

# POLITECNICO DI TORINO

Collegio di Ingegneria Chimica e dei Materiali

**Corso di Laurea Magistrale  
in Ingegneria dei Materiali**

Tesi di Laurea Magistrale

**Stampa 3D di scaffolds polimerici bioderivati  
rinforzati con vetri bioattivi funzionalizzati**



**Relatori:**

Prof. Marco Sangermano  
Prof.ssa Marta Miola

**Candidata:**

Mariacristina Martorino

**Ottobre 2024**



## Sommario

1. Introduzione .....	5
1.1 L'Additive Manufacturing .....	7
1.1.1 Stampa 3D per la rigenerazione ossea: Funzionamento e Tipologie.....	7
1.2 Introduzione generale ai Polimeri Termoplastici e Termoindurenti.....	9
1.2.1 Utilizzo di polimeri derivati da risorse naturali e sintetiche.....	10
1.2.2 Fotopolimerizzazione.....	11
1.3 Vetri bioattivi .....	13
1.3.1 Bioattività e caratteristiche dei vetri bioattivi.....	13
1.3.2 Proprietà degli ioni di rame e tellurio nei vetri bioattivi .....	16
1.3.3 La rigenerazione ossea attraverso gli scaffolds .....	16
2. Materiali e Metodi .....	18
2.1 Materiali .....	18
2.2 Sintesi sol-gel dei vetri bioattivi .....	20
2.2.1 Vetro S4.....	23
2.2.2 Vetro S4BCu.....	23
2.2.3 Vetro S4BTe .....	24
2.3 Funzionalizzazione dei vetri bioattivi.....	29
2.3.1 Pretrattamento .....	30
2.3.2 Silanizzazione .....	30
2.4 Preparazione delle Formulazioni.....	33
2.5 Stampa 3D .....	35
2.6 Tecniche di Caratterizzazione .....	36
2.6.1 Spettroscopia Infrarossa a trasformata di Fourier (FTIR) .....	37
2.6.2 Angolo di Contatto .....	38
2.6.3 Potenziale Zeta e DLS.....	39
2.6.4 Microscopio elettronico a scansione ad emissione di campo e spettroscopia in dispersione di energia (FESEM-EDS).....	41
2.6.5 Foto calorimetria a scansione differenziale (Foto-DSC) .....	42

2.6.6 Reologia e Fotoreologia .....	42
2.6.7 Dynamic Mechanical Thermal Analysis (DMTA).....	43
2.6.8 Prove a Trazione e Compressione.....	45
2.7 Test biologici e analisi del pH dei provini in SBF .....	47
2.7.1 Preparazione dell'SBF (Simulated Body Fluid) e dei campioni .....	47
2.7.2 Preparazione dei campioni per l'analisi di citocompatibilità e attività metabolica .....	49
Risultati e Discussione .....	50
3.1 Caratterizzazione dei vetri bioattivi .....	50
3.1.1 Analisi FTIR sui vetri bioattivi .....	50
3.1.2 Angolo di Contatto .....	53
3.1.3 Potenziale Zeta e DLS.....	57
3.1.4 Analisi FESEM-EDS dei vetri bioattivi.....	61
3.2 Valutazione della Reattività delle Formulazioni e Stampa 3D .....	66
3.2.1 Analisi ATR-FTIR sulle resine liquide.....	66
3.2.2 Foto-DSC .....	71
3.2.3 Fotoreologia .....	74
3.2.4 Reologia .....	75
3.3 Caratterizzazione Termomeccanica e Meccanica dei Provini Stampati.....	76
3.3.1 DMTA .....	76
3.3.2 Prove a Trazione e Compressione.....	79
3.4 Caratterizzazione del processo di stampa 3D .....	83
3.4.1 Provini ottenuti con il processo di stampa 3D .....	83
3.4.2 Analisi SEM dei campioni post prova a trazione.....	85
3.5 Test Biologici e Bioattività .....	88
3.5.1 Valutazione della crescita di idrossiapatite e analisi XRD .....	88
3.5.2 Test sulla citocompatibilità e sull'attività antibatterica .....	92
Conclusione .....	95
Bibliografia.....	96

## 1. Introduzione

La stampa 3D rappresenta una delle tecnologie più innovative e promettenti nel campo della medicina rigenerativa. Questo lavoro di Tesi proporrà l'utilizzo della stampa 3D per sviluppare scaffold compositi formati da vetri bioattivi funzionalizzati e polimeri derivati da fonti rinnovabili, combinando le capacità dell'Additive Manufacturing con i vantaggi di materiali avanzati.

Infatti, l'utilizzo di polimeri derivati da fonti rinnovabili rappresenterà una scelta sostenibile, ma necessiteranno dei miglioramenti nelle proprietà meccaniche e biologiche per ottenere prestazioni ottimali.

Per questo sarà fondamentale integrare materiali inorganici, come i vetri bioattivi, all'interno della matrice polimerica. I vetri bioattivi sono noti per la loro capacità di stimolare la formazione di nuovo tessuto osseo grazie all'idrossiapatite che crea un'interfaccia, giunzione naturale tra l'innesto e il tessuto osseo, oltre al fatto di promuovere l'adesione e la proliferazione cellulare grazie all'inserimento di ioni come rame e, proprietà antibatteriche e antiossidative grazie all'inclusione di ioni tellurio.

In questo studio, verrà utilizzata una resina acrilata derivata dall'olio di soia (AESO) in combinazione con un diluente reattivo, l'acrilato di isobornile (IBOA) con aggiunta di un fotoiniziatore (Irgacure 819). All'interno di questa matrice, vengono dispersi vetri bioattivi funzionalizzati per sviluppare uno scaffold rinforzato. La formulazione di base utilizzata comprenderà AESO 70:30 (70% AESO, 30% IBOA), 1 phr di Irgacure 819 e 30 phr di vetro bioattivo S4B, S4BCu e S4BTe e i rispettivi vetri bioattivi silanizzati.

Un altro elemento innovativo di questo Lavoro sarà l'introduzione di ioni dopanti come il rame  $\text{Cu}^{2+}$  e il tellurio  $\text{Te}^{4+}$  nella struttura dei vetri bioattivi. Il rame infatti, è noto per le sue proprietà pro-angiogenetiche, che stimolano la formazione di nuovi vasi sanguigni e determinano l'integrazione degli innesti ossei, mentre il tellurio possiede proprietà antimicrobiche e antinfiammatorie.

In questa prima parte della Tesi, si fornirà un quadro generale sulle tecniche innovative della stampa 3D nell'Additive Manufacturing, una breve descrizione sui materiali polimerici, soprattutto quelli derivanti da fonti rinnovabili, le nozioni di base della fotopolimerizzazione e le diverse tecniche di stampa 3D, concentrandosi in particolare sulla tecnologia MSLA (Masked Stereolithography Apparatus). Inoltre, verranno descritte le proprietà di bioattività e biocompatibilità dei vetri bioattivi, determinanti nel ruolo della rigenerazione ossea grazie all'utilizzo di questi, all'interno di template tridimensionali come gli scaffold.

Nella seconda parte di questo Lavoro, verranno trattati i materiali e i metodi inerenti ai test di caratterizzazione dei vetri bioattivi per valutare l'effetto della silanizzazione tramite analisi ATR-FTIR, l'analisi sull'idrofobicità della superficie dei vetri bioattivi tramite angolo di contatto. Infine l'analisi al FESEM-EDS mostrerà l'adesione e la distribuzione dei vetri bioattivi all'interno della matrice polimerica includendo anche l'analisi composizionale e morfologica.

Ulteriori prove verranno eseguite sulle formulazioni liquide per valutare il processo di fotopolimerizzazione, la cinetica di polimerizzazione delle resine liquide e il comportamento termomeccanico delle resine solide. Inoltre, verranno mostrati i risultati ottenuti con la stampa 3D e le prove di trazione e compressione eseguite sui provini post-stampa per testare l'efficacia dei miglioramenti apportati con la silanizzazione sulle proprietà meccaniche

Infine questa Tesi, si concentrerà anche sugli aspetti biologici, testando la capacità delle cellule di aderire e proliferare sulla superficie dei campioni, tramite l'analisi sulla citocompatibilità, determinando il grado di integrazione cellulare sugli scaffolds. Verrà valutata anche la capacità dei vetri bioattivi inseriti nella matrice polimerica, di indurre la crescita di idrossiapatite in una soluzione fisiologica simulata (Simulated Body Fluid, SBF).

Lo scopo di questo Lavoro sarà sviluppare scaffolds compositi tramite stampa 3D in modo da combinare l'utilizzo della silanizzazione dei vetri bioattivi, per migliorare la compatibilità con la matrice polimerica ottenendo migliori proprietà meccaniche e l'uso di nanoparticelle di vetro bioattivo con ioni rame e tellurio per sfruttare le proprietà pro-angiogeniche e antinfiammatorie, oltre a quelle di bioattività del vetro stesso. Questo Studio contribuirà all'avanzamento delle tecnologie per la rigenerazione ossea nel campo della medicina rigenerativa.

## 1.1 L'Additive Manufacturing

Il termine "*Additive Manufacturing*" comprende molte tecnologie che realizzano prodotti strato per strato, consentendo di stampare oggetti tridimensionali su richiesta.

La tecnologia è definita come un processo di unione di materiali per realizzare oggetti a partire da modelli 3D. Le tecnologie AM più utilizzate sono la modellazione a deposizione fusa (FDM), la stereolitografia (SLA), la fusione laser selettiva (SLM), la sinterizzazione laser selettiva (SLS) e la lavorazione a luce digitale (DLP). Possono essere utilizzati materiali metallici, ceramici ma anche una varietà di polimeri e compositi per la produzione additiva, in base al tipo di processo.

Nel settore medico le tecniche AM attraverso la stampa 3D, sono molto spesso utilizzate per prodotti personalizzabili e unici, a convenienza del consumatore. Un esempio sono le applicazioni in ortodonzia, protesi, ortesi, impianti ecc.. [1]

### 1.1.1 Stampa 3D per la rigenerazione ossea: Funzionamento e Tipologie

Le tecnologie di stampa 3D sono diventate fondamentali nella rigenerazione ossea. Le principali tecnologie utilizzate in questo campo includono la Stereolitografia (SLA) e la Digital Light Processing (DLP).

La SLA e il DLP sono tecnologie basate su resine fotopolimeriche che vengono solidificate strato per strato attraverso l'esposizione a una sorgente luminosa. Queste riproducono strutture complesse come la realizzazione di scaffolds, per la rigenerazione ossea, studio di questa Tesi, grazie al quale si può riuscire a determinare la vascolarizzazione e l'integrazione ossea, per l'innesto.

