, favorendo una guida temporanea per la rigenerazione del tessuto lesionato, che degrada con velocità prossima a quella di formazione del neo-tessuto[6].

Applicazioni ingegnerizzate per i tessuti periodontali

La parodontite è una patologia infiammatoria di natura multifattoriale che progressivamente invade i tessuti del parodonto, inclusi l'osso alveolare, il cemento radicolare ed il legamento periodontale; se non curata adeguatamente, porta alla distruzione degli stessi fino ad un irreversibile caduta dei denti[87]. I trattamenti per questa patologia e per quelle ad essa correlate, come la perimplantite nel caso degli impianti dentali, sono una delle più gradi sfide che l'ingegneria tissutale sta affrontando a causa delle difficoltà di rigenerazione dei tessuti periodontali ed in particolare del cemento radicolare[88].

Sebbene le cellule del legamento periodontale abbiano la capacità di differenziare *in vitro* in cementoblasti ed osteoclasti, e sia stato dimostrato che il trapianto di tali cellule abbia un risvolto positivo verso la formazione di nuovo cemento, le tecniche che consentono di effettuarne il trapianto *in vivo*, direttamente nel sito del legamento periodontale, sono ancora in fase di sviluppo[89][90].

Da studi recenti, invece, è noto che gli scaffold bioattivi giocano un ruolo importante nell'interazione tra risposta biologica delle cellule periodontali e conseguente formazione di nuovo tessuto[88]. È perciò di grande rilevanza clinica la progettazione e la realizzazione di scaffold bioattivi, da inserire direttamente nel sito della lesione, che siano in grado di stimolare la differenziazione in senso cementogenico delle cellule del legamento periodontale in modo da migliorarne la rigenerazione[88]. In tal senso, uno studio condotto da Han *et al.* ha dimostrato che incorporando ioni litio (Li⁺) all'interno di scaffold mesoporosi bioattivi a base di vetro bioattivo 45S5, commercialmente noto con il nome di Bioglass[®], oltre che ad influenzare il processo di formazione dell'idrossiapatite stimolato dal vetro, si ottengono delle risposte positive in merito alla proliferazione ed alla differenziazione delle cellule del legamento periodontale verso il fenotipo cementogenico, tramite l'attivazione di specifici pathway di segnalazione che migliorano sensibilmente l'espressione dell'alcaline fosfatasi (ALP), un gene associato alla biomineralizzazione dell'apatite[91][88].

Questi effetti sono fortemente influenzati dalla dose di ioni litio incorporati all'interno dello scaffold; la concentrazione ottimale si aggira intorno al 5% mentre per concentrazioni inferiori si inibisce la formazione dello strato di idrossiapatite e per concentrazioni superiori si hanno effetti citotossici[88]. Analogamente, altri studi hanno posto l'attenzione sulla realizzazione di scaffolds mesoporosi a base di vetro bioattivo appartenente al sistema CaO-P₂O₅-SiO₂ al cui interno sono stati incorporati ioni Sr²⁺, ottenendo risultati confrontabili, a dimostrazione del fatto che elementi ionici accoppiati con scaffold bioattivi producono effetti positivi sulla proliferazione delle cellule del parodonto, sulla differenziazione osteo/cementogenica e sulla mineralizzazione[87].

Applicazioni per la remineralizzazione dello smalto

Le strategie di rigenerazione tradizionali contro l'erosione dello smalto o lesione cariose, quali riempitivi con amalgame, resine composite o ceramici standard, hanno l'inconveniente di risolvere solo temporaneamente il problema in questione. Infatti, spesso, anche dopo questi trattamenti possono ripresentarsi carie secondarie all'interfaccia tra lo smalto originale ed il materiale utilizzato come riempitivo a causa di un indebolimento dell'adesione del materiale alla superficie del dente per invecchiamento[12].

Nello smalto naturale, la formazione dei cristalli di apatite avviene in una matrice ricca di amelogenina che ha un ruolo fondamentale nel controllo della cristallizzazione del calcio e del fosforo per formare cristalli di idrossiapatite che presentino geometrie allungate[92]. Per questo motivo, tra le varie strategie di riparazione dello smalto dentale si annoverano degli idrogeli in chitosano contenenti amelogenina (CS-AMEL), che sintetizzano uno strato di dentina artificiale mineralizzato ed organizzato come l'originale. È un materiale di semplice realizzazione, assolutamente biocompatibile e biodegradabile, con proprietà uniche in termini antimicrobici, nei confronti di un ampio spettro di batteri tra i quali streptococchi e lactobacilli che sono i principali fattori eziologici nell'insorgenza delle carie, e di adesione cellulare sia verso i tessuti molli che quelli densi. Il CS-AMEL, in forma di gel, viene applicato direttamente sulla zona lesionata dello smalto instaurando una forte adesione all'interfaccia che riduce la probabilità d'insorgenza di carie secondarie ai margini del restauro, aumentando notevolmente l'efficienza del trattamento in termini di durabilità[12].

Altri studi hanno posto l'attenzione sull'amelogenia in combinazione con scaffolds elettrospinnati a base di acido poli-glicolico (PGA) e poli-caprolattone (PCL), ottenendo buoni risultati in termini di

cinetica di rilascio delle proteine, proprietà meccaniche, potenziale di mineralizzazione e proprietà di adesione cellulare[93].

Come accennato nei paragrafi precedenti, recentemente, si stanno conducendo molte ricerche anche nell'ambito dei vetri bioattivi da impiegare come materiali per rigenerazione dentale. Questi biomateriali, grazie alla loro capacità di indurre la formazione dell'idrossiapatite quando entrano in contatto con i fluidi biologici sono degli ottimi candidati per incentivare la remineralizzazione dello smalto[94]. Infatti, è stato evidenziato, da studi *ex vivo*, che i vetri bioattivi sono maggiormente efficaci nel favorire i processi di mineralizzazione rispetto agli agenti "gold standard" utilizzati in clinica come il fluoruro e CPP-APP(fosfopeptide di caseina-fosfato di calcio)[94].

1.3.3 Altri approcci

Come precedentemente illustrato, i tessuti dentali sono organizzati secondo un'architettura complessa, presentano proprietà meccaniche anisotrope ed una distribuzione cellulare assolutamente eterogenea. Per questi motivi, è particolarmente complesso ricrearne la struttura tridimensionale attraverso le tecnologie convenzionali[6]. Recentemente, per superare i limiti di queste tecnologie, sono state proposte tecniche di 3-D printing dei tessuti dentali e craniofacciali. [95][96].

Grazie ad eccellenti caratteristiche di biocompatibilità, bagnabilità e capacità di mimare la matrice extracellulare (EMC) dei tessuti dentali, spesso vengono utilizzati idrogeli polimerici come inchiostro (bio-ink) per la stampa dello scaffold. Tuttavia, anche materiali ceramici come idrossiapatite o compositi vengono considerati delle ottime alternative da utilizzare come bio-ink nell'ambito dell'odontoiatria rigenerativa[6][97]. Altri approcci sono legati all'impiego delle proteine derivate dalla matrice dello smalto (EMDPs), come l'amelogenina, che intervengono nel processo di cementogenesi, stimolandolo. Infatti, è noto che le EMDPs siano in possesso di un gran numero di proprietà biologiche importanti per la rigenerazione dei tessuti del cavo orale: stimolano la chemiotassi, incentivano la proliferazione cellulare favorendone anche l'adesione e la sopravvivenza, incrementano l'espressione dei fattori di crescita, delle citochine, dei costituenti della matrice extracellulare e regolano la formazione di nuovo tessuto osseo[98]. Per questi motivi sono stati condotti degli studi che hanno dimostrato come l'adozione di queste cellule possa essere una valida alterativa clinica, con risultati migliori rispetto ai trattamenti convenzionali, per il trattamento dei difetti parodontali intraossei, nonché per la rigenerazione della superficie dello smalto danneggiato[99][100][92].

Anche le nanotecnologie si stanno sempre più affermando in campo medico e nel settore dentale, cercando di creare tecniche odontoiatriche che siano sempre più raffinati ed apportando, al tempo stesso, innumerevoli vantaggi clinici. Ad esempio, alla nanoscala è possibile capire meglio i processi di amelogenesi e quindi anche come replicarli *in vitro*[9]. Grazie a tecniche di visualizzazione alla nanoscala è possibile avere una visione più chiara circa i fenomeni dinamici che governano la formazione dei tessuti dentali. Inoltre, le nanotecnologie consentono di trasportare molecole che facilitano la remineralizzazione delle strutture dentali in maniera semplificata e non invasiva, prevenendo in questo modo patologie di desolubilizzazione dello smalto, come le carie[9]. Un

esempio di questa strategia sono sistemi ottenuti dalla combinazione di nanoparticelle contenenti fluoruro di calcio rinforzati con resine composite (RBC)[101].

A livello immunologico e tossicologico è stato evidenziato che la dimensione delle particelle influenza fortemente la risposta immunitaria a livello cellulare e tissutale dell'organismo ospitante. Perciò le nanotecnologie sono impiegate anche per la realizzazione di rivestimenti sempre più sottili da appore agli impianti dentali per favorire processi osteoconduttivi e migliorare l'interazione con i tessuti circostanti[9][102].

Capitolo 2

Caratteristiche e Tecnologie di Produzione per Vetri e Vetroceramici Bioattivi in Ingegneria Tissutale

Lo scopo di questo capitolo è quello di introdurre le caratteristiche fondamentali dei vetri e dei vetroceramici bioattivi, partendo dalla descrizione dei vetri e delle loro proprietà, in termini di comportamento meccanico e struttura molecolare. Successivamente, verrà introdotto il concetto di bioattività ed il meccanismo che conduce alla rigenerazione dei tessuti sia molli che duri. Segue una trattazione sulle principali tecniche di fabbricazione per la realizzazione di scaffold porosi, focalizzandosi su quelli che sono i metodi convenzionali e non convenzionali maggiormente utilizzati per la produzione in ambito medico, evidenziandone limitazioni e vantaggi.

2.1 Caratteristiche generali dei vetri

I vetri vengono definiti come dei "solidi amorfi (organici, inorganici o metallici) sprovvisti di un ordine a lungo raggio, cosi come per i fluidi, ed esibiscono una regione di transizione vetrosa"[67]. All'interno di questa regione è possibile osservare una transizione di fase dallo stato liquido allo stato solido che si verifica in corrispondenza di un preciso valore di temperatura detta temperatura di transizione vetrosa (T_g) , dipendente sia dalla velocità di raffreddamento che dalla temperatura di fusione del materiale: per $T>T_g$ il vetro si comporta come un fluido viscoso e, conseguentemente, sarà soggetto a deformazioni qualora vengano applicate forze esterne, per $T<T_g$ il materiale manifesta un comportamento essenzialmente elastico e per questo caratterizzato da frattura di tipo fragile mentre, quando $T_g < T < T_f$ assume proprietà viscoelastiche[62].

I materiali vetrosi si ottengono per progressivo irrigidimento di un liquido viscoso che non cristallizza durante il raffreddamento, originando una struttura metastabile in cui gli atomi cercano di riorganizzarsi senza successo, rimanendo così immobilizzati all'interno di un network disordinato. A causa di questa instabilità termodinamica, tali sistemi tendono ad evolvere verso stati più stabili, caratterizzati da un più alto livello di cristallinità. Tutti i vetri hanno in comune il fatto di essere costituiti da un una fitta rete di atomi legati covalentemente con atomi di ossigeno[62]. Questo avviene, ad esempio, per i vetri di silicati, costituiti da unità tetraedriche SiO4⁴⁻ dove ogni atomo di silicio è situato al centro di un tetraedro a cui vertici sono presenti gli atomi d'ossigeno; ogni vertice viene condiviso da un tetraedro adiacente in modo che ogni ossigeno risulti mutualmente condiviso da due atomi di silicio(**Figura 2.1**)[103].



Figura 2.1: Confronto tra un network di silice cristallina (cristobalite) e uno di silice amorfa (vetro di silice). Il primo presenta un'organizzazione spaziale con ordine a lungo raggio, mentre il secondo è fornito solo di ordine a corto raggio[103]

I materiali amorfi, sotto opportune condizioni cinetiche e termodinamiche, possono essere convertiti in materiali semicristallini o cristallini attraverso il fenomeno della *devetrificazione*. Si tratta di un lento processo di nucleazione e crescita di specie cristalline che può verificarsi all'interno della matrice vetrosa, sottoponendo il vetro ad un trattamento termico per cui si raggiunge una velocità di cristallizzazione piuttosto elevata. La nucleazione non avviene simultaneamente in tutta la massa ma per progressivo accrescimento di clusters costituiti da poche centinaia di atomi, conducendo alla formazione di materiali vetroceramici. Sia il fenomeno della nucleazione che la conseguente crescita di cristalli sono processi termicamente attivati che possono essere descritti attraverso una curva che esprime la temperatura in funzione del tempo, come mostrato in **Figura 2.2** [62].



Figura 2.2: Schematizzazione del trattamento termico per la realizzazione di materiali vetroceramici[62].

Per quanto riguarda le proprietà meccaniche, i vetri presentano una bassa resistenza a trazione, legata alla loro scarsa tenacità ed ai difetti di grosso taglio inclusi all'interno della struttura, mentre

manifestano elevate prestazioni in termini di resistenza alla compressione (circa 10 volte superiore rispetto al valore di resistenza a trazione). La resistenza a fatica, e quindi la durabilità del vetro, è strettamente influenzata dalla composizione chimica del materiale e dalle condizioni ambientali a cui è sottoposto, come l'umidità dell'aria circostante e l'esposizione all'acqua che dà origine a fenomeni di scambio ionico e formazione di sali che si depositano sulla sua superficie [104]. Variando la composizione di ossidi all'interno del network del vetro, inoltre, è possibile modularne le proprietà in termini di reattività con i fluidi biologici[105]. Queste caratteristiche rendono i vetri dei materiali estremamente versati per innumerevoli campi di applicazione incluso quello clinico.

2.2 Vetri bioattivi

Nel corso del ventesimo secolo, la necessità di rigenerare o sostituire parti del corpo lesionate da traumi o malattie, in modo da ristabilirne il normale funzionamento fisiologico, ha spinto la scienza verso l'investigazione di tecnologie all'avanguardia e materiali sempre più performanti ed efficienti. Inizialmente, un biomateriale per poter essere utilizzato in clinica doveva essere classificato come bioinerte, ovvero non doveva generare una risposta immunitaria avversa da parte del tessuto o organo ospite che ne causasse il rigetto[106]. Tuttavia, il Prof. Hench nel 1969, in seguito ad evidenze scientifiche, dichiarò che: "Il corpo umano rigetta i materiali metallici e polimeri sintetici tramite la formazione di una cicatrice fibrotica in quanto i tessuti viventi non sono composti di questi materiali. L'osso contiene componenti a base di fosfato di calcio e idrossiapatite; perciò se un materiale fosse in grado di formare uno strato di idrossiapatite in vivo, potrebbe non essere rigettato dal corpo" [107]. Spinto da questa convinzione, Hench propose un nuovo tipo di biomateriale, denominato 45S5 e anche noto con il nome commerciale di Bioglass[®], che oltre ad essere biocompatibile fosse anche bioattivo, ovvero in grado di formare legami solidi all'interfaccia con il tessuto e stimolare specifici meccanismi cellulari di guarigione e rigeneramento tramite il rilascio di ioni e/o molecole, per dissoluzione, all'interno dell'ambiente fisiologico[106]. Sebbene inizialmente le proprietà e le caratteristiche dei vetri/vetroceramici bioattivi non furono investigate per applicazioni a sistemi stomatologici, sono attualmente impiegati per la realizzazione di materiali dentali.

L'osso alveolare infatti, così come accade per gli altri tessuti ossei, può andare in contro a degenerazione con conseguenti perdite di massa e per questo deve essere rigenerato tramite opportune strategie che ben si sposano con tali materiali biologicamente attivi [67]. A tal scopo, gli scienziati a partire da Hench, si sono mossi verso lo studio di nuove combinazioni di vetri bioattivi da poter utilizzare per la rigenerazione dei tessuti del cavo orale (**Tabella 2.1**).

FASE	CRISTALLINA	NOME COMMERCIALE	USO CLINICO
PRINCIPALE			
Mica		DICOR MGC	Corone, inlay
Leucite		IPS EMPRESS	Corone, inlay, faccette
Leucite		PRO CAD	Corone, inlay, faccette
Leucite, fluoroa	patite	IPS d.SIGN	Corone, ponti

Tabella 2.1: Vetri bioattivi comunemente utilizzati in odontoiatria[67].

Silicato di litio zirconio	IPS EMPRESS 2	Abutment
Disilicato di litio	IPS EMPRESS Cosmo	Corone, ponti
Silicato di litio	IPS e.max CAD	Corone, inlay, faccette, ponti
Fluoroapatite	IPS eris	Cristallizzazione su vetroceramici
		a base di disilicato di litio
Fluoroapatite	IPS e.max Ceram	Sinterizzazione su CAD di IPS
		e.max
Fluoroapatite	IPS e.max Zirpress	Flusso viscoso su ZrO ₂

2.2.1 Principali caratteristiche dei vetri bioattivi

I vetri bioattivi sono classificati come biomateriali di terza generazione ovvero materiali capaci di formare, quando immersi all'interno di una soluzione fisiologica simulata in vitro o per contatto con i fluidi biologici in vivo, uno strato di idrossiapatite/idrossicarbonatoapatite (HA/HCA), la principale fase minerale di cui è composto l'osso, instaurando legami chimici con i tessuti viventi. Proprio per questo si definiscono osteproduttivi[108]. I vetri bioattivi sono composti principalmente da silice, ossido di sodio, ossido di calcio e fosfati anche se, è possibile aggiungere ulteriori ossidi in modo da renderli maggiormente compatibili per specifiche applicazioni cliniche[109]. Il vantaggio principale di questa classe di materiali risiede nel fatto che è possibile realizzarli in modo tale da poterne controllare il tasso di degradazione e la velocità nel formare legamici chimici all'interfaccia con il tessuto ospite. Tale velocità dipende fortemente dalla composizione chimica del vetro: è stato evidenziato che, nel caso di vetri bioattivi ottenuti tramite metodologia melt-derived per avere una rapida formazione dello strato di HCA sono necessari contenuti di silice inferiori al 50% molare mentre, per contenuti di silice maggiori del 60% molare, il vetro perde le sue caratteristiche bioattive diventando di fatto un materiale inerte[108].Questo limite è stato superato con l'introduzione della sintesi via sol-gel che verrà discussa in seguito. In generale, è possibile raggruppare i vetri impiegati nel settore biomedicale per la rigenerazione sia dei tessuti molli che dei tessuti duri, in base alla loro composizione chimica secondo 3 sistemi principali:

- i) Vetri bioattivi silicati;
- ii) Vetri bioattivi borati;
- iii) Vetri bioattivi fosfati.

Sebbene il meccanismo di bioattività presenti degli step in comune per tutti e 3 i sistemi, ognuno di questi differisce dall'altro in base a peculiarità specifiche[110]. In particolare, il seguente lavoro di tesi è incentrato sullo sviluppo di vetri bioattivi appartenenti al primo sistema, il cui meccanismo di bioattività verrà in seguito.

2.2.2 Bioglass[®]

Il primo vetro bioattivo adottato in campo medico fu sinterizzato più di 40 anni fa dal Prof. Larry L. Hench, la cui inspirazione avvenne in seguito alla celebre conversazione con un colonnello dell' US Army in ritorno dalla guerra del Vietnam[67]. L'argomento principale della conversazione riguardava il rigetto dei materiali polimerici e degli impianti metallici da parte dell'organismo, a causa della formazione di una capsula fibrotica che ne impediva la corretta integrazione. Inoltre, il professore menzionò anche i suoi recenti studi sulle radiazioni gamma applicate ai semiconduttori vanadio/fosfato. Dopo aver ascoltato queste parole, il colonello pose la domanda da cui ebbe inizio il lavoro del Prof. Hench riguardo lo sviluppo dei vetri bioattivi:

"Se sei in grado di realizzare un materiale capace di resistere all'esposizione di radiazioni ad alta energia, potresti produrre un materiale in grado di sopravvivere all'esposizione con il corpo umano? [107]".

Il colonnello, infatti, spiegò che negli anni della guerra ogni giorno si era costretti a dover amputare gli arti dei soldati a causa del rigetto dei materiali metallici e dei sistemi polimerici, unici strumenti di cui disponevano i chirurgi. Per questo motivo vi era la necessità di scoprire una nuova famiglia di materiali in grado di legarsi completamente ai tessuti viventi, senza formazione di tessuti cicatriziali. Dopo sperimentazioni condotte tra il 1969 ed il 1971, Hench ed il suo gruppo riuscirono a sintetizzare il primo vetro in grado di ricoprirsi di idrossiapatite e fosfati di calcio, componenti principali del tessuto osseo[107].

La composizione di questo vetro bioattivo appartiene al sistema $SiO_2-Na_2O-CaO-P_2O_5$ con formulazione in peso percentuale (wt.%), frutto di numerosi processi di ottimizzazione, pari a $45\%SiO_2-24.5\%Na_2O-24.5\%CaO-6\%P_2O_5$ (Figura 2.3), caratterizzata da un elevato contenuto di Na₂O, CaO e da un alto rapporto CaO/ P₂O₅ che rende la superficie del materiale fortemente reattiva al contatto con i fluidi fisiologici[35].



Figura 2.3: Diagramma composizionale per il vetro 45% SiO₂-24.5% Na₂O-24.5% CaO-6%P₂O₅ di Hench appartenente alla regione di bioattività A, regione in cui si vengono a formare legami con l'osso[35].

Questa particolare composizione di vetro bioattivo è denominata 4585 ed indica che il contenuto di silice è pari al 45% in peso e che il rapporto Ca/P è uguale a 5. Così come per i vetri non bioattivi, anche il 45S5 è caratterizzato da scarse proprietà meccaniche in quanto risulta particolarmente fragile, poco tenace, con un modulo elastico elevato rispetto a quello dell'osso corticale/alveolare ed una bassa resistenza alla trazione. Queste caratteristiche non lo rendono un materiale idoneo per la realizzazione di protesi integrali soggette a carichi cicli mentre, al contrario, può essere utilizzato per la fabbricazione di piccoli impianti, come gli scaffods, da inserire all'interno di difetti dalle dimensioni contenute e, per questo, trova diverse applicazioni nel settore dentale tra cui la rigenerazione dei tessuti periodontali [108][111]. Il primo impiego del Bioglass[®] in odontoiatria risale al 1986, dove fu sfruttato per la realizzazione di impianti per il mantenimento della cresta endossea (ERMIs) mentre, successivamente, nel 1993 fu proposto in forma di particelle di diametro compreso tra 90-710 µm, sotto il nome commerciale PerioGlas®, per il trattamento delle patologie periodontali[67][112]. È un materiale comunque molto versatile ed utilizzato, in combinazione con polimeri o impianti metallici, anche in altri settori della medicina per la riparazione dei tessuti duri come l'ortopedia e la chirurgia maxillo-facciale[62]. Sebbene il 4585 sia il primo vetro utilizzato in clinica, non è il solo ad essere bioattivo ma esistono differenti altri vetri silicati che sono stati sviluppati al fine di migliorare le prestazioni in termini di proprietà meccaniche e lavorabilità del materiale (Tabella 2.2)[113].

Composition (wt%)	4585	13-93	6P53B	58S	70S30C	13- 93B1	13- 93B3	P50C25N25
Na ₂ O	24.5	6.0	10.3	0	0	5.8	5.5	9.3
K ₂ O	0	12.0	2.8	0	0	11.7	11.1	0
MgO	0	5.0	10.2	0	0	4.9	4.6	0
CaO	24.5	20.0	18.0	32.6	28.6	19.5	18.5	19.7
SiO ₂	45.0	53	52.7	58.2	71.4	34.4	0	0
P2O5	6.0	4.0	6.0	9.2	0	3.8	3.7	71.0
B2O3	0	0	0	0	0	19.9	56.6	0

Tabella 2.2: Composizioni di vari vetri bioattivi[113]

Oltre agli ioni sodio e calcio, è possibile includere altri tipi di cationi all'interno della matrice vetrosa, in moda da conferire al vetro bioattivo ulteriori proprietà benefiche in termini di rigenerazione tissutale (**Tabella 2.3**). Ad esempio, l'aggiunta di ioni argento ha evidenziato effetti antibatterici sia nei confronti di batteri Gram Positivi che batteri Gram Negativi, favorendo in tal modo i processi di guarigione fisiologica senza effetti tossici nei confronti delle cellule dei tessuti circostanti. È stato investigato anche l'effetto dello stronzio come sostitutivo cationico al posto del calcio per il trattamento dell'osteoporosi; l'aggiunta di questi ioni ha evidenziato un'inibizione dell'attività osteoclastica[114][110]. Sono stati notati anche effetti antibatterici dello stronzio nei confronti dei patogeni del cavo orale, in particolare del *P.gingivalis* che lo rendono un ottimo candidato per applicazioni dentali.

Tabella 2.3: Ruolo dei principali elementi all'interno del corpo umano[35].

Nome dell'elemento	Ruolo biologico
Calcio	Costituente delle ossa e dei denti, regolazione dei nervi, attivazione enzimatica, eccitabilità neuromuscolare

Fosforo	Costituente dei denti, ossa adenosina trifosfato ed acidi nucleici
Sodio	Principale catione dei fluidi extracellulari, regolazione del volume di plasma, mantenimento della pressione osmotica, trasmissione degli impulsi nervosi, processi di adsorbimento per i sali della bile ed amminoacidi
Potassio	Principale catione dei fluidi extracellulari, regolazione della pressione osmotica, glicogenesi, contrazione muscolare delle cellule cardiache
Cloro	Bilanciamento di fluidi ed elettroliti, anione principale dei succhi gastrici e dei fluidi extracellulari
Magnesio	Costituente di ossa e denti, attivatore enzimatico
Cromo	Mantiene la configurazione delle molecole di RNA, migliora la tolleranza al glucosio
Cobalto	Costituente della vitamina B ₁₂ , cofattore di enzimi coinvolti nella biosintesi del DNA
Rame	Essenziale per i sistemi ematologico e neurologico, formazione di guaine mieliniche nel sistema nervoso, costituente di molti enzimi, aiuta nell'assorbimento del ferro
Iodio	Componente degli ormoni tiroidei
Ferro	Richiesto per la formazione dell'emoglobina, componente di enzimi coinvolti nella respirazione cellulare, mielinizzazione del midollo spinale, sintesi ed impacchettamento di neurotrasmettitori
Manganese	Cofattore dell'idrolasi, decarbossilasi, coinvolto nella sintesi delle glicoproteine, richiesto nel processo metabolico del piruvato e per la formazione dell'urea
Molibdeno	Parte dei metallo-enzimi, coinvolto nel metabolismo cellulare
Selenio	Costituente del glutatione perossidasi, incluso in meccanismi di difesa contro i radicali liberi, ossidante con vitamine E
Silicio	Calcificazione delle ossa, componente di mucopolisaccaridi, componente di tessuti connettivi, agente reticolante, supporta la resilienza dei tessuti connettivi
Zinco	Cofattore per molti enzimi, replicazione cellulare, metabolismo delle vitamine A ed E, coinvolto nei processi di rigenerazione dei tessuti e guarigione delle ferite
Fluoro	Incrementa la durezza delle ossa, incentiva la remineralizzazione dello smalto, previene le carie dentali
Zolfo	Richiesto per amminoacidi, tessuto connettivo, pelle, unghie e capelli
Stronzio	Di supporto per la calcinazione delle ossa, dei denti, nella guarigione e nel riassorbimento osseo
Nikel	Mantenimento della struttura di membrana, controllo della prolactina
Boro	Di supporto nella formazione delle ossa
Bario	Opacizzante osseo

2.2.3 Definizione e classificazione del concetto di Bioattività

Il concetto di bioattività può essere assunto come un'estensione di quello della biocompatibilità, applicabile a tutte quelle classi di biomateriali che sono in grado di innescare una specifica risposta da parte dell'organismo attraverso la creazione di un forte legame con il tessuto con cui entrano in contatto. La formazione di tali legami chimici all'interfaccia tra tessuto e biomateriale è da considerarsi come il primo passo verso la formazione di nuovo tessuto. Inoltre, lo spessore dell'interfaccia, i meccanismi di legame ed i tempi con cui questi legami si formano, variano a seconda delle caratteristiche intrinseche del materiale[62]. Proprio in riferimento al tempo con cui vengono a formarsi i legami chimici, è possibile introdurre un'altra variabile fondamentale che definisce il "livello di bioattività", ovvero la velocità di formazione di legame, secondo la relazione:

$I_b = 100/t_{0,5bb}$

dove $t_{0,5bb}$ è inteso come il tempo necessario a far sì che la metà della superficie di uno specifico biomateriale sia legata ai tessuti[62]. È possibile classificare i materiali bioattivi raggruppandoli in due categorie principali, a seconda del livello di interazione che riescono ad instaurare con i tessuti circostanti:

- Classe A: sono materiali che possiedono, contemporaneamente, proprietà osteoconduttive ed osteoproduttive ed attraverso tali meccanismi la loro superficie bioattiva viene colonizzata dalle cellule osteogeniche che si trovano nell'ambiente biologico circostante. In particolare, i vetri bioattivi di classe A, tramite processi di dissoluzione degli ioni contenuti all'interno della loro matrice, sono in grado di innescare processi di rigenerazione ossea, in seguito ad un intervento chirurgico, grazie all'attivazione dei fenomeni di remineralizzazione della matrice ossea con conseguente formazione di nuovo tessuto. In tal modo, si determina una risposta sia intracellulare che extracellulare all'interfaccia tessuto/impianto a causa dell'interazione con gli ioni rilasciati dalla superfice del materiale [62][108].
- Classe B: si tratta di materiali che possiedono capacità osteoconduttive determinate da fattori extracellulari. Un tipico esempio di materiali bioattivi di classe B sono gli impianti in idrossiapatite[62].