La Masked Stereolithography Apparatus (MSLA) è una tecnologia di stampa 3D avanzata che fa parte della stereolitografia (SLA). Entrambe, si basano sulla fotopolimerizzazione di resine liquide. Tuttavia, l'MSLA si distingue per l'uso di uno schermo LCD che maschera la luce UV, permettendo di polimerizzare interi strati di resina in una sola esposizione, a differenza della SLA tradizionale che utilizza un laser UV per solidificando ogni strato punto per punto.

Nella MSLA, una matrice di LED UV emette luce attraverso uno schermo LCD supportato da "maschera digitale". Lo schermo LCD mostra un'immagine bidimensionale del layer da polimerizzare, che blocca o lascia passare la luce UV solo nelle aree desiderate. Questo processo consente di solidificare l'intero strato di resina simultaneamente, migliorando significativamente la velocità di stampa rispetto alla SLA tradizionale.

I vantaggi della MSLA riguardano la velocità di stampa, ovvero la capacità di fotopolimerizzare interi strati alla volta, utile quando sono richiesti molti strati. L'uso del LED UV determina una distribuzione della luce uniforme sull'intero piano di stampa, migliorandone la qualità e dettando una risoluzione elevata in grado di produrre strutture biologiche più complesse come gli scaffold. Anche la riduzione dei tempi di esposizione permette un processo più efficiente.

Inoltre, la precisione della MSLA permette di incorporare materiali come vetri bioattivi all'interno della matrice, favorendo la rigenerazione ossea e l'integrazione degli impianti come in questo lavoro di Tesi. [2][3]



## 1.2 Introduzione generale ai Polimeri Termoplastici e Termoindurenti

I polimeri si dividono in due categorie principali: polimeri termoplastici e polimeri termoindurenti. Queste categorie si differenziano principalmente per il loro comportamento sotto l'azione del calore e per le loro proprietà chimico-fisiche.

### **Polimeri Termoplastici**

I polimeri termoplastici sono materiali che possono essere deformati quando vengono riscaldati e ritornano allo stato solido quando vengono raffreddati. Questo processo può essere ripetuto più volte senza modificare significativamente la struttura chimica del polimero, il che rende i termoplastici molto versatili e riciclabili.

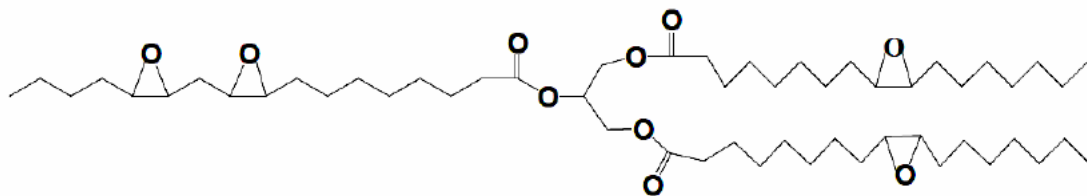
I polimeri termoindurenti, a differenza dei termoplastici, subiscono una reazione chimica durante il processo di riscaldamento, che li solidifica in modo permanente. Dopodiché, non possono più essere fusi o rimodellati. Questo avviene perché il riscaldamento provoca la formazione di legami chimici irreversibili tra le catene polimeriche, creando una rete tridimensionale rigida. [4]

I polimeri termoindurenti vengono utilizzati nella stampa 3D ovvero in tecniche avanzate di cui già abbiamo parlato nella *Sezione 1.1.1* che consentono la stampa 3D, come la MSLA, che permette alle resine di essere fotopolimerizzabili sotto l'effetto della luce UV, tecnologia utilizzata in questo Lavoro.

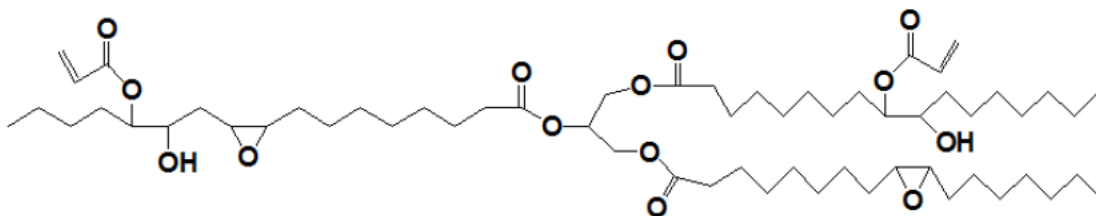
### 1.2.1 Utilizzo di polimeri derivati da risorse naturali e sintetiche

I polimeri naturali sono stati considerati per essere utilizzati come matrici per scaffold come per esempio il collagene, l'acido ialuronico ecc. sfruttando la loro biocompatibilità e biodegradabilità. Anche i polimeri sintetici possono essere utilizzati, come PLGA (acido poli(lattico-co-glicolico)), PLA (acido polilattico), poli(caprolattone) e poli(alcol vinilico) (PVA). Ma sia i polimeri naturali che quelli sintetici mostrano dei limiti, per esempio i polimeri naturali presentano scarse proprietà meccaniche, mentre i biopolimeri sintetici derivanti da fonti petrolchimiche possono avere una buona biocompatibilità ma dettano reazioni di degradazione non benefiche all'uomo. Tuttavia, i recenti progressi nella modifica chimica dei polimeri naturali possono offrire una soluzione efficace per le applicazioni di ingegneria tissutale. Un esempio è l'olio di soia epossidato acrilato (AESO), utilizzato in questo Lavoro di Tesi, che è formato da una struttura di trigliceridi con gruppi funzionali acrilati che possono essere utilizzati nel processo di polimerizzazione UV. Questi trigliceridi sono composti da acidi grassi naturali, questo non prevede citotossicità. Di conseguenza, l'AESO è promettente per applicazioni di scaffold nel campo biomedico [5].

La modifica chimica dell'olio di soia per produrre AESO si compone di due fasi: l'olio di soia viene prima epossidato per formare olio di soia epossidato (ESO) e successivamente funzionalizzato con gruppi acrilati per formare AESO, come mostrato nelle Figure 1 e 2. [6]



*Fig.1 Olio di soia epossidato*



*Fig.2 Olio di soia epossidato acrilato*

## 1.2.2 Fotopolimerizzazione

La fotopolimerizzazione è un processo che permette che le resine polimeriche vengano reticolate sotto effetto della luce UV. Il processo fotoindotto è più sostenibile a differenza della reticolazione termica, dove si ha l'emissione di composti organici volatili (VOC). Inoltre, la fotopolimerizzazione è un processo meno energivoro in cui la reticolazione avviene in maniera più veloce. [7]

I processi fotoindotti si dividono in due categorie in base al loro meccanismo: radicalico e cationico. La fotopolimerizzazione radicalica è particolarmente efficace nel reagire con i monomeri acrilati in condizioni inerti, come dimostrato in molti articoli. [5]

Questo Lavoro di Tesi introduce infatti un nuovo scaffold composito stampato in 3D, ottenuto attraverso la fotopolimerizzazione radicalica.

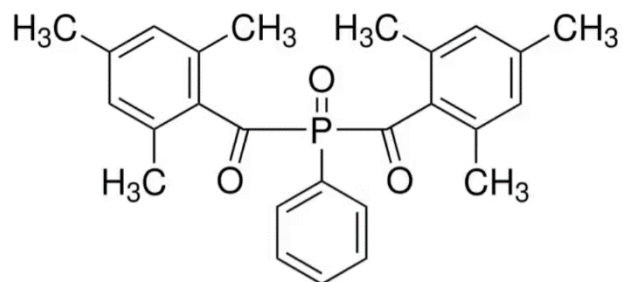
In questo modo si possono ottenere delle reticolazioni di formulazioni liquide in un ambiente biologico permettendo l'integrazione in vivo.

In base al meccanismo di reazione, la fotopolimerizzazione per addizione può essere radicalica o ionica (che a sua volta può essere cationica o anionica).

In questa Tesi si è utilizzata la fotopolimerizzazione per addizione radicalica. In base al tipo di reazione che sviluppa le specie radicaliche, si distinguono due classi di fotoiniziatori:

- Fotoiniziatori di tipo Norrish I: si ha la fotolisi dei legami carbonio-carbonio in posizione alfa ad un gruppo carbonilico, in questo modo si generano due radicali primari. I radicali formati sono in grado di iniziare la reazione di polimerizzazione a catena.
- Fotoiniziatori di tipo Norrish II: la generazione di radicali avviene attraverso l'interazione tra la molecola dell'iniziatore, nello stato di tripletto e una molecola in grado di agire come donatore di idrogeno. L'iniziatore assorbe la radiazione luminosa e passa a uno stato eccitato, formando un biradicale che estrae un atomo di idrogeno dalla molecola donatrice. Questo processo trasforma il biradicale in un radicale che dimerizza, rendendolo stabile, mentre dalla molecola donatrice si forma un altro radicale che avvia così la polimerizzazione vera e propria.

In questo Lavoro di Tesi, la fotoreticolazione si ottiene attraverso una polimerizzazione radicalica, grazie alla presenza del fotoiniziatore Irgacure 819, con il nome commerciale BAPO, il diluente reattivo IBOA, quando esposti ad una radiazione.



*Fig3. Struttura del fotoiniziatore BAPO*

## 1.3 Vetri bioattivi

### 1.3.1 Bioattività e caratteristiche dei vetri bioattivi

Per garantire la bioattività un materiale deve essere in grado di generare un'interfaccia in grado di sopportare le sollecitazioni che agiscono localmente. La bioattività è un'estensione della biocompatibilità dei materiali che inducono una risposta da parte dell'organismo capace di portare ad un legame chimico con i tessuti, soprattutto nel campo delle sostituzioni ossee. Il biomateriale, in questo modo, può rispondere all'esigenze di impianto all'interno di un organismo.

Un materiale bioattivo, quindi, è in grado di creare un ambiente compatibile determinando la crescita di un interfaccia mineralizzata, giunzione naturale tra tessuto e materiale.

I vetri bioattivi vengono utilizzati nella produzione di scaffolds utilizzati per la rigenerazione ossea, utilizzati in questo Studio.

I vetri bioattivi sono vetri a base di ossidi e si possono identificare tre categorie di ossidi all'interno, tra cui ossidi formatori, che formano la struttura vetrosa a partire dalla fase liquida (numero di coordinazione 3 o 4, come Si, B, P), ossidi modificatori per diminuire la viscosità e per permettere una lavorazione a temperature più basse (numero di coordinazione  $\geq 6$  come Na, Ca, Ba, K e ossidi intermedi che possono comportarsi come ossidi formatori di reticolo con numero di coordinazione tra 4 e 6 (Al, Li, Zn, Mg) [32] [33].

I vetri bioattivi capaci di produrre idrossiapatite devono questa proprietà agli ossidi modificatori, grazie quindi all'ossido di calcio e di sodio o di entrambi. Mentre se si va verso la silice pura si discosta dalla bioattività come si può vedere dal diagramma di fase (Fig.3.1) che ha proposto Hench.

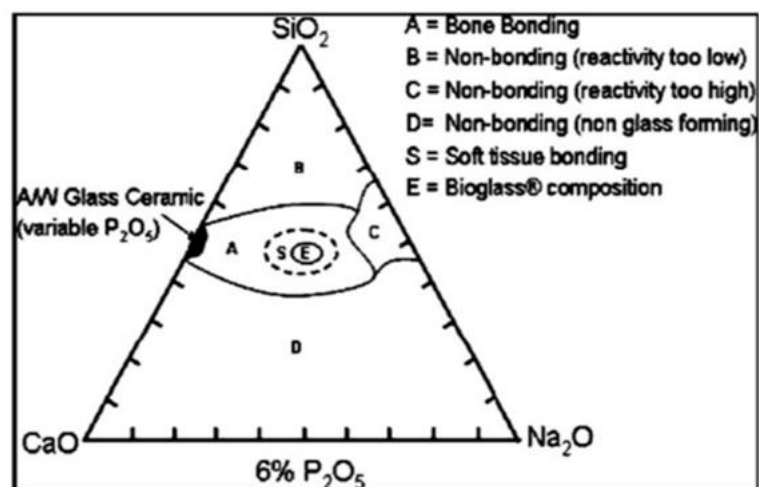


Fig.3.1 Diagramma di fase di un vetro bioattivo silicato [34]

La scoperta del vetro bioattivo risale proprio a Hench che tramite il Bioglass® 45S5 nel 1969 è riuscito a ottenere il primo esempio di un biomateriale appartenente alla terza generazione.

Il vetro bioattivo 45S5, di composizione 45%mol SiO<sub>2</sub> - 24.5%mol Na<sub>2</sub>O - 24.5%mol CaO - 6%mol P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, ha la capacità di formare un legame chimico con il tessuto osseo se immerso in una soluzione fisiologica simulata, portando così alla formazione di uno strato di idrossiapatite (simile alla fase minerale dell'osso). Con questo si introduce una prima proprietà del vetro bioattivo, quale l'osteococonduzione mentre l'inclusione di altri cationi all'interno dei vetri bioattivi conferisce proprietà osteoinduttive.[11]

Il meccanismo di bioattività descritto da Hench (Fig 3.2) definisce come la formazione di uno strato di idrossiapatite avviene in seguito a 5 fasi che si succedono nei fluidi corporei in vivo o in SBF in vitro.

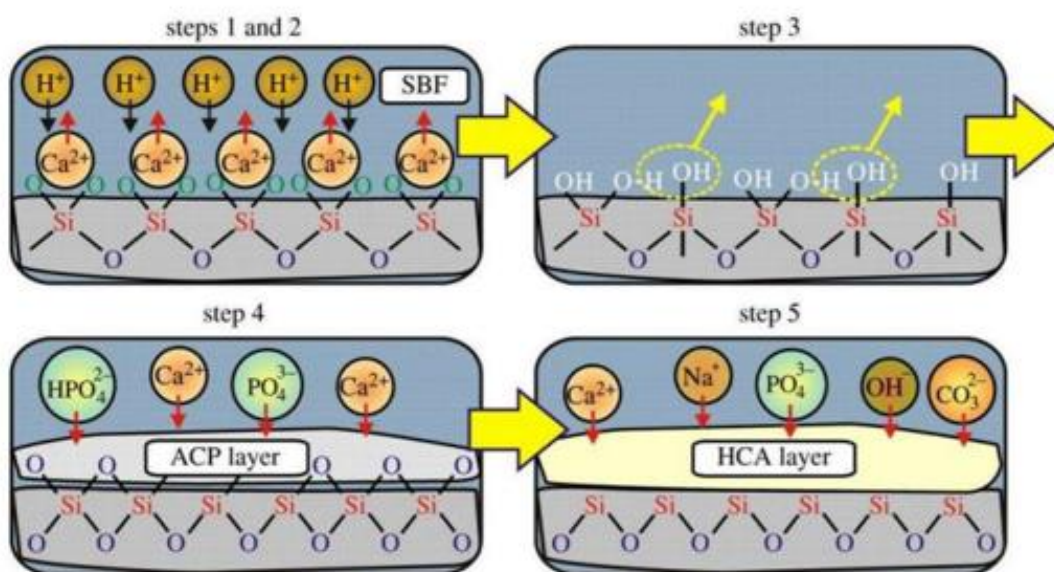


Fig 3.2 Meccanismo di bioattività

Innanzitutto si ha uno scambio ionico di ioni sodio  $\text{Na}^+$  e/o  $\text{Ca}^{2+}$  con ioni  $\text{H}^+$  provenienti dalla soluzione, con questo segue la creazione di  $\text{Si-OH}$  sulla superficie del vetro. Nella prima fase il pH aumenta e si forma una regione ricca di silice in prossimità della superficie del vetro. Dopodiché, si ha il rilascio di silice solubile in soluzione nella forma di  $\text{Si}(\text{OH})_4$ ; La silice solubile abbandona il vetro ma sulla superficie vi sono i silanoli, non tutti passano in soluzione; Si ha quindi successivamente la condensazione dei gruppi silanoli che polimerizzando formano la silice idrata ovvero gel di silice in superficie. Nello strato che si è formato è presente prevalentemente silice e non si hanno più ioni calcio, ioni fosfato e ossidi modificatori. Inoltre, si ha la migrazione di ioni  $\text{Ca}^{2+}$  e ioni fosfato dalla soluzione alla superficie. Nello strato di gel cominciano a diffondersi altri ioni presenti in soluzione restando comunque in fase amorfa. Infine si ha la cristallizzazione del layer superficiale tramite  $\text{OH}^-$  e ioni carbonato derivati dalla soluzione. Quando la concentrazione di fosfato di calcio è sufficientemente elevata il fil di gel si riorganizza tanto da cristallizzare sotto forma di cristalli di idrossicarbonatoapatite, poiché anche gli ioni carbonato sono presenti in soluzione.

I requisiti fondamentali di un vetro bioattivo sono:

- La biocompatibilità dei vetri bioattivi è una proprietà fondamentale, non possono essere tossici e, allo stesso tempo devono garantire la proliferazione cellulare.
- A contatto con una soluzione fisiologica simulata (fluido corporeo simulato), deve formarsi uno strato di idrossiapatite.
- Il vetro bioattivo deve poter resistere a qualsiasi tipo di pressione o sforzo anche durante la manipolazione del materiale e durante le normali attività del paziente.[14]

In questo Lavoro di Tesi vengono scelte nanoparticelle di vetro (BGs) che rispetto alle micrometriche determinano una degradazione più rapida migliorando le proprietà bioattive e accelerando il processo rigenerativo. Queste in sintesi, permettono l'assorbimento cellulare, garantendo un rilascio intracellulare e localizzato di ioni terapeutici.[15]

### 1.3.2 Proprietà degli ioni di rame e tellurio nei vetri bioattivi

Gli ioni inglobati e successivamente rilasciati, stimolano gli effetti metabolici coinvolti nella formazione dei tessuti e possono indurre risposte intracellulari ed extracellulari.

Per esempio oggetto di questo studio sono il rame e il tellurio. È stato confermato che il rame è presente sotto forma di ioni  $\text{Cu}^{2+}$  nella struttura vetrosa fungendo da ione modificatore. Il rame, possiede proprietà pro-angiogeniche, in particolare, permette la formazione di un network di capillari e la vascolarizzazione in vivo di uno scaffold.[32] Alcuni studi suggeriscono che il rame possa stimolare la proliferazione e la differenziazione delle cellule staminali mesenchimali, influenzando positivamente l'osteogenesi. [12]

I vetri bioattivi contenenti tellurio possiedono invece un forte effetto antibatterico, inibendo la formazione di biofilm di *S.aureus* e *S.epidermidis*.

Insieme all'effetto antibatterico possiedono anche un effetto antiossidante, riducendo la risposta infiammatoria nei tessuti circostanti all'innesto del materiale. [13]

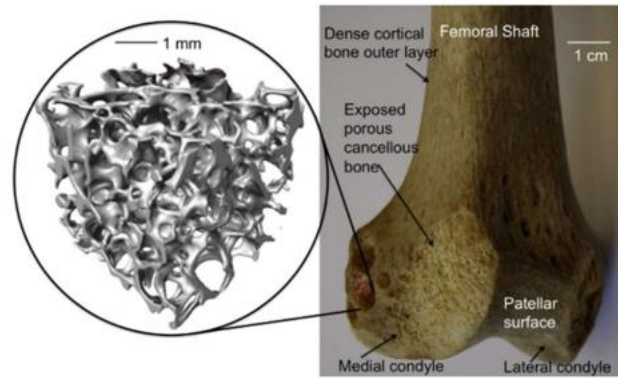
### 1.3.3 La rigenerazione ossea attraverso gli scaffolds

Una delle applicazioni più importanti dei vetri bioattivi è la rigenerazione ossea, e la guarigione dunque di difetti ossei, che possono essere causati da traumi o da malattie, quali osteoporosi. In generale, sono stati sviluppati scaffold per risolvere lesioni ossee che si verificano sempre più frequentemente negli anziani.[8] La guarigione naturale delle ossa nel corpo umano ha bisogno del sostegno di innesti che risultano sempre più limitati.

L'idea della rigenerazione ossea tramite l'utilizzo di uno scaffold è quella di utilizzare un template tridimensionale temporaneo per determinare la fase di riparazione dell'osso: idealmente lo scaffold dovrebbe stimolare il naturale meccanismo di rigenerazione del corpo umano; permettendo di reclutare le cellule e all'interno di far penetrare i vasi sanguigni per la sopravvivenza dell'osso. Lo scaffold deve poi lasciare spazio al nuovo osso per far sì che questo si rimodelli naturalmente.

In generale l'osso è un nanocomposito la cui componente organica è formata da collagene, mentre la componente inorganica è formata da fosfati di calcio in forma di cristalli di idrossiapatite. L'osso spongioso ha una struttura composta da un network interconnesso di pori con dimensione di 500 micrometri come è mostrato in Fig.3.3.