Un esempio di vetro bioattivo di classe A è il Bioglass[®] di Hench, in grado di innescare sia una risposta intracellulare che una extracellulare. Gli effetti intracellulari si riflettono sulla proliferazione di nuovo tessuto osseo attraverso il rilascio di silice solubile e ioni calcio mentre, gli effetti extracellulari sono legati alla nanoporosità intrinseca ed all'elevata area superficiale dello strato di HCA che si forma rapidamente a contatto con i fluidi biologici [115].

2.2.4 Meccanismo di Bioattività

Con "meccanismo di bioattività" si intende la capacità di un materiale di interagire con il tessuto nel quale è stato impiantato, attraverso una serie di reazioni fisico-chimiche, all'interfaccia tra il materiale

e il tessuto. Quando un vetro bioattivo viene immerso all'interno di una soluzione acquosa come l'SBF (soluzione fisiologica simulata), oppure impiantato in vivo, si verificano una serie di reazioni che portano alla formazione di uno strato di HCA che si interpone tra la soluzione ed il biomateriale (**Figura 2.4**)[62][108]:

- Lisciviazione: rapido scambio di cationi alcalini Na⁺ e Ca²⁺ provenienti dal network del vetro con cationi H⁺ o H₃O⁺ contenuti nell'SBF, incrementando il valore del pH all'interfaccia a valori superiori a 7.4;
- Dissoluzione del network vetroso: rottura dei legami -O-Si-O- dovuta all'azione degli ioni H⁺ con conseguente rilascio locale di silice solubile [Si(OH)4] e successiva formazione di silanoli Si-OH. Qualora il vetro presenti un contenuto di silice superiore al 60% ci sarebbe un più lento grado di dissoluzione legato all'elevato numero di ponti di ossigeno presenti nella struttura;
- Polimerizzazione del gel di silice: Condensazione e successiva ripolimerizzazione dei silanoli per formare uno stato amorfo ricco di SiO₂ e povero di ioni sodio e calcio. Lo spessore di questo strato può variare tra 1 e 2μm.
- Precipitazione: gli ioni calcio e fosfato rilasciati dalla matrice del vetro, insieme agli altri ioni presenti nella soluzione formano, al di sopra dello strato amorfo di SiO₂, uno stato ricco di fosfato di calcio (CaP). Questo strato, inizialmente amorfo, cristallizza attraverso l'incorporazione di anioni carbonato contenuti nella soluzione formando uno strato misto di idrossiapatite/idrossicarbonatoapatite (HA/HCA). Il meccanismo di nucleazione e crescita dell'HCA appare essere lo stesso sia *in vivo* che *in vitro*;
- Adsorbimento di molecole biologiche nello strato di SiO₂-HCA;
- Azione dei macrofagi;
- > Attaccamento e differenziamento delle cellule staminali;
- Generazione di nuova matrice;
- Mineralizzazione della matrice.



Figura 2.4: Sequenza dei processi che portano alla formazione di uno strato di HCA secondo il meccanismo di bioattività di Hench[108].

Inoltre, la presenza di cationi modificatori all'interno della matrice del vetro come sostituti degli atomi Ca e Na, risulta determinante nel modulare le caratteristiche chimico-fisiche del materiale agendo sulla temperatura di transizione vetrosa, generando cavità all'interno della struttura, influenzando la densità del network, la viscosità ed incrementando la solubilità del vetro quando immerso in ambiente fisiologico. Anche la presenza di fasi cristalline può condizionare le proprietà di solubilità del vetro interferendo con i processi di scambio ionico[116].

2.3 Metodi per la produzione dei vetri bioattivi

Esistono diverse tecniche che permettono la sintesi dei vetri bioattivi, conferendo loro diverse proprietà fisico-chimiche a seconda dei requisiti finali. Generalmente, si definiscono due principali processi manifatturieri per la produzione di vetri bioattivi: la tecnica tradizionale del *melt-quenching* o i più moderni metodi di sintesi *sol-gel* (**Figura 2.5**)[117].



Figura 2.5: Schema dei principali passaggi delle tecniche di melt-quenching e sol-gel per la produzione di vetroceramici[117]

Entrambi i metodi portano alla formazione di polveri o monoliti per la formazione di sistemi bioattivi, anche se i vetri ottenuti attraverso la tecnica del melt-quenching presentano delle limitazioni
intrinseche nel processo di fabbricazione[35]. La necessità di superare queste limitazioni ha spinto gli studiosi verso la ricerca di un metodo alternativo, rappresentato dalla sintesi sol-gel.

2.3.1 Melt-quenching

La tecnica *melt-quenching*, a cui in italiano ci si riferisce come processo "per colata e per fusione", è la metodologia più antica per la produzione di sistemi vetrosi per il settore medico. Questa tecnica si basa sulla realizzazione di vetri a partire da precursori ossidi e carbonati ad alto grado di purezza (c.a 99.99%), per evitare ogni forma di contaminazione, che vengono inseriti all'interno di macinatore a sfere e macinati a secco o con modeste quantità di etanolo o acetone fino ad ottenere polveri finissime ed omogenee. Queste polveri, successivamente, poste in un crogiuolo e fuse ad alte temperature (1350°C<T<1500°C) all'interno di una fornace, settando i parametri del processo in modo da evitare la formazione di bolle. Generalmente si scelgono crogioli in platino o allumina, come contenitori delle polveri per la decomposizione termica, per le loro spiccate proprietà refrattarie. A questo punto le polveri fuse, in forma di liquido viscoso, vengono colate all'interno di stampi della geometria desiderata (**Figura 2.6**). Inoltre, può essere previsto un secondo trattamento termico a circa 500°C per eliminare le tensioni interne presenti nella struttura del vetro, che originano in seguito ai processi di raffreddamento[35][104].



Figura 2.6: Processo di colata melt-quanching (gruppo DISAT-Politecnico di Torino)

2.3.2 Tecnica Sol-Gel

La sintesi via sol-gel è una tecnica di processazione chimica impiegata per produrre materiali ceramici in cui una soluzione di precursori chimici, generalmente nitrati oppure alcossidi, o una dispersione di particelle colloidali gelifica, tramite reazioni di idrolisi e polimerizzazione (**Figura 2.7** [118]), sotto determinate condizioni di pH e concentrazioni chimiche a temperature prossime a quella ambientale (22°C)[117][119]. In tal modo, si forma un sistema bifasico in cui coesistono una fase liquida ed una fase solida. Si tratta di una tecnologia versatile ed ampiamente utilizzata in grado di realizzare una vasta gamma di materiali differenti per forma (fibre, rivestimenti, film sottili, etc) e dimensioni che spaziano dalla micro alla nano scala[120].



Figura 2.7: schematizzazione dei processi di idrolisi (1) e policondensazione (2)[118]

Il processo coinvolge 7 step di reazioni:

- 1) <u>Miscelazione</u> dei reagenti alcossisi o organometallici a temperatura ambiente e conseguente formazione di legami covalenti tra gli elementi. Durante questa fase si verificano simultaneamente reazioni di idrolisi e poli-condensazione fino ad una completa omogeneizzazione della soluzione.
- 2) Colata del sol all'interno di stampi della geometria desiderata;
- <u>Gelificazione del sol e</u> successiva formazione del reticolo tridimensionale del vetro osservata attraverso un incremento della viscosità nel tempo, in quanto il sol parte da un valore di viscosità molto basso. Il tempo di gelificazione è influenzato dalla natura dei gruppi alcossidi, dalla concentrazione e dalla quantità d'acqua coinvolta durante il processo di idrolisi;
- 4) <u>Invecchiamento</u>, in cui prevalgono reazioni di policondensazione che comportano un aumento della resistenza meccanica per effetto della densificazione della matrice vetrosa. Questa fase si verifica ponendo il gel all'interno di una stufa (temperatura compresa tra 25-80°C) per

diverse ore. Oltre alla densità vengono influenzate anche l'area superficiale ed il volume dei pori del materiale;

- 5) <u>Essiccazione</u> del gel invecchiato e rimozione della fase liquida dal network tridimensionale. Questo passaggio è caratterizzato da un forte ritiro volumico indotto dalla temperatura di essiccazione che potrebbe portare alla rottura catastrofica del materiale. Per evitare che questo accada, il gel deve essere in grado di resistere a tali shock termici.
- 6) *Disidratazione*, in grado di far avvenire la rottura dei silanoli dal reticolo poroso della matrice vetrosa. In questo modo si raggiunge un'elevata stabilità chimica;
- 7) <u>Densificazione del gel</u> attraverso trattamenti termici ad alta temperatura. Le temperature coinvolte in questo processo (500-700°C) sono comunque inferiori rispetto a quelle previste dal metodo melt-quanching[119].

I vetri bioattivi fabbricati per mezzo di questa tecnica hanno evidenziano un enorme potenziale per applicazioni nel settore della medicina rigenerativa, superando alcuni dei limiti riscontrati in quelli fabbricati tramite strategie di melt-quenching.

È stato riscontrato che per incrementare la cinetica di rilascio dei vetri bioattivi in ambiente fisiologico, uno dei parametri su cui è possibile intervenire è la composizione chimica. Nel caso dei vetri ottenuti tramite melt-quenching, che richiedono temperature molto elevate per una corretta fusione dei precursori ossidi, ciò è possibile soltanto all'interno di un range limitato di valori poiché, per quantità di SiO₂ > del 60% molare, il vetro perde le sue proprietà di bioattività trasformandosi in un materiale inerte quando immerso nei fluidi biologici. Questo non accade nella sintesi via sol gel in quanto è stato osservato un comportamento bioattivo anche in vetri che presentano un contenuto di silice maggiore del 90% molare.

Inoltre, il metodo sol-gel porta alla formazione di vetri con porosità intrinseca alla nanoscala, aumentando significativamente l'area superficiale ed ottenendo una struttura molto vicina all'architettura dell'osso trabecolare. Di conseguenza, ciò comporta una cinetica di degradazione ed un grado di conversione del vetro in HA più rapidi rispetto agli scaffold processati da fuso[35].

2.4 Scaffolds

L'ingegneria tissutale e la medicina rigenerativa sono in continua ricerca di strategie all'avanguardia che portino risultati sempre più efficaci nella rigenerazione di difetti dei tessuti causati da grossi traumi o eventi patologici, come i tumori, che richiedono asportazioni chirurgiche. In odontoiatria queste terapie di rigenerazione hanno assunto un ruolo centrale soprattutto nei casi in cui il paziente non presenti dei volumi ossei sufficientemente estesi ad assicurare un corretto posizionamento dell'impianto[121]. Gli elementi principali, che stanno alla base dell'implementazione di soluzioni ingegneristiche mirate alla rigenerazione di nuovi tessuti, possono essere identificati in tre categorie

fondamentali (**Figura 2.8**): cellule, impalcature tridimensionali (scaffolds) e segnali biochimici[121][122].



Figura 2.8: Elementi principale dell'ingegneria tissutale[122].

Vengono utilizzati un gran numero di biomateriali differenti per forme e caratteristiche: dalle polveri, a materiali in forma di monoliti fino ad arrivare agli scaffold porosi, ovvero strutture tridimensionali in grado di mimare la struttura e l'architettura ossea e di fornire un supporto fisico alle cellule stimolandone l'adesione, la proliferazione, la migrazione ed il differenziamento fino alla completa maturazione di nuovo tessuto[122]. Al giorno d'oggi, i vetri e vetroceramici bioattivi, insieme ai compositi polimerici, sono considerati i materiali d'elezione per la realizzazione di scaffolds per ingegneria tissutale dell'osso trabecolare/alveolare[123].

Requisiti principali per scaffold in TE e RM.

L'obiettivo principale di uno scaffold è quello di offrire un substrato di supporto temporaneo per le cellule di un tessuto danneggiato, favorendone i processi di genesi e rigenerazione. Questi sistemi, inoltre, devono essere in grado di trasportare macromolecole biologiche, come proteine, fattori di crescita o geni, necessari ad indurre una crescita corretta ed organizzata del tessuto[124]. Per questo, gli scaffolds, necessitano di caratteristiche chimiche, biologiche e meccaniche che siano il più possibile affini al microambiente dello specifico substrato da sostituire[123]. Uno scaffold ideale dovrebbe soddisfare i seguenti requisiti:

Biocompatibilità e bioattività: lo scaffold non deve rilasciare prodotti tossici nell'ambiente fisiologico circostante né indurre effetti locali o sistemici. Inoltre, non deve dare origine ad una risposta da corpo estraneo (FBR) quando impiantato, per evitare la formazione di una capsula fibrotica ed il conseguente fallimento dell'impianto. Al contrario deve promuovere l'adesione e la proliferazione cellulare favorendo la crescita di nuovo tessuto, stimolando i processi di guarigione e decomponendosi gradualmente in sostanze biodegradabili[123];

- Porosità: lo scaffold deve possedere una struttura porosa ed interconnessa per facilitare lo scambio di nutrienti, dei prodotti gassosi, la penetrazione cellulare, la crescita di nuovo tessuto e la formazione di una rete vascolare. A tal fine, per poter essere impiantato nell'osso, è necessario che questi sistemi dispongano di una porosità superiore al 50% in volume (confrontabile con la porosità dell'osso), ed un diametro dei pori compreso tra i 300 ed i 500 µm. Quest'ultimo parametro risulta particolarmente importante in quanto per valori inferiori a quelli indicati si registra una scarsa vascolarizzazione, mentre per valori superiori si vanno ad influenzare negativamente le proprietà meccaniche[123][125];
- Proprietà meccaniche sufficienti a garantire stabilità meccanica e comunque conformi a quelle del sito d'impianto[35];
- Fabbricazione: i materiali devono poter essere fabbricati in maniera semplice, economica per la produzione in larga scala e secondo geometri desiderate, personalizzabili in base alla morfologia del difetto del paziente[123];
- Sterilizzazione: lo scaffold deve poter essere sterilizzato senza che le sue proprietà e caratteristiche originali subiscano alterazioni[123].

Ovviamente, al giorno d'oggi, non esiste uno scaffold in grado di soddisfare tutti i requisiti elencati. Tuttavia, molti studi suggeriscono che i vetri bioattivi, con composizioni appropriate, sono i materiali più promettenti nel poter rispettare queste specifiche ed essere utilizzati in campo medico. Inoltre, si stanno studiando strategie per poter funzionalizzare gli scaffold a base di vetri bioattivi e donargli proprietà antibatteriche e capacità di trasportare selettivamente i farmaci[33].

2.5 Tecnologie di Produzione per Scaffold a Base di Vetri e Vetroceramici bioattivi

I metodi di fabbricazione ed i processi manifatturieri ricoprono un ruolo cruciale nel determinare le proprietà strutturali degli scaffolds. Le caratteristiche meccaniche, la dimensione dei pori e la loro interconnettività sono parametri critici nella realizzazione di scaffolds a base di vetri/vetroceramici bioattivi. Per questo motivo, nel corso degli anni, sono state sviluppate un gran numero di tecniche differenti al fine di poter controllare al meglio questi parametri ed avvicinarsi il più possibile a mimare la struttura dei vari tessuti viventi, combinando efficacia e fattibilità economica nella produzione[35][126]. In particolare, i principali processi manifatturieri possono essere divisi in due grandi famiglie, note come metodi *convenzionali* e tecniche di *additive manufacturing* (**Tabella2.4**)[123]. Nel primo caso si parla di approcci *"top-down"* secondo cui le strutture vengono "scolpite" a partire da un blocco di materiale grezzo mentre, nel secondo caso definito approccio

"bottom-up" gli scaffold vengono assemblati per addizione di materiale a partire da micro/nanoblocchi di materiale[127].

Gruppi	Classi tecnologiche	Metodi specifici	
Convenzionali	Tecniche di foaming	Gel-casting foaming, sol-gel foaming, H ₂ O ₂ foaming	
	Consolidazione termica di particelle	Bruciatura della fase organica, pogeni polimerici, consolidamento dell'amido, metodo della buccia di riso	
	Porous polymer replication	Coating, foam replication	
	Freeze-drying TIPS (temperature induces phase separation)		
Additive manufacturing	Selective laser sintering Stereolitografia Direct ink writing	3D printing, ink-jet printing, robocasting	

Tabella 2.4: Principali processi manifatturieri per la produzione di scaffold per ingegneria tissutale
dell'osso(trabecolare/alveolare)[123].

2.5.1 Metodi convenzionali

Tecniche di "foaming"

Le tecniche di "foaming" fanno parte della famiglia dei processi manifatturieri convenzionali e possono essere adottate partendo sia da vetri bioattivi ottenuti per colata e da fusione sia da quelli processati tramite sintesi sol-gel; nel primo caso si parla di *gel-cast foaming*, mentre nel secondo di *sol-gel foaming* (**Figura 2.9** [128][129]). In particolare, si basano sull'utilizzo di agenti schiumogeni, da introdurre all'interno di sospensioni di particelle vetrose o colloidali in modo da creare bolle d'aria e indurre porosità all'interno della struttura di scaffold tridimensionali, con l'intento di mimare l'architettura dell'osso trabecolare. La dimensione dei pori comprende un intervallo molto ampio che si estende da 20 µm a circa 1-2 mm[130][123].

È possibile produrre la schiuma attraverso l'iniezione di gas, tramite azioni meccaniche o reazioni chimiche aggiungendo dei surfactanti alla sospensione delle polveri per stabilizzare il sistema e ridurre la tensione superficiale all'interfaccia solido-liquido. Inoltre, nella tecnica del *gel-cast*

foaming solitamente vengono aggiunti alla sospensione di particelle vetrose, una quantità opportuna di iniziatore e catalizzatore per accelerare le reazioni di polimerizzazione.

L'introduzione dei vetri bioattivi sintetizzati tramite tecnica sol-gel da utilizzare nei processi di foaming si riconduce alla loro capacità di sinterizzare senza innescare processi di formazione fasi cristalline ed all'abilità di sviluppare porosità direttamente durante il processo. Al contrario, i vetri ottenuti attraverso il processo melt-quanching necessitano di pretrattamenti per raggiungere un risultato analogo[123].



Figura 2.9: Immagini SEM di scaffold vetrosi bioattivi prodotti attraverso tecniche di *gel-cast foaming* (a,b) [128] e *sol-gel foaming* (c,d) [129]

Esiste inoltre un ulteriore approccio riguardante l'utilizzo di una soluzione di perossido come agente schiumogeno chiamato per questo motivo H_2O_2 -foaming. Quest'ultima strategia prevede di riscaldare la soluzione di perossido in modo che rilasci vapore acqueo ed ossigeno da sfruttare come agenti schiumogeni per la realizzazione di scaffold macroporosi. Tutte queste tecniche, tuttavia, presentano delle criticità legate alla non presenza di uno strato esterno poroso, alla possibilità di formazione di porosità chiuse da cui deriva una scarsa interconnettività della struttura dello scaffold, e da proprietà meccaniche non ottimali[123].

Metodi "porous polymer replication"

I metodi di "porous polymer replication" si basano sull'utilizzo di modelli sacrificali tridimensionali con elevato grado di porosità (oltre al 90% in volume di spazi vuoti) ed interconnessione macroporosa per la riproduzione biomimetica dell'architettura dell'osso trabecolare. L'idea principale è quella di rivestire o immergere, con delle sospensioni di polveri vetrose, le pareti del modello sacrificale che, in seguito, potrà essere sinterizzato o meno. A seconda della scelta di immergere o rivestire il "template" si parla di metodi di *coating* o *foam (sponge) replication* (Figura 2.10[131]).

I metodi di *coating* permettono di fabbricare scaffolds compositi vetro-polimerici senza alcuna sinterizzazione in modo da preservare la fase organica rappresentata dalla catena polimerica. Generalmente, scaffolds così strutturati presentano un corpo polimerico, che dona tenacità al sistema, rivestito superficialmente dal vetro attraverso tecniche differenti come deposizione elettroforetica o sputtering. In questo modo è possibile funzionalizzare il substrato polimerico donandogli, oltre alle proprietà di bioattività, l'abilità di rilasciare ioni terapeutici (ad esempio argento o stronzio) con una cinetica controllata[123][114].

Nel caso della *sponge replication*, a differenza della prima tipologia di metodi, la spugna viene completamente rimossa, pirolizzando in seguito alla sinterizzazione della fase inorganica. I modelli sacrificali, generalmente in poliuretano commerciale vengono sagomati in forme differenti, cilindriche o cubiche, ed immersi all'interno di una sospensione di polveri vetrose ("slurry"), costituita dalle polveri del vetro bioattivo selezionato, acqua distillata ed un legante (in genere PVA). Il template in poliuretano, dopo l'immersione, viene sottoposto a sforzi di compressione lungo le tre direzioni dello spazio per favorire una perfusione omogenea della soluzione all'interno della spugna ed evitare la formazione di difetti strutturali. I campioni, dopo questo processo ciclico di immersione e compressione, vengono lasciati asciugare per poi essere trattati termicamente al fine di rimuovere completamente la parte organica e sinterizzare quella inorganica. Si tratta di una tecnica di fabbricazione economica, di facile implementazione e di scarso impatto ambientale[132].



Figura 2.10: Microstruttura di: (a) spugna in poliuretano; (b) osso trabecolare umano secco; (c,d) scaffold in vetro bioattivo 13-93 ottenuto tramite il metodo di *sponge replication*[131].

Approccio "Freeze-drying"

Nella famiglia dei processi di produzione convenzionali, l'approccio *"freeze-drying"* rappresenta un'alternativa all'utilizzo di fasi organiche come elemento porogeno, sfruttando la formazione di cristalli di ghiaccio e la successiva sublimazione controllata per generare uno scaffold con struttura tridimensionale porosa[133].

In particolare, per la produzione di scaffold vetrosi, si parte da una sospensione colloidale di particelle vetrose che viene inserita all'interno di uno stampo, con geometria desiderata, e raffreddata rapidamente (ad esempio in azoto liquido) in modo da generare i cristalli di ghiaccio. Generalmente, poiché la fase di raffreddamento non è omogenea in tutte le direzioni, ne originano cristalli con geometrie allungate ed orientate secondo il gradiente di raffreddamento (**Figura 2.11**[110]). L'emulsione congelata, viene successivamente liofilizzata sottovuoto a basse temperature e pressioni per evitare la formazione di tensioni interne sufficientemente elevate da provocare il collasso della struttura. Una volta evaporato il solvente, lo scaffold viene trattato termicamente per sinterizzare la fase inorganica[133][123].





Il vantaggio principale di questa tecnica risiede nel poter controllare il processo di raffreddamento in modo da realizzare una microstruttura porosa orientata che conferisce allo scaffold migliori prestazioni meccaniche, in termini di resistenza alla compressione, lungo la direzione di formazione dei cristalli. È possibile anche controllare il grado di porosità regolando la concentrazione della soluzione: a maggior concentrazione corrisponde un minor grado di porosità[123][133].

Inoltre, diversi studi hanno dimostrato che la microstruttura orientata così ottenuta, favorisce una miglior interazione con le cellule dei tessuti, incentivandone la proliferazione ed il differenziamento[110].

Metodi termici

Rientrano nelle strategie convenzionali per la fabbricazione di scaffolds porosi anche metodi basati sull'utilizzo della temperatura per indurre separazione di fase o il consolidamento delle particelle coinvolte.

Il primo approccio, denominato TIPS (*"termperature induces phase separation"*), viene utilizzato principalmente per la produzione di scaffold polimerici ma è efficace anche nel realizzare scaffolds compositi (vetro-polimerici). Si basa sul principio fisico secondo cui la temperatura è in grado di far variare la solubilità tra due polimeri differenti. Infatti, due polimeri possono essere completamente solubili a temperature elevate e, al contrario, essere totalmente insolubili per basse temperature. Per questo motivo, partendo da una soluzione omogena di due polimeri, abbassando la temperatura si entra in una zona chiamata lacuna di miscibilità, in cui si formano due fasi distinte: una ricca di polimero ed una povera di polimero. La prima costituirà la struttura massiva dello scaffold mentre la fase povera di polimero verrà rimossa tramite lavaggio, in modo da ottenere una struttura con porosità interconnessa. Inoltre, controllando opportunamente il gradiente di raffreddamento, è possibile orientare la porosità ottenendo strutture anisotrope, tipiche dei tessuti molli[133][123].

I metodi basati sul consolidamento termico invece, includono tutti quei processi che richiedono l'utilizzo di modelli o particelle polimeriche sacrificali che subiscono trattamenti di sinterizzazione. Con queste tecniche è possibile ottenere materiali in vetro bioattivo o bioceramici con forme complesse ed è possibile controllare il grado di porosità variando opportunamente i parametri del processo. Tuttavia, è difficile spingersi verso livelli di porosità superiori al 70% in volume cosi come è difficile ottenere strutture con un' architettura porosa altamente interconnessa[123].

2.5.2 Tecniche di additive manufacturing

L'introduzione delle tecniche di "additive manufacturing" (AMT) o "prototipazione rapida" (RP), ha rivoluzionato il settore industriale della fabbricazione dei materiali. Questa classe di processi, basata sul concetto di lavorazione strato per strato, consente di realizzare scaffolds con architettura riproducibile e controllabile in termini di porosità e morfologia, superando i limiti associati dalle tecniche convenzionali[133]. Per poter operare con queste tecnologie è necessaria una ricostruzione virtuale, precisa ed accurata, del tessuto/organo da sostituire, che può essere ricavata da immagini cliniche di tomografia computerizzata (CT), risonanza magnetica (MRI) o direttamente tramite software di ricostruzione CAD. In generale, il processo produttivo standardizzato segue quattro step fondamentali:

- i. Produzione di un modello personalizzato del difetto del paziente tramite software CAD o partendo da immagini cliniche successivamente elaborate;
- ii. Segmentazione del modello tridimensionale in "fette" bidimensionali;
- iii. Implementazione dei dati ottenuti;
- iv. Realizzazione fisica del modello tramite lavorazione strato per strato[134].

Le tecniche di AMT, inoltre, consentono anche di processare più materiali contemporaneamente, spaziando dai metalli ai ceramici inerti o bioattivi (vetri) fino alle cellule, e di realizzare strutture con un alto grado di interconnessione dei pori facilitando lo scambio di nutrienti e la formazione di una rete vascolare nello scaffold, utile per applicazione ortopediche o odontoiatriche[123].

A seconda che lo scaffold necessiti o meno di un trattamento termico supplementare, ai fini della realizzazione finale, si parla di metodi di AMT diretti o indiretti. Il vantaggio principale della prima sottoclasse di metodi è legato al fatto che le particelle ceramiche vengono fuse direttamente durante lo stampaggio del materiale senza la necessità di effettuare post-trattamenti, al contrario dei metodi indiretti in cui quest'ultimo passaggio è sempre necessario. Alcuni esempi di tecniche AMT sono: *Stereolitografia, Selective Laser Sintering* e *3D printing*[123][135].

Stereolitografia (SLA)

La stereolitografia è un tipo di tecnologia di RP in cui il prodotto finale viene realizzato per deposizione di strati sottili consecutivi, attraverso lo sfruttamento di processi fotochimici (**Figura 2.12**[133]). Consente di processare una grande varietà di materiali differenti come polimeri, ceramici/vetri o idrogeli, ricorrendo all'azione delle radiazioni ultraviolette (UV), che irradiano il substrato inducendone la reticolazione e la polimerizzazione. Il materiale di partenza, necessariamente fotopolimerizzabile, insieme a piccole quantità di fotoiniziatore necessario per l'inizializzazione delle reazioni radicaliche, viene posizionato su una piattaforma mobile e colpito selettivamente dalla radiazione UV controllata da remoto[123][133].



Figura 2.12: Schematizzazione del processo della Stereolitografia[133]

Le regioni investite dalla sorgente laser reticolano diventando solide, al contrario, le altre restano in forma liquida e verranno rimosse tramite lavaggio. Il laser è in grado di spostarsi per tutto il piano x,y mentre la piattaforma può muoversi solo lungo l'asse z: ad ogni deposizione-reticolazione di uno strato, la piattaforma si abbassa per permettere la deposizione di nuovo materiale e ricominciare il processo fino alla realizzazione della struttura desiderata. La radiazione UV irradia tutto il nuovo strato innescando una reazione di polimerizzazione che penetra fino all'interfaccia con lo strato precedente in modo da determinare una forte connessione e fornire stabilità meccanica all'intera struttura[133].

La stereolitografia, grazie alle sue caratteristiche, è in grado di stampare direttamente strutture ceramiche (vetri) 3D delicate e dalle geometrie complesse per applicazioni biomediche e componenti dentali. Un esempio di scaffold ceramici prodotti tramite SLA è riportato nella **Tabella 2.5**[135].

Materiali	Caratteristiche principali	Applicazioni
B-TCP	Buona biocompatibilità, bio- adsorbimento, scarse deformazioni, porosità e ritiro volumico ridotti	Riparazione dei tessuti duri
Fosfato di calcio	Biocompatibilità e proprietà osteoconduttive	Rigenerazione ossea intra- orale
Reticoli ceramici, SiC	Eccellente resistenza, buone proprietà compressive, comportamento a frattura, caratteristiche microscopiche	Ceramiche strutturali leggere
Fosfato tricalcico	Elevata resistenza meccanica, buona resistenza a compressione, poroso	Applicazioni di ingegneria tissutale, riparazione e rigenerazione di tessuto osseo

Tabella 2.5 : Esempio di scaffold realizzati tramite SLA per applicazioni mediche[135]

Selective laser Sintering (SLS)

Tra le tecnologie di additive manifacturing per implementazione diretta, la SLS è l'unica ad utilizzare un fascio laser ad alta energia pulsata o continua, (ad esempio laser al CO₂) in grado di svolgere la duplice funzione di scansione e sinterizzazione delle polveri. Proprio per questo motivo, i dispositivi per SLS sono costituiti da due camere principali: inizialmente le polveri vengono posizionate in una camera, dove viene acquisito un modello CAD e successivamente vengono traferite nella camera adiacente dove subiscono il processo di sinterizzazione (**Figura 2.13**)[123].