*Fig.3.3 Struttura dell'osso spongioso [35]*

L'ingegneria dei tessuti ha dettato una grande rilevanza nel campo della riparazione e rigenerazione ossea combinando biomateriali biocompatibili che imitano la matrice cellulare naturale[9].Inoltre l'incorporazione di vetri bioattivi negli scaffold porta a un miglioramento delle proprietà meccaniche e del comportamento biologico, che è studio di questa Tesi.[10]

## 2. Materiali e Metodi

In questa sezione verranno elencati i materiali e i metodi utilizzati per l'analisi di caratterizzazione dei vetri bioattivi e delle formulazioni per il processo di stampa 3D.

### 2.1 Materiali

Per la preparazione delle formulazioni, sono stati utilizzati i seguenti componenti:

- Monomero: Olio di soia epossidato acrilato (AESO) prodotto da Sigma Aldrich(Fig.4)

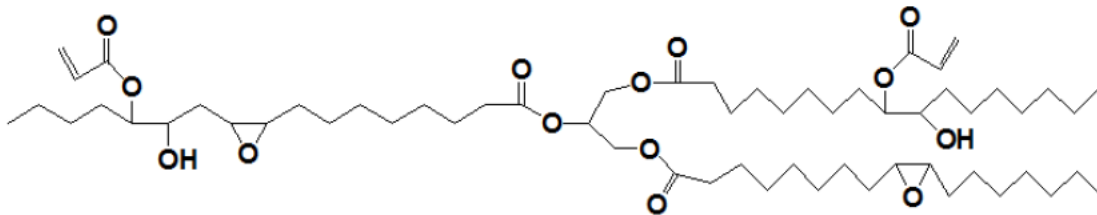


Fig.4 Struttura dell'olio di soia epossidato acrilato (AESO)

- Diluente: Isobornil acrilato (IBOA) prodotto da Sigma Aldrich (Fig.5)

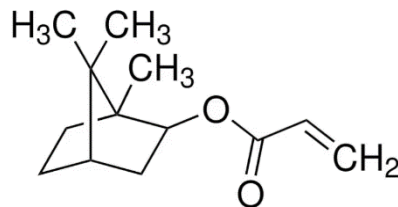


Fig.5 Struttura dell'isobornil acrilato (IBOA)

- Fotoiniziatore: Fenilbis(2,4,6-trimetilbenzoil)fosfina ossido, con nome commerciale di Irgacure 819, prodotto dalla BASF.

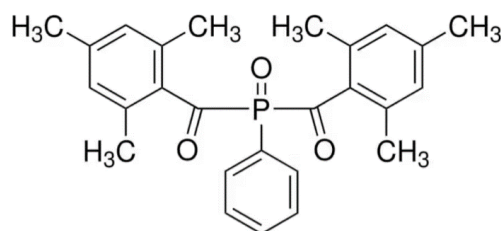


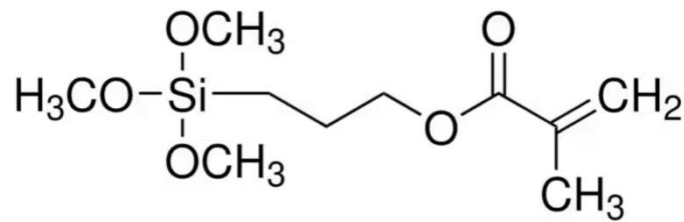
Fig.6 Struttura dell'Irgacure 819(BAPO)

I principali componenti chimici utilizzati per la sintesi dei vetri bioattivi sono:

- Idrossido di ammonio ( $\text{NH}_4\text{OH}$ )
- Ortosilicato tetraetile (TEOS)
- Tellurite di sodio ( $\text{Na}_2\text{TeO}_3$ )
- Nitrato di rame(II) triidrato ( $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ )
- Trietilfosfato (TEP)
- Nitrato di calcio tetraidrato ( $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ )

Mentre per la funzionalizzazione è stato utilizzato l'agente silanizzante:

- 3-(Trimethoxysilyl)propylmethacrylate (TMSPMA)



*Fig.7 Struttura del 3-(Trimethoxysilyl)propylmethacrylate (TMSPMA)*

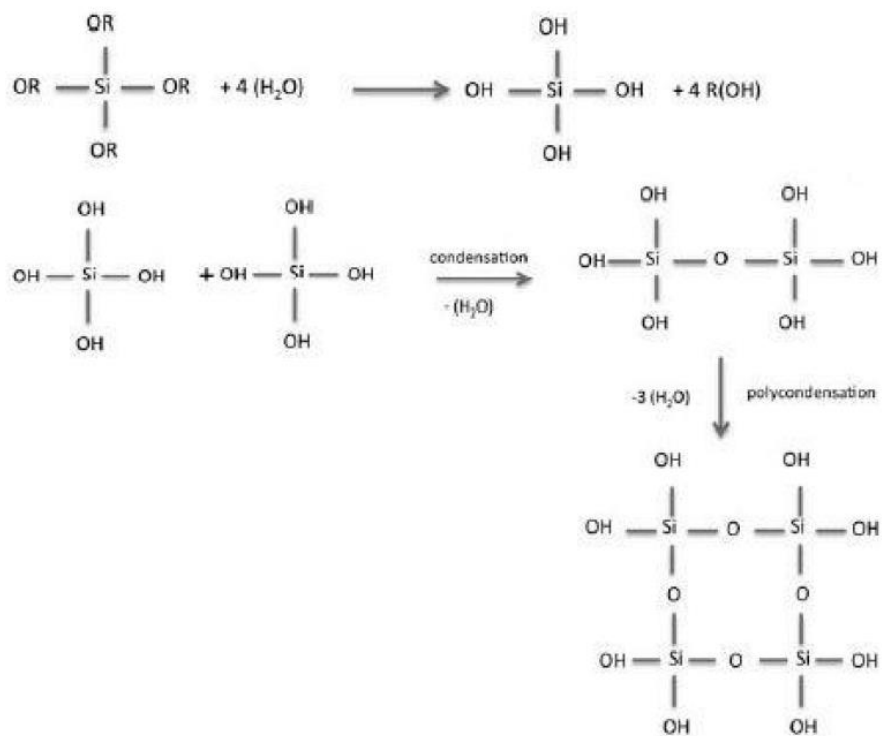
## 2.2 Sintesi sol-gel dei vetri bioattivi

La tecnica sol-gel permette di ottenere un *gel* (sistema bifasico, solido e liquido) partendo da un *sol* (dispersione di particelle colloidali in un liquido) attraverso un processo di idrolisi e polimerizzazione.

La sintesi è stata eseguita utilizzando il "metodo delle due soluzioni", ovvero una sintesi basica basata sulla miscela iniziale di due soluzioni: la prima contenente EtOH e TEOS, mentre la seconda contenente solo solventi come H<sub>2</sub>O ed EtOH, caratterizzata dall'aggiunta di una soluzione di ammoniaca (NH<sub>4</sub>OH al 28%) con la funzione di agente gelificante. Di seguito i passaggi caratteristici della tecnica:

1. Miscela dei precursori;
2. Idrolisi in catalisi basica dei precursori in acqua deionizzata e idrossido di ammonio: si formano silanoli che condensano formando Si-O-Si ed originano il network di silice;
3. Gelazione: la viscosità aumenta;
4. Essiccamento a 60°C per 48 ore;
5. Calcinazione per stabilizzare il sistema, a 600-700°C per 2 ore. [16][37]

L'idrolisi in catalisi basica, per questo processo inizia con l'attacco nucleofilo dell'ossidrile (OH<sup>-</sup>) al silicio (Si<sup>4+</sup>) del gruppo -OR del precursore. Questo porta alla sostituzione del gruppo -OR con un gruppo -OH, generando l'idrolisi del precursore. Successivamente, i precursori idrolizzati e quelli non idrolizzati reagiscono tra loro attraverso un processo di condensazione. La condensazione comporta la formazione di legami Si-O-Si. Questo processo prosegue fino a che il sistema sviluppa la struttura finale a base di silice, come indicato nella sintesi sol-gel.



*Fig.8 Reazioni nella sintesi sol-gel di un vetro a base silice*

Nello specifico, è stato utilizzato un catalizzatore basico ovvero l'ammoniaca (NH<sub>4</sub>OH). L'ammoniaca agisce come agente gelificante nel processo sol-gel, promuovendo l'idrolisi e la condensazione dei precursori (come il TEOS) per formare le nanoparticelle di silice.

L'uso dell'ammoniaca permette di controllare il pH della soluzione promuovendo un pH più alto che favorisce la formazione di nanoparticelle di dimensioni maggiori, migliorando la monodispersione delle particelle e riducendo l'aggregazione.

Sono stati considerati e preparati tre tipi di vetri bioattivi mostrati in Tab.1: il vetro S4, utilizzato come riferimento, e due varianti dopate rispettivamente con ioni rame (S4BCu) e ioni tellurio (S4BTe), utilizzando come precursori l'ortosilicato tetraetile (TEOS) per il silicio, trietilfosfato (TEP) per il fosforo, nitrato di calcio tetraidrato per il calcio, nitrato di rame triidrato per il rame e tellurite di sodio ( $\text{Na}_2\text{TeO}_3$ )

<i>Vetro</i>	<b>SiO<sub>2</sub>[%]</b>	<b>P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>[%]</b>	<b>CaO[%]</b>	<b>CuO[%]</b>	<b>TeO<sub>2</sub>[%]</b>
<i>S4</i>	77	9	14	-	-
<i>S4BCu</i>	62	9	9	5	-
<i>S4BTe</i>	62	9	9	-	5

*Tab.1 Composizione dei vetri bioattivi*

### 2.2.1 Vetro S4

Per la preparazione del vetro S4, sono state preparate due soluzioni distinte:

- Soluzione I: 46 ml di acqua bidistillata, 30 ml di etanolo (EtOH) e 17 ml di idrossido di ammonio (NH<sub>4</sub>OH).
- Soluzione II: 93 ml di EtOH e 11,2 ml di tetraetilortosilicato (TEOS).

La Soluzione II viene agitata su una piastra con un'ancoretta magnetica per 30 minuti. Successivamente, la Soluzione I viene aggiunta lentamente alla Soluzione II continuando l'agitazione per altri 30 minuti, durante i quali si forma una sospensione bianca indicativa della formazione di nanoparticelle di silice (Fig.9). Questa sospensione viene quindi centrifugata a 7000 rpm per 5 minuti (Fig.10) per raccogliere le nanoparticelle (Fig.11) e rimuovere gran parte del solvente. In seguito, vengono aggiunti 0,84 ml di trietilfosfato (TEP) come precursore del fosforo e mantenute in agitazione per 3 ore. Successivamente, si aggiungono 2,31 g di nitrato di calcio tetraidrato (Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O) e si prosegue con l'agitazione per altri 90 minuti. Infine, le polveri di vetro ottenute vengono centrifugate e successivamente essiccate a 60°C per 48 ore (Fig.14). Dopodichè, le polveri vengono pestate in un mortaio e inserite in un crogiolo (Fig.15) per il trattamento in forno a 700°C per 2 ore (Fig.16).

### 2.2.2 Vetro S4BCu

La procedura per il vetro S4BCu segue lo stesso metodo dell'S4 fino all'aggiunta del precursore del calcio. Dopo 90 minuti di agitazione, si aggiungono 0,74 g di nitrato di rame triidrato (Cu(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·3H<sub>2</sub>O) (Fig 13), continuando la miscelazione per altri 30 minuti per permettere l'incorporazione del rame nella struttura vetrosa. La sospensione ottenuta, di colore blu, viene poi trattata come il vetro S4 per ottenere le polveri finali.

### 2.2.3 Vetro S4BTe

Per il vetro S4BTe, si segue lo stesso procedimento fino all'aggiunta del precursore del tellurio, sostituendo il rame con 0,277 g di tellurite di sodio ( $\text{Na}_2\text{TeO}_3$ ). Anche in questo caso, la miscelazione viene prolungata per 30 minuti, e la sospensione, che rimane bianca, viene sottoposta agli stessi passaggi di centrifugazione, essiccamento e trattamento termico utilizzati per gli altri vetri bioattivi.

Questa procedura permette di ottenere tre tipi di vetri bioattivi, ciascuno con specifiche proprietà dovute alla presenza di differenti ioni dopanti (rame o tellurio).



*Fig. 9 Formazione di nanoparticelle di silice*





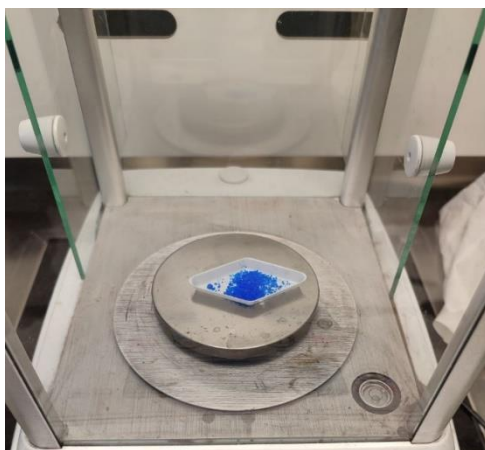
*Fig. 10 Centrifugazione della sospensione*



*Fig. 11 Raccolta delle nanoparticelle di silice*



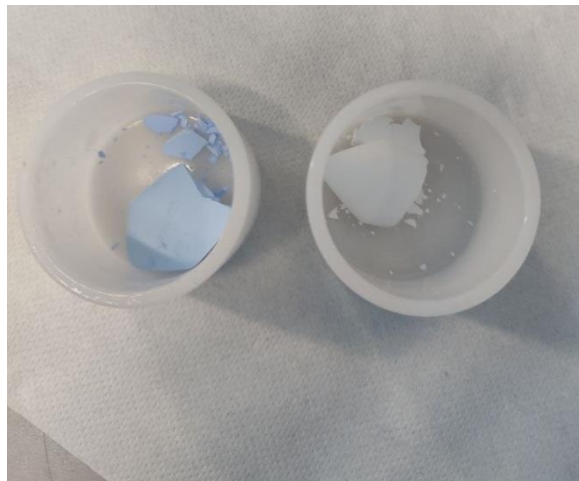
*Fig. 12 Nanoparticelle di silice*



*Fig. 13 Polveri di nitrato di rame triidrato ( $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ )*



*Fig. 14 Inserimento delle polveri S44BCu e S4 in stufa per essere essiccate*



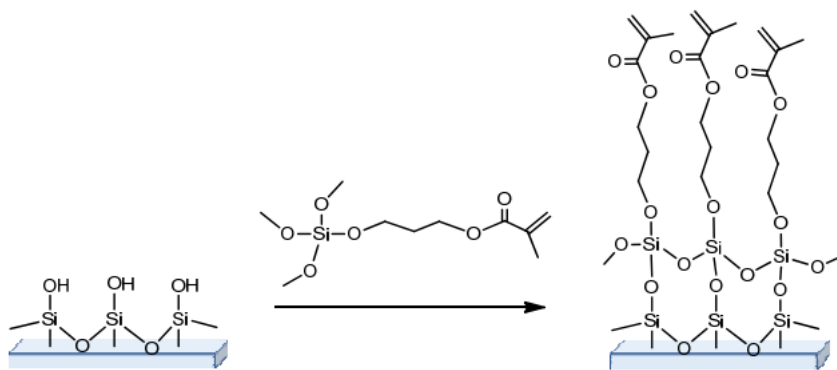
*Fig. 15 Polveri di S4BCu (in blu) e S4 essiccate*



*Fig. 16 Crogioli con le polveri di S4BCu e S4 in forno*

## 2.3 Funzionalizzazione dei vetri bioattivi

La funzionalizzazione dei vetri bioattivi tramite silanizzazione è una tecnica utilizzata per migliorare le proprietà superficiali dei vetri bioattivi. La silanizzazione consente di legare chimicamente agenti silanici (Fig.17) alla superficie del vetro[18]



*Fig.17 Legami tipici tra superficie vetrosa e silano(TMSPMA)*

Per la funzionalizzazione, è stato scelto il vetro S4 come riferimento, e lo stesso metodo è stato successivamente applicato anche ai vetri bioattivi dopati con Cu e Te.

### 2.3.1 Pretrattamento

La procedura è stata eseguita considerando variabili come il pretrattamento, il tempo di miscelazione e la presenza di un pH acido. Si è mantenuto lo stesso pretrattamento, variando il pH e il tempo di miscelazione. [19] Utilizzando il pretrattamento in acetone riusciamo a esporre i gruppi -OH utili al legame con l'agente silanizzante.

Trattamento con Acetone:

Si sono prelevate 0,5 g di polvere S4, sono stati immersi in 2 ml di acetone all'interno di una cuvetta. La cuvetta è stata sottoposta a ultrasuoni per 5 minuti e poi centrifugata a 7000 rpm per 5 minuti. L'acetone è stato successivamente rimosso con una pipetta.

Trattamento con Acqua:

Alle polveri trattate con acetone sono stati aggiunti 2 ml di acqua. La cuvetta è stata sottoposta a ultrasuoni per 5 minuti e poi centrifugata per 5 minuti a 7000 rpm. Questo processo è stato ripetuto tre volte, seguito da asciugatura delle polveri in incubatore a 37°C per una notte.

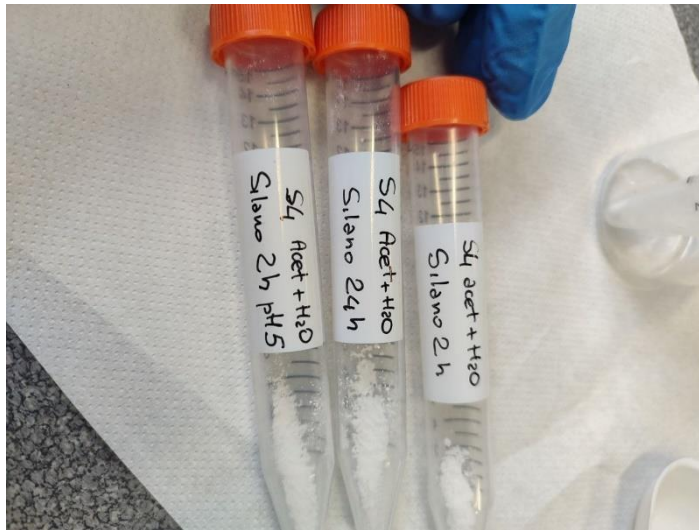
### 2.3.2 Silanizzazione

- Dopo aver prelevato 0,5 g di polvere di S4 pretrattata, è stata suddivisa in tre cuvette, ognuna contenente 0,15 gr di polvere e 1 ml di una soluzione composta da 800 µl di etanolo e 200 µl di 3-(Trimethoxysilyl)propylmethacrylate (agente silanizzante).

Le cuvette in Fig.18 sono trattate come segue:

- **Cuvetta 1:** Miscelazione per 2 ore
- **Cuvetta 2:** Miscelazione per 2 ore e pH 3 (ottenuto aggiungendo acido acetico, verificato con cartine in Fig.19).
- **Cuvetta 3:** Miscelazione per 24 ore.

Le cuvette sono state sottoposte a ultrasuoni per 5 minuti per favorire una migliore dispersione del silano. Nelle cuvette 1 e 2 è stato mantenuto il tempo di miscelazione variando il pH. Terminata la miscelazione si è passati alla centrifugazione a 7000 rpm per 5 minuti e rimosso l'eccesso di soluzione è stato rimosso. È stato aggiunto 1 ml di etanolo, seguito da un'ulteriore centrifugazione e rimozione dell'eccesso. Infine, le cuvette sono state poste in incubatore a 37°C per 24 ore (Fig.20). Nella cuvetta 3, si è variato il tempo di miscelazione per 24 ore, con conseguente centrifugazione per 5 minuti e rimozione di etanolo per due volte consecutive.



*Fig.18 Cuvette 1,2,3 con diversi trattamenti*



*Fig.19 Utilizzo di cartine per la misura del pH*



*Fig.20 Cuvette in miscelatore a 37°C*



## 2.4 Preparazione delle Formulazioni

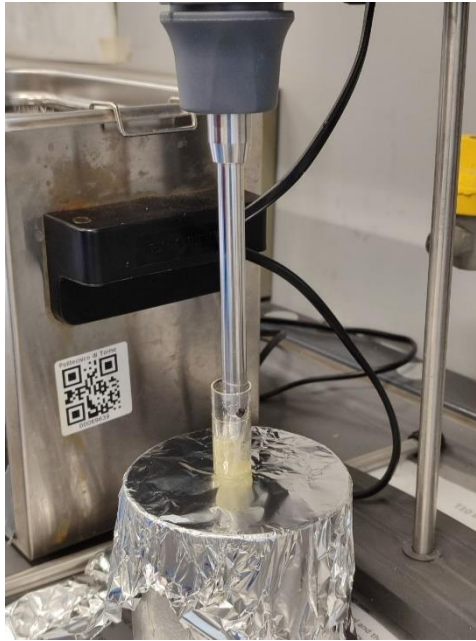
Si sono realizzate 6 formulazioni che prevedono una miscela di base AESO 70:30, 70% AESO e 30% IBOA con 1 phr di fotoiniziatore (Irgacure 819) e 30phr di vetri bioattivi silanizzati *vedi Sezione 2.1 Materiali*.

Nella Tab. 2 seguente sono riportate le sei diverse formulazioni preparate per gli studi di caratterizzazione.