Il principio fisico su cui si basa questa tecnologia è l'absorbimento ottico; di conseguenza, è necessario che i materiali impiegati nel processo siano in grado di assorbire la luce nell'intorno della lunghezza d'onda della radiazione laser adottata come sorgente. Esistono tre metodi di lavoro

differenti attraverso cui la SLS può legare assieme le particelle: sinterizzazione allo stato solido ("*solid-state sintering*"), sinterizzazione assistita della fase liquida ("*liquid phase assisted sintering*") e fusione completa ("*full melting*"). Nella sinterizzazione allo stato solido le polveri si uniscono tra loro per effetto di trattamenti termici nell'intorno della temperatura di fusione del materiale, il secondo metodo viene utilizzato principalmente per quei materiali che presentano difficoltà nella sinterizzazione, mentre si predilige l'ultima classe di metodi per materiali bassofondenti, come metalli o leghe, ottenendo elevate densità dei prodotti[135][123].



Figura 2.13: Schema qualitativo del processo di fabbricazione tramite SLS[123]

Uno dei parametri critici di questa tecnica è la distanza di "hatching", ovvero la distanza tra due linee di scansione adiacenti, in quanto condiziona sensibilmente la risoluzione. Infatti, se questa distanza fosse troppo stretta si potrebbe andare in contro alla sovrapposizione delle due linee, con conseguente diminuzione della porosità ed interconnettività della struttura dello scaffold[123].Tra i materiali che possono essere processati tramite SLS per la fabbricazione di scaffold porosi, si annoverano anche i vetri bioattivi. Un esempio è lo scaffold a base di 45S5 Bioglass[®] prodotto dal gruppo di ricerca di J. Liu che, tramite l'ottimizzazione dell'energia della sorgente laser, è riuscito ad ottenere valori di tenacità e durezza confrontabili con quelli dell'osso trabecolare e quindi, di possibile applicazione nel campo della medicina rigenerativa[136].

3D Printing

Il 3D Printing è una delle tecniche di RP più utilizzate per la produzione di scaffold porosi per applicazioni nel settore medico, oltre che industriale. Si basa sul principio fondamentale della stampa ad inchiostro, che può avvenire per filamento continuo (CIJ) o a singola goccia (DOD) su un letto di particelle ceramiche in forma di polveri, posizionate su una piattaforma mobile. Generalmente, per ottimizzare il processo, vengono scelte polveri sferiche di piccole dimensioni (20-40µm) essendo predisposte ad un miglior consolidamento fisico, a differenza delle particelle con geometrie irregolari, e a non favorire la formazione di vuoti che influiscono negativamente sulle prestazioni meccaniche dello scaffold. È possibile processare una vasta gamma di polveri tra cui polveri di HA, calcio fosfati o vetri bioattivi per la fabbricazione di scaffold bioattivi[123].

L'elemento fondamentale per questa tecnologia è l'inchiostro, ovvero un legante generalmente a base acquosa ma anche di origine organica, che viene depositato sullo strato di polveri provocandone la presa. In seguito alla deposizione del legante, le polveri vengono fatte asciugare e consolidare per effetto termico, per poi ripetere ciclicamente la procedura fino al completamento della struttura. Successivamente, una volta terminata la fabbricazione, si procede col rimuovere le polveri in eccesso per evitare che si generino tensioni interne allo scaffold e si procede con un ultimo trattamento termico per sinterizzare le polveri ceramiche (vetrose)[123], [133], [135].

2.6 Coating

I rivestimenti superficiali ("coating") sono tra i metodi più diffusi e largamente utilizzati per migliorare le proprietà superficiali di biocompatibilità e bioattività dei biomateriali. In particolare, i vetri/vetroceramici bioattivi sono altamente biocompatibili e presentano un'elevata predisposizione ad integrarsi con i tessuti viventi rendendoli un'opzione ottimale come rivestimento per impianti metallici o leghe, accoppiando in questo modo resistenza meccanica a compatibilità biologica. I metodi con cui produrre i rivestimenti permettono infatti di poter sfruttare al meglio i benefici prodotti dalla biocompatibilità dei metalli e dalla bioattività dei vetri. I vetri bioattivi infatti, migliorano sensibilmente l'adesione e l'integrazione tra l'impianto ed il tessuto circostante, incrementandone perciò le prospettive "vita" all'interno dell'organismo ospite. Contemporaneamente, il coating protegge il materiale dall'usura, dalla corrosione e dalla degradazione provocata nel tempo dall'ambiente fisiologico[137].

Tra le principali tecniche di coating a base di vetri bioattivi per applicazioni ortopediche ed odontoiatriche, si annoverano i metodi sol-gel, deposizione elettroforetica (EPD), smaltatura ("enameling"), spruzzatura termica e laser cladding (**Tabella 2.6**[137]).

Metodi	Vantaggi	Svantaggi
Smaltatura	semplice, economico, versatile, possibilità di produrre spessori di dimensione variabile	gradiente composizionale, cristallizzazione del vetro, formazione di prodotti chimici, stress termici residui

Deposizione elettroforetica	rivestimenti di geometria complessa, economico, semplicità di controllo degli spessori	applicabile solo a substrati conduttivi
Pulsed laser deposition	elevata accuratezza, rivestimenti sottili anche a basse temperature	necessità di pretrattamenti
Spruzzatura termica	ampio range di rivestimenti, scarsa probabilità di compromettere la bioattività del vetro	bassa adesione tra vetro e substrato

La *smaltatura* è una tecnica convenzionale che permette di rivestire substrati metallici con sottili strati di vetri bioattivi in maniera semplice ed economica. Si basa su un semplice trattamento termico, generalmente compreso tra 750 ed 850°C, partendo da polveri vetrose che vengono fuse e raffreddate bruscamente in acqua formando delle fritte. Queste, vengono successivamente macinate e depositate sulla superficie del substrato metallico interagendo con esso fino a formare uno strato continuo vetroso. Inoltre, controllando la composizione del vetro ed i parametri del processo (tempo di cottura, temperatura ed atmosfera) è possibile depositare uno strato vetroso che abbia buona aderenza, bioattività e coefficiente di espansione termica prossimo a quello del materiale metallico[137]–[139].

Per quanto riguarda la *deposizione elettroforetica*, si tratta di una tecnologia elettrochimica che permette di produrre una gran varietà di coating a base di materiali differenti (ceramici polimerici, composito, particelle di vetro bioattivo) per innumerevoli applicazioni mediche. È costituita tipicamente da due celle elettrolitiche: applicando una corrente continua all'interno di una camera riempita con un apposito elettrolita, le particelle cariche in sospensione si spostano verso l'elettrodo di carica opposta, acculandosi e depositandosi sulla sua superficie fino a formare un film omogeneo e compatto. Si tratta di un processo relativamente semplice che consente di realizzare rivestimenti a base di vetri bioattivi su strutture aventi geometrie complesse, superfici elevate e spessore variabile, da valori inferiori ad 1 μ m fino a spessori superiori a 500 μ m. Inoltre, i benefici offerti dal processo di EPD includono anche un elevato grado di purezza, tempi brevi di deposizione e la possibilità di ottenere coating porosi, senza la necessità di ricorrere a temperature elevate che potrebbero danneggiare il substrato metallico o i coating, qualora presentasse una fase organica[139][140].

Un'ulteriore strategia che consente di rivestire substrati metallici con polveri vetrose, è rappresentata dalle tecniche di *spruzzatura termica* o *spruzzatura al plasma*. Questa particolare famiglia di metodi, sfrutta l'impiego di plasma ad alta temperatura (fino a 30.000K) per sciogliere particelle di vetro in gocce di dimensioni ridotte che vengono spruzzate ad alta velocita sul supporto metallico, solidificando rapidamente. Numerosi studi hanno dimostrato che rispetto alla smaltatura, i coating a base di vetro bioattivo su substrati metallici rivestiti tramite spruzzatura termica, manifestano maggiore resistenza meccanica superficiale ed un'adesione ottimale. Inoltre, sono state evidenziate migliori proprietà di bioattività, sia *in vitro* che *in vivo*, e superiore stabilità a lungo termine, che rendono questa tecnica generalmente accettata per applicazioni ortopediche e dentali[139][137].

La "*pulsed laser deposition*" (PLD) è una tecnica di deposizione ad alta risoluzione, utilizzata principalmente quando i metodi convenzionali falliscono, che consente di ottenere rivestimenti sottili anche a basse temperature. Nella PLD il materiale bersaglio viene vaporizzato da un fascio laser (ad esempio Nd:YAG) ad alta energia all'interno di una camera in cui viene praticato il vuoto spinto, generando un plasma che si deposita sotto forma di film sottile sul substrato di interesse, conservando la sua stechiometria originale. Manipolando la dinamica di espansione del plasma, inoltre, è possibile controllare la deposizione dei film, da compatti ad estremamente porosi[141].Questa tecnica permette

di rivestire substrati metallici, come le leghe di Ti tipiche degli impianti dentali, con coating bioattivi multistrato, garantendo un'elevata adesione ed evitando ogni forma di contaminazione[142][139].

2.7 Compositi

Nonostante godano di eccellenti proprietà di bioattività, i vetri bioattivi presentano l'inconveniente di possedere scarse proprietà meccaniche legate, principalmente, alla loro rigidezza, limitandone l'impiego ad applicazioni che non prevedono situazioni di carico eccessivo. A tal proposito, lo sviluppo di materiali compositi risulta particolarmente vantaggioso in quanto consente di combinare le proprietà chimico-fisiche di due tipi di fasi differenti al fine di creare un sistema con proprietà superiori rispetto ai costituenti di partenza e, quindi, in grado di soddisfare al meglio le esigenze meccaniche e fisiologiche del tessuto ospitante. Compositi a matrice polimerica possono essere progettati in modo da combinare le proprietà meccaniche dei vetri bioattivi, dei ceramici o dei vetroceramici con la flessibilità dei polimeri, al fine di mimare la biologia dell'osso, anch'esso composito, costituito principalmente da minerali (HA) e piccole percentuali di fase organica (filamenti di collagene) che donano elasticità all'intera struttura[66].

Per conferire il carattere bioattivo alle matrici polimeriche, in genere, vengono effettuati coating o inclusioni con particelle di vetro all'interno della matrice stessa; le dimensioni, la forma e la frazione di volume occupata dall'inclusione sono i parametri fondamentali per il controllo del livello di bioattività del composito. Idealmente, secondo le formulazioni dei modelli matematici che studiano il comportamento meccanico dei materiali compositi, la forma delle particelle di rinforzo dovrebbe essere di geometrica sferica. In realtà, i rinforzi presentano quasi sempre geometri irregolari o acircolari, che sono da preferirsi alle forme sferiche poiché in questo modo il polimero fuso è in grado di penetrare meglio all'interno delle irregolarità offerte dalle particelle in fase di processazione, conferendo maggiore stabilità meccanica alla struttura[143]. Inoltre, tramite inclusione, è possibile modificare anche le caratteristiche superficiali e strutturali degli scaffolds aumentando l'idrofilicità del polimero, con conseguente alterazione della cinetica di degradazione[144]. In particolare, è stato dimostrato che l'introduzione di particelle di 45S5 Bioglass[®] all'interno di scaffold a base di PDLLA e PLGA[144].

Esistono numerose tecniche di fabbricazione che permettono di ottenere scaffolds compositi tridimensionali con un elevato grado di interconnessione dei pori, per applicazioni biomediche ed in particolare dentali. Queste strategie includono i metodi di TIPS (vedi sezione 2.5.1 metodi convezionali), solvent casting/particle leaching, sinterizzazione di microsfere, additive manufacturing e coating[144].

Il processo di *solvent casting* per scaffold biocompositi coinvolge la dissoluzione di componenti polimerici all'interno di solventi organici con l'aggiunta di polveri ceramiche/vetrose in un sistema in agitazione, la soluzione così ottenuta viene poi versata all'interno di stampi tridimensionali predefiniti. Il solvente verrà in seguito allontanato per effetto dell'evaporazione. Si tratta di una tecnologia di fabbricazione di facile implementazione, economica e che non richiede l'utilizzo di strumentazioni specifiche. Tuttavia, presenta delle limitazioni intrinseche riguardo le possibili geometrie ottenibili (tipicamente forme planari o tubulari), oltre che all'eventuale ritenzione di solventi tossici all'interno della matrice polimerica a causa di una evaporazione incompleta. Inoltre,

qualora venissero utilizzati polimeri organici, potrebbe esserci il rischio di una loro denaturazione provocata dai solventi organici[144]. I costrutti polimero-ceramici bioattivi possono essere fabbricati anche attraverso la combinazione dei metodi di solvent casting, particle leaching ed impacchettamento delle microsfere. Inizialmente si formano delle microsfere polimeriche mediante emulsione tradizionale acqua olio/acqua che verranno in seguito mescolate insieme ad un solvente, elementi porogeni (es. sale) e polveri di vetro bioattivo. In questo modo è possibile realizzare strutture tridimensionali bioattive con porosità controllata. Anche questo caso si manifestano inconvenienti legati all'interconnettività. Ciononostante, diversi compositi a base di calcio-fosfati sono stati prodotti attraverso questa metodologia[145].

È possibile inoltre produrre scaffold compositi anche senza l'utilizzo di fasi porogene sacrificali da aggiungere nella soluzione contenete le particelle vetrose o ceramiche. Con questo tipo di procedura, la porosità può essere controllata soltanto variando la dimensione delle polveri coinvolte ed il processo di sinterizzazione. Infatti, per far in modo che si formino porosità nell'architettura dello scaffold, la sinterizzazione viene bloccata non appena vengono a crearsi tra le particelle un numero di colli di sinterizzazione abbastanza elevato da conferire le giuste proprietà meccaniche e la porosità voluta[123]. In questo approccio, denominato sinterizzazione di microsfere, si parte dalla sintesi di microsfere composite a base di matrici polimeriche e vetri bioattivi o inclusioni ceramiche, tramite tecniche di emulsione/evaporazione del solvente o spruzzatura di soluzioni polimeriche seguite da NIPS (*"non-solvent induced phase separation"*). Una volta che le microsfere sono state sintetizzate, si procede con la sinterizzazione all'interno di stampi tridimensionali, senza l'applicazione di pressione esterne, ottenendo scaffolds compositi porosi[144][145]. Attraverso questa tecnica sono state prodotti da Lu *et al* scaffolds 3D biodegradabili e bioattivi ottenuti dalla combinazione di PLAGA e Bioglass[®], ottenendo diametri delle cavita porose di 90 µm e proprietà meccaniche confrontabili con quelle dell'osso spongioso/[146].

Le tecniche di additive manufacturing descritte precedentemente (vedi sezione 2.5.2), oltre che per la produzione di scaffold vetrosi possono essere impiegate anche per la fabbricazione di scaffold compositi. A tal proposito, il processo di "fused deposition modeling", è stato adottato per la realizzazione di sistemi compositi aventi un network poroso ed altamente interconnesso, per applicazioni in ambito biomedicale. Si tratta una tecnologia bottom up in cui precursori polimerici (es. PLA,PLLA) e calcio-fosfati (es, HA, TCP) in polvere vengono fusi ed estrusi tramite un ugello riscaldato, sottoforma di filamenti continui, su una piattaforma mobile che si abbassa ogni qual volta sia terminata la deposizione di uno strato di materiale, ripetendo la procedura fino al completamento della struttura 3D[135][144].

Un ulteriore approccio che consente di combinare le caratteristiche di biodegradabilità ed elasticità dei polimeri con quelle dei vetri bioattivi o dei materiali ceramici, consiste nel rivestire scaffold porosi prodotti, ad esempio, sottoforma di schiuma o corpi fibrosi tramite immersione in sospensioni di particelle vetrose o elettrodeposizione elettroforetica. Così facendo, vengono evitati step di sinterizzazione e trattamenti termici, in modo da preservare la fase organica del prodotto finale[123]. Un esempio di scaffold realizzati secondo questo procedimento è stato descritto da Roether et al. il quale si è servito di schiume di PDLLA immerse all'interno di una sospensione con particelle di 4585 di dimensioni inferiori a 5 μ m. In questo modo, è stato ottenuto un rivestimento stabile, aderente ed omogeneo sulla superfice del polimero[147].

Capitolo 3

Vetri e Vetroceramici Bioattivi in Odontoiatria e Medicina dentale

La trattazione di questo capitolo è incentrata sul ruolo dei vetri e vetroceramici bioattivi nell'ambito dell'odontoiatria rigenerativa. Numerosi studi hanno evidenziato che l'incidenza delle patologie che affliggono il cavo orale, come ad esempio la progressiva distruzione dell'osso alveolare causata da processi infiammatori cronici, è in continua crescita e per questo è di fondamentale importanza l'introduzione di materiali innovativi in grado di ripristinare le normali funzionalità dei tessuti danneggiati. Dopo una breve panoramica sui requisiti e sui potenziali benefici che questi materiali possono apportare in clinica dentale rispetto alle pratiche tradizionali, sono state descritte le principali applicazioni in cui trovano impiego. Partendo dalla trattazione dell'ipersensibilità dentinale e di come i vetri bioattivi siano in grado di offrire giovamento nell'alleviare i sintomi dei pazienti, si è passati alla descrizione dei coating per differenti tipologie di impianti dentali, di scaffold per la rigenerazione e la guarigione di difetti ossei (in particolare in ambito dentale per difetti dell'osso alveolare), dei cementi vetroionomerici bioattivi e di sistemi idonei per ingegnerizzare opportunamente i tessuti duri del cavo orale.

3.1 Vetri e vetroceramici bioattivi in odontoiatria

L'obiettivo principale dell'odontoiatria rigenerativa è quello di ripristinare i tessuti danneggiati che supportano meccanicamente e biologicamente il dente. Tra le cause più comuni che conducono alla perdita di uno o più denti, si registrano traumi o malattie dei tessuti periodontali che includono periodontiti, peri-implatite, gengiviti e patologie legate all'avanzare dell'età. Le strategie che si occupano della guarigione di questi disturbi si basano essenzialmente sulla formazione di nuovo osso alveolare e tessuti connettivi (che costituiscono il cemento e il legamento periodontale). Sia il tessuto osseo che quello connettivo rappresentano degli elementi fondamentali per la sopravvivenza dei denti, garantendone ancoraggio e stabilità[148].

Considerando gli interventi destinati alla sostituzione di denti mancanti o gravemente compromessi, il gold standard è rappresentato dall'inserimento di impianti in titanio, con percentuali di riuscita dell'intervento che si aggirano intorno al 98%. Tuttavia, questa metodologia è comunque affetta da diverse limitazioni, prima fra tutte, la necessità di rispettare determinate condizioni in termini di qualità e quantità di osso alveolare del paziente, essenziali per una corretta riuscita dell'intervento in quanto esso rappresenta il sito di ancoraggio per l'impianto. Proprio per questo motivo, poiché un numero elevato di pazienti non presenta quantità sufficienti di tessuto osseo per l'inserimento dell'impianto, le strategie per la rigenerazione dei tessuti duri sono di cruciale importanza nel settore della chirurgia dentale[148].

Le tecniche convenzionali per il trattamento delle patologie che comportano la necessità di interventi di sostituzione dentale prevedono la rimozione chirurgica dei microrganismi patogeni, dei depositi di minerali che si accumulano sulla superfice della radice dentale e l'estrazione del cemento infetto o

dei tessuti necrotici. Sebbene siano efficaci, queste procedure comportano, nell'immediato postoperatorio, l'esposizione della radice nell'ambiente del cavo orale che risulta particolarmente ostile in quanto popolato da un elevato numero di batterie e patogeni. Infatti, la superficie della radice si mostra come un substrato particolarmente adatto per l'adesione batterica e per la formazione di biofilm, con conseguente aumento della risposta infiammatoria. Ciò può provocare l'erosione dei tessuti periodontali come conseguenza di un eccessivo reclutamento di macrofagi ed altre cellule del sistema immunitario. Terapie antibiotiche a base di acido citrico o tetraciclina, promuovono la riparazione dei tessuti danneggiati, senza però incentivarne la rigenerazione[148][149].

Negli ultimi anni, la necessità di superare queste problematiche, ha spostato l'attenzione verso lo sviluppo di biomateriali innovativi in possesso di proprietà di osteoconduttività/osteoinduttività, caratteristiche meccaniche approssimabili a quelle dell'osso alveolare e possibilità di essere modellati su misura in base alle dimensioni del difetto del paziente. Questa famiglia di materiali, i bioceramici, include i fosfati di calcio, i solfati di calcio ed in particolare i vetri e vetroceramici bioattivi. Spesso si ricorre anche a combinazioni tra vetri e fasi polimeriche al fine di ottenere proprietà meccaniche migliorate, adesione cellulare più stabile, proprietà superiori di osteoconduttività e tasso di degradazione controllabile per la realizzazione di scaffolds tridimensionali [148].

Il successo dei vetri e vetroceramici bioattivi in odontoiatria, richiede caratteristiche altamente specifiche da rispettare tra cui durabilità nell'ambiente del cavo orale, un'elevata resistenza alla corrosione ed alla pressione masticatoria, oltre che ad una struttura il più simile possibile a quella dei denti naturali[67].

Principalmente i vetri destinati ad applicazioni nel settore della medicina dentale possono essere suddivisi in due macrocategorie: per restauro e bioattivi. La maggior parte dei vetri e vetroceramici per restauro dentale, sono materiali inerti e biocompatibili che trovano impiego nella ricostruzione e nel restauro di denti danneggiati. Dall'altre parte i vetri bioattivi manifestano abilità nel formare legami con l'osso e stimolare reazioni biologiche positive all'interfaccia tra tessuto e materiale. Quest'ultima categoria è preferita per il trattamento dell'ipersensibilità dentinale, per la realizzazione di rivestimenti per impianti endossei, per stimolare la rigenerazione dell'osso alveolare e nelle terapie periodontali[34] (**Figura 3.1** [150]).

Come riempitivi, i vetri bioattivi promuovono la remineralizzazione del dente e prevengono la formazione di carie secondarie attraverso il rilascio di ioni calcio e fosfato dal loro network, inibendo la colonizzazione batterica sul materiale ed al tempo stesso favorendo una più salda adesione all'interfaccia dente/materiale[151].

Inoltre, la ricerca in questo settore, si sta muovendo anche verso l'investigazione e lo sviluppo di composizioni di vetri che siano in grado di combinare proprietà di bioattività alla possibilità di inglobare farmaci anti-osteoporotici capaci di accelerare i processi di formazione dell'HA in modo da pervenire ad una guarigione più veloce e meno dolorosa per il paziente[67].



Figura 3.1: Rappresentazione dei differenti aspetti per cui i vetri/vetroceramici bioattivi possono essere sfruttati con l'obiettivo di indurre attività biologiche specifiche nel settore medico ed odontoiatrico[150]

REQUISITI PER APPLICAZIONI DENTALI

Nell'ambito dei sistemi odontostomatologici, le parti del cavo orale che possono essere riparate e sostituite tramite l'adozione di vetri e vetroceramici bioattivi sono numerose. Questi materiali, infatti, sono adatti per la realizzazione di corone artificiali, ponti, perni, abutments oppure per effettuare restauri di tipo indiretto in alternativa a quelli con amalgame o resine composite, oltre che per applicazioni di tipo rigenerativo. Tuttavia, è necessario che siano in possesso di determinate caratteristiche in modo da poter garantire prestazioni accettabili in termini di bioattività e sicurezza per la salute del paziente[67].

Di seguito sono elencati i requisiti essenziali per vetri e vetroceramici bioattivi impiegati in ambito dentale:

- Biocompatibilità: è un requisito indispensabile. Devono essere assolutamente non tossici per l'organismo né produrre residui nocivi per le cellule in seguito alla loro degradazione, favorendo contemporaneamente adesione e proliferazione cellulare;
- Non devono esibire risposte infiammatorie eccessive, citotossicità o immunogenicità;
- Proprietà di traslucenza, opalescenza e fluorescenza confrontabili con quelle del dente naturale al fine di garantire un'ottima estetica dentale;
- Stabilità chimica a lungo termine ed elevata resistenza alla corrosione;

- Eccellente tenacità e resistenza a flessione in grado sopportare le sollecitazioni prodotte dai muscoli masticatori;
- In contatto con SBF si deve osservare la formazione di uno strato di idrossiapatite (HA) sulla superficie del materiale per attestarne il carattere bioattivo: questa è una proprietà essenziale se lo scopo principale è la rigenerazione dell'osso alveolare, ma può essere desiderata anche in altri contesti (ad esempio trattamento dell'ipersensibilità dentinale);
- Eccellente stabilità termica[67] [35].

Inoltre, per la realizzazione di scaffolds macroporosi, la maggior parte dei vetri bioattivi deve essere sottoposta a trattamenti termici che possono innescare fenomeni di nucleazione ed accrescimento di fasi cristalline incorporate nella matrice amorfa del vetro. Il verificarsi di questo fenomeno non deve in alcun modo alterare le proprietà di bioattività del materiale né dar luogo a reazioni citotossiche[35].

3.2 Ipersensibilità dentinale

L'ipersensibilità dentinale (dental hypersensitivity, DH) è una condizione del cavo orale di origine multifattoriale molto frequente nella popolazione, che può svilupparsi nel corso del tempo a causa di infiammazioni o scorretta igiene dentale. Tipicamente, comporta disturbi molto comuni come la recessione gengivale o l'erosione dello smalto che possono provocare l'esposizione della dentina e dei tubuli dentinali (**Figura 3.2** [152]). Con il "denudamento" di questi tessuti, migliaia di fibre nervose contenute all'interno di microcanali che scorrono attraverso la dentina, possono risentire degli stimoli esterni (termici, osmotici meccanici) dando origine ad un dolore acuto, intermittente e di breve durata. Questo meccanismo di trasmissione del dolore è fondato su fenomeni idrodinamici. Infatti, i fluidi organici presenti all'interno dei tubuli, in seguito a variazioni di flusso, generano pressioni sui meccano-recettori dei nervi pulpari provocando dolore[153], [154].



Figura 3.2: Rappresentazione qualitativa dell'esposizione dentinale[152]

Sulla base di queste considerazioni, le terapie dentali proposte per il trattamento dell'ipersensibilità dentinale hanno come obiettivo principale la desensibilizzazione dei nervi pulpari in riposta al dolore e l'interruzione dei meccanismi stimolatori attraverso l'occlusione dei tubuli dentinali esposti[153]. I prodotti maggiormente utilizzati per contrastare questa patologia comprendono prodotti da banco come gel o dentifrici desensibilizzanti, agenti di adesione dentinale (DBA), cementi vetroionomerici (GIC) e vetri/vetroceramici bioattivi[155]. In particolare, tra le varie classi di materiali elencati, i vetri/vetroceramici bioattivi, grazie a caratteristiche composizionali molto simili a quelle dei tessuti mineralizzati e alla capacità di indurre la formazione di fosfati di calcio quando immersi in fluidi biologici, rappresentano una soluzione efficiente per la rigenerazione di smalto e dentina. In aggiunta, questi materiali esibiscono spiccate proprietà antibatteriche *in vitro* con possibili effetti benefici nell'attenuazione dei sintomi dell'ipersensibilità dentinale, attraverso l'inibizione della risposta pulpare contro i batteri[156].

Il primo esempio di vetro bioattivo utilizzato per il trattamento dell'DH è conosciuto con il nome commerciale NovaMin[®]. Si tratta di un dentifricio contenente polveri finissime di 45S5 Bioglass[®] (approssimativamente 18µm) che, a differenza delle paste dentali che inglobano prodotti chimici capaci di anestetizzare solo temporaneamente le terminazioni nervose della polpa che causano il dolore, è in grado di agire direttamente sulla dentina. Studi clinici hanno riportato che queste nanoparticelle possono occludere fisicamente i tubuli dentinali (circa 1µm in diametro), portando ad una più veloce remineralizzazione della dentina rispetto ai prodotti da banco che impiegano dalle 2 alle 4 settimane ed alleviando il dolore per lunghi periodi[34][150].

Questo fenomeno è legato alle caratteristiche tessiturali delle particelle che, esibendo una maggiore area superficiale, favoriscono un rilascio ioni più efficiente[157]. NovaMin, inoltre, ha mostrato effetti benefici anche nell'ambito delle procedure di sbiancamento dentale rispetto alle metodologie tradizionali a base di pasta abrasiva ed aria compressa, con una riduzione della sensibilità dentinale di circa il 44% [158].

I Biosilicati (BS), vetroceramici appartenenti al sistema P₂O₅–Na₂O–CaO–SiO₂, sono stati proposti per il trattamento dell'ipersensibilità dentinale, essendo in grado di depositare *in situ* uno strato di HCA su tubuli esposti fino ad occluderli in maniera permanente (**Figura 3.3**[159]).