<i>Formulazione di base</i>	<b>30 phr vetri bioattivi</b>
<i>AESO 70%</i>	S4
<i>IBOA 30%</i>	S4_Silanizzato
<i>1phr BAPO</i>	S4BCu
	S4BCu_Silanizzato
	S4BTe
	S4BTe_Silanizzato

*Tab.2 Formulazioni utilizzate per i test di caratterizzazione e per il processo di stampa 3D*

Ogni formulazione è stata trattata con ultrasuoni per circa 5 minuti a 60°C per migliorare la dispersione delle particelle di vetro. Successivamente, la miscela è stata omogeneizzata utilizzando un Ultraturrax T10 per 2 minuti(Fig.21), con un intervallo di un minuto, per disperdere ulteriormente le particelle e ottenere una miscela più uniforme. Per ultimare il processo, è stato utilizzato Thinky mixer, che combina rotazione e controrotazione per migliorare l'efficienza della miscelazione.



*Fig.21 Ultraturrax T10, utilizzato per miscelare le formulazioni*

## 2.5 Stampa 3D

Il processo di stampa 3D è stato eseguito utilizzando una stampante a stereolitografia mascherata (MSLA) modello SL1S SPEED acquistata da Prusa(Fig.22).

La Prusa SL1S SPEED è una stampante 3D ad alta velocità che utilizza la tecnologia **MSLA (Masked Stereolithography Apparatus)**. Questa stampante è progettata per essere più veloce rispetto ai modelli precedenti, con tempi di polimerizzazione strato per strato che possono scendere fino a 1,4 secondi. La SL1S SPEED è dotata di un LCD monocromatico da 5,96 pollici con una risoluzione di 2560x1620 pixel, che offre un'elevata precisione di stampa. La stampante ha un volume di costruzione di 127 x 80 x 150 mm.

La stampante MSLA utilizza un vat contenente resina fotopolimerizzabile, che si solidifica quando esposta alla luce ultravioletta (UV). Una sorgente UV, costituita da un LED monocromatico a 405 nm, emette luce attraverso uno schermo LCD per polimerizzare gli strati di resina in una volta sola e rendendo più veloce la stampa. Questo schermo funge da maschera digitale, bloccando o lasciando passare la luce per solidificare solo le aree illuminate della resina, utile per dettagli complessi. Una piattaforma si muove verticalmente, permettendo la formazione del modello strato dopo strato. Il processo di stampa inizia con un file CAD che viene convertito in formato SL1S tramite PrusaSlicer per essere riconosciuto dalla stampante.[21][22]



*Fig.22 Stampante 3D tipo MSLA, Prusa SL1S SPEED[32]*

## 2.6 Tecniche di Caratterizzazione

Le seguenti analisi riassumono i test di caratterizzazione affrontati per i vetri bioattivi, le formulazioni liquide e i campioni ottenuti dal processo di stampa 3D.

- **Spettroscopia Infrarossa a trasformata di Fourier (FTIR):** L'analisi ATR-FTIR per identificare i picchi dei legami chimici specifici della funzionalizzazione. Mentre l'analisi in trasmissione è utilizzata per determinare la conversione dei legami sulle resine liquide.
- **Angolo di Contatto:** Per misurare l'idrofobicità delle superfici dei vetri bioattivi silanizzati e non trattati.
- **Potenziale Zeta e DLS (Dynamic Light Scattering):** Per analizzare la distribuzione delle dimensioni delle particelle nei campioni vetrosi silanizzati e non, fornendo ulteriori informazioni sulla stabilità delle sospensioni di nanoparticelle di vetro silanizzato e non trattato, in acqua.
- **Microscopio elettronico a scansione ad emissione di campo e spettroscopia in dispersione di energia (FESEM-EDS):** Per l'analisi superficiale e composizionale dei campioni vetrosi e dei provini dopo il processo di stampa 3D.
- **Foto Calorimetria a Scansione Differenziale (fotoDSC):** Per misurare il calore del processo di fotopolimerizzazione delle resine liquide
- **Reologia e Fotoreologia:** Per analizzare la viscosità di stampa e la cinetica di polimerizzazione delle resine liquide
- **Analisi Dinamico Meccanica Termica (DMTA):** Per valutare il comportamento termomeccanico delle resine fotoreticolate e determinare la temperatura di transizione vetrosa
- **Prove a Trazione e Compressione:** Per determinare le proprietà meccaniche dei campioni post-stampa.

### 2.6.1 Spettroscopia Infrarossa a trasformata di Fourier (FTIR)

Per questa analisi è stato utilizzato lo spettrometro Thermo Scientific™ Nicolet™ iS50 FTIR, con il software Omnic™ Spectra per visualizzare lo spettro di assorbimento. Questa analisi viene utilizzata per caratterizzare le superfici, identificando legami chimici attraverso l'energia vibrazionale emessa. Quando i legami chimici assorbono la radiazione infrarossa, rilasciano energia sotto forma di vibrazioni, che permettono di ottenere informazioni sulla struttura chimica. Ogni legame ha un'energia specifica che si manifesta come un picco nello spettro di assorbimento. Questa analisi è stata utilizzata per caratterizzare la superficie vetrosa. Per questa analisi si sono studiate le 3 prove di miscelazione per il vetro bioattivo S4, S4BCu per valutare la funzionalizzazione *Sezione 2.3.2 Silanizzazione*[23]

Gli spettri mostrano il numero d'onda sulle ascisse e l'assorbanza in percentuale sulle ordinate. Invece, l'analisi ATR-FTIR è stata impiegata per valutare le 6 formulazioni in *Sezione 2.4* dopo l'esposizione a una lampada Hamamatsu LC8 al 50% dell'intensità, determinando il grado di conversione della resina dopo la fotoreticolazione. Le formulazioni sono state depositate su un supporto in silicio come film spessi circa 12 µm, e gli spettri IR sono stati acquisiti per le sei formulazioni, ottenendo prima la baseline e poi esponendo ciascuna formulazione per 10s, 20s, 30s, 60s e 120s.

In questo lavoro di tesi l'analisi FTIR è stata utilizzata per verificare la conversione di legami (in questo caso C=C degli acrilati) seguendo la diminuzione dei picchi specifici indicando il progresso della polimerizzazione. In questo modo valutiamo la cinetica di polimerizzazione della resina liquida successivamente all'esposizione alla luce UV. Monitorando così, i picchi specifici che diminuiranno con la polimerizzazione. Nell'ATR, quindi la luce infrarossa non attraversa il campione, ma viene riflessa più volte all'interno di un cristallo a contatto con il campione, generando un'onda evanescente che penetra solo pochi micrometri nella superficie del campione. In questo modo, l'analisi si concentra sulla superficie del campione. A differenza della tecnica eseguita in trasmissione sui vetri bioattivi silanizzati e non in cui la luce infrarossa attraversa tutto il campione.

La conversione è stata calcolata utilizzando la seguente equazione:

$$\text{Conversione (\%)} = \frac{\left(\frac{A_{fun}}{A_{rif}}\right)_{t=0} - \left(\frac{A_{fun}}{A_{rif}}\right)_t}{\left(\frac{A_{fun}}{A_{rif}}\right)_{t=0}} \cdot 100$$

Dove  $A_f$  è l'area del picco del gruppo funzionale sotto indagine durante la prova e  $A_r$  è l'area del picco utilizzato come riferimento.

### 2.6.2 Angolo di Contatto

La misurazione dell'angolo di contatto fornisce informazioni sulle caratteristiche superficiali di un materiale, come la sua bagnabilità e le proprietà idrofobiche o idrofile. Questo angolo si forma tra la superficie di un solido e la tangente alla superficie di un liquido posizionato su di esso.

Nel caso dei vetri bioattivi, la misurazione dell'angolo di contatto permette di valutare come il processo di silanizzazione influisce sull'idrofobicità/idrofilicità del materiale. Questo tipo di analisi viene generalmente eseguito utilizzando il metodo della goccia sessile, dove una goccia di liquido (di solito acqua) viene posta sulla superficie del vetro, e l'angolo tra la superficie del vetro e la tangente alla goccia viene misurato.

Per effettuare l'analisi, una piccola quantità di vetro viene distribuita uniformemente su un vetrino. Successivamente, una goccia di liquido viene applicata con una siringa e si cattura il momento in cui la goccia si deposita sulla superficie o viene assorbita, permettendo di misurare con precisione l'angolo di contatto.

Inoltre, una superficie verrà considerata idrofobica quando l'angolo di contatto dell'acqua con la superficie è superiore a 90 gradi. Al contrario, idrofilica quando l'angolo di contatto è inferiore a 90 gradi.

### 2.6.3 Potenziale Zeta e DLS

Il potenziale zeta è una misura fondamentale per caratterizzare superfici e materiali, in particolare per valutare le modifiche della superficie determinate da trattamenti specifici, come la funzionalizzazione. Questa misura è fondamentale per controllare la stabilità delle sospensioni di nanoparticelle, oltre che per analizzare i processi di coagulazione.

Il diametro idrodinamico descrive le dimensioni effettive di una particella sospesa in un fluido, tenendo conto non solo della dimensione della particella stessa, ma anche dello strato di molecole di solvente che la circonda. La misurazione di questo diametro avviene tramite la tecnica del Dynamic Light Scattering (DLS), in cui un raggio laser viene diretto attraverso la sospensione di particelle. Le particelle, in movimento per diffusione browniana, diffondono la luce laser in tutte le direzioni.

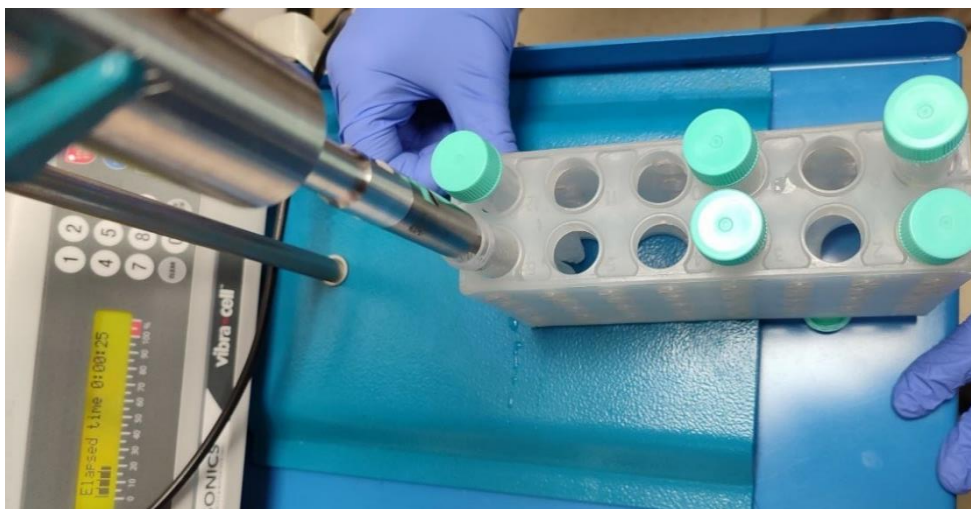
Nell'analisi del potenziale zeta e del diametro idrodinamico, si valuta il grado di dispersione delle nanoparticelle e la dimensione delle particelle di vetro, sia silanizzate che non trattate tramite strumento Anton Paar (Fig.23)

Per queste misurazioni, è stata utilizzata acqua bidistillata a pH 7, simile al pH fisiologico, analizzando tre polveri di vetri bioattivi silanizzati e tre di vetri bioattivi non silanizzati.

Sono stati preparati campioni inserendo 5 mg di polveri non trattate in cuvette da 25 ml contenenti 10 ml di acqua bidistillata a pH 7. Dopo 1 minuto di trattamento con ultrasuoni(Fig.24), si sono prelevati 1200 microlitri di soluzione e trasferiti in una cuvetta, riempita con acqua bidistillata fino a poco meno dell'orlo. La cuvetta è stata quindi inserita nello strumento per avviare l'analisi. La stessa soluzione utilizzata per misurare il diametro dinamico medio è stata inserita nella "omega cuvette" dello strumento per lo studio del potenziale zeta.



*Fig.23 Strumento Anton Paar, per la misura del potenziale zeta e diametro idrodinamico*



*Fig.24 Trattamento con ultrasuoni delle sospensioni*



#### 2.6.4 Microscopio elettronico a scansione ad emissione di campo e spettroscopia in dispersione di energia (FESEM-EDS)

Il Field Emission Scanning Electron Microscope (FESEM) è una analisi avanzata del microscopio elettronico a scansione (SEM) che utilizza un fascio di elettroni ad alta energia. Il FESEM genera un fascio di elettroni ad emissione di campo, ottenendo un'alta risoluzione e maggiore coerenza del fascio.

Gli elettroni emessi vengono accelerati da una differenza di potenziale (tipicamente tra 1 kV e 30 kV) e focalizzati su un punto del campione grazie a lenti elettromagnetiche.

Vi sono più segnali che vengono generati dall'interazione con il campione:

- Elettroni secondari (SE): Sono elettroni a bassa energia che mostrano la morfologia e topografia della superficie del campione.
- Elettroni retrodiffusi (BSE): Sono elettroni riflessi con una maggiore energia. Forniscono informazioni sulla composizione del campione, poiché gli elementi più pesanti riflettono più elettroni.
- Raggi X : Sono quelli derivanti dagli strati interni degli atomi del campione, e gli elettroni di strati superiori vanno a riempire le vacanze che si sono formate, emettendo raggi X specifici. Questi sono utilizzati per l'analisi chimica tramite spettrometria a dispersione di energia (EDS).
- EDS) è una tecnica che permette la caratterizzazione chimica di materiali. E' utilizzata per identificare elementi presenti in un campione e per determinare la loro composizione. [24]

L'utilizzo del FESEM ad emissione di campo con strumento SUPRATM 40 Zeiss, consente di osservare la morfologia e la distribuzione dei vetri bioattivi all'interno della matrice polimerica. Si utilizza per studiare le modifiche superficiali del composito, in questo caso dopo avvenuta funzionalizzazione. Quando viene unito all'EDS, il FESEM può fornire informazioni sulla composizione chimica per verificare la presenza di calcio e fosforo importante per la bioattività insieme alla presenza di ioni Cu e Te per introdurre le proprietà antibatteriche e pro-angiogeniche all'interno dei vetri bioattivi. In questo caso l'analisi EDS servirà a valutare la presenza di rame e tellurio all'interno del network vetroso, affinché non vengano rilasciati in soluzione.

Per le analisi FESEM-EDS dei vetri bioattivi è stata preparata una soluzione acquosa posizionata su retini di rame con carbon tape (SPI Supplies Lacey Carbon Coated 200 Mesh Copper Grids) e lasciata essiccare a temperatura ambiente.

Mentre per l'analisi al microscopio elettronico a scansione (FESEM) sono stati trattati i provini a trazione stampati 3D, riduci delle prove meccaniche in cui è stata esposta la superficie di frattura e ricoperta di platino per renderla conduttiva.

Questi provini sono stati posizionati su un tape in carbonio su uno stub che verrà inserito nello strumento per l'analisi.

#### 2.6.5 Foto calorimetria a scansione differenziale (Foto-DSC)

L'analisi foto-DSC, è una tecnica utilizzata per monitorare e quantificare i processi di polimerizzazione foto indotta. Questo studio, misura l'energia rilasciata durante la fotopolimerizzazione della resina.

Con lo strumento Mettler TOLEDO DSC-1 di calorimetria a scansione differenziale si ottengono le variazioni di entalpia nei campioni quando vengono sottoposti a un irraggiamento luminoso. Per questo si utilizza una lampada a mercurio di tipo Hamamatsu LC8 ad intensità circa pari a  $100 \text{ mW/cm}^2$ , lunghezza d'onda 365 nm. In questo caso la lampada è stata utilizzata al 50% dell'intensità totale. Per ogni prova, vengono inseriti 9-12 mg per le sei formulazioni *vedi Sezione 2.4 Tab.2* in un crogiolo di alluminio con un volume di 40  $\mu\text{L}$ , il tutto a temperatura ambiente di  $25^\circ\text{C}$ .

#### 2.6.6 Reologia e Fotoreologia

La reologia è stata condotta per valutare la viscosità delle formulazioni preparate per determinare la loro idoneità per il processo di stampa 3D con valori di viscosità registrati su un intervallo di velocità di taglio compreso tra  $0,01$  e  $1000 \text{ s}^{-1}$ .

La foto-reologia è stata eseguita utilizzando lo stesso reometro, con l'aggiunta di una lampada UV Hamamatsu LC8 con una potenza di irradiazione di  $30 \text{ mW/cm}^2$ . La lampada è stata accesa 120 secondi dopo l'inizio di ogni test. La lampada è stata utilizzata al 100% della sua intensità, con una potenza di irradiazione di  $30 \text{ mW/cm}^2$ . La piastra inferiore è stata sostituita con una piastra di vetro per consentire il passaggio della radiazione UV e la distanza tra le piastre è stata ridotta a 0,3 mm. Le misurazioni sono state eseguite a una frequenza costante di 1 Hz e a una temperatura costante di  $25^\circ\text{C}$ . Durante questo tipo di analisi, i due moduli  $G'$  e  $G''$  sono stati misurati nel tempo.  $G'$  rappresenta il modulo conservativo, che descrive la componente elastica del materiale durante la deformazione, mentre  $G''$  corrisponde al modulo di dissipazione che rappresenta la componente viscosa.

### 2.6.7 Dynamic Mechanical Thermal Analysis (DMTA)

Per l'analisi dinamo meccanica è stato utilizzato lo strumento Triton Technology. È stato applicato uno stress uniassiale, con tension mode e frequenza pari a 1 Hz. Per questo tipo di prova si utilizza l'azoto per raffreddare la camera dove è presente il provino (come descritto precedentemente) fino a circa -10°C. Partendo da questa temperatura si raggiunge il plateau tramite una velocità di riscaldamento pari a 5 °C/min, riuscendo a ricavare proprietà viscoelastiche. Ad ogni provino delle 6 formulazioni viene applicato uno sforzo ciclico dal quale ricaviamo la componente di deformazione elastica rappresentata dal modulo conservativo  $E'$  ed una deformazione viscosa rappresentata dal modulo dissipativo  $E''$ . Il rapporto tra queste due grandezze viene chiamato fattore di smorzamento, ricavando in questo modo la  $\tan \delta$  che è proprio la temperatura di transizione vetrosa.

Per preparare i provini per la DMTA, è stata utilizzata la lampada UV DYMAX® ECE 5000. Ogni formulazione è stata collocata in uno stampo (Fig.25) con l'ausilio di una spatolina, ottenendo provini di dimensioni 1.5 x 3.5 x 12 mm. Sono stati realizzati 3 campioni per ciascuna formulazione. Gli stampi sono stati posizionati su un piedistallo a 10 cm dalla sorgente luminosa, con un'intensità di 130 mW/cm<sup>2</sup>, e mantenuti sotto la lampada UV per 10 secondi (Fig.26). Una camera con flusso di azoto è stata posta sopra lo stampo per prevenire l'interferenza dell'ossigeno nella fotoreticolazione.

Inoltre è stato ottenuto Il numero di reticolazioni per volume  $\nu_c$   
Utilizzando l'Equazione :

$$\nu_c = \frac{E'}{3RT}$$

Dove  $E'$  corrisponde al modulo di conservazione nel plateau gommoso a  $T_g+50^\circ\text{C}$ ,  $T$  e' la temperatura corrispondente a  $E'$  in Kelvin e  $R$  è la costante dei gas

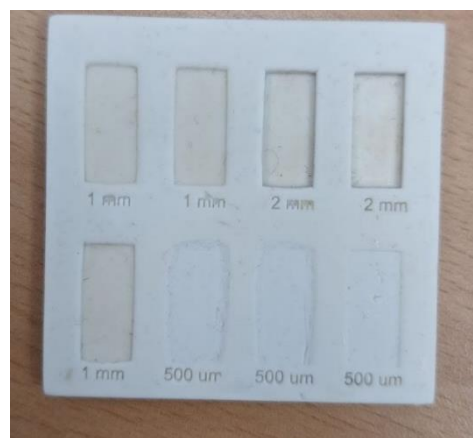


Fig.25 Stampo per la prova DMTA



*Fig.26 Provini delle formulazioni fotoreticolate*

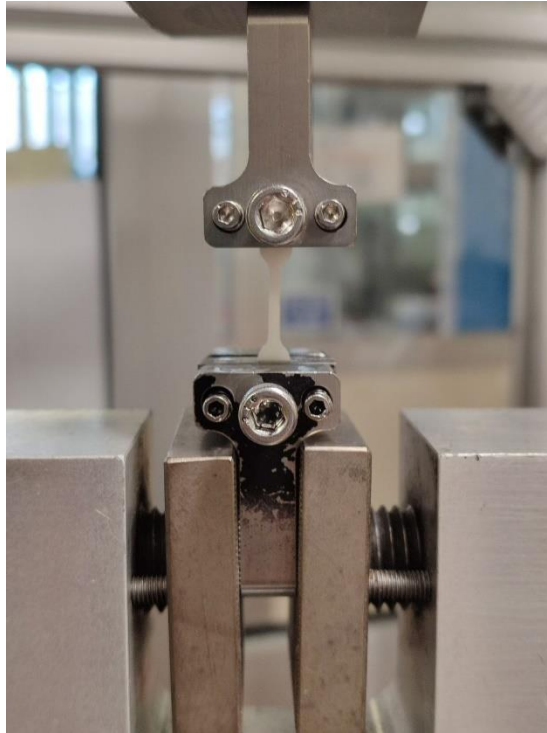
### 2.6.8 Prove a Trazione e Compressione

Le prove a trazione e a compressione sono state utilizzate per verificare le proprietà meccaniche dei provini delle formulazioni di vetri bioattivi silanizzati e non, in *Sezione 2.4* a seguito del processo di stampa 3D.