Figura 3.3: Immagini SEM di dischi di dentina su cui sono stati depositati gel di BS, rispettivamente dopo 1h (D), 12h (H), 24h (L). Si noti come dopo appena 24h si sia depositato uno strato di HCA in grado di occludere i tubuli esposti [159]

Ciò è dovuto alla principale fase cristallina (Na₂CaSi₂O₆) di cui sono composti, ricca di ioni calcio e sodio che vengono rilasciati sulla superfice del dente mantenendo concentrazioni alcaline di pH, ideali per la corretta formazione dello strato di HCA. Inoltre, l'applicazione dei BS in seguito a trattamenti di sbiancamento permette di aumentare la microdurezza dello smalto in modo da ridurre significativamente la demineralizzazione delle strutture dentali e minimizzarne la sensibilità[160]. In aggiunta, i BS sono capaci di combinare un elevato livello di bioattività (I_B >8) a buone caratteristiche di resistenza meccanica (Modulo di Young 60-80 GPa) e tenacità (1.0 MPa*m^{1/2}). Queste peculiarità li rendono ottimi candidati anche per applicazioni di rigenerazione dell'osso alveolare[117]. Un' altro vantaggio di questi materiali risiede nella struttura altamente cristallizzata che non presenta superfici di taglio affilate[34].

Altri studi hanno mostrato come l'inclusione di fluoro all'interno della struttura dei vetri bioattivi promuova lo sviluppo di fluorapatite, chimicamente più stabile dell'HA o dell'HCA. A tal proposito, Lins *et al* [161]hanno evidenziato che i sistemi basati sull'utilizzo di nanoparticelle di vetro bioattivo contenenti cristalli di fluoroapatite all'interno di matrici vetrose presentino elevata area superficiale e volume dei pori, con potenziali benefici per il trattamento dell'DH[157].

Si sono dimostrate promettenti per il trattamento dell'ipersensibilità dentinale anche polveri di vetro bioattivo ottenute tramite processi sol-gel. Esperimenti hanno dimostrato che dopo 24h dall'utilizzo di dentifrici contenenti tali polveri e dopo lavaggi con bevande acide, i tubuli mantengono una conformazione chiusa[109].

3.3 Coating

Studi clinici hanno evidenziato che circa l'1% - 2% dei pazienti sottoposti ad interventi chirurgici per l'inserimento di impianti dentali, manifestano processi di osteointegrazione inadeguati all'interfaccia osso/materiale che ne causano il fallimento entro il primo mese. Un'ulteriore 5% invece, va incontro a fallimenti tardivi legati all'insorgenza di peri-implatiti, dopo diversi anni dal successo dell'osteointegrazione[162]. Questo processo può essere inibito anche a causa di patologie preesistenti come diabete mellito, osteoporosi ed in quei pazienti sottoposti a cure a base di bifosfonati o che hanno subito trattamenti di radioterapia. Inoltre, è risaputo che gli impianti in lega di Ti o zirconia (ZrO₂) sono biologicamente inerti e quindi incapaci di legarsi con il tessuto osseo per effetto di interazioni chimiche, ma semplicemente per fissazione morfologica[34]. Le complicazioni associate all'assunzione di farmaci ed alle terapie antimicrobiche per prevenire infezioni batteriche, in seguito all'inserimento di impianti, sono ancora oggi un problema frequente. La crescita di patogeni e la formazione del biofilm sui substrati metallici possono causare danni ai tessuti circostanti e, nei casi più gravi, il fallimento dell'impianto provocando ulteriori disagi per il paziente. L'insieme di questi fattori ha dato origine alla necessità di modificare bioattivamente le superfici degli impianti in modo da accelerare i processi di osteointegrazione ed evitare l'insorgenza di complicanze indesiderate[162].

Per far ciò, tra le strategie più diffuse ed efficienti, si annoverano quelle di apposizione di materiale effettuando rivestimenti bioattivi in grado di aumentare l'area superficiale di contatto ed incentivare i processi di rilascio ionico. I coating a base di vetri/vetroceramici bioattivi hanno la capacità di migliorare la stabilità dell'impianto all'interfaccia tessuto/materiale, in quanto sono in grado contemporaneamente di instaurare saldi legami con l'osso e proteggere il substrato metallico da fenomeni corrosivi prodotti dai fluidi biologici, evitando anche il rilascio di ioni metallo tossici per le cellule, nell'ambiente circostante. Rispetto ai coating a base di HA, che manifestano effetti superiori di stabilità nel breve termine ma svantaggi nel lungo termine a causa di rapida cinetica di degradazione, i vetri bioattivi presentano un elevato indice di bioattività che li rende in grado di incentivare i processi di proliferazione cellulare, attaccamento e deposizione di matrice extra cellulare (ECM). Inoltre, stimolano il differenziamento ed il reclutamento degli odontoblasti nel lungo periodo, sostituendosi progressivamente alla crescita di nuovo tessuto, in accordo con la cinetica di formazione dell'osso[163].

Per valutare la validità di un coating, è necessario considerare diversi fattori:

- (i) buona adesione interfacciale tra vetro ed impianto per trasferire omogeneamente i carichi;
- (ii) resistenza ad applicazioni cicliche sotto sforzo;
- (iii) bioattività;
- (iv) coefficiente di espansione termica (CTE).

Quest'ultimo parametro físico è fondamentale per garantire che il rivestimento non si scolli dal substrato metallico in seguito ai processi di sinterizzazione del vetro, in quanto il CTE dei vetri è superiore rispetto a quello del titanio e delle sue leghe. Per cercare di ridurre questa differenza, spesso vengono aggiunti ossidi (MgO, SiO2) alla composizione del vetro, andando però ad influenzare negativamente la bioattività. Anche l'incapsulamento di polveri di fluoroapatite (FA) ed ossidi all'interno di matrici vetrose ha esibito miglioramenti in termini di riduzione del CTE [163]. Inoltre, per garantire buone capacità di resistenza ai carichi è stato rilevato che lo spessore ideale dei rivestimenti debba rientrare nell'intervallo 100-200 micron in modo da giungere anche ad una continuità di struttura elettronica[164].

I rivestimenti a base di vetri/vetroceramici bioattivi su impianti metallici sono stati oggetto di numerosi studi. Verné *et al* [165] si sono occupati di rivestire impianti in Ti-6Al-4V con coating doppio stato a base di vetroceramici bioattivi attraverso semplice immersione e trattamenti termici. Come materiale da rivestimento a diretto contatto con il substrato metallico è stato utilizzato un vetro appartenete al sistema SiO₂-CaO-Na₂O-MgO-P₂O5-K₂O mentre per produrre lo strato esterno bioattivo, si è ricorso ad un vetroceramico modificato con allumina e ioni fluoro (SiO₂-Al₂O₃-P₂O₅-K₂O-CaO-F). Il processo di fabbricazione è avvenuto a temperature che hanno garantito la corretta adesione dello strato bioattivo. La scelta di rivestire l'impianto con uno strato intermedio è stata fatta per accoppiare i CTE del metallo e dello strato esterno, in modo da evitare uno scollamento improvviso. Questo tipo di trattamento, che non ha alterato né le caratteristiche di bioattività né la natura della fase cristallina del vetro, è stato raccomandato per il rivestimento di viti endossee, oltre che per impianti integrali[34][165].

Ferraris *et al* [166] hanno realizzato rivestimenti a base di vetri bioattivi fosfosilicati e vetroceramici per impianti dentali in zirconia, attraverso il metodo della smaltatura. Anche in questo caso è avvenuta la formazione di uno strato intermedio tra la zirconia ed il vetro bioattivo, tramite diffusione delle particelle vetrose all'interno della matrice ceramica, in grado di accoppiare le proprietà meccaniche

dei due materiali ed assicurare continuità al trattamento termico, senza la generazioni di effetti avversi [166].

In letteratura, è stato proposto l'utilizzo di vetri neri (black glasses) come materiale di rivestimento per impianti in titanio, per applicazioni biomediche. Si tratta di una particolare classe di vetri a base di ossicarburo di silicio (Si-O-C), generati attraverso la sostituzione di ioni ossigeno con ioni carbonio all'interno di una matrice a base di SiO₂. I vetri sono stati sintetizzati tramite metodo sol-gel e manifestano buona resistenza a corrosione, buona biocompatibilità *in vitro* ed un'adeguata capacità di formare apatite, rendendoli materiali promettenti da utilizzare a contatto con tessuto osseo vivente [167].

Sono stati sviluppati anche coating nanostrutturati per rivestire impianti in titanio attraverso tecnica *liquid precursor plasma spraying* (LPPS). Si tratta di un processo efficiente e di semplice implementazione per la produzione di rivestimenti a base di vetroceramici bioattivi. I coating hanno manifestato una rapida formazione di uno strato nanometrico di HCA in seguito ad immersione in SBF, dimostrando abilità di bioattività idonee per applicazioni odontoiatriche ed ortopediche [168].

Esteban-Tejeda *et al* [169] e Diaz *et al* [170]hanno prodotto rivestimenti bioattivi ed antimicrobici in vetroceramica su zirconia e substrati in leghe di titanio, per il trattamento della peri-implatite. Inizialmente, i substrati sono stati rivestiti con vetri binari soda-calce per semplice immersione o spruzzatura termica, per poi essere trattati termicamente innescando fenomeni di nucleazione ed accrescimento di due fasi cristalline differenti (Na₃KAl₄Si₄O₁₆ e Na₂Ca₂Si₃O₉). Sono state valutate successivamente le proprietà di bioattività, attestate attraverso la formazione di cristalli di HA, e di antimicrobicità nei confronti di *Escherichia coli, Candida krusei* e *Staphylococcus aureus,* con risultati soddisfacenti[169], [170]. Di seguito è riportata una tabella riassuntiva dei rivestimenti (**Tabella 3.1**).

Sistemi	Substrato	Caratteristiche	Riferimenti
(1) SiO_2 -CaO-Na ₂ O- MgO-P ₂ O5-K ₂ O (2) SiO_2 -Al ₂ O ₃ -P ₂ O ₅ - K ₂ O-CaO-F	Impianti e viti in Ti- 6Al-4V	Bioattività, accoppiamento meccanico e termico	[165]
Vetri neri (Si-O-C)	Impianti in titanio	Resistenza a corrosione, buona biocompatibilità, formazione di HA <i>in vitro</i>	[167]
Vetri fosfosilicati	Impianti in zirconia	Bioattività, accoppiamento meccanico e termico	[166]
Coating nanostrutturati (SiO ₂ -CaO-Na ₂ O-P ₂ O5)	Impianti in titanio	Rapida formazione di HCA	[168]
$\begin{array}{lll} Vetroceramici & contenti\\ Na_3KAl_4Si_4O_{16} & e\\ Na_2Ca_2Si_3O_9 \end{array}$	Zirconia (Y-ZTP) e Ti-6Al-4V	Bioattività, antibattericità	[169], [170]

Tabella 3.1: Rivestimenti a base di vetri/vetroceramici bioattivi per impianti dentali

3.4 Cementi vetroionomerici

I cementi vetroionomerici (GIC) sono materiali compositi di recente scoperta (1975), ampiamente utilizzati per applicazioni nel settore dentale. I GIC convenzionali vengono realizzati a partire da polveri di vetri alluminosilicati ad alto contenuto di fluoro che partecipano a reazioni di polimerizzazione all'interno di matrici polimeriche a base di acidi poliacrilici liquidi. Questi substrati si legano chimicamente alla struttura del dente attraverso la formazione di legami trasversali tra i gruppi carbossili esposti lungo le loro catene e gli ioni calcio provenienti dai tessuti duri (smalto e dentina) con conseguente rilascio di ioni fluoro per lunghi periodi, manifestando importanti effetti nel contrastare l'insorgenza e la progressione delle carie[62], [171].

Inoltre, i GIC sono stati proposti come materiali in grado di innescare processi di reminalizzazione della dentina, in quanto mimano molte delle proprietà fisiche di questo composito biologico, offrono una buona resistenza quando sottoposti a sforzi di compressione (30MPa) e soprattutto, rilasciano *in vivo* ioni Ca²⁺ e PO₄³⁻, principali componenti dell'HA. In alcune composizioni commerciali, è stato aggiunto stronzio come sostituto del calcio apportando miglioramenti in termini di radiopacità, senza influenzare le procedure di sintesi ed alterarne le capacità remineralizzanti. Sebbene godano di elevata resistenza a compressione, i GIC si sono mostrati particolarmente vulnerabili a sforzi di taglio e di trazione evidenziando, di conseguenza, bassa resistenza a flessione, alla trazione diametrale ed all'usura[171].

Proprio per questi motivi, si stanno investigando delle strategie, attraverso l'inserimento di additivi, per migliorarne le prestazioni meccaniche ed incentivarne maggiormente le proprietà di bioattività. Cambiando la composizione degli acidi polialchenoici è possibile influenzare positivamente le proprietà meccaniche dei GIC. Infatti, all'interno di certi limiti, un incremento del contenuto di ioni Al³⁺ o F⁻ può migliorare la resistenza dell'intera struttura. Un'altra strategia per aumentare la densità di impacchettamento di questi materiali è quello di includere nanoparticelle, duramente la fase di polimerizzazione, all'interno della matrice polimerica[172].

Negli ultimi anni, infatti, l'ascesa delle nanotecnologie ha permesso di modificare molti materiali per applicazioni dentali, consentendo di superare notevoli limitazioni fisiche e strutturali. Diversi tipi di nanoparticelle sono state incorporate all'interno dei GIC, ad esempio idrossiapatite, fluoroapatite o ossidi metallici, le più promettenti delle quali si sono rivelate essere le nanoparticelle di vetri bioattivi (BGN). Queste nanoparticelle sono in grado di incrementare l'area superficiale e capacità di interazione con le cellule dei tessuti dentali quando combinate con GIC, migliorando complessivamente gli aspetti biologici e meccanici di questi materiali[171].

A tal proposito, Kim *et al* [171] hanno proposto l'incorporazione di nanoparticelle vetrose appartenenti al sistema binario SiO₂-CaO, ottenute attraverso sintesi sol-gel, all'interno di matrici di GIC pure o modificate con chitosano. Le BGN (circa 42 nm in diametro, con forma sferica) sono state inserite in piccole quantità, mostrando evidenti miglioramenti in termini di proprietà meccaniche e proprietà di biomineralizzazione, rispetto al controllo (GIC senza BGN). Il chitosano è stato utilizzato come legante tra le nanoparticelle vetrose e le polveri di vetrofluorosilicati all'interno dei GIC, migliorando con successo gli aspetti meccanici in termini di resistenza a sforzi di trazione diametrali, resistenza a compressione ed a flessione, ma con un minor potere remineralizzante rispetto alla sua controparte. Sono stati poi eseguite prove *in vitro* su cellule staminali della polpa dentale per supportare ulteriori studi in vivo, non evidenziando alcuna citotossicità[171].

Altri gruppi di ricerca, si sono concentrati su strategie differenti per migliorare le prestazioni dei GIC. Ana *et al* [173] hanno realizzato GIC modificati con resine idrosolubili (RMGIC) contenenti polveri di vetri bioattivi, superando le limitazioni dei cementi vetroionomerici convenzionali, grazie a minor concentrazioni di acido poliacrilico presente nella composizione del materiale. L'inclusione di queste resine ha incrementato le caratteristiche meccaniche ed i valori di resistenza alla disintegrazione senza influenzare la cinetica di rilascio dei fluoruri. Inoltre, è stato rilevato un adeguato livello di bioattività attraverso la formazione di fasi di carbonatoapatite sulla loro superficie dopo immersione in SBF. L'apatite creatasi manifesta un basso grado di cristallinità, che si riflette in una maggiore abilità nel formare legami con l'osso[173].

Valanezhad *et al* [174] si sono occupati di addizionare nanoparticelle di vetro bioattivo (70%mol SiO₂- 30%mol CaO) sintetizzate via sol-gel all'interno di RMGIC, ottenendo un incremento del valore di resistenza a flessione pari al 30%. In aggiunta, è stata valutata la morfologia di lineamenti di cellule osteogeniche coltivate sulla superficie dei campioni, esibendo un buon grado di aderenza ed espansione. È stato registrato un aumento del livello di crescita cellulare sul cemento, proporzionale alla concentrazione di nanoparticelle al suo interno, manifestando un potenziale uso in ambito clinico[174].

Karimi *et al* [175] hanno elaborato GIC ibridi, contenenti percentuali differenti di vetroceramici 45S5. In particolare, incorporando un quantitativo di particelle pari al 5% in peso, con una percentuale di cristallinità (Na₂Ca₂Si₃O₉) di circa il 74%, si migliorano considerevolmente le proprietà meccaniche dei GIC, operando come agente di rinforzo ed inducendo simultaneamente mineralizzazione all'interno del cemento. I valori di resistenza a sforzi di compressione e DTS (*Diametral tensile strength*) hanno ottenuto, rispettivamente, incrementi del 15% e 60% se comparati con quelli dei GIC tradizionali. Inoltre, come risultato positivo di questa combinazione, il cemento manifesta diversi meccanismi di rafforzamento meccanico tra cui deflessione delle cricche[175]. La **Tabella 3.2** schematizza le strategie presentate in questa sezione.

Sistemi	Caratteristiche	Riferimenti
(1) GIC contenti BGN	(2) miglior resistenza a sforzi di trazione	[171]
	diametrali, resistenza a compressione ed a	
(2) GIC contenti BGN	flessione rispetto ad (1) ma minor potere	
e chitosano	remineralizzante	
RMGIC con polveri di	Buone caratteristiche meccaniche, maggior	[173]
vetro bioattivo	resistenza alla disintegrazione, formazione di	
	apatite a basso grado di cristallinità	
RMGIC con aggiunta	Incremento della resistenza a trazione, substrato	[174]
di BGN	idoneo per le cellule osteogeniche	
GIC ibridati con	Prestazioni superiori riguardo resistenza a	[175]
combeite	compressione ed a prove di trazione diametrale	

Tabella 3.2: Cementi vetroionomerici bioattivi per applicazioni odontoiatriche

3.5 Scaffold per la rigenerazione dei tessuti dentali

I vetri e vetroceramici bioattivi rappresentano una classe di materiali estremamente attraente per la produzione di scaffold dedicati alla rigenerazione dei tessuti ossei e periodontali, grazie a proprietà

versatili che possono essere controllate manipolandone opportunamente la composizione chimica. Affiche possano essere utilizzati per il supporto, la guarigione ed il ripristino delle normali funzioni dell'osso corticale (dell'osso alveolare considerando l'ambito dentale), gli scaffold devono essere in possesso di una struttura mesoporosa ed interconnessa (diametro dei pori ~ 100µm) che sia in grado di incoraggiare la crescita cellulare e favorire la deposizione di nuova matrice extracellulare riempiendo gli spazi vuoti causati dal difetto. La morfologia e la dimensione dei pori, infatti, sono aspetti cruciali nell'influenzare i processi di osteogenesi, proprietà meccaniche e cinetica di degradazione di uno scaffold. Per una corretta guarigione, i tessuti ossei necessitano di una fitta rete vascolare che fornisca il giusto apporto di ossigeno e nutrienti alle cellule osteogeniche. In tal senso gli scaffold a base di vetri bioattivi risultano particolarmente interessanti in quanto incentivano i meccanismi di neovascolarizzazione attraverso basse concentrazioni di rilascio ionico, offrendo una valida alternativa rispetto ad approcci costosi che coinvolgono l'impiego di fattori di crescita e dei potenziali effetti collaterali che ne scaturiscono[117][108][148].

I vetroceramici bioattivi "gel-derived" sono materiali moderni e promettenti per questo genere di applicazioni. L'elevata bioattività e la possibilità di realizzare strutture mesoporose con contenuti in SiO₂ maggiori del 90% in peso, hanno reso questi materiali particolarmente attraenti anche nel campo del rilascio controllato di farmaci, macromolecole e nella produzione di materiali ibridi[117]. La **Figura 3.4** [176] mostra un buon esempio di scaffold ottenuto a partire da un vetroceramico bioattivo "gel-derived" mesoporoso appartenente al sistema ternario SiO₂-CaO-P₂O₅. Elementi inorganici come Ce, Ga e Zn possono essere facilmente introdotti all'interno della matrice vetrosa, donando al materiale la possibilità di attivare specifiche proprietà biologiche, benefiche per il recupero della salute delle componenti ossee[176]. Le considerazione fatte per l'esempio appena descritto valgono principalmente per applicazioni di ingegneria tissutale dell'osso.



Figura 3.4: Caratteristiche di uno scaffold mesoporoso "gel-derived" come ottimo candicato per applicazioni ingegneria tissutale ossea (alveolare). L'inclusione di cationi inorganici dona proprietà aggiuntive all'intero sistema[176] Un altro esempio riportato in letteratura di produzione di scaffold "gel-derived" per la rigenerazione dei tessuti ossei, è stato proposto dal gruppo di Vallet-Regì *et al* [177], [178]. In particolare, attraverso questo studio si è riuscito a dimostrare che controllando in maniera opportuna i trattamenti termici a cui sottoporre i vetri in forma di gel, si riescono ad ottenere fasi cristalline che incrementano le proprietà meccaniche degli scaffold, avvicinandosi ai valori fisiologici dei tessuti ossei, senza il deterioramento delle proprietà bioattive. Partendo da un sistema SiO₂-CaO-P₂O₅ di vetro in forma di gel, trattato a temperature prossime ai 1300°C, il gruppo di ricerca della professoressa Vallet-Regì è riuscito ad ottenere uno scaffold da utilizzare come substrato per il ripristino di tessuto osseo con diametro dei pori compreso tra 400-500µm contenente fasi di pseudo-wallostonite, wollastonite, fosfato tricalcico e cristobalite. Il materiale ha riportato buone caratteristiche bioattive in seguito all'esecuzione di test di bioattività, manifestando anche la capacità, *in vitro*, di promuovere il differenziamento di cellule staminale mesenchimali in osteoblasti[177], [178], [34]. I risultati di questo studio fanno riferimento alla rigenerazione di tessuto osseo e non sono specifici per i tessuti dentali.

Anche il gruppo di Chatzistavrou *et al* [179], [180] si è occupato della produzione di scaffold porosi con potenziali applicazioni in medica dentale, ottenuti tramite sintesi *sol-gel* di sistemi SiO₂-P₂O₅-Al₂O₃-CaO-Na₂O-K₂O combinati con vetri bioattivi del tipo SiO₂-CaO-P₂O₅. Questo metodo ha portato alla formazione di compositi vetroceramici omogenei e microporosi, in grado di fornire una superfice bioattiva di supporto per l'adesione e la proliferazione di cellule gengivali e del legamento periodontale. In questo modo, potrebbe essere incentivata una più solida sigillatura tra il dente ed un eventuale impianto[179], [180]. Inoltre, dopando con ioni-Ag, sono stato osservati meccanismi di proliferazione di cellule della polpa dentale e proprietà antibatteriche che potrebbero estendere l'applicazione di questi materiali anche in approcci di rigenerazione dentale dei tessuti molli[181].

Han *et al* [182] hanno proposto l'inserimento di ioni terapeutici all'interno della matrice vetrosa di scaffold mesoporosi per stimolare l'attività biologica delle cellule coinvolte nella rigenerazione periodontale. In tal senso, l'incorporazione ed il successivo rilascio di ioni litio (Li⁺) ha dimostrato di poter promuovere l'attaccamento, la proliferazione e la differenziazione in senso cementogenico delle cellule del legamento periodontale, attraverso l'attivazione di specifici "pathways" di segnalazione (Wnt/ β -catenina)[182].

Recentemente, vetri bioattivi contenenti ioni magnesio (ad esempio akermanite -Ca₂MgSi₂O₇- o diopside -Ca₂MgSi₂O₆), sono stati oggetto di numerosi studi legati alle loro buone proprietà meccaniche e capacità di degradare in maniera controllata. A partire da queste considerazioni, Goudouri *et al* [183] hanno svolto un lavoro incentrato sulla processazione di vetroceramici contenenti magnesio, per la produzione di scaffold con fasi cristalline di akermanite. Gli scaffold prodotti tramite tecniche di *foam replication*, a partire da vetri bioattivi *sol-gel*, sono stati rivestiti con gelatina in modo da migliorarne l'integrità strutturale ed incentivare i fenomeni di adesione cellulare, essendo la gelatina un substrato particolarmente affine per le cellule. Le caratteristiche morfologiche (dimensione dei pori di circa 200-400 μ m) insieme ad una valutazione positiva delle proprietà di bioattività (formazione di uno strato di HA dopo 9 giorni di immersione in SBF) hanno confermato lo scaffold cosi realizzato idoneo per applicazioni di ingegneria tissutale dell'osso alveolare [183].

Interessante è anche lo studio proposto da Sowmya *et al* [184] incentrato sulla fabbricazione di uno scaffold multistrato per la rigenerazione simultanea di cemento radicolare, osso alveolare e legamento periodontale, con l'intento di mimare la complessità tissutale coinvolta nella rigenerazione del parodonto. Nello specifico, lo scaffold è stato strutturato attraverso la deposizione, in successione, di:

- chitosano, PLGA ed uno strato nanometrico di vetro bioattivo caricato con proteina del cemento 1 (CEMP1) per la rigenerazione del cemento;
- chitosano e PLGA caricato con specifici fattori di crescita per il ripristino del legamento periodontale;
- chitosano, PLGA ed uno strato di nanometrico di vetro bioattivo caricato con fattori di crescita piastrinica (PRP), per la rigenerazione dell'osso alveolare.

Test *in vivo* su animale hanno confermato una completa guarigione periodontale e deposizione di nuova matrice d'osso alveolare dopo un periodo di tre mesi, evidenziando un elevato potenziale per l'applicazione su esseri umani[184].

Sistemi	Substrato	Caratteristiche	Riferimenti
Scaffold mesoporoso "gel-derived" drogato con ioni Ce ³⁺ , Ga ³⁺ , Zn ²⁺	Osso alveolare	Bioattività, rilascio di ioni per la stimolazione dei processi di rigenerazione ossea	[176]
Scaffold mesoporoso "gel-derived" contente fasi cristalline	Osso alveolare	Morfologia idonea, buona bioattività, differenziamento cellule mesenchimali in osteoblasti	[177], [178], [34]
Scaffold microporosi compositi	Gengiva, legamento periodontale	Bioattività, adesione e proliferazione di cellule gengivali e del legamento periodontale.	[179], [180]
Scaffold mesoporosi drogati con ioni Li ⁺	Cemento radicolare	Differenziamento cementegenico, attivazione di specifici "patway" di segnalazione cellulare	[182]
Scaffold multistato contente fattori di crescita	Cemento radicolare, osso alveolare, legamento peridontale	Test <i>in vivo</i> su animale: completa guarigione periodontale e deposizione di nuova matrice d'osso alveolare dopo 3 mesi	[184]
Scaffold mesoporosi contenti Mg + coating di gelatina	Osso alveolare	Incremento dell'adesione cellulare, buone caratteristiche morfologiche e di bioattività.	[183]

Tabella 3.3: Esempi di scaffold	porosi per	la rigenerazione	dei tessuti dentali
---------------------------------	------------	------------------	---------------------

3.6 Vetri e vetroceramici bioattivi per applicazioni ai tessuti duri del cavo orale

Nel corso degli anni, diverse composizioni di vetri bioattivi sono state sviluppate con l'obiettivo di realizzare materiali in grado di rigenerare porzioni di tessuto osseo danneggiato o malato. Le capacità di osteoconduttività ed osteoinduttività hanno dimostrato l'efficacia di questi materiali nell'instaurare

legami chimici con l'osso e la versatilità nel realizzare strutture capaci di adattarsi a richieste differenti (ad esempio cementi, coating, scaffold). Ciononostante, l'elevata fragilità intrinseca e le scarse proprietà meccaniche ne hanno limitato l'utilizzo, sia nel settore dentale che in quello ortopedico, soltanto ad applicazioni che non richiedano l'introduzione di carichi eccessivi. Per questi motivi è nata la necessità di sottoporre i vetri bioattivi a trattamenti termici, al fine di innescare processi di nucleazione di fasi cristalline che consentono di rafforzarne l'intera struttura. I vetroceramici bioattivi, così ottenuti, hanno riscosso un notevole successo nell'ambito dell'ingegneria tissutale grazie a proprietà meccaniche superiori rispetto a quelle dei vetri genitori, in termini di comportamento viscoso, tenacità e resistenza alla frattura[185][117].

Tuttavia, nel caso specifico dei materiali per la realizzazione di impianti dentali, l'accoppiamento ottimale tra performance meccaniche dell'impianto e quelle dell'osso alveolare è ancora lontano dagli standard desiderati. Infatti, il limite di resistenza alla frattura dei vetroceramici bioattivi commerciali ($K_{IC} < 3Mpa m^{1/2}$), che misura la resistenza di un materiale alla propagazione delle cricche e l'abilità di prevenire l'insorgere di una frattura impovvisa, è inferiore rispetto a quello dei tessuti duri del cavo orale ($2 < K_{IC} < 12$ Mpa $m^{1/2}$). Per questo motivo, molti studi si stanno concentrando sull'implementazione di sistemi che incrementino il valore di K_{IC} ed aumentino contemporaneamente il livello di bioattività[34].

Vetroceramici bioattivi appartenenti al sistema CaO-MgO-SiO₂, contenenti wollastonite (CaSiO₃) e diopsite (CaMgSi₂O₆) come principali fasi cristalline, hanno dimostrato caratteristiche attrattive per lo sviluppo di biomateriali per impianti dentali. La presenza di wollastonite, infatti, accentua le proprietà di bioattività cosi come l'inserimento dell'ossido di magnesio, promuovendo la formazione dello strato di apatite. Il magnesio, inoltre, migliora le abilità di adesione, proliferazione e differenziamento di cellule osteoblastiche. Dimitriadis *et al* [185] si sono occupati dello sviluppo di tali vetroceramici, ottenuti tramite metodologia *melt-quenching* e successiva sinterizzazione, aggiungendo quantitativi di P₂O₅, CaF₂ e vari rapporti Na₂O/K₂O con eccellenti risultati in termini di bioattività e caratteristiche meccaniche confrontabili con quelle dell'osso mascellare e dentina. È stata introdotta anche una piccola percentuale di allumina (1%) per migliorare ulteriormente le performance meccaniche del materiale, incrementandone la microdurezza senza alterare le proprietà di bioattività[185].

Anche il gruppo di Saadaldin *et al* [186] ha proposto la sintesi di vetroceramici bioattivi con wollastonite come principale fase cristallina per la produzione di impianti dentali. In questo caso il vetroceramico, prodotto tramite metodo *sol-gel*, presenta cristalli di wollastonite con forme aciculari che contribuiscono positivamente al rafforzamento della resistenza alla frattura, con valori di K_{IC} compresi tra 4.5-5.5 MPa m^{1/2}, e nel prevenire la formazione e propagazione delle cricche. Inoltre, rispetto ai materiali convenzionali per impianti, come titanio e zirconia, questo nuovo vetroceramico dispone di un modulo elastico molto inferiore (89-100 GPa). Ciò potrebbe ridurre, almeno parzialmente, il fenomeno dello "stress shielding". Tali proprietà meccaniche, insieme ad un'elevata stabilità chimica, indicano questo materiale come possibile candidato per la realizzazione di impianti dentali privi di componenti metalliche[186]. Lo stesso gruppo ha sviluppato un ulteriore vetroceramico contenente cristalli di miserite [KCa₅(Si₂O₇)(Si₆O₁₅)(OH)F] come fase dominante, ottenendo risultati in linea con quelli dell'esperimento precedente. In aggiunta, il biomateriale si è dimostrato in grado di preservare il colore naturale dei tessuti che circondano l'impianto migliorando l'estetica globale del trattamento, a differenza del titanio che tende a rilasciare sfumature grigiastre che possono causare disagi nel paziente [187].

Con molte applicazioni in odontoiatria, i vetroceramici contenenti leucite (KAlSi₂O₆) come fase cristallina sono in grado di prevenire l'insorgere e la propagazione delle cricche, con conseguenti miglioramenti in termini di tenacità e resistenza alla frattura. Yilmaz *et al* [188] sono riusciti con successo a produrre un sistema cosi strutturato, ottenendo clusters policristallini (200-300 micrometri in diametro) dispersi omogeneamente all'interno di una matrice vetrosa a base di potassio, silico ed allumina. Una microstruttura così organizzata, a base di piccoli clusters prismatici di leucite, è determinante per il miglioramento delle caratteristiche meccaniche del materiale. Inoltre, questa distribuzione dei cristalli conferisce buone proprietà ottiche e di traslucenza all'intero sistema[188].

Oltre alla nucleazione di fasi cristalline all'interno della matrice del vetro, anche la combinazione tra materiali differenti può apportare migliorie alle proprietà meccaniche e di bioattività. L'accoppiamento tra polimeri biodegradabili e vetri/vetroceramici bioattivi ha dato origine ad una nuova tipologia di materiali per applicazioni di odontoiatria rigenerativa. Questa associazione di caratteristiche è stata sfruttata per produrre compositi, in possesso di proprietà migliorate rispetto a quelle dei materiali di partenza. In particolare, lo scopo di questa nuova classe di materiali è quello di rafforzare gli aspetti meccanici, strutturali e di bioattività forniti dalla componente inorganica (vetro) attraverso l'unione con una fase organica che doni elasticità e flessibilità all'intero sistema. Molto spesso, i polimeri naturali vengono impiegati per la realizzazione di materiali compositi, tra cui PVA, chitosano, PEG, PCL e PU, grazie al vantaggio di essere biodegradabili e di possedere una conformazione simile a quella della matrice extracellulare dei tessuti viventi[157].

Proprio in quest'ottica, Peter *et al* [189] hanno realizzato uno scaffold composito a base di chitoano e gelatina contenente nanoparticelle di vetro bioattivo per la rigenerazione dell'osso alveolare. Il chitosano, in possesso di spiccate proprietà antibatteriche, risulta particolarmente adatto per questo genere di applicazioni in quanto le zone adiacenti all'osso alveolare mostrano un'importante sensibilità all'attività batterica. Inoltre, è stato evidenziato un incremento significativo dell'adsorbimento proteico e dell'adesione di cellule osteogeniche sulla superficie di nanocompositi ceramici bioattivi in confronto ai ceramici alla microscala. La combinazione di questi fattori ha portato buoni risultati in termini di miglioramento delle proprietà meccaniche e biocompatibilità nei confronti delle cellule osteogeniche, indicando questo materiale come potenziale strumento per l'ingegnerizzazione del tessuto osseo alveolare[189].

Anche i compositi rinforzati con fibre vetrose sono molto utilizzati in odontoiatria grazie al duplice vantaggio di possedere una resistenza adeguata a sforzi meccanici, donando un aspetto estetico accettabile alla bocca del paziente. In generale si tratta di materiali omogenei e non cristallini a base di resine poliacriliche rafforzate dalla presenza delle fibre vetrose distribuite in maniera arbitraria, in grado di incrementare la tenacità della matrice polimerica, oltre che la resistenza a flessione e compressione. Attualmente, trovano impiego per applicazioni endodontiche, ortodontiche e periodontali[151].

Sistemi		Substrate)	Caratteristiche	Riferimenti
Vetroceramici	CaO-	Osso	alveolare,	Bioattività, elevata microdurezza	[185]
MgO-SiO ₂ in prese	enza di	dentina		(1% allumina), buone	
diopside e wollaste	onite			caratteristiche meccaniche	
-					

Tabella 3.4: Vetri/vetroceramici bioattivi per applicazioni ai tessuti duri del cavo orale

(1) Vetroceramici con wollastonite(2) Vetroceramici con miserite	Da intendersi come sostituti per impianti dentali metallici	$4.5 < K_{IC} < 5.5 \text{ MPa m}^{1/2}$ Modulo elastico (89-100GPa). In aggiunta il sistema (2) preserva il colore naturale dei tessuti circostanti.	[186] [187]
Vetroceramici con leucite	Tessuti duri	Buone proprietà meccaniche, ottiche e di traslucenza	[188]
Composito chitosano/gelatina/BGN	Osso alveolare	Antibattericità, adsorbimento proteico, adesione cellule osteogeniche	[189]
Compositi rinforzati con fibre di vetro bioattivo (GFRC)	Tessuti duri, periodontali	Elevata tenacità, resistenza a sforzi di compressione e flessione.	[151]

Capitolo 4

Materiali e Metodi

Nei capitoli iniziali sono stati presentati i vetri bioattivi come biomateriali in grado di supportare i processi di rigenerazione sia dei tessuti duri che di quelli molli del cavo orale, facendo una panoramica sui principali processi produttivi coinvolti nella loro sintesi. Sulla base di queste considerazioni, il seguente lavoro di tesi ha lo scopo di realizzare biomateriali in forma di polvere e scaffold porosi da utilizzare in applicazioni di odontoiatria rigenerativa.

L'attività sperimentale è stata svolta nel Dipartimento di Scienza Applicata e Tecnologia (DISAT) del Politecnico di Torino ed è stata organizzata in modo da condurre parallelamente la produzione di scaffold attraverso il metodo della spugna polimerica, partendo da polveri appartenenti al sistema CaO – MgO – SiO₂ – P₂O₅ – Na₂O – CaF₂ (vetro 1d), e la sintesi di materiale vetroso attraverso metodo *sol-gel*, derivanti dal sistema binario SiO₂-CaO, drogato con ioni litio (SiO₂-CaO-Li₂O) rispettivamente al 2% e 5 % in peso.

L'intento di questo capitolo è quello di descrivere i materiali ed i metodi utilizzati per la preparazione dei campioni e le tecniche di caratterizzazione impiegate per definirne le proprietà fisico-chimiche, composizionali, tessiturali e meccaniche.

4.1 Scaffold (vetro 1d)

Gli scaffolds sono stati realizzati mediante la tecnica della spugna polimerica (*sponge replication*), in quanto si tratta di un metodo semplice, a basso costo ed efficiente in grado di produrre strutture che riproducano l'architettura dell'osso alveolare[132]. Sono state utilizzate spugne porose (45 PPI "*pores per inch*") in poliuretano (PU) commerciale, sagomate opportunamente in modo da ottenere modelli cubici sacrificali di dimensioni 10x10x10 mm³ (**Figura 4.1**).

Figura 4.1: Modelli scarificali in PU

Questi modelli sono stati immersi all'interno di una sospensione di particelle vetrose ("slurry") costituita per il 30 % da polveri di vetro bioattivo appartenenti al sistema CaO – MgO – SiO₂ – P₂O₅ – Na₂O – CaF₂ (vetro 1d) (**Tabella 4.1, Tabella 4.2** [190]), per il 64% da acqua distillata e per il 6% da alcool polivinilico (PVA).

Glass	SiO ₂	CaO	MgO	P ₂ O ₅	Na ₂ O	CaF ₂	CaO/ SiO ₂	P ₂ O ₅ / CaF ₂
1d	45,45	30,30	12,99	2.60	4.33	4.33	0.67	0.60

Tabella 4.1: Composizione del vetro (mol%)[190]

Tabella 4.2: Proprietà del vetro ottenute da densità, dilatometria, DTA e HSM[190]

 $(\rho, \text{densità del vetro}; V_m, \text{volume molare}; T_g, \text{temperatura di transizione vetrosa}, T_S, \text{temperatura di rammollimento del vetro}; CTE, coefficiente di espansione termica; T_{FS}, temperatura di primo ritiro volumico; T_{MS}, temperatura di massimo ritiro volumico; T_C, temperatura di inizio cristallizzazione; T_P, temperatura di picco della cristallizzazione; A/A_0, rapporto area di massimo ritiro volumico/area iniziale; S_c= T_c - T_{MS})$

$\rho (g cm^{-3})$	2.84 ± 0.009
V_m (cm ³ mol ⁻¹)	20.85 ± 0.07
$T_g \pm 2$ (°C)	495
$T_5 \pm 2$ (°C)	673
$CTE \times 10^{6} (K^{-1})$	10.61
$T_{FS} \pm 5$ (°C)	640
$T_{MS} \pm 5$ (°C)	705
T _c ± 2 (℃)	804
$T_{p1} \pm 2$ (°C)	831
$T_{p2} \pm 2$ (°C)	-
A/Ao	0.69
Sc	99

Il PVA è stato solubilizzato per effetto di un'agitazione continua (200-300 rpm) a 80°C per circa 30min; una volta constata la completa solubilizzazione del PVA l'acqua evaporata durante il processo è stata aggiunta nuovamente alla soluzione per il ripristino delle condizioni iniziali. Le polveri del vetro 1d sono state quindi aggiunte alla soluzione in continua miscelazione (400-500 rpm) a temperatura ambiente e la soluzione è stata lasciata a miscelare per circa 15 min (**Figura 4.2**).

Figura 4.2: Set-up per la preparazione slurry su agitatore magnetico con piastra riscaldante

A questo punto, le spugne sono state immerse nello slurry per 60 secondi, estratte e compresse (circa 20kPa per 1 secondo) fino al 60% del loro spessore nelle 3 direzioni dello spazio (x,y,z), al fine di perfondere omogeneamente il template attraverso la rimozione dello slurry in eccesso (**Figura 4.3**).

Figura 4.3 : Sistema utilizzato per la compressione al 60% dello spessore della spugna

I cicli di immersione e compressione sono stati ripetuti per tre volte. Una parte dei campioni è stata sottoposta ad un ulteriore ciclo di sola impregnazione con l'intento di rendere la struttura più ricca di materiale (scaffolds sinterizzati ad 800°C con e senza plateau); i campioni sono stati fatti asciugare a temperatura ambiente per 24h (**Figura 4.4**).

Figura 4.4: Spugne impregnate con vetro bioattivo dopo cicli di infiltrazione e compressione

Successivamente, i campioni sono stati trattati termicamente in forno (Nabertherm 1300) in modo da rimuovere la fase organica (pirolizzazione della spugna), sinterizzare quella inorganica ed ottenere scaffolds macroporosi a base di vetro bioattivo (**Figura 4.5**).


Figura 4.5: Fornace elettrica Nabertherm 1300

In particolare, sono stati eseguiti quattro trattamenti termici differenti:

- 1) T=700°C per 3 ore con un incremento di 5 gradi/minuto ($T < T_C$)
- 2) T=750°C per 3 ore con un incremento di 5 gradi/minuto ($T < T_C$)
- 3) T=800°C per 3 ore con un incremento di 5 gradi/minuti ($T \sim T_C$)
- 4) T_1 =400°C per 1 ore (plateau) con un incremento di 5 gradi/minuto e T_2 =800°C per 3 ore con lo stesso incremento di temperatura ($T \sim T_C$) (Figura 4.6).





Figura 4.6: A) Scaffolds trattati a 750°C; B) Scaffolds trattati a 800°C+plateau a 400°C

Gli scaffold sinterizzati a 700°C per 3h hanno manifestato evidenti problematiche di integrità strutturale e per questo non sono stati sottoposti al ulteriori indagini.

Le dimensioni degli scaffolds prodotti sono state misurate mediate calibro digitale per calcolare il valore di porosità percentuale, attraverso partendo il calcolo della densità e dei volumi. Le misurazioni sono state condotte per 4 campioni (**Tabella 4.3**).

Scaffold	Massa (g)	Volume (cm ³)	Densità (g/cm ³)
Campione 1	255.9*10-3	276.55*10-3	0.93
Campione 2	237.5*10-3	250.07*10-3	0.95
Campione 3	228.1*10 ⁻³	250.15*10-3	0.91
Campione 4	180.1*10 ⁻³	215.75*10-3	0.84

 Tabella 4.3: Proprietà fisiche degli scaffold vetrosi (vetro 1d)

Il valore della porosità percentuale è stato ricavato secondo l'equazione:

%porosità_n =
$$1 - \frac{\rho_n}{\rho} * 100$$

Dove con ρ_n si indica la densità apparente del campione n-esimo, con *n* numero intero, mentre ρ è la densità del vetro 1d calcolata precedentemente da Kansal *et al*[190]. Il valore di porosità media degli scaffold, calcolato come media aritmetica degli n-esimi valori di porosità attraverso l'equazione appena menzionata, è risultato pari al 68%.

4.2 Vetri Sol-Gel

Le polveri di vetro bioattivo sono state prodotte attraverso il metodo sol-gel, in accordo con quanto descritto precedentemente[119]. Le composizioni dei sistemi ossidi sono riportate nella **Tabella 4.4.** I due sistemi a base di litio, rispettivamente al 5% e 2% molare sono stati ottenuti dopando opportunamente il vetro binario 60SiO₂-40CaO già sintetizzato dal gruppo di Baino *et al*[191], che verrà utilizzato come controllo per l'analisi dei risultati finali.

Tabella 4.4: Quantitativi dei precursori usati per sintetizzare le varie composizioni (TEOS: tetraetil ortosilicato; CaNT: nitrato di calcio; LiNT: nitrato di litio)

Composizione (mol%)	TEOS (ml)	CaNT(g)	LiNT(g)	
60SiO ₂ -40CaO	11.66	8.22	-	
60SiO ₂ -35CaO-5Li ₂ O	23.74	14.74	1.28	
60SiO ₂ -38CaO-2Li ₂ O	23.74	16.00	0.49	

I valori riportati in **Tabella 4.4** fanno riferimento alle quantità di ortosilicato tetraetile (TEOS), nitrato di calcio tetraidrato (CaNT) e nitrato di litio (LiNT) utilizzati rispettivamente come precursori di ossido di silicio (SiO₂), ossido di calcio (CaO) e ossido di litio (Li₂O) per la produzione di 40 ml di sol. Entrambe le sintesi dei vetri contenti litio sono state condotte nel seguente modo: sono stati aggiunti 2.4ml di HNO₃ (2M) a 14.4 ml di acqua bidistillata all'interno di flasks sigillate, ponendo la soluzione in agitazione per 5 minuti a temperatura ambiente. A questo punto è stato aggiunto il TEOS mantenendo il sistema in agitazione continua (200 rpm) per circa 1h, al fine di ottenere una soluzione trasparente ed omogenea come conseguenza del completamento delle reazioni di idrolisi. Successivamente, seguendo la medesima procedura è stato introdotto CaNT. Come ultima fase di preparazione delle soluzioni, sono stati aggiunti i quantitativi di nitrato di litio corrispondenti al 5% e 2% mol di ossido di litio, agitando per un'ora fino ad ottenere una completa dissoluzione dei sali (**Figura 4.7**).



Figura 4.7: Sistema 60SiO₂-38CaO-2Li₂O (mol%) in forma di sol

Di seguito sono riportate le reazioni chimiche sfruttate per la sintesi, considerando la proporzione $(H_2O + HNO_3)$: TEOS= 8:1;

 $SiC_8H_{20}O_4 + 2H_2O \rightarrow SiO_2 + 4C_2H_5OH$ (equazione per il calcolo dell'ossido di silicio) $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O \rightarrow CaO + 2HNO_3 + 3H_2O$ (equazione per il calcolo dell'ossido di calcio) $2LiNO_3 + H_2O \rightarrow Li_2O + 2HNO_3$ (equazione per il calcolo dell'ossido di litio) Preparati i sol, lo step di gelazione è avvenuto lasciando asciugare le bottigliette a temperatura ambiente per tre giorni. Durante questa fase si apprezza un notevole incremento della viscosità (**Figura 4.8**).



Figura 4.8: Sistema 60SiO₂-38CaO-2Li₂O (mol%) in forma di gel dopo asciugatura a temperatura ambiente

A seguire, i campioni sono stati sottoposti prima ad invecchiamento a 60°C in stufa per 3 giorni per poi essere essiccati, sempre in stufa, portando la temperatura a 140°C per 2 giorni. A questo punto, il gel essiccato è stato tratto termicamente in fornace (Nabertherm) a 700°C (calcinazione) per 3h impostando un incremento della temperatura di 2 gradi/minuto (**Figura 4.9**).



Figura 4.9: Gel calcinati a 700°C per 3h: a) 60SiO₂-38CaO-5Li₂O (mol%) b) 60SiO₂-38CaO-2Li₂O (mol%)

Come fase finale, i due sistemi di vetro sol-gel sono stati macinati a secco tramite macinatore a sfere (ANALYSETTE 3 SPARTAN-FRITSCH), fino ad ottenere polveri fini di vetro bioattivo (**Figura 4.10**)



Figura 4.10: Macinatore a sfere ANALYSETTE 3 SPARTAN-FRITSCH (a sinistra); polveri di vetro bioattivo ottenute attraverso il processo di macinazione (a destra)

4.3 Caratterizzazioni

Sia gli scaffold macroporosi che le polveri *sol-gel* sono state caratterizzati attraverso Diffrattometria a Raggi X (XRD) per valutare l'eventuale presenza di fasi cristalline nucleate in seguito al processo di sinterizzazione, Microspia a Scansione Elettronica (SEM) per esaminarne la morfologia e Spettrometria a Dispersione di Energia (EDS) per determinarne le composizioni. Inoltre, sono state esaminate le caratteristiche meccaniche degli scaffold in termini di resistenza a sforzi di compressione, valutando il carico di rottura delle trabecole porose, ed il modulo di Young(E), mentre le polveri *sol-gel* sono state sottoposte ad analisi di adsorbimento-desorbimento di azoto seguite da BET per valutarne la tessitura nano-porosa.

Inoltre, gli scaffold sono stati sottoposti al test di bioattività *in vitro* secondo il protocollo di Kokubo, immergendo i campioni in SBF (Simulated Body Fluid) rispettivamente per 48 ore, una settimana e due settimane. Tale test è stato svolto per verificare la bioattività dei campioni analizzati, attraverso la formazione di uno strato di idrossicarbonatoapatite (HCA) sulla loro superficie.

4.3.1 Diffrattometria a Raggi X (XRD)

La Diffrattometria a raggi X (XRD) è una tecnica analitica utilizzata per l'identificazione delle fasi cristalline e delle proprietà fisiche di un materiale. In particolare, l'analisi XRD sfrutta un fascio di

fotoni X, generati da un catodo, che vengono collimati e direzionati verso il materiale ridotto in forma di polvere, producendo un'interferenza costruttiva rilevata da un opportuno sensore che trasduce la radiazione in un'informazione digitale[192]. Il principio di funzionamento si basa sulla legge di Bragg:

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

dove con *n* sì indica un numero intero, con λ la lunghezza d'onda della radiazione elettromagnetica, con θ l'angolo di diffrazione, e con *d* la distanza tra gli strati atomici in un cristallo. Attraverso questa equazione, investendo il campione con radiazioni che spazzano un angolo di 2θ , è possibile risalire al valore della variabile *d* che identifica univocamente la fase cristallina di ogni minerale. In questo modo si ottiene uno spettro che, grazie all'ausilio di un software dotato di un grande database, viene confrontato con quelli emessi dalle varie fasi cristalline e ne identifica l'eventuale presenza[192].

Il dispositivo è formato da tre componenti principali (Figura 4.11 [193])

- Tubo radiogeno, a sua volta è costituito da un catodo (filamento di tungsteno) e da un anodo (generalmente in tungsteno-reniato o molibdeno). Il catodo, riscaldandosi per effetto della corrente, emette un flusso di elettroni che, accelerati dall'applicazione di una differenza di potenziale tra catodo ed anodo, bombardano l'anodo. Quando gli elettroni dispongo di un'energia tale da riuscire a scalzare gli atomi degli orbitali più interni del metallo dell'anodo, l'energia emessa corrisponde esattamente ad un fotone in banda X;
- ii) Porta campioni, in cui viene disposto un sottile strato delle polveri da dover analizzare;
- iii) Rilevatore (semiconduttori, cristalli scintillatori in ioduro di cesio o trasduttori a gas)[192]



Figura 4.11 : Rappresentazione del processo di diffrattometria a raggi x [193]

L'analisi XRD è stata eseguita sia sui vetri sol-gel che sugli scaffold macroporosi polverizzati utilizzando il diffrattometro X'Pert, con un angolo 2θ compreso tra 10 e 70° e radiazione incidente Cu K α (λ =15.405nm), operando a 40kV e 30mA all'interno della camera Bragg-Bretano (**Figura 4.12**).



Figura 4.12: Diffrattometro modello X'Pert

4.3.2 Microscopia a Scansione Elettronica (SEM) e Spettroscopia a Dispersione di Energia (EDS)

La Microscopia a Scansione elettronica (SEM) è una tecnica investigativa che sfrutta fasci di elettroni ad alta energia per realizzare immagini morfologiche, ad ingrandimenti elevati, della superficie dei campioni da analizzare. L'interazione tra gli elettroni del fascio e gli atomi che compongono il campione genera segnali, per effetto della dissipazione di energia cinetica, che forniscono informazioni riguardo la struttura cristallina, texture, e composizione chimica del materiale. I segnali generati includono elettroni retrodiffusi, fotoni, luce visibile ed elettroni retrodiffusi diffratti (**Figura 4.13** [194]) [195].



Figura 4.13: Schematizzazione dei segnali generati all'interfaccia del campione analizzato[194]

Un generico dispositivo SEM è costituito da:

- Una sorgente che genera il fascio di elettroni;
- Un sistema di lenti che permette di modulare opportunamente il fascio;
- Porta-campioni;
- Rilevatori;
- Dispositivo di output[195].

Generalmente, questi dispositivi permettono di esaminare aree da 1cm a 5 μ m di estensione, con una risoluzione spaziale compresa tra 50 e 100 nm. Inoltre, i campioni, per poter essere analizzati correttamente, devono rispettare alcuni requisiti specifici tra cui essere allo stato solido, possedere dimensioni adatte per poter essere alloggiati all'interno del porta-campioni e mantenere un'elevata stabilità nel vuoto[195].

Il microscopio SEM può essere provvisto di un rivelatore allo stato solido in grado di distinguere l'energia dei raggi X emessi dal campione (EDS). In questo modo è possibile determinare gli elementi chimici che compongono il materiale ed effettuare analisi qualitative riguardanti le loro concentrazioni[196].

Le polveri di vetro bioattivo sol-gel e gli scaffold sono stati sottoposti ad analisi combinata SEM-EDS, mediante dispositivo SEM modello ZEISS SUPRA 40 (**Figura 4.14**), con l'intento di valutarne morfologia e composizione.



Figura 4.14: SEM (ZEISS SUPRA 40) utilizzato per analisi morfologiche e composizionali

4.3.3 Analisi BET (Brunauer-Emmett-Teller)

L'analisi BET è una tecnica che consente di determinare le caratteristiche tessiturali dei materiali, ad esempio in termini di area superficiale specifica di un materiale solido attraverso fenomeni di adsorbimento e desorbimento, causati dall'azione di un fluido gassoso (prevalentemente viene adoperato l'azoto in quanto non interagisce con il materiale), che avvengono nel materiale. Il volume di gas adsorbito dipende principalmente dalla pressione esercitata dal gas, oltre che dalla sua natura e da quella del materiale: maggiore è la pressione maggiore è la quantità di molecole di gas che vengono adsorbite. Per questo motivo, durante il processo, la pressione d'esercizio viene incrementata fino a creare uno strato di gas monomolecolare sulla superfice del solido in esame[197][198].

A partire dalla massa del monostrato di gas formatosi è possibile risalire alla quantità di particelle gassose adsorbite sulla superficie del materiale attraverso l'equazione:

$$\frac{1}{w(\frac{p}{p_0} - 1)} = \frac{1}{W_m C} + \frac{C - 1}{W_m C} \left(\frac{p}{p_0}\right)$$

dove con w sì identifica il peso del gas adsorbito alla pressione $\frac{p}{p_0}$, con W_m il peso del gas adsorbito costituente il monostrato, e con C la costante BET che indica l'interazione, in valore assoluto, tra le molecole del gas insufflato e la superficie delle particelle solide. Ai fini dell'analisi è necessario inserire il campione in quantità ben precise (>100mg) all'interno di una buretta in vetro e trattarlo attraverso un processo di degassamento in condizioni di vuoto, prima di insufflare il gas ed avviare la misura[197].

In particolare, l'analisi BET consente di determinare il volume dei pori e la loro dimensione, oltre che l'area superficiale del materiale. Questo è particolarmente interessante per i materiali mesoporosi come i vetri bioattivi ottenuti via sol-gel, in quanto le loro caratteristiche tessiturali nanoporose influenzano il comportamento bioattivo, essendo questo aspetto strettamente correlato alle tempistiche di degradazione del materiale ed alla cinetica di rilascio ionico (funzione dell'area superficiale)[199].

Le analisi di adsorbimento-desorbimento di azoto sono state condotte sulle polveri vetrose drogate con ioni litio attraverso analizzatore ad assorbimento modello ASAP2020 PLUS prodotto dall'azienda Micromeritics[®] (Figura 4.15).



Figura 4.15: Analizzatore ad assorbimento (Micromeritics® modello ASAP2020 PLUS)

4.3.4 Test Meccanici

I test meccanici vengono eseguiti per valutare il comportamento di un materiale quando viene sottoposto a sforzi di deformazione (trazione, flessione, compressione e torsione). In particolare, nel caso degli scaffold macroporosi a base di vetro 1d sono state condotte prove di compressione sottoponendo il provino a carichi assiali con l'intento valutare quanto, effettivamente, sia in grado di riprodurre il comportamento meccanico dell'osso alveolare.

La resistenza meccanica del provino è stata calcolata a partire dall'equazione:

$$\sigma = \frac{F}{A}$$

dove σ rappresenta la resistenza alla compressione [MPa], *F* è il carico esercitato sul provino [N] e A è l'area della superficie del provino a contatto con la pressa[mm²] [200].

Le prove sono state eseguite su una macchina di tipo elettromeccanico (MTS CriterionTM Model 43) (**Figura 4.16**), impiegando una cella di carico da 5kN classe 0.5 e velocità di prova pari a 1 mm/min. La macchina, fornita di motore passo-passo, di un blocco di supporto fisso, di una traversa mobile, di cinghie e pulegge dentate, permette un movimento della traversa con velocità comprese tra 1 μ m/min e 750 mm/min consento di testare diverse tipologie di materiale.



Figura 4.16: Pressa elettromeccanica MTS CriterionTM Model 43

4.3.5 Prove di Bioattività in vitro

Con le prove di bioattività *in vitro* si intende valutare la capacità di un materiale di formare legami chimici con l'osso, attraverso la formazione di uno strato di apatite sulla sua superficie[108]. Per far questo, gli scaffold macroporosi sono stati immersi all'interno di una soluzione fisiologica simulata (SBF) caratterizzata da una concentrazione ionica molto simile a quella del plasma sanguigno umano. Infatti, se un materiale è in grado di ricoprirsi di uno strato di HA *in vitro*, è molto probabile che ciò possa verificarsi anche *in vivo*.

L'SBF è stata preparata seguendo il protocollo descritto da Kokubo *et al* [201]. In **Tabella 4.5** sono riportate le quantità dei reagenti necessari per ottenere 1L di SBF.

Reagente	Formula	1L SBF [g/L]	
Cloruro di sodio	NaC1	8,035	
Bicarbonato di sodio	NaHCO ₃	0.355	
Cloruro di potassio	KC1	0.225	
Fosfato dipotassico tri-idrato	K2HPO4·3H2O	0,231	
Cloruro di magnesio esaidrato	MgCl2·6H2O	0.311	
Acido cloridrico 1M	1M-HC1	39ml	
Cloruro di calcio	CaCl ₂	0,292	
Solfato di sodio	Na ₂ SO ₄	0,072	
TRIS	(CH2OH)3CNH2	6,118	
Acido cloridrico 1M	1M-HC1	0-5ml	

Tabella 4.5: Reagenti necessari per la preparazione di 1L di SBF[201]

Le proprietà bioattivite sono state testate a 3 tempi diversi (48 h, 7 gg, 14 gg), immergendo i campioni all'interno di recipienti riempiti con SBF e posizionandoli in incubatore a 37°C. Il volume di SBF è stato stabilito sulla base del rapporto 1,5g/ml (grammi di scaffold/ml di SBF), come suggerito dal protocollo comunemente usato in letteratura[202]; la soluzione è stata inoltre sostituita periodicamente (refresh) ogni 48 h per simulare la circolazione dei fluidi in abito corporeo

Trascorsi i periodi di incubazione, gli scaffold sono stati estratti dall'SBF, sciacquati in acqua distillata e fatti asciugare sotto cappa per 24h.