Per queste prove è stato utilizzato come strumento MTS QTest™/10 Elite della MTS System Corporation (Fig.27) e come software TestWorks® 4. Per le prove a trazione è stata utilizzata una cella di carico di 50N e lo sforzo a trazione è stato applicato con una velocità di 5 mm/min (Fig.28). Per le prove a compressione invece si sono utilizzate celle di carico di 500 N e velocità di 2mm/min (Fig.29).



Fig.27 MTS QTest™/10 Elite della MTS System Corporation



*Fig.28 Prova di Trazione dei provini post stampa 3D*



*Fig.29 Prova di Compressione dei provini post stampa 3D*

## 2.7 Test biologici e analisi del pH dei provini in SBF

I test biologici includono l'analisi della citocompatibilità che si vuole determinare sulla superficie dei campioni per verificare la proliferazione cellulare. L'analisi del pH verifica la presenza dello scambio ioni tra i campioni ottenuti con il processo della stampa 3D, e il liquido biologico garantendo la bioattività

Di seguito, sono descritti i metodi di preparazione dei provini. Per quanto riguarda l'analisi del pH viene prima di tutto descritta la preparazione della soluzione SBF in Sezione 2.7.1 inserendo all'interno di questa i provini a trazione post stampa 3D Sezione 3.5.1. La misura del pH dei campioni determinerà lo scambio ionico vetro-SBF.

### 2.7.1 Preparazione dell'SBF (Simulated Body Fluid) e dei campioni

Per preparare la soluzione SBF, si è seguito un protocollo che simula il fluido corporeo umano per valutare la bioattività e la capacità di indurre la formazione di idrossiapatite.[25]

I reagenti necessari per 1000 ml di soluzione sono:

1. NaCl: 8,035 g
2. NaHCO<sub>3</sub>: 0,355 g
3. KCl: 0,225 g
4. K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O: 0,231 g
5. MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O: 0,311 g
6. 1M HCl: 39 ml
7. CaCl<sub>2</sub>: 0,292 g
8. Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>: 0,072 g
9. TRIS: 6,118 g
10. 1M HCl: 0-5 ml (per l'aggiustamento finale del pH)

Si procede con le seguenti istruzioni:

Versare 700 ml di acqua deionizzata in un becher di plastica

Riscaldare l'acqua a  $36,5 \pm 1,5^\circ\text{C}$

Aggiungere i reagenti dall'1 all'8 nell'acqua uno alla volta seguendo l'ordine e mescolare dopo ogni aggiunta con un ancoretta magnetica fino alla completa dissoluzione

Preparazione del pH:

Portare il volume della soluzione fino a 900ml

Misurare il pH con pHmetro, con  $2,0 \pm 1,0$  in partenza

Aggiungere il TRIS, poco alla volta, mantenendo la temperatura a  $36,5 \pm 1,5^\circ\text{C}$ . Continua a monitorare il pH fino a raggiungere  $7,30 \pm 0,05$ . Continuare ad aggiungere TRIS fino a che il pH raggiunge 7,45.

Una volta raggiunto un pH di  $7,45 \pm 0,01$ , non aggiungere più TRIS

Si aggiunge 1M HCl, goccia a goccia, per abbassare il pH a  $7,42 \pm 0,01$ . La soluzione si porta a un volume finale di  $20^\circ\text{C}$ .

Dopo aver preparato la soluzione SBF, i campioni utilizzati per la prova a trazione vengono suddivisi in piccoli frammenti per aumentare l'area di contatto con il fluido. Questi frammenti vengono poi immersi in 10 ml di SBF all'interno di contenitori di plastica. Questi vengono posti in un miscelatore mantenuto a una temperatura costante di 37°C. Il pH della soluzione viene misurato periodicamente utilizzando un pHmetro nei giorni 7, 14 e 28 per monitorare eventuali variazioni del pH legate all'interazione dei campioni con la SBF.



### 2.7.2 Preparazione dei campioni per l'analisi di citocompatibilità e attività metabolica

Innanzitutto le 6 formulazioni in *Sezione 2.4* compresa quella di riferimento AESO 70:30 con 1phr di Irgacure 819 sono state inserite in stampi tipo UPO, inseriti in Lampada Dymax 60 sec per la fotoreticolazione. I dischetti che si sono formati vengono inseriti in apposite piastre colonnate, almeno 20 dischetti per ogni formulazione.

Sono stati utilizzati : Le hbMSCs sono un tipo di cellule staminali adulte che si trovano nel midollo osseo umano.

Queste sono state coltivate in un terreno di coltura, DMEM LG +15%FBS, DMEM LG (Dulbecco's modified eagle medium low glucose) che fornisce nutrienti essenziali, vitamine e amminoacidi combinate al 15% di FBS (siero fetale bovino) e l'1% di antibiotico.

L'obiettivo dello studio è quello di valutare la citocompatibilità delle cellule staminali mesenchimali derivate dal midollo osseo (hbMSC) nei confronti dei campioni sperimentali. Per questo, 20.000 hbMSCs sono state seminate direttamente sulla superficie dei campioni, precedentemente sterilizzati con UV-C per 30 minuti su ciascun lato. I campioni non sono stati né pre-condizionati né pre-immersi prima dell'esperimento.

Dopo la semina, i campioni sono stati incubati per 4 ore per permettere alle cellule di aderire alla superficie. Successivamente, sono stati aggiunti 700  $\mu$ L di terreno di coltura fresco, e l'incubazione è andata avanti per un periodo di 24-48 ore.

Dopo ogni intervallo di tempo, sono state condotte le seguenti analisi:

- L'attività metabolica delle cellule è stata valutata utilizzando il test Alamar Blue.
- La morfologia delle cellule attaccate è stata visualizzata tramite microscopia elettronica a scansione (SEM).
- A causa dell'attività autofluorescente, non è stato possibile eseguire il test di vitalità cellulare Live/Dead.

## Risultati e Discussione

In questo capitolo verranno analizzati e discussi i risultati delle prove di caratterizzazione effettuate sui vetri bioattivi, sulle formulazioni liquide e sui campioni realizzati tramite tecnica di stampa 3D.

### 3.1 Caratterizzazione dei vetri bioattivi

Di seguito sono riportati i risultati e le osservazioni ottenute per i vetri bioattivi.

#### 3.1.1 Analisi FTIR sui vetri bioattivi

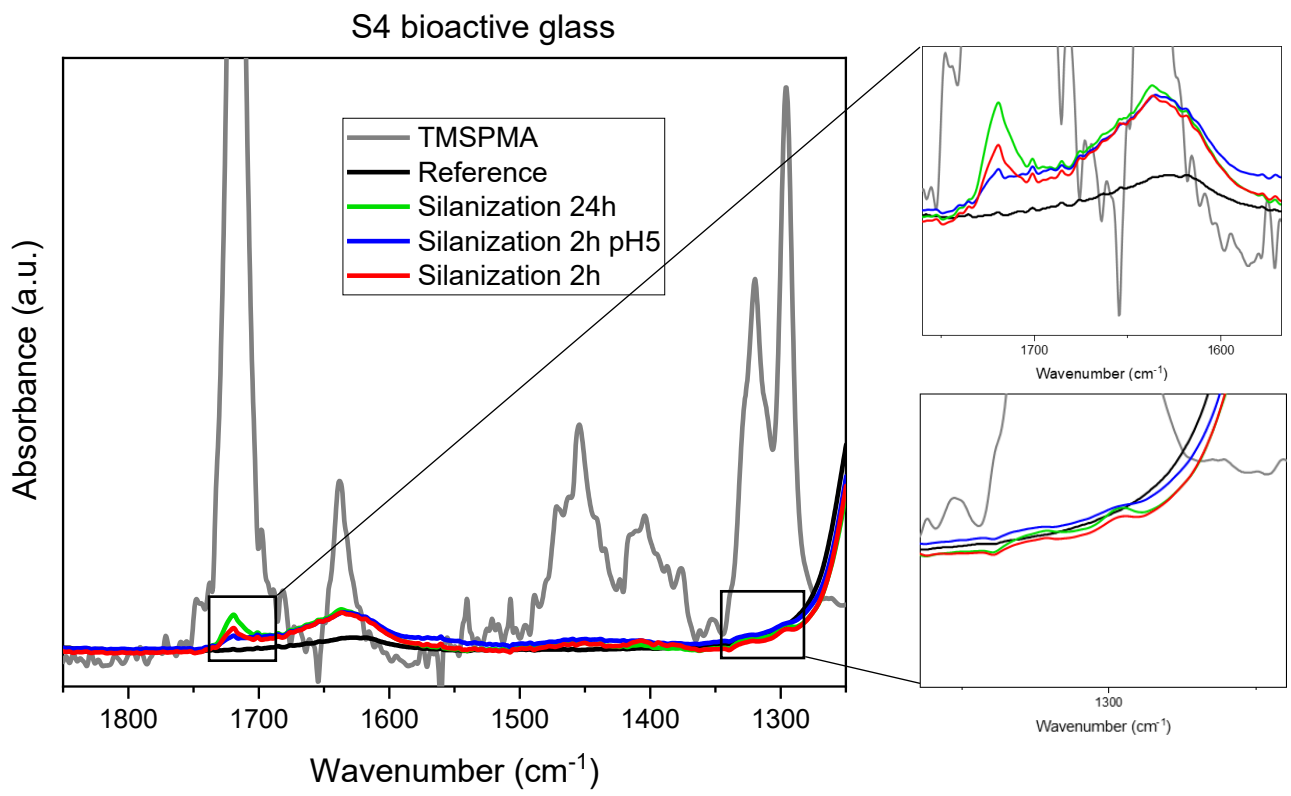
Per questa analisi sono stati considerati i vetri bioattivi S4,S4BCu in *Sezione 2.2 Tab.1*,dopo la silanizzazione secondo le prove affrontate nella *Sezione 2.3.2 Silanizzazione*, con diversi tempi di miscelazione con l'agente silanizzante 3-(Trimethoxysilyl)propylmethacrylate (*Sezione