Come ultimo step, i campioni sono stati sottoposti ad analisi SEM ed EDS per valutare morfologia e composizione dello strato di HA formatosi.

Capitolo 5

Risultati e discussione

Lo scopo del presente lavoro di tesi è duplice e riguarda lo sviluppo, realizzazione ed analisi di scaffold macroporosi bioattivi e polveri vetrose contenenti ioni litio per la rigenerazione dei tessuti del parodonto. Il principio di base su cui è stata organizzata l'attività sperimentale riguarda la valutazione delle proprietà e delle caratteristiche di biomateriali ottenuti attraverso due metodologie di sintesi differenti: *melt-quenching* e *sol-gel*. In questo capitolo vengono esposti i risultati conseguiti durante la sperimentazione e comparati con quelli ottenuti da altri gruppi di ricerca riguardanti lo stesso campo di applicazione. I risultati verranno discussi in base alle prove eseguite, di seguito elencate:

- *Diffrattometria a raggi X* (XRD) per valutare la presenza di fasi cristalline nucleate durante la fase di sinterizzazione per gli scaffold a base di vetro 1d e calcinazione per le polveri solgel;
- *Microscopia a scansione elettronica* (SEM) *e Spettroscopia a dispersione di energia* (EDS) con l'intento di effettuare indagini a livello morfologico e composizionale sugli scaffold macroporosi;
- *Test di bioattività* per verificare la formazione di idrossiapatite sulla superfice dei campioni a base di vetro 1d, valutata attraverso analisi combinata SEM-EDS
- *Analisi di adsorbimento-desorbimento di azoto* (BET) per esaminare l'area superficiale, la dimensione, la forma ed il volume dei pori delle polveri sol-gel;
- *Test meccanici di compressione* per analizzare il comportamento meccanico degli scaffold porosi e confrontarlo con le caratteristiche meccaniche dell'osso alveolare.

5.1 Scaffold Macroporosi

5.1.1 Diffrattometria a raggi X (XRD)

Come descritto precedentemente, le analisi XRD sono state eseguite allo scopo di verificare la presenza di fasi cristalline nei campioni, nucleate in seguito ai trattamenti termici a cui sono stati sottoposti.

In figura **Figura 5.1** è rappresentato lo spettro di diffrazione ottenuto per lo scaffold macroporoso a base di vetro 1d trattato termicamente a 750°C per 3 h in forno. In accordo con l'analisi termica

differenziale (DTA) svolta dal gruppo di Kansal *et al* [190] che ha evidenziato una temperatura di inizio cristallizzazione (T_C) pari a 804 ± 2°C, lo spettro risultate è caratterizzato dalla presenza di una curva che descrive un "alone amorfo" compreso tra 22° e 38°. Questo andamento, tipico dei solidi amorfi, conferma la natura vetrosa del materiale. Il range angolare di giacitura dell'alone è quello tipico dei vetri silicati.



Figura 5.1: Spettro di diffrazione relativo allo scaffold poroso a base di vetro 1d sinterizzato a 750°C

Al contrario, nel caso dello scaffold sinterizzato ad 800°C per 3h e sottoposto ad un ulteriore ciclo di sola immersione nello "slurry", è stato ottenuto un materiale vetroceramico. In questo caso l'analisi qualitativa del diffrattogramma XRD mostrata in **Figura 5.2**, ha evidenziato la cristallizzazione di diopside (CaMgSi₂O₆) e fluorapatitie [Ca₅(PO₄)₃F]. La diopside è risultata essere la principale fase cristallina contenuta all'interno del materiale, come manifestato dall'intensità dei picchi dello spettro riportato. Anche questo risultato si dimostra in linea con quanto atteso rispetto alle analisi condotte da Kansal *et al* [190], essendo la temperatura di trattamento termico prossimo a T_C .



Figura 5.2: Spettro di diffrazione relativo allo scaffold poroso a base di vetro 1d sinterizzato a 800°C

5.1.2 Microscopia a scansione elettronica (SEM) e Spettroscopia a dispersione di energia (EDS)

Gli scaffold porosi a base di vetro 1d sono stati analizzati attraverso microscopio SEM con l'intento di esaminarne la morfologia e condurre valutazioni qualitative circa la natura del materiale (amorfo o semicristallino). Contemporaneamente sono state condotte analisi EDS al fine di verificare che la composizione elementare teorica dei campioni corrisponda a quella realmente ottenuta in seguito ai processi di fabbricazione eseguiti.

La Figura 5.3 mostra la micrografia SEM della superficie del campione sinterizzato a 750°C a diversi livelli d'ingrandimento ed il corrispettivo spettro EDS. Dalle immagini (Figura 5.3 A) si può osservare un'architettura trabecolare porosa esibita dallo scaffold che riproduce quella dell'osso spongioso/alveolare, con una buona interconnessione tra i pori. Inoltre, è possibile stabilire visivamente che il diametro dei pori rientra nell'intervallo di dimensioni 10-500 µm, rendendo il materiale potenzialmente idoneo per applicazioni di rigenerazione dell'osso alveolare. Rispetto alla superficie del campione sinterizzato a 800°C, la superficie dello scaffold trattato a 750°C (Figura 5.3 B) appare più liscia ed omogenea, indicando da un lato la corretta riuscita del processo di sinterizzazione con rimozione delle porosità interstiziali, dall'altro la natura amorfa del vetro con assenza di fenomeni di cristallizzazione, come anche confermato dalle analisi XRD precedentemente descritte. Lo spettro EDS evidenzia i picchi degli elementi che compongono il materiale, in accordo con la composizione del vetro 1d. Tuttavia, non è stato possibile effettuare un'analisi quantitativa affidabile a causa di un processo di metallizzazione non ottimale.



Figura 5.3: Immagini SEM di scaffold porosi sinterizzati a 750°C ottenute ad ingrandimenti differenti e spettrografia EDS

Le immagini degli scaffold sinterizzati ad 800°C sono rappresentate in **Figura 5.4**. Anche in questo caso è possibile osservare una struttura organizzata in trabecole, che rispecchia la morfologia naturale del tessuto osseo spongioso. Inoltre, lo scaffold presenta una buona interconnettività tridimensionale dei pori ben visibile in **Figura 5.4 A**, caratteristica fondamentale per l'impiantabilità *in vivo* al fine di stimolare la migrazione cellulare, la crescita di nuovo tessuto e il trasporto/fuoriuscita dei prodotti di scarto. A differenza dei campioni sinterizzati alla temperatura di 750°C, La **Figura 5.4 B** mostra una superficie rugosa dello scaffold legata alla nucleazione di fasi cristalline, diopside e fluorapatite, sviluppatesi durante il trattamento termico, dimostrando la natura vetroceramica dello scaffold anche in questo caso confermata dall'analisi XRD. Per quanto riguarda la spettroscopia EDS, valgono le stesse considerazioni proposte per il campione descritto in precedenza.



Figura 5.4: Immagini SEM di scaffold porosi sinterizzati a 800°C ottenute ad ingrandimenti differenti e spettrografia EDS

5.1.3 Test di bioattività

Gli scaffold porosi a base di vetro 1d sinterizzati ad 800°C sono stati monitorati dopo l'immersione in SBF rispettivamente per 48 h, 7 gg e 14 gg, con l'intento di valutarne le proprietà bioattivite e l'evoluzione della morfologia superficiale. La **Figura 5.5** mostra le immagini ottenute tramite micrografia SEM relative ai campioni estratti dall'SBF dopo 48 h a tre diversi livelli di ingrandimento. Dalle immagini (**Figura 5.5 A, B**) è possibile osservare che la superficie dello scaffold appare ricoperta da uno strato di gel di silice, con le tipiche crepe dovute all'asciugatura del campione, in cui sono già visibili aggregati di fosfato di calcio. Questo aspetto è confermato dalla **Figura 5.5 C** ad ingrandimenti maggiori, in cui si nota la formazione dello strato di HA/HCA sotto forma di nanostrutture globulari. [203].



Figura 5.5: Micrografica SEM di scaffold sinterizzati ad 800°C dopo immersione in SBF per un periodo di 48h a tre diversi livelli di ingrandimento

I test di bioattività *in vitro* dopo una e due settimane di immersione in SBF (**Figura 5.6**) rivelano una notevole abilità di formazione di apatite sulla superficie del campione, nonostante la devetrificazione avvenuta durante la sinterizzazione potesse teoricamente rallentare in modo importante questo

fenomeno, come anche riportato in letteratura[35]. Dopo una settimana (Figura 5.6 A, B), la superficie dello scaffold appare ancora ricoperta da uno strato di gel di silice fessurato, con una geometria dei cristalli di idrossiapatite analoga a quella analizzata nel caso precedente.

Nel caso relativo al periodo d'immersione più lungo (**Figura 5.6 C, D**), invece, le trabecole dello scaffold risultano completamente ricoperte da uno strato omogeneo di nanocristalli globulari, tipico della crescita di idrossiapatite *in vitro*. Questa tendenza suggerisce la continua evoluzione dello strato di reazione come risultato dello scambio ionico tra superficie dello scaffold ed SBF, come anche osservato da Baino *et al* nello sviluppo di scaffold porosi per applicazioni di ingegneria tissutale del tessuto osseo[203].



Figura 5.6: Micrografica SEM di scaffold sinterizzati ad 800°C dopo immersione in SBF per un una settimana (A, B) e due settimane (C, D) a diversi livelli di ingrandimento

La composizione dello strato di HA sulla superfice degli scaffold è stata valutata attraverso spettroscopia EDS (**Figura 5.7**) rivelando rapporti Ca/P (at.%) pari ad 1,78 per i campioni estratti dopo 48h dall'SBF e 1,50 per quelli estratti dopo una settimana, evidenziando una fluttuazione accettabile nell'intorno del rapporto Ca/P relativo all'idrossiapatite stechiometrica (1.67). La formazione di HA deficitaria in Ca (Ca/P < 1.67) sulla superficie di vetri e vetroceramici bioattivi durante immersione in SBF si riscontra piuttosto comune in letteratura [129][204]. Per i campioni relativi al periodo d'immersione più lungo, invece, è stato riscontrato un valore anomalo di tale

rapporto (Ca/P > 2.6), che potrebbe essere legato ad un errore strumentale dovuto ad una metallizzazione non ottimale. Inoltre, è stata rilevata anche una netta diminuzione dell'intensità del picco del Si per i campioni estratti dopo una settimana dall'SBF, confermando che la superfice dello scaffold è stata completamente ricoperta da un sottile strato di idrossiapatite globulare che "maschera" il gel di silice sottostante.



Figura 5.7: A sinistra, analisi EDS relativa ai campioni estratti dopo 48 h d'immersione in SBF; a destra, analisi EDS relativa ai campioni estratti dopo una settimana d'immersione in SBF

5.1.4 Test meccanici di compressione

I test meccanici di compressione sono stati eseguiti su scaffold cubici sinterizzati ad 800°C per 3h (con ciclo aggiuntivo di sola immersione) ed opportunamente rettificati al fine di evitare il disallineamento con i piatti di carico, fenomeno che potrebbe condurre ad una scorretta valutazione dei carichi applicati. Le dimensioni dei campioni sono riportate in **Tabella 5.1**. Gli scaffold prodotti attraverso il metodo della spugna polimerica sono morfologicamente molto simili all'architettura dell'osso spongioso. Per questo motivo, è di particolare importanza valutare se le proprietà meccaniche dei campioni siano confrontabili o meno con quelle del tessuto d'osso spongioso (alveolare).

Nome campione	Altezza (mm)	Larghezza (mm)	Spessore (mm)	Area (mm²)
1A	5,01	4,96	5,72	28,37
2A	4,75	5,44	6,22	33,84
3A	5,37	5,01	4,84	24,25
1B	4,88	5,53	5,39	29,81
2B	4,88	6,04	5,42	32,74
3B	5,09	5,28	5,58	29,46

Tabella 5.1: Dimensioni degli scaffe	old utilizzati per la	valutazione delle	caratteristiche	meccaniche
- as end ever 2 meension acguised		, manual one wente		

In **Figura 5.8** sono raffigurate le curve sforzo-deformazioni ottenute per i 6 campioni analizzati. Si noti come tutte le curve presentino un profilo seghettato riconducibile al progressivo cedimento delle trabecole degli scaffold, il cui andamento può essere descritto attraverso tre stage fondamentali in accordo con quanto precedentemente definito da Chen *et al* [205].

Inizialmente, nei siti dove i carichi sono maggiormente concentrati, le trabecole più sottili e meno resistenti tendono a fratturarsi provocando una diminuzione temporanea degli sforzi apparenti registrati. Tuttavia la struttura, nel suo complesso, è ancora in grado di resistere all'applicazione di carichi di maggior intensità, provocando un ulteriore risalita della curva e quindi un aumento delle sollecitazioni registrate. La ripetizione di questo comportamento, tipico dei materiali ceramici porosi, porta alla formazione di una curva sforzo-deformazione con un profilo frastagliato in corrispondenza della frattura progressiva delle varie trabecole. Quando anche le trabecole più spesse si fratturano, la curva manifesta un crollo netto che coincide con il collasso della struttura del materiale

Facendo riferimento, ad esempio, al grafico del campione 2A il primo tratto della curva presenta un andamento crescente e positivo fino al raggiungimento di un valore di picco pari a 13,8 MPa. L'intensità di questo sforzo causa la frattura dei piani trabecolari di cui è formato lo scaffold, portando ad un successivo ed evidente andamento negativo della curva all'aumentare delle deformazioni. Come ultima fase, si verifica una densificazione delle polveri vetrose per effetto delle progressive fratture evidenziata da un ulteriore incremento dei valori d'intensità degli sforzi, prima del cedimento finale dello scaffold. Un andamento simile è visibile anche nel campione 3B con sforzi di picco che raggiungono valori di 23 MPa.

In media, la resistenza alla compressione ed il modulo elastico degli scaffold, rispettivamente di 29,7 MPa (dev. standard 14.9 MPa) e 1,4 GPa (dev. standard 0.8 GPa), risultano superiori rispetto agli intervalli di riferimento considerati per l'osso trabecolare umano (1-20 MPa e 50-500 MPa[13][206]). Ciò potrebbe essere spiegato in riferimento alla diminuzione della porosità media in seguito alla rettificazione (48% invece che 68%). È possibile, infatti, che gli strati superficiali degli scaffold, rimossi attraverso questa procedura, fossero maggiormente porosi rispetto al nucleo della struttura portando ad una riduzione complessiva della porosità e, di conseguenza, ad una maggiore resistenza meccanica.









Figura 5.8: Curve sforzo-deformazione degli scaffold porosi a base di vetro 1d sottoposti a prove di compressione meccanica

5.2 Vetri sol-gel

5.2.1 Diffrattometria a raggi X (XRD)

Per quanto riguarda le analisi condotte sulle polveri vetrose appartenenti al sistema binario SiO₂-CaO drogate rispettivamente con il 2% ed il 5% di litio (mol%), i diffrattogrammi sono mostrati in **Figura 5.9** e **5.10**. I risultati ottenuti per le polveri a basso contenuti di litio ($60SiO_2$ -38CaO- $2Li_2O$ (mol%)) possono essere commentati facendo un confronto con il sistema binario $60SiO_2$ -40CaO sintetizzato precedentemente dal gruppo di Baino *et al* ed utilizzato, in questo caso, come controllo[191]. Come mostrato dal grafico è possibile dedurre che aggiungendo piccole percentuali di agente dopante (ossido di litio) all'interno della composizione del materiale non viene alterata la natura vetrosa del sistema binario di base (60S40C) né favorita la nucleazione di fasi cristalline indotta dai trattamenti termici. Il processo di calcinazione eseguito a $700^{\circ}C$, infatti, non ha portato alla formazione di alcuna fase cristallina all'interno della matrice vetrosa, come dimostrato dalla presenza del solo alone amorfo compreso tra 25 e $35^{\circ}C$ tipico dei vetri silicati. Ciò è in accordo con studi precedenti sul sistema 60S40C, per il quale l'analisi DTA ha rilevato una T_c pari ad $850^{\circ}C$, molto al di sopra della temperatura di calcinazione ($700^{\circ}C$) [191].



Figura 5.9: Spettro di diffrazione relativo al sistema 60SiO₂-38CaO-2Li₂O (mol%) con alone amorfo compreso tra 25 e 35°C

Diversamente da quanto appena detto, aumentando il tenore di litio all'intero della matrice vetrosa (sistema $60SiO_2$ -35CaO- $5Li_2O$ (mol%)) si influenzano i processi di devetrificazione e la cinetica di cristallizzazione del materiale, portando alla nucleazione ed all'accrescimento di strutture cristalline. Di conseguenza, i risultati mostrano come la natura amorfa del vetro non sia più preservata a discapito della formazione di un materiale vetroceramico contenente wollastonite (CaSiO₃) come principale fase cristallina. Il ruolo degli ioni litio nel determinare la devetrificazione di una matrice vetrosa è stato precedentemente investigato da Miguez-Pacheco *et al* e da Moghanian *et al* [207][208]. In entrambi i casi, in cui sono stati sintetizzati vetri bioattivi drogati con percentuali variabili di ioni litio, è stato apprezzato che un incremento di questi ioni nella composizione del vetro genera una diminuzione delle temperature caratteristiche (inclusa T_C) rispetto al materiale di partenza. Questo

potrebbe dimostrare come la nucleazione di wollastonite nelle polveri sol-gel sia legata ad un abbassamento della temperatura di inizio cristallizzazione al di sotto della temperatura impostata per la calcinazione (700°C).



Figura 5.10: Spettro di diffrazione relativo al sistema 60SiO2-35CaO-5Li2O (mol%)

5.2.2 Analisi BET

L'analisi BET è stata eseguita sulle polveri vetrose sol-gel appartenenti ai sistemi 60SiO₂-35CaO-5Li₂O (mol%) e 60SiO₂-38CaO-2Li₂O (mol%), calcinate a 700°C per 3h in aria. L'obiettivo di questa prova è quello effettuare indagini sulla tessitura nanoporosa delle polveri come risultato del processo di sintesi sol-gel. Queste proprietà vengono valutate a partire dall'analisi di curve isoterme derivanti dall'adsorbimento e dal desorbimento di azoto sulle pareti dei pori del materiale a differenti valori di pressione relativa. Inoltre, è stata calcolata anche la distribuzione della dimensione dei pori dei due sistemi facendo riferimento al braccio di desorbimento della curva isoterma.

L'andamento dei rami di adsorbimento e desorbimento genera un cappio di isteresi che può essere analizzato attraverso la classificazione IUPAC (**Tabella 5.2**). La forma del cappio dà un'indicazione sulla geometria dei pori del materiale.

Tabella 5.2: Classificazione IUPAC che mette in relazione la forma del cappio di isteresi con la struttura dei pori

Forma	del	cappio	di	Struttura dei pori
isteresi				
H1				Materiali porosi costituiti da agglomerati con una distribuzione stretta della
				dimensione dei pori
				-

H2	Materiali porosi (ad esempio vetri porosi e gel di ossidi inorganici) con pori di dimensione e forma non ben definita
НЗ	Aggregati di particele in forma di lastre con porosità a fessura
H4	Materiali con pori stretti a fessura o materiali microporosi con isoterma di tipo I

Il profilo delle isoterme, invece, viene valutato per mezzo della classificazione proposta da Stafford *et al* che individua sei differenti tipologie di curve[209] (**Figura 5.11**[210]):

- Tipo I: in genere riferito a solidi microporosi con ridotta superfice esterna, caratterizzati da una concavità rispetto all'asse P/P_0 e con comportamento asintotico per $P/P_0 \rightarrow 1$
- Tipo II: di solito riferito a materiali macroporosi o non porosi. Il punto B in **Figura 5.11** indica il termine della formazione del primo monostrato di particelle di gas adsorbito. Dal punto B in poi ha inizio l'adsorbimento multistrato.
- Tipo III: tipologia non comune. In questo caso la curva è caratterizzata da una convessità rispetto all'asse P/P₀ lungo l'intero intervallo di estensione e non è possibile distinguere il punto B.
- Tipo IV: di solito riferito ad adsorbenti mesoporosi. Sono caratterizzati dalla presenza di un cappio d'isteresi generato per condensazione capillare che si verifica all'interno della struttura mesoporosa. Il tratto iniziale della curva è associato all'adsorbimento monostrato-multistrato e presenta analogie con le curve di tipo II
- Tipo V: tipologia non comune. In genere è associato ad adsorbenti porosi in cui l'interazione adsorbente-adsorbato è debole.
- Tipo VI: caratterizzato da un andamento multi-gradino dove la forma di ogni gradino dipende dalla temperatura e dalle caratteristiche del sistema.



Figura 5.11: A sinistra è rappresentata la classificazione proposta da Stafford *et al*; a destra la classificazione IUPAC[210]

I grafici dell'isoterma di adsorbimento-desorbimento di azoto e della distribuzione delle dimensioni dei pori delle polveri vetrose appartenenti al sistema 60SiO₂-35CaO-5Li₂O (mol%) sono raffigurati in **Figura 5.12**. In accordo con la classificazione sul profilo dell'isoterma appena introdotto, la curva può essere classificata come un'isoterma di tipo IV in cui al primo tratto è associato l'assorbimento del monostrato di particelle di gas di azoto, con successiva formazione di multistrati sovrapposti all'aumentare della pressione. Considerando la classificazione IUPAC, la curva esibisce un profilo del cappio d'isteresi di tipo H2 riconducibile ad una natura mesoporosa del materiale, i cui pori manifestano una forma indefinita. Le proprietà mesoporose del materiale sono state confermate dall'analisi sulla distribuzione delle dimensioni dei pori, aventi un diametro medio di 20,06 nm conforme con il range caratteristico dei materiali mesoporosi (2-50 nm). Il volume dei pori calcolato per le polveri è pari a 0,0708 cm³/g. Tuttavia, l'area specifica superficiale risulta di 9,7807 m²/g, un valore notevolmente più basso se confrontato con quello del sistema binario 60SiO₂-40CaO utilizzato come controllo (119.4 m²/g)[191]. Questo decremento potrebbe essere collegato con l'aggiunta di ioni litio: infatti, come osservato in precedenti lavori, l'introduzione di modificatori di reticolo nei vetri sol-gel causa una riduzione dell'area superficiale e del volume associato ai pori [211][212].



Figura 5.12: In alto, la curva isoterma di adsorbimento-desorbimento di azoto delle polveri di vetro solgel drogate con il 5%(mol) di litio; in basso, la distribuzione delle dimensioni dei pori dello stesso sistema

Diametro dei pori (nm)

Le stesse analisi, riportate in **Figura 5.13**, sono state condotte per il sistema $60SiO_2$ -38CaO-2Li₂O (mol%) di polveri vetrose. Anche in questo caso, il profilo dell'isoterma di adsorbimento-

desorbimento di azoto è classificabile come un tipo IV ed il cappio di isteresi come un tipo H2, con le medesime considerazioni riportate per il sistema precedente. Il grafico relativo alla distribuzione delle dimensioni dei pori presenta un profilo più stretto rispetto a quello delle polveri drogate al 5%, con un diametro medio di 37,13 nm e quindi in linea con le proprietà tessiturali dei materiali mesoporosi. In questo caso il volume dei pori risulta di 0,518 cm³/g. L'area superficiale misurata è pari a 56,4016 m²/g; questo valore è in linea con quello ottenuto dopando il sistema 60S40C con 2 mol% di ferro (60SiO₂-38CaO-2Fe (mol%)) [191].



I parametri tessiturali dei due sistemi sono riportanti nella Tabella 5.3.

Figura 5.13: In alto, la curva isoterma di adsorbimento-desorbimento di azoto delle polveri di vetro solgel drogate con il 2%(mol) di litio; in basso, la distribuzione delle dimensioni dei pori dello stesso sistema

Tabella 5.3: Parametri tessiturali ottenuti per i materiali sol-gel calcinati attraverso analisi di adsorbimento-desorbimento di azoto.

Sistema (mol%)	Area superficiale specifica (m²/g)	Volume dei pori (cm ³ /g)	Diametro medio dei pori (nm)
60SiO ₂ -35CaO-5Li ₂ O	9,7807	0,0708	20,06
60SiO ₂ -38CaO-2Li ₂ O	56,4016	0,5187	37,13

Capitolo 6

Conclusioni

I vetri e vetroceramici bioattivi, grazie a proprietà di osteoconduttività /osteoinduttività si presentano come degli ottimi strumenti in grado di formare legami chimici con l'osseo alveolare e stimolare lo sviluppo di reazioni biologiche positive all'interfaccia tra tessuto e materiale. Queste peculiarità li rendono candidati ideali per il trattamento dell'ipersensibilità dentinale, delle patologie periodontali e per la rigenerazione del tessuto osseo alveolare. Quest'ultimo aspetto è di particolare importanza per il settore dell'implantologia dentale in quanto esistono categorie di pazienti che, per natura, sono sprovviste di una quantità e qualità di tessuto osseo sufficienti per l'inserimento ed il corretto ancoraggio di impianti dentali[34][148].

Inoltre, è noto che inglobando ioni terapeutici all'interno della matrice dei vetri e vetroceramici bioattivi è possibile influenzare la risposta biologica delle cellule periodontali e stimolare la formazione di nuovo tessuto. In tal senso, l'incorporazione di ioni litio (Li^+) in scaffold mesoporosi bioattivi ha evidenziato la stimolazione dei processi di proliferazione delle cellule del legamento periodontale e differenziamento verso il fenotipo cementogenico, attraverso l'espressione di geni associati al processo della cementogenesi (*cementum protein 1*, CEMP1 e *cementum attachment protein*, CAP) [88] [91].

Sulla base di queste considerazioni, l'attività sperimentale del presente lavoro di tesi è stata incentrata sulla produzione e la caratterizzazione di scaffold porosi e biomateriali in forma di polvere da utilizzare per applicazioni di odontoiatria rigenerativa.

Gli scaffold a base di vetro 1d (CaO–MgO–SiO₂–P₂O₅–Na₂O–CaF₂) sono stati realizzati attraverso il metodo della spugna polimerica utilizzando template porosi in poliuretano sottoposti a cicli di immersione/compressione all'interno dello slurry e sinterizzati a temperature differenti (750°C e 800°C con plateau a 400°C) al fine di ottenere sia materiali amorfi che semicristallini. In particolare, dalla sinterizzazione ad 800°C sia con che senza plateau aggiuntivo, l'analisi XRD ha evidenziato la nucleazione di diopside e fluorapatitie come principali fasi cristalline all'interno del materiale mentre nel caso dei campioni sinterizzati a 750°C l'analisi mostra uno spettro caratterizzato dalla presenza di un alone amorfo, tipico dei vetri silicati, confermando la natura vetrosa del materiale. Entrambi i risultati sono in accordo con le analisi DTA precedentemente eseguite da Kansal *et al* [190] che rivelano una T_C di circa 804°C.

La micrografia SEM eseguita sui campioni mostra, in tutti i casi, un'architettura trabecolare che ben riproduce la morfologia dell'osso alveolare, oltre ad una buona interconnessione tra i pori il cui diametro rientra nell'intervallo di dimensioni 10-500 μ m, rendendo perciò i materiali potenzialmente idonei per applicazioni di rigenerazione del tessuto osseo trabecolare.

Le proprietà meccaniche sono state valutate sottoponendo gli scaffold sinterizzati ad 800°C (con ciclo aggiuntivo di sola immersione) a prove di compressione meccanica, registrando valori medi di modulo elastico e resistenza alla compressione rispettivamente pari a 29,7 MPa e 1,4 GPa che risultano superiori rispetto agli intervalli di riferimento considerati per l'osso trabecolare umano (1-20 MPa e 50-500 MPa[13][206]). Ciò potrebbe essere spiegato in riferimento alla diminuzione della porosità media in seguito ai processi di rettificazione, necessari per una corretta esecuzione dei test meccanici (48% invece che 68%).

Ai fini di valutare le proprietà di bioattività, gli scaffold (800°C) sono stati immersi in SBF per 48 h, 7 gg e 14 gg e successivamente sottoposti ad analisi SEM-EDS con l'intento di esaminare l'evoluzione della morfologia superficiale. Già dopo 48 h di immersione è stata osservata la formazione di uno strato di HA, confermando l'eccellete bioattività *in vitro* del materiale. Questo aspetto appare maggiormente evidente per i campioni relativi ai periodi di immersione più lunghi, le cui trabecole risultano ricoperte in maniera omogenea da nanocristalli globulari di HA. Le indagini di spettroscopia EDS hanno permesso di valutare la composizione dello strato di HA attraverso il calcolo dei rapporti Ca/P. Questi valori (1,78 per i campioni estratti dopo 48 h dall'SBF e 1,50 per quelli estratti dopo una settimana) hanno evidenziato una fluttuazione accettabile nell'intorno del rapporto Ca/P relativo all'idrossiapatite stechiometrica (1.67).

Parallelamente, polveri vetrose appartenenti al sistema binario di base SiO₂-CaO sono state ottenute attraverso sintesi *sol-gel* (calcinazione a 700°C per 3 h) e drogate con il 2% e 5% di litio al fine di realizzare due sistemi ternari distinti (60SiO₂-35CaO-5Li₂O e 60SiO₂-38CaO-2Li₂O in mol%).

Le proprietà della tessitura nanoporosa delle polveri, indagate attraverso analisi di adsorbimentodesorbimento di azoto, hanno confermato per entrambe le composizioni un diametro medio contenuto nell'intervallo caratteristico die materiali mesoporosi (2-50 nm). È stato osservato che rispetto al sistema genitore, il valore dell'area superficiale specifica diminuisce all'aumentare del tenore di Li contenuto nel materiale.

I diffrattogrammi ottenuti da analisi XRD hanno evidenziato la natura vetrosa del sistema al 2% di litio, in linea con quanto atteso, mentre le polveri ad alto contenuto di tale agente drogante hanno esibito picchi di diffrazione tipici dei materiali semi-cristallini contenenti wollastonite, nonostante la temperatura di calcinazione impostata fosse inferiore rispetto alla Tc del vetro genitore (850°C). Infatti, la presenza di quantità elevate di questi ioni nella composizione dei vetri genera una diminuzione di ciascuna temperatura caratteristica rispetto al materiale di partenza [207][208].

Sulla base dei risultati ottenuti possiamo affermare che sono stati ottenuti scaffold porosi con evidenti proprietà bioattive che ben riproducono la morfologia dell'osso trabecolare e polveri vetrose con caratteristiche di tessitura nanoporosa confrontabili con quelle dei materiali mesoporosi, con potenziali applicazioni nell'ambito dentale.

Ulteriori obiettivi degni di approfondimento potrebbero riguardare l'ottimizzazione della morfologia degli scaffold e il loro impatto in ambiente biologico, attraverso studi rivolti a:

- Valutare la citotossicità delle polveri contenti ioni litio conducendo test cellulari in vitro;
- Migliorare i processi di impregnazione degli scaffold per incrementare il valore di porosità totale fino ad almeno il 50% in volume (condizione necessaria per l'impiantabilità *in vivo*);
- Condurre analisi ICP-MS (*Inductively coupled plasma mass spectrometry*) per determinare il rilascio di ioni litio nei fluidi biologici in modo da monitorare la cinetica del rilascio per il tempo necessario alla completa rigenerazione dei tessuti
- Effettuare prove micro-tomografiche (Micro-CT) per valutare in maniera significativa la presenza di eterogeneità all'interno dei campioni.

Bibliografia

- [1] "Dente," [Online]. Available: https://it.wikipedia.org/wiki/Dente.
- [2] S. Pierantoni, "Anatomia del dente," [Online]. Available: http://www.studiodentisticopietrantoni.it/anatomia-odontoiatrica/il-dente/.
- [3] A. Goldberg, M., Kulkarni, A.B., Young, M., Boskey, "Dentin: structure, Composition and Mineralization: the role of dentin ECM in dentin formation and mineralization," *Front. Biosci. Ed.*, vol. 3, p. 711, 2011.
- [4] Moradian-Oldak J., "Protein-mediated enamel mineralization," *Front. Biosci.*, vol. 17, p. 1996, 2012.
- [5] C. Pujia, A., Calabrese, "Lo smalto e le reazioni di acidificazione," *Attual. Odontostomatol.*, vol. 2, pp. 17–23, 2008.
- [6] P. Amrollahi, B. Shah, A. Seifi, and L. Tayebi, "Recent advancements in regenerative dentistry: A review," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 69, pp. 1383–1390, 2016, doi: 10.1016/j.msec.2016.08.045.
- [7] F.-Z. Cui and J. Ge, "New observations of the hierarchical structure of human enamel, from nanoscale to microscale," J. Tissue Eng. Regen. Med., vol. 1, no. 3, pp. 185–191, May 2007, doi: 10.1002/term.21.
- [8] E. Abou Neel *et al.*, "Demineralization–remineralization dynamics in teeth and bone," *Int. J. Nanomedicine*, vol. Volume 11, pp. 4743–4763, Sep. 2016, doi: 10.2147/IJN.S107624.
- [9] V. Uskoković and L. E. Bertassoni, "Nanotechnology in dental sciences: Moving towards a finer way of doing dentistry," *Materials (Basel).*, vol. 3, no. 3, pp. 1674–1691, 2010, doi: 10.3390/ma3031674.
- [10] F. Duchini, "Tesi di Laurea: 'Ipersensibilità dentinale: due metodiche terapeutiche a confronto'." 2015.
- [11] "Smalto(odontoiatria)," [Online]. Available: https://it.wikipedia.org/wiki/Smalto_(odontoiatria).
- [12] Q. Ruan, Y. Zhang, X. Yang, S. Nutt, and J. Moradian-Oldak, "An amelogenin-chitosan matrix promotes assembly of an enamel-like layer with a dense interface," *Acta Biomater.*, vol. 9, no. 7, pp. 7289–7297, 2013, doi: 10.1016/j.actbio.2013.04.004.
- [13] A. Talal, S. K. Hamid, M. Khan, and A. S. Khan, "Structure of biological apatite," in *Handbook of Ionic Substituted Hydroxyapatites*, Elsevier, 2020, pp. 1–19.
- [14] M. Song et al., "Clinical and Molecular Perspectives of Reparative Dentin Formation: Lessons Learned from Pulp-Capping Materials and the Emerging Roles of Calcium," Dent. Clin. North Am., vol. 61, no. 1, pp. 93–110, 2017, doi: 10.1016/j.cden.2016.08.008.
- [15] A. Mazzoni *et al.*, "A review of the nature, role, and function of dentin non-collagenous proteins. Part II: enzymes, serum proteins, and growth factors," *Endod. Top.*, vol. 21, no. 1, pp. 19–40, Sep. 2009, doi: 10.1111/j.1601-1546.2012.00268.x.
- [16] J. Jakiel, A. Szyszkowska, M. Malicka, M. Rahnama, and L. Dawidowicz, "Evaluation of dentinal tubules of dentin of the roots of necrotic teeth by means of scanning electron microscope," *Polish Ann. Med.*, vol. 24, no. 1, pp. 36–42, Feb. 2017, doi:

10.1016/j.poamed.2016.11.016.

- [17] M. Goldberg, A. B. Kulkarni, M. Young, and A. Boskey, "Dentin: structure, composition and mineralization.," *Front. Biosci. (Elite Ed).*, vol. 3, pp. 711–35, Jan. 2011, doi: 10.2741/e281.
- [18] . Khan, Abdul Samad and Chaudhry, Aqif Anwar, *Handbook of Ionic Substituded Hydroxyapatites*. Woodhead Publishing, 2019.
- [19] B. Hashemi-Beni, M. Khoroushi, M. R. Foroughi, S. Karbasi, and A. A. Khademi, "Tissue engineering: Dentin – pulp complex regeneration approaches (A review)," *Tissue Cell*, vol. 49, no. 5, pp. 552–564, Oct. 2017, doi: 10.1016/j.tice.2017.07.002.
- [20] C. Yu and P. Abbott, "An overview of the dental pulp: its functions and responses to injury," *Aust. Dent. J.*, vol. 52, pp. S4–S6, Mar. 2007, doi: 10.1111/j.1834-7819.2007.tb00525.x.
- [21] "Malattia Parodontale," [Online]. Available: https://www.drgrech.it/articoli/sedazione-cosciente-2/.
- [22] E. Cataneo, "Parodontologia," [Online]. Available: https://www.studioenricocataneo.it/servizi/parodontologia.html.
- [23] C. R. Silva, M. Gomez-Florit, P. S. Babo, R. L. Reis, and M. E. Gomes, *3D Functional scaffolds for dental tissue engineering*. Elsevier Ltd, 2017.
- [24] A. Nanci and D. D. Bosshardt, "Structure of periodontal tissues in health and disease," *Periodontol. 2000*, vol. 40, pp. 11–28, 2006.
- [25] I. Fantigrossi, "Tesi di Laurea: SVILUPPO E CARATTERIZZAZIONE DI MATERIALI BIOMIMETICI E BIOATTIVI PER LA RIGENERAZIONE DENTALE," 2015.
- [26] "Osso Alveolare," [Online]. Available: https://it.wikipedia.org/wiki/Osso_alveolare.
- [27] "La Parodontite: cos'è e quali sono i sintomi principali," [Online]. Available: https://www.gengive.org/2019/10/22/la-parodontitte-cose-e-quali-sono-i-sintomiprincipali/?gclid=Cj0KCQjwuL_8BRCXARIsAGiC51D1ROlj5h8toCr4-hOBFzb-XehwTFQy3g9l7B21ROmpCqSrssYnUI8aAj_AEALw_wcB.
- [28] "Gengiva," [Online]. Available: https://it.wikipedia.org/wiki/Gengiva.
- [29] J. Crossman, M. Elyasi, T. El-Bialy, and C. Flores Mir, "Cementum regeneration using stem cells in the dog model: A systematic review," *Arch. Oral Biol.*, vol. 91, pp. 78–90, Jul. 2018, doi: 10.1016/j.archoralbio.2018.04.001.
- [30] Y. Kozawa, H. Chisaka, Y. Iwasa, R. Yokota, K. Suzuki, and H. Yamamoto, "Origin and Evolution of Cementum as Tooth Attachment Complex," *J. Oral Biosci.*, vol. 47, no. 1, pp. 25–32, Jan. 2005, doi: 10.1016/S1349-0079(05)80005-2.
- [31] E. Matalová, V. Lungová, and P. Sharpe, "Development of Tooth and Associated Structures," in *Stem Cell Biology and Tissue Engineering in Dental Sciences*, Elsevier, 2015, pp. 335–346.
- [32] Y. Oshida, E. B. Tuna, O. Aktören, and K. Gençay, "Dental implant systems," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 11, no. 4, pp. 1580–1678, 2010, doi: 10.3390/ijms11041580.
- [33] F. Baino and C. Vitale-Brovarone, *Bioactive glass and glass-ceramic foam scaffolds for bone tissue restoration*. Woodhead Publishing Limited, 2014.
- [34] M. Montazerian and E. D. Zanotto, "Bioactive and inert dental glass-ceramics," J. Biomed.

Mater. Res. - Part A, vol. 105, no. 2, pp. 619–639, 2017, doi: 10.1002/jbm.a.35923.

- [35] G. Kaur, O. P. Pandey, K. Singh, D. Homa, B. Scott, and G. Pickrell, "A review of bioactive glasses: Their structure, properties, fabrication and apatite formation," *J. Biomed. Mater. Res. Part A*, vol. 102, no. 1, pp. 254–274, 2014, doi: 10.1002/jbm.a.34690.
- [36] A. Griguolo, "Impianti dentali," [Online]. Available: https://www.mypersonaltrainer.it/salute-benessere/impianti-dentali.html.
- [37] E. Bressan *et al.*, "Nanostructured Surfaces of Dental Implants," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 14, no. 1, pp. 1918–1931, Jan. 2013, doi: 10.3390/ijms14011918.
- [38] A. Palmquist, O. M. Omar, M. Esposito, J. Lausmaa, and P. Thomsen, "Titanium oral implants: surface characteristics, interface biology and clinical outcome," J. R. Soc. Interface, vol. 7, no. suppl_5, Oct. 2010, doi: 10.1098/rsif.2010.0118.focus.
- [39] A. B. Novaes Jr, S. L. S. de Souza, R. R. M. de Barros, K. K. Y. Pereira, G. Iezzi, and A. Piattelli, "Influence of implant surfaces on osseointegration," *Braz. Dent. J.*, vol. 21, no. 6, pp. 471–481, 2010, doi: 10.1590/S0103-64402010000600001.
- [40] A. Cumbo, C and Marigo, Luca and Somma, F and La Torre, G and Minciacchi, Irene and D'Addona, "Implant platform switching concept: a literature review," *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, vol. 17, no. 392–397, 2013.
- [41] "Carie," [Online]. Available: https://www.curaseptspa.it/wikisept-carie.php.
- [42] D. Aiello, "Ascesso dentale," [Online]. Available: https://www.studiodentisticoaiello.it/ascesso-dentale/.
- [43] "Implantologia e parodontiti," [Online]. Available: https://implantologi.it/implantologia/implantologia-e-parodontite/.
- [44] F. Luceri, "Ponte dentale," [Online]. Available: https://studioluceri.com/ponte-dentale/.
- [45] "Perimplantite: infezione ad un impianto dentale," [Online]. Available: reesmile.com/implantologia-dentale/perimplantite-infezione-ad-un-impiantodentale/#:~:text=La causa della perimplantite è,dove si annidano i batteri.
- [46] "Perimplantite: definizione, sintomi e cure," [Online]. Available: https://www.zenadent.it/it/blog/implantologia/perimplantite-definizione-sintomi-cure/.
- [47] "MALATTIA PARODONTALE E VALUTAZIONE DELLA PROGRESSIONE," [Online]. Available: https://www.dentalassistance.it/news/malattia-parodontale-e-valutazione-dellaprogressione/.
- [48] N. A. Valente and S. Andreana, "Peri-implant disease : what we know and what we need to know," vol. 46, no. 3, pp. 136–151, 2016.
- [49] L. Le Guéhennec, A. Soueidan, P. Layrolle, and Y. Amouriq, "Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration," *Dent. Mater.*, vol. 23, no. 7, pp. 844–854, Jul. 2007, doi: 10.1016/j.dental.2006.06.025.
- [50] S. Najeeb, Z. K. BDS, S. Z. BDS, and M. S. Z. BDS, "Bioactivity and Osseointegration of PEEK Are Inferior to Those of Titanium: A Systematic Review," *J. Oral Implantol.*, vol. 42, no. 6, pp. 512–516, Dec. 2016, doi: 10.1563/aaid-joi-D-16-00072.
- [51] S. Prasad, M. Ehrensberger, M. P. Gibson, H. Kim, and E. A. Monaco, "Biomaterial properties of titanium in dentistry," *J. Oral Biosci.*, vol. 57, no. 4, pp. 192–199, Nov. 2015,

doi: 10.1016/j.job.2015.08.001.

- [52] X. LIU, P. CHU, and C. DING, "Surface modification of titanium, titanium alloys, and related materials for biomedical applications," *Mater. Sci. Eng. R Reports*, vol. 47, no. 3–4, pp. 49–121, Dec. 2004, doi: 10.1016/j.mser.2004.11.001.
- [53] Z. Khurshid *et al.*, *Titanium*, *zirconia*, *and polyetheretherketone (PEEK) as a dental implant material*. Elsevier Ltd, 2020.
- [54] M. S. Zafar *et al.*, "Properties of dental biomaterials," in *Advanced Dental Biomaterials*, Elsevier, 2019, pp. 7–35.
- [55] R. P. Vitti, A. Catelan, M. Amaral, and R. R. Pacheco, "Zirconium in dentistry," in *Advanced Dental Biomaterials*, Elsevier, 2019, pp. 317–345.
- [56] A. A. Madfa, F. A. Al-Sanabani, N. H. Al-Qudami, J. S. Al-Sanabani, and A. G. Amran, "Use of Zirconia in Dentistry: An Overview," *Open Biomater. J.*, vol. 5, no. 1, pp. 1–7, Jan. 2014, doi: 10.2174/1876502501405010001.
- [57] S. Schultze-Mosgau, H. Schliephake, M. Radespiel-Tröger, and F. W. Neukam,
 "Osseointegration of endodontic endosseous conesZirconium oxide vs titanium," *Oral Surgery, Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endodontology*, vol. 89, no. 1, pp. 91–98, Jan. 2000, doi: 10.1016/S1079-2104(00)80022-0.
- [58] J. Grech and E. Antunes, "Zirconia in dental prosthetics: A literature review," *J. Mater. Res. Technol.*, vol. 8, no. 5, pp. 4956–4964, Sep. 2019, doi: 10.1016/j.jmrt.2019.06.043.
- [59] Z. Khurshid, M. S. Zafar, S. Najeeb, T. Nejatian, and F. Sefat, "Introduction to dental biomaterials and their advances," in *Advanced Dental Biomaterials*, Elsevier, 2019, pp. 1–5.
- [60] S. Najeeb *et al.*, "Dental implants materials and surface treatments," in *Advanced Dental Biomaterials*, Elsevier, 2019, pp. 581–598.
- [61] T. Nejatian *et al.*, "Digital dentistry," in *Advanced Dental Biomaterials*, Elsevier, 2019, pp. 507–540.
- [62] E. Vernè, "Dispense del corso 'Biomateriali e materiali nanostrutturati," 2015.
- [63] Z. ÖZKURT, U. ISERI, and E. KAZAZOGLU, "Zirconia ceramic post systems: a literature review and a case report," *Dent. Mater. J.*, vol. 29, no. 3, pp. 233–245, 2010, doi: 10.4012/dmj.2009-128.
- [64] M. G. Subaşı, N. Demir, Ö. Kara, A. N. Ozturk, and F. Özel, "Mechanical properties of zirconia after different surface treatments and repeated firings," J. Adv. Prosthodont., vol. 6, no. 6, p. 462, 2014, doi: 10.4047/jap.2014.6.6.462.
- [65] K. Sawant and A. Pawar, "Bioactive glass in dentistry: A systematic review," *Saudi J. Oral Sci.*, vol. 7, no. 1, p. 3, 2020, doi: 10.4103/sjos.sjoralsci_56_19.
- [66] G. Kaur *et al.*, "Mechanical properties of bioactive glasses, ceramics, glass-ceramics and composites: State-of-the-art review and future challenges," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 104, no. June, p. 109895, 2019, doi: 10.1016/j.msec.2019.109895.
- [67] M. S. Dahiya, V. K. Tomer, and S. Duhan, *Bioactive glass/glass ceramics for dental applications*. Elsevier Inc., 2018.
- [68] K. Rosenqvist, S. Airaksinen, S. J. Fraser, K. C. Gordon, and A. M. Juppo, "Interaction of bioactive glass with clodronate," *Int. J. Pharm.*, vol. 452, no. 1–2, pp. 102–107, Aug. 2013,

doi: 10.1016/j.ijpharm.2013.04.059.

- [69] K. M. Galler and R. N. D'Souza, "Tissue engineering approaches for regenerative dentistry," *Regen. Med.*, vol. 6, no. 1, pp. 111–124, Jan. 2011, doi: 10.2217/rme.10.86.
- [70] A. Bakopoulou, "Prospects of Advanced Therapy Medicinal Products–Based Therapies in Regenerative Dentistry: Current Status, Comparison with Global Trends in Medicine, and Future Perspectives," J. Endod., vol. 46, no. 9, pp. S175–S188, 2020, doi: 10.1016/j.joen.2020.06.026.
- [71] A. Bagegni, S. Abou-Ayash, G. Rücker, A. Algarny, and W. Att, "The influence of prosthetic material on implant and prosthetic survival of implant-supported fixed complete dentures: a systematic review and meta-analysis," *J. Prosthodont. Res.*, vol. 63, no. 3, pp. 251–265, Jul. 2019, doi: 10.1016/j.jpor.2019.02.001.
- [72] A. Chércoles-Ruiz, A. Sánchez-Torres, and C. Gay-Escoda, "Endodontics, Endodontic Retreatment, and Apical Surgery Versus Tooth Extraction and Implant Placement: A Systematic Review," *J. Endod.*, vol. 43, no. 5, pp. 679–686, May 2017, doi: 10.1016/j.joen.2017.01.004.
- [73] G. Huynh-Ba, P. Kuonen, D. Hofer, J. Schmid, N. P. Lang, and G. E. Salvi, "The effect of periodontal therapy on the survival rate and incidence of complications of multirooted teeth with furcation involvement after an observation period of at least 5 years: a systematic review," *J. Clin. Periodontol.*, vol. 36, no. 2, pp. 164–176, Feb. 2009, doi: 10.1111/j.1600-051X.2008.01358.x.
- S. Morimoto, F. B. W. Rebello de Sampaio, M. M. Braga, N. Sesma, and M. Özcan,
 "Survival Rate of Resin and Ceramic Inlays, Onlays, and Overlays," *J. Dent. Res.*, vol. 95, no. 9, pp. 985–994, Aug. 2016, doi: 10.1177/0022034516652848.
- [75] F. J. Rodríguez-Lozano and J. M. Moraleda, "Use of dental stem cells in regenerative dentistry: A possible alternative," *Transl. Res.*, vol. 158, no. 6, pp. 385–386, Dec. 2011, doi: 10.1016/j.trsl.2011.07.008.
- [76] F. J. Rodríguez-Lozano *et al.*, "Mesenchymal stem cells derived from dental tissues," *Int. Endod. J.*, vol. 44, no. 9, pp. 800–806, Sep. 2011, doi: 10.1111/j.1365-2591.2011.01877.x.
- [77] G. T.-J. Huang, S. Gronthos, and S. Shi, "Mesenchymal Stem Cells Derived from Dental Tissues vs . Those from Other Sources: Their Biology and Role in Regenerative Medicine," *J. Dent. Res.*, vol. 88, no. 9, pp. 792–806, Sep. 2009, doi: 10.1177/0022034509340867.
- [78] S. Gronthos, M. Mankani, J. Brahim, P. G. Robey, and S. Shi, "Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and invivo," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 97, no. 25, pp. 13625– 13630, Dec. 2000, doi: 10.1073/pnas.240309797.
- [79] M. Miura *et al.*, "SHED: Stem cells from human exfoliated deciduous teeth," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 100, no. 10, pp. 5807–5812, May 2003, doi: 10.1073/pnas.0937635100.
- [80] B.-M. Seo *et al.*, "Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament," *Lancet*, vol. 364, no. 9429, pp. 149–155, Jul. 2004, doi: 10.1016/S0140-6736(04)16627-0.
- [81] C. Morsczeck *et al.*, "Isolation of precursor cells (PCs) from human dental follicle of wisdom teeth," *Matrix Biol.*, vol. 24, no. 2, pp. 155–165, Apr. 2005, doi: 10.1016/j.matbio.2004.12.004.
- [82] W. Sonoyama *et al.*, "Mesenchymal Stem Cell-Mediated Functional Tooth Regeneration in

Swine," PLoS One, vol. 1, no. 1, p. e79, Dec. 2006, doi: 10.1371/journal.pone.0000079.

- [83] N. Wada, B. Wang, N.-H. Lin, A. L. Laslett, S. Gronthos, and P. M. Bartold, "Induced pluripotent stem cell lines derived from human gingival fibroblasts and periodontal ligament fibroblasts," *J. Periodontal Res.*, vol. 46, no. 4, pp. 438–447, Aug. 2011, doi: 10.1111/j.1600-0765.2011.01358.x.
- [84] K. and others Oda, Yasuaki and Yoshimura, Yasuhide and Ohnishi, Hiroe and Tadokoro, Mika and Katsube, Yoshihiro and Sasao, Mari and Kubo, Yoko and Hattori, Koji and Saito, Shigeru and Horimoto, "Induction of pluripotent stem cells from human third molar mesenchymal stromal cells," *J. Biol. Chem.*, vol. 285, pp. 29270–29278, 2010.
- [85] F.-M. Chen and Y. Jin, "Periodontal Tissue Engineering and Regeneration: Current Approaches and Expanding Opportunities," *Tissue Eng. Part B Rev.*, vol. 16, no. 2, pp. 219– 255, Apr. 2010, doi: 10.1089/ten.teb.2009.0562.
- [86] Y. Zhang, H. Sun, X. Song, X. Gu, and C. Sun, "Biomaterials for periodontal tissue regeneration," *Rev. Adv. Mater. Sci.*, vol. 40, no. 3, pp. 209–214, 2015.
- [87] C. Wu, Y. Zhou, C. Lin, J. Chang, and Y. Xiao, "Strontium-containing mesoporous bioactive glass scaffolds with improved osteogenic/cementogenic differentiation of periodontal ligament cells for periodontal tissue engineering," *Acta Biomater.*, vol. 8, no. 10, pp. 3805– 3815, 2012, doi: 10.1016/j.actbio.2012.06.023.
- [88] P. Han, C. Wu, J. Chang, and Y. Xiao, "The cementogenic differentiation of periodontal ligament cells via the activation of Wnt/β-catenin signalling pathway by Li + ions released from bioactive scaffolds," *Biomaterials*, vol. 33, no. 27, pp. 6370–6379, 2012, doi: 10.1016/j.biomaterials.2012.05.061.
- [89] K. G. Silvério *et al.*, "Mesenchymal Stem Cell Properties of Periodontal Ligament Cells From Deciduous and Permanent Teeth," *J. Periodontol.*, vol. 81, no. 8, pp. 1207–1215, Aug. 2010, doi: 10.1902/jop.2010.090729.
- [90] J. Jiang, X. Wu, M. Lin, N. Doan, Y. Xiao, and F. Yan, "Application of autologous periosteal cells for the regeneration of class III furcation defects in Beagle dogs," *Cytotechnology*, vol. 62, no. 3, pp. 235–243, Jun. 2010, doi: 10.1007/s10616-010-9284-y.
- [91] M. Khorami, S. Hesaraki, A. Behnamghader, H. Nazarian, and S. Shahrabi, "In vitro bioactivity and biocompatibility of lithium substituted 45S5 bioglass," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 31, no. 7, pp. 1584–1592, Oct. 2011, doi: 10.1016/j.msec.2011.07.011.
- [92] M. T. Duailibi, S. E. Duailibi, F. M. L. Dantas, and P. C. Yelick, *Scaffolds that promote enamel remineralization*. Elsevier Ltd, 2019.
- [93] J. M. McCool, I. A. Rodriguez, S. A. Sell, Y. Han, and G. L. Bowlin, "A preliminary study on amelogenin-loaded electrospun scaffolds," *J. Bioact. Compat. Polym.*, vol. 29, no. 1, pp. 32–49, Jan. 2014, doi: 10.1177/0883911513513661.
- [94] A. A. Taha, M. P. Patel, R. G. Hill, and P. S. Fleming, "The effect of bioactive glasses on enamel remineralization: A systematic review," *J. Dent.*, vol. 67, no. July, pp. 9–17, 2017, doi: 10.1016/j.jdent.2017.09.007.
- [95] F. Obregon, C. Vaquette, S. Ivanovski, D. W. Hutmacher, and L. E. Bertassoni, "Three-Dimensional Bioprinting for Regenerative Dentistry and Craniofacial Tissue Engineering," J. Dent. Res., vol. 94, no. 9_suppl, pp. 143S-152S, Sep. 2015, doi: 10.1177/0022034515588885.

- [96] N. E. Fedorovich, J. Alblas, W. E. Hennink, F. C. Öner, and W. J. A. Dhert, "Organ printing: the future of bone regeneration?," *Trends Biotechnol.*, vol. 29, no. 12, pp. 601–606, Dec. 2011, doi: 10.1016/j.tibtech.2011.07.001.
- [97] S. E. Bakarich, R. Gorkin, M. in het Panhuis, and G. M. Spinks, "Three-Dimensional Printing Fiber Reinforced Hydrogel Composites," ACS Appl. Mater. Interfaces, vol. 6, no. 18, pp. 15998–16006, Sep. 2014, doi: 10.1021/am503878d.
- [98] F. B. Zanatta, F. G. de Souza, T. M. P. Pinto, R. P. Antoniazzi, and C. K. Rösing, "Do the clinical effects of enamel matrix derivatives in infrabony defects decrease overtime? A systematic review and meta-analysis," *Braz. Dent. J.*, vol. 24, no. 5, pp. 446–455, 2013, doi: 10.1590/0103-6440201302192.
- [99] M. Esposito, M. G. Grusovin, N. Papanikolaou, P. Coulthard, and H. V Worthington, "Enamel matrix derivative (Emdogain®) for periodontal tissue regeneration in intrabony defects," *Cochrane Database Syst. Rev.*, Oct. 2009, doi: 10.1002/14651858.CD003875.pub3.
- [100] R. Koop, J. Merheb, and M. Quirynen, "Periodontal Regeneration With Enamel Matrix Derivative in Reconstructive Periodontal Therapy: A Systematic Review," J. Periodontol., vol. 83, no. 6, pp. 707–720, Jun. 2012, doi: 10.1902/jop.2011.110266.
- [101] H. H. K. Xu, J. L. Moreau, L. Sun, and L. C. Chow, "Strength and fluoride release characteristics of a calcium fluoride based dental nanocomposite," *Biomaterials*, vol. 29, no. 32, pp. 4261–4267, Nov. 2008, doi: 10.1016/j.biomaterials.2008.07.037.
- [102] N. Singh *et al.*, "NanoGenotoxicology: The DNA damaging potential of engineered nanomaterials," *Biomaterials*, vol. 30, no. 23–24, pp. 3891–3914, Aug. 2009, doi: 10.1016/j.biomaterials.2009.04.009.
- [103] M.Salvo, "Dispense del corso 'Ceramici Avanzati," 2013.
- [104] H. Ylanen, "Material and Mechanical Properties of Bioactive Glass," in *Bioactive Glass:Materials, Properties and Applications*, 1 st., Ed. Woodhead Publishing, 2011.
- [105] D. Pugliese, "Glass systems Glass structure," pp. 1–20.
- [106] A. Sola, D. Bellucci, V. Cannillo, and A. Cattini, "Bioactive glass coatings: a review," Surf. Eng., vol. 27, no. 8, pp. 560–572, Sep. 2011, doi: 10.1179/1743294410Y.0000000008.
- [107] L. L. Hench, "The story of Bioglass," pp. 967–978, 2006, doi: 10.1007/s10856-006-0432-z.
- [108] S. Kumar, B. Kundu, and S. Datt, "Development and Applications of Varieties of Bioactive Glass Compositions in Dental Surgery, Third Generation Tissue Engineering, Orthopaedic Surgery and as Drug Delivery System," *Biomater. Appl. Nanomedicine*, 2011, doi: 10.5772/24942.
- [109] Z. Abbasi, M. E. Bahroloolum, M. H. Shariat, and R. Bagheri, "Bioactive Glasses in Dentistry: A Review," J. Glas. Dent. A Rev., vol. 2, no. 1, pp. 1–9, 2015.
- [110] J. R. Jones, "Review of bioactive glass: From Hench to hybrids," Acta Biomater., vol. 23, pp. S53–S82, 2015.
- [111] R. J. A.G. Jones, "Bio-Glasses: An introduction," 2012.
- [112] E. Fiume, C. Migneco, E. Vernè, and F. Baino, "Comparison between Bioactive Sol-Gel and Melt-Derived Glasses/Glass-Ceramics Based on the Multicomponent SiO2–P2O5–CaO– MgO–Na2O–K2O System," *Materials (Basel).*, 2020.

- [113] M. N. Rahaman *et al.*, "Bioactive glass in tissue engineering," *Acta Biomater.*, vol. 7, no. 6, pp. 2355–2373, Jun. 2011, doi: 10.1016/j.actbio.2011.03.016.
- [114] V. Mouriño, J. P. Cattalini, and A. R. Boccaccini, "Metallic ions as therapeutic agents in tissue engineering scaffolds: an overview of their biological applications and strategies for new developments," *J. R. Soc. Interface*, vol. 9, no. 68, pp. 401–419, Mar. 2012, doi: 10.1098/rsif.2011.0611.
- [115] H. Oonishi *et al.*, "Quantitative comparison of bone growth behavior in granules of Bioglass, A-W glass-ceramic, and hydroxyapatite," *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 51, no. 1, pp. 37–46, Jul. 2000, doi: 10.1002/(SICI)1097-4636(200007)51:1<37::AID-JBM6>3.0.CO;2-T.
- [116] H. Aguiar, P. González, and J. Serra, *Bioactive glass structure and solubility*, Second Edi. Elsevier Ltd., 2018.
- [117] M. Montazerian and E. Dutra Zanotto, "History and trends of bioactive glass-ceramics," J. Biomed. Mater. Res. Part A, vol. 104, no. 5, pp. 1231–1249, 2016, doi: 10.1002/jbm.a.35639.
- [118] G. Kaur, G. Pickrell, N. Sriranganathan, V. Kumar, and D. Homa, "Review and the state of the art: Sol-gel and melt quenched bioactive glasses for tissue engineering," *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.*, vol. 104, no. 6, pp. 1248–1275, Aug. 2016, doi: 10.1002/jbm.b.33443.
- [119] F. Baino, E. Fiume, M. Miola, and E. Verné, "Bioactive sol-gel glasses: Processing, properties, and applications," *Int. J. Appl. Ceram. Technol.*, vol. 15, no. 4, pp. 841–860, Jul. 2018, doi: 10.1111/ijac.12873.
- [120] G. J. Owens *et al.*, "Sol-gel based materials for biomedical applications," *Prog. Mater. Sci.*, vol. 77, pp. 1–79, Apr. 2016, doi: 10.1016/j.pmatsci.2015.12.001.
- [121] G. Pagni and W. Giannobile, "Tecniche di terapia cellulare nella rigenerazione parodontale e implantare," 2011, [Online]. Available: https://www.ildentistamoderno.com/tecniche-diterapia-cellulare-nella-rigenerazione-parodontale-e-implantare/#:~:text=Gli scaffolds sono utilizzati sia,esempio sostituti ossei da innesto.
- [122] D. C. Massai, "Dispense del corso 'Bioreattori," 2018.
- [123] F. Baino *et al.*, "Processing methods for making porous bioactive glass-based scaffolds—A state-of-the-art review," *Int. J. Appl. Ceram. Technol.*, vol. 16, no. 5, pp. 1762–1796, 2019, doi: 10.1111/ijac.13195.
- [124] K. Arvidson *et al.*, "Bone regeneration and stem cells," *J. Cell. Mol. Med.*, vol. 15, no. 4, pp. 718–746, Apr. 2011, doi: 10.1111/j.1582-4934.2010.01224.x.
- [125] L. Roseti et al., "Scaffolds for Bone Tissue Engineering: State of the art and new perspectives," Mater. Sci. Eng. C, vol. 78, pp. 1246–1262, Sep. 2017, doi: 10.1016/j.msec.2017.05.017.
- [126] L.-C. Gerhardt and A. R. Boccaccini, "Bioactive Glass and Glass-Ceramic Scaffolds for Bone Tissue Engineering," *Materials (Basel).*, vol. 3, no. 7, pp. 3867–3910, Jul. 2010, doi: 10.3390/ma3073867.
- [127] G. Ciardelli and G. Ciofani, "Dispense del corso: 'Bionanotecnologie," 2018.
- [128] Z. Y. Wu, R. G. Hill, S. Yue, D. Nightingale, P. D. Lee, and J. R. Jones, "Melt-derived
bioactive glass scaffolds produced by a gel-cast foaming technique," *Acta Biomater.*, vol. 7, no. 4, pp. 1807–1816, Apr. 2011, doi: 10.1016/j.actbio.2010.11.041.

- [129] F. Baino, E. Fiume, M. Miola, F. Leone, B. Onida, and E. Verné, "Fe-doped bioactive glassderived scaffolds produced by sol-gel foaming," *Mater. Lett.*, vol. 235, pp. 207–211, Jan. 2019, doi: 10.1016/j.matlet.2018.10.042.
- [130] S. K. Sarkar and B. T. Lee, "Hard tissue regeneration using bone substitutes: an update on innovations in materials," *Korean J. Intern. Med.*, vol. 30, no. 3, p. 279, 2015, doi: 10.3904/kjim.2015.30.3.279.
- [131] Q. Fu, M. N. Rahaman, B. Sonny Bal, R. F. Brown, and D. E. Day, "Mechanical and in vitro performance of 13–93 bioactive glass scaffolds prepared by a polymer foam replication technique," *Acta Biomater.*, vol. 4, no. 6, pp. 1854–1864, Nov. 2008, doi: 10.1016/j.actbio.2008.04.019.
- [132] F. Baino, M. Ferraris, O. Bretcanu, E. Verné, and C. Vitale-Brovarone, "Optimization of composition, structure and mechanical strength of bioactive 3-D glass-ceramic scaffolds for bone substitution," *J. Biomater. Appl.*, vol. 27, no. 7, pp. 872–890, 2013, doi: 10.1177/0885328211429193.
- [133] V. Chiono, "Dispense del corso 'Ingegneria per la Medicina Rigenerativa," 2018.
- [134] E. Sachlos and J. Czernuszka, "Making Tissue Engineering Scaffolds Work. Review: The application of solid freeform fabrication technology to the production of tissue engineering scaffolds," *Eur. Cells Mater.*, vol. 5, pp. 29–40, Jun. 2003, doi: 10.22203/eCM.v005a03.
- [135] M. V. Varma, B. Kandasubramanian, and S. M. Ibrahim, "3D printed scaffolds for biomedical applications," *Mater. Chem. Phys.*, vol. 255, no. April, p. 123642, 2020, doi: 10.1016/j.matchemphys.2020.123642.
- [136] J. Liu, H. Hu, P. Li, C. Shuai, and S. Peng, "Fabrication and Characterization of Porous 45S5 Glass Scaffolds via Direct Selective Laser Sintering," *Mater. Manuf. Process.*, p. 130219154812009, Feb. 2013, doi: 10.1080/10426914.2012.736656.
- [137] J. anne N. Oliver, Y. Su, X. Lu, P. H. Kuo, J. Du, and D. Zhu, "Bioactive glass coatings on metallic implants for biomedical applications," *Bioact. Mater.*, vol. 4, no. September 2019, pp. 261–270, 2019, doi: 10.1016/j.bioactmat.2019.09.002.
- [138] A. Conde and J. J. de Damborenea, "Degradation of Vitreous Enamel Coatings," in *Reference Module in Materials Science and Materials Engineering*, Elsevier, 2016.
- [139] J. Chang, Y. L. Zhou, and Y. Zhou, "Surface modification of bioactive glasses," in *Bioactive Glasses*, Elsevier, 2011, pp. 29–52.
- [140] F. Pishbin, A. Simchi, M. P. Ryan, and A. R. Boccaccini, "Electrophoretic deposition of chitosan/45S5 Bioglass® composite coatings for orthopaedic applications," *Surf. Coatings Technol.*, vol. 205, no. 23–24, pp. 5260–5268, Sep. 2011, doi: 10.1016/j.surfcoat.2011.05.026.
- [141] L. M. M. e N. (Politecnico di Milano), "Fabbricazione di materiali e superfici nanostrutturate," [Online]. Available: http://www.nanolab.polimi.it/Ricerca-sintesi.htm.
- [142] P. Kuo et al., "Laser coating of bioactive glasses on bioimplant titanium alloys," Int. J. Appl. Glas. Sci., vol. 10, no. 3, pp. 307–320, Jul. 2019, doi: 10.1111/ijag.12642.
- [143] M. Wang, "Developing bioactive composite materials for tissue replacement," Biomaterials,

vol. 24, no. 13, pp. 2133–2151, Jun. 2003, doi: 10.1016/S0142-9612(03)00037-1.

- [144] K. Rezwan, Q. Z. Chen, J. J. Blaker, and A. R. Boccaccini, "Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering," *Biomaterials*, vol. 27, no. 18, pp. 3413–3431, Jun. 2006, doi: 10.1016/j.biomaterials.2006.01.039.
- [145] Q. Chen, J. A. Roether, and A. R. Boccaccini, "Tissue Engineering Scaffolds from Bioactive Glass and Composite Materials," *Top. Tissue Eng.*, vol. 4, no. Eds. N Ashammakhi, R Reis, F Chiellini ©, 2008.
- [146] H. H. Lu, S. F. El-Amin, K. D. Scott, and C. T. Laurencin, "Three-dimensional, bioactive, biodegradable, polymer-bioactive glass composite scaffolds with improved mechanical properties support collagen synthesis and mineralization of human osteoblast-like cellsin vitro," *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 64A, no. 3, pp. 465–474, Mar. 2003, doi: 10.1002/jbm.a.10399.
- [147] J. . Roether, A. . Boccaccini, L. . Hench, V. Maquet, S. Gautier, and R. Jérôme, "Development and in vitro characterisation of novel bioresorbable and bioactive composite materials based on polylactide foams and Bioglass® for tissue engineering applications," *Biomaterials*, vol. 23, no. 18, pp. 3871–3878, Sep. 2002, doi: 10.1016/S0142-9612(02)00131-X.
- [148] G. Iviglia, S. Kargozar, and F. Baino, *Biomaterials, current strategies, and novel nano*technological approaches for periodontal regeneration, vol. 10, no. 1. 2019.
- [149] F. Illueca, P. B. Vera, P. Cabanilless, V. Fernanades, and F. Loscos, "Periodontal regeneration in clinical practise," *Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal*, vol. 11, pp. 382–392, 2006.
- [150] A. Polini, H. Bai, and A. P. Tomsia, "Dental applications of nanostructured bioactive glass and its composites," *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomedicine Nanobiotechnology*, vol. 5, no. 4, pp. 399–410, 2013, doi: 10.1002/wnan.1224.
- [151] M. R. Syed, M. Khan, F. Sefat, Z. Khurshid, M. S. Zafar, and A. S. Khan, "Bioactive glass and glass fiber composite: Biomedical/dental applications," *Biomed. Ther. Clin. Appl. Bioact. Glas.*, pp. 467–495, 2018, doi: 10.1016/B978-0-08-102196-5.00017-3.
- [152] "Cause di sensibilità dentale," [Online]. Available: https://www.sensodyne.it/sensibilitadenti/cause-sensibilita-dentale.html.
- [153] "Ipersensibilità dentinale," [Online]. Available: https://www.colgateprofessional.it/indications/ipersensibilita-dentinale.
- [154] M. Gagliani, "Ipersensibilità dentinale: una patologia dai molteplici aspetti," 2015, [Online]. Available: http://www.cicweb.it/wp-content/uploads/2015/10/Modulo-AIC.pdf.
- [155] D. G. Gillam, J. S. Bulman, M. A. J. Eijkman, and H. N. Newman, "Dentists' perceptions of dentine hypersensitivity and knowledge of its treatment," *J. Oral Rehabil.*, vol. 29, no. 3, pp. 219–225, Mar. 2002, doi: 10.1046/j.1365-2842.2002.00812.x.
- [156] Q. Ma *et al.*, "Comparison of in vitro dentinal tubule occluding efficacy of two different methods using a nano-scaled bioactive glass-containing desensitising agent," *J. Dent.*, vol. 60, pp. 63–69, 2017, doi: 10.1016/j.jdent.2017.03.001.
- [157] S. M. Carvalho, C. D. F. Moreira, A. C. X. Oliveira, A. A. R. Oliveira, E. M. F. Lemos, and M. M. Pereira, *Bioactive glass nanoparticles for periodontal regeneration and applications in dentistry*. Elsevier Inc., 2019.

- [158] F. Baino, S. Hamzehlou, and S. Kargozar, "Bioactive Glasses: Where Are We and Where Are We Going?," J. Funct. Biomater., vol. 9, no. 1, p. 25, Mar. 2018, doi: 10.3390/jfb9010025.
- [159] C. Tirapelli, H. Panzeri, R. G. Soares, O. Peitl, and E. D. Zanotto, "A novel bioactive glassceramic for treating dentin hypersensitivity," *Braz. Oral Res.*, vol. 24, no. 4, pp. 381–387, 2010, doi: 10.1590/S1806-83242010000400002.
- [160] M. Carminatti *et al.*, "Experimental gel containing bioactive glass-ceramic to minimize the pulp damage caused by dental bleaching in rats," *J. Appl. Oral Sci.*, vol. 28, pp. 1–10, 2020, doi: 10.1590/1678-7757-2019-0384.
- [161] C. E. Camargos Lins, S. M. de Carvalho, A. A. R. de Oliveira, and M. de Magalhães Pereira, "Application of Fluorine Containing Bioactive Glass Nanoparticles in Dentin Hypersensitivity Treatment," *Key Eng. Mater.*, vol. 696, pp. 103–107, May 2016, doi: 10.4028/www.scientific.net/KEM.696.103.
- [162] R. Smeets et al., "Impact of Dental Implant Surface Modifications on Osseointegration," Biomed Res. Int., vol. 2016, pp. 1–16, 2016, doi: 10.1155/2016/6285620.
- [163] Y. K. AlMaimouni, M. A. Benrashed, N. I. Alyousef, A. T. Shah, and A. S. Khan, *Bioactive glass coated dental implants*. Elsevier Ltd, 2020.
- [164] S. Lopez-Esteban, E. Saiz, S. Fujino, T. Oku, K. Suganuma, and A. P. Tomsia, "Bioactive glass coatings for orthopedic metallic implants," *J. Eur. Ceram. Soc.*, vol. 23, no. 15, pp. 2921–2930, Jan. 2003, doi: 10.1016/S0955-2219(03)00303-0.
- [165] E. Verné, C. Fernández Vallés, C. Vitale Brovarone, S. Spriano, and C. Moisescu, "Doublelayer glass-ceramic coatings on Ti6Al4V for dental implants," *J. Eur. Ceram. Soc.*, vol. 24, no. 9, pp. 2699–2705, Aug. 2004, doi: 10.1016/j.jeurceramsoc.2003.09.004.
- [166] M. Ferraris *et al.*, "Coatings on zirconia for medical applications," *Biomaterials*, vol. 21, no. 8, pp. 765–773, Apr. 2000, doi: 10.1016/S0142-9612(99)00209-4.
- [167] F. Baino, "Bioactive glasses When glass science and technology meet regenerative medicine," *Ceram. Int.*, vol. 44, no. 13, pp. 14953–14966, 2018, doi: 10.1016/j.ceramint.2018.05.180.
- [168] Y. Xiao *et al.*, "Nanostructured bioactive glass-ceramic coatings deposited by the liquid precursor plasma spraying process," *Appl. Surf. Sci.*, vol. 257, no. 6, pp. 1898–1905, Jan. 2011, doi: 10.1016/j.apsusc.2010.09.023.
- [169] L. Esteban-Tejeda *et al.*, "Biocide glass–ceramic coating on titanium alloy and zirconium oxide for dental applications," *Mater. Lett.*, vol. 111, pp. 59–62, Nov. 2013, doi: 10.1016/j.matlet.2013.08.049.
- [170] L. A. Díaz et al., "High-velocity suspension flame sprayed (HVSFS) soda-lime glass coating on titanium substrate: Its bactericidal behaviour," J. Eur. Ceram. Soc., vol. 36, no. 10, pp. 2653–2658, Aug. 2016, doi: 10.1016/j.jeurceramsoc.2016.02.046.
- [171] D. A. Kim, J. H. Lee, S. K. Jun, H. W. Kim, M. Eltohamy, and H. H. Lee, "Sol-gel-derived bioactive glass nanoparticle-incorporated glass ionomer cement with or without chitosan for enhanced mechanical and biomineralization properties," *Dent. Mater.*, vol. 33, no. 7, pp. 805–817, 2017, doi: 10.1016/j.dental.2017.04.017.
- [172] T. De Caluwé *et al.*, "Addition of bioactive glass to glass ionomer cements: Effect on the physico-chemical properties and biocompatibility," *Dent. Mater.*, vol. 33, no. 4, pp. e186–

e203, 2017, doi: 10.1016/j.dental.2017.01.007.

- [173] I. Dewi and R. Anggraeni, "Heliyon Development of bioactive resin modi fi ed glass ionomer cement for dental biomedical applications," *Heliyon*, vol. 7, no. August 2020, p. e05944, 2021, doi: 10.1016/j.heliyon.2021.e05944.
- [174] A. Valanezhad, T. Odatsu, K. Udoh, T. Shiraishi, T. Sawase, and I. Watanabe, "Modification of resin modified glass ionomer cement by addition of bioactive glass nanoparticles," J. *Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 27, no. 1, pp. 1–9, 2016, doi: 10.1007/s10856-015-5614-0.
- [175] A. Zandi Karimi, E. Rezabeigi, and R. A. L. Drew, "Glass ionomer cements with enhanced mechanical and remineralizing properties containing 45S5 bioglass-ceramic particles," J. Mech. Behav. Biomed. Mater., vol. 97, no. May, pp. 396–405, 2019, doi: 10.1016/j.jmbbm.2019.05.033.
- [176] A. J. Salinas and M. Vallet-Regí, "Glasses in bone regeneration: A multiscale issue," J. Non. Cryst. Solids, vol. 432, pp. 9–14, Jan. 2016, doi: 10.1016/j.jnoncrysol.2015.03.025.
- [177] D. Arcos and M. Vallet-Regí, "Sol-gel silica-based biomaterials and bone tissue regeneration," *Acta Biomater.*, vol. 6, no. 8, pp. 2874–2888, Aug. 2010, doi: 10.1016/j.actbio.2010.02.012.
- [178] A. J. Salinas and M. Vallet-Regí, "Bioactive ceramics: from bone grafts to tissue engineering," *RSC Adv.*, vol. 3, no. 28, p. 11116, 2013, doi: 10.1039/c3ra00166k.
- [179] X. Chatzistavrou, D. Esteve, E. Hatzistavrou, E. Kontonasaki, K. M. Paraskevopoulos, and A. R. Boccaccini, "Sol–gel based fabrication of novel glass-ceramics and composites for dental applications," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 30, no. 5, pp. 730–739, Jun. 2010, doi: 10.1016/j.msec.2010.03.005.
- [180] X. Chatzistavrou, O. Tsigkou, H. D. Amin, K. M. Paraskevopoulos, V. Salih, and A. R. Boccaccini, "Sol-gel based fabrication and characterization of new bioactive glass-ceramic composites for dental applications," *J. Eur. Ceram. Soc.*, vol. 32, no. 12, pp. 3051–3061, Sep. 2012, doi: 10.1016/j.jeurceramsoc.2012.04.037.
- [181] X. Chatzistavrou *et al.*, "Fabrication and characterization of bioactive and antibacterial composites for dental applications," *Acta Biomater.*, vol. 10, no. 8, pp. 3723–3732, Aug. 2014, doi: 10.1016/j.actbio.2014.04.030.
- [182] P. Han, C. Wu, J. Chang, and Y. Xiao, "The cementogenic differentiation of periodontal ligament cells via the activation of Wnt/β-catenin signalling pathway by Li+ ions released from bioactive scaffolds," *Biomaterials*, vol. 33, no. 27, pp. 6370–6379, Sep. 2012, doi: 10.1016/j.biomaterials.2012.05.061.
- [183] O. M. Goudouri *et al.*, "Development of highly porous scaffolds based on bioactive silicates for dental tissue engineering," *Mater. Res. Bull.*, vol. 49, pp. 399–404, Jan. 2014, doi: 10.1016/j.materresbull.2013.09.027.
- [184] S. Sowmya *et al.*, "Tri-Layered Nanocomposite Hydrogel Scaffold for the Concurrent Regeneration of Cementum, Periodontal Ligament, and Alveolar Bone," *Adv. Healthc. Mater.*, vol. 6, no. 7, p. 1601251, Apr. 2017, doi: 10.1002/adhm.201601251.
- [185] K. Dimitriadis, D. U. Tulyaganov, and S. Agathopoulos, "Development of novel aluminacontaining bioactive glass-ceramics in the CaO-MgO-SiO2 system as candidates for dental implant applications," *J. Eur. Ceram. Soc.*, vol. 41, no. 1, pp. 929–940, 2021, doi: 10.1016/j.jeurceramsoc.2020.08.005.

- [186] S. A. Saadaldin and A. S. Rizkalla, "Synthesis and characterization of wollastonite glassceramics for dental implant applications," *Dent. Mater.*, vol. 30, no. 3, pp. 364–371, Mar. 2014, doi: 10.1016/j.dental.2013.12.007.
- [187] S. A. Saadaldin, S. J. Dixon, D. O. Costa, and A. S. Rizkalla, "Synthesis of bioactive and machinable miserite glass-ceramics for dental implant applications," *Dent. Mater.*, vol. 29, no. 6, pp. 645–655, Jun. 2013, doi: 10.1016/j.dental.2013.03.013.
- [188] S. Yilmaz, S. Agathopoulos, and F. N. Oktar, "Crystallization of leucite in potassiumalumino-silicate glasses," *J. Optoelectron. Adv. Mater.*, vol. 17, no. 5–6, pp. 681–685, 2015.
- [189] M. Peter, N. S. Binulal, S. V. Nair, N. Selvamurugan, H. Tamura, and R. Jayakumar, "Novel biodegradable chitosan–gelatin/nano-bioactive glass ceramic composite scaffolds for alveolar bone tissue engineering," *Chem. Eng. J.*, vol. 158, no. 2, pp. 353–361, Apr. 2010, doi: 10.1016/j.cej.2010.02.003.
- [190] I. Kansal, D. U. Tulyaganov, A. Goel, M. J. Pascual, and J. M. F. Ferreira, "Structural analysis and thermal behavior of diopside-fluorapatite- wollastonite-based glasses and glassceramics," *Acta Biomater.*, vol. 6, no. 11, pp. 4380–4388, 2010, doi: 10.1016/j.actbio.2010.05.019.
- [191] F. Baino et al., "Fe-Doped Sol-Gel Glasses and Glass-Ceramics for Magnetic Hyperthermia," *Materials (Basel).*, vol. 11, no. 1, p. 173, Jan. 2018, doi: 10.3390/ma11010173.
- [192] "X-ray Powder Diffraction (XRD)," [Online]. Available: https://serc.carleton.edu/research_education/geochemsheets/techniques/XRD.html.
- [193] M. Beltrami, "Caratterizzazione dei materiali," 2018.
- [194] "No Title," [Online]. Available: http://archeologiamedievale.unisi.it/SitoCNR/Metalli/ferro/03d.html.
- [195] "Scanning Electron Microscopy (SEM)," [Online]. Available: https://serc.carleton.edu/research_education/geochemsheets/techniques/SEM.html.
- [196] "MICROSCOPIA ELETTRONICA E MICROANALISI ELEMENTARE SEM-EDS," [Online]. Available: https://www.inrim.it/servizi/servizi-tecnologici/microscopia-elettronicae-microanalisi-elementare-sem-eds.
- [197] "BET," [Online]. Available: https://particle.dk/methods-analytical-laboratory/surface-areabet-2/.
- [198] L. Ferigo, "Tesi di Laurea Magistrale:"STUDIO DELLE CARATTERISTICHE E DELLE PRESTAZIONI DELLE MEMBRANE DI DIFFUSIONE DI CAMPIONATORI DIFFUSIVI PER IL MONITORAGGIO DI AGENTI INQUINANTI"," 2014.
- [199] M. Sudibandriyo, "' A SIMPLE TECHNIQUE FOR SURFACE AREA DETERMINATION THROUGH SUPERCRITICAL CO 2 ADSORPTION," vol. 14, pp. 1–6, 2010.
- [200] L. Coppola, "GEOMETRIA DEI PROVINI E RESISTENZA A COMPRESSIONE," [Online]. Available: http://www00.unibg.it/dati/corsi/20057/33192-Lezione 15 -Geometria_dei_provini_e_resistenza_a_compressione.pdf.
- [201] T. Kokubo and H. Takadama, "How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity?," *Biomaterials*, vol. 27, no. 15, pp. 2907–2915, 2006, doi: 10.1016/j.biomaterials.2006.01.017.
- [202] A. L. B. Maçon, "A unified in vitro evaluation for apatite-forming ability of bioactive glasses

and their variants," J. Mater. Sci. Mater. Med, vol. 26, no. 2, p. 115, 2015.

- [203] Fiume, Serino, Bignardi, Verné, and Baino, "Bread-Derived Bioactive Porous Scaffolds: An Innovative and Sustainable Approach to Bone Tissue Engineering," *Molecules*, vol. 24, no. 16, p. 2954, Aug. 2019, doi: 10.3390/molecules24162954.
- [204] A. López-Noriega, D. Arcos, I. Izquierdo-Barba, Y. Sakamoto, O. Terasaki, and M. Vallet-Regí, "Ordered Mesoporous Bioactive Glasses for Bone Tissue Regeneration," *Chem. Mater.*, vol. 18, no. 13, pp. 3137–3144, Jun. 2006, doi: 10.1021/cm0604880.
- [205] Q. Z. Chen, I. D. Thompson, and A. R. Boccaccini, "45S5 Bioglass®-derived glass-ceramic scaffolds for bone tissue engineering," *Biomaterials*, vol. 27, no. 11, pp. 2414–2425, 2006, doi: 10.1016/j.biomaterials.2005.11.025.
- [206] F. Baino and C. Vitale-Brovarone, "Mechanical properties and reliability of glass-ceramic foam scaffolds for bone repair," *Mater. Lett.*, vol. 118, pp. 27–30, Mar. 2014, doi: 10.1016/j.matlet.2013.12.037.
- [207] V. Miguez-Pacheco *et al.*, "Development and characterization of lithium-releasing silicate bioactive glasses and their scaffolds for bone repair," *J. Non. Cryst. Solids*, vol. 432, pp. 65– 72, Jan. 2016, doi: 10.1016/j.jnoncrysol.2015.03.027.
- [208] A. Moghanian, S. Firoozi, and M. Tahriri, "Synthesis and in vitro studies of sol-gel derived lithium substituted 58S bioactive glass," *Ceram. Int.*, vol. 43, no. 15, pp. 12835–12843, 2017, doi: 10.1016/j.ceramint.2017.06.174.
- [209] K. S. W. Sing and R. T. Williams, "Physisorption Hysteresis Loops and the Characterization of Nanoporous Materials," *Adsorpt. Sci. Technol.*, vol. 22, no. 10, pp. 773–782, Dec. 2004, doi: 10.1260/0263617053499032.
- [210] K. S. W. Sing, "Reporting physisorption data for gas/solid systems with special reference to the determination of surface area and porosity (Recommendations 1984)," *Pure Appl. Chem.*, vol. 57, no. 4, pp. 603–619, Jan. 1985, doi: 10.1351/pac198557040603.
- [211] A. J. Salinas, S. Shruti, G. Malavasi, L. Menabue, and M. Vallet-Regí, "Substitutions of cerium, gallium and zinc in ordered mesoporous bioactive glasses," *Acta Biomater.*, vol. 7, no. 9, pp. 3452–3458, Sep. 2011, doi: 10.1016/j.actbio.2011.05.033.
- [212] H. Luo *et al.*, "One-pot synthesis of copper-doped mesoporous bioglass towards multifunctional 3D nanofibrous scaffolds for bone regeneration," *J. Non. Cryst. Solids*, vol. 532, p. 119856, Mar. 2020, doi: 10.1016/j.jnoncrysol.2019.119856.

Ringraziamenti

Desidero ringraziare il Prof. Francesco Baino e la Dott.essa Carla Migneco per gli insegnamenti, la disponibilità, per aver ascoltato ogni mio dubbio e soprattutto per la pazienza che hanno dimostrato nei miei confronti in questo periodo particolarmente complicato. Grazie a voi ho avuto la possibilità di approcciarmi al mondo della ricerca con passione e voglia di migliorami ogni giorno.

Un sincero grazie ai miei genitori per aver sempre creduto in me e per avermi supportato in ogni momento durante il mio percorso universitario. Grazie per l'amore e per l'affetto che mi avete sempre dato.

Un grazie enorme a Nicole (Mon cuorrrr), il mio oracolo di vita, che con i suoi incantesimi di "Stregonometria Ossea" mi ha fatto sempre divertire, sorridere e sentire un vero imperatore. Una persona davvero braaaaaavissima dal cuore grande e generoso.

Un grazie ai miei coinquilini di Via Filadelfia 124, Igor, Samuele, Salvatore e Scoccabastoni che mi hanno aiutato nei momenti difficili e soprattutto sopportato. Devo ringraziarvi perché con voi mi sono sempre sentito a casa.

Un grazie anche al Cigno di via Ossoppo Lorenzo, mio compagno di squadra del Cit Turin, con cui ho condiviso bellissime esperienze sportive e non solo. Sei un amico prezioso e ti prometto che prima poi ti farò mangiare gli arrosticini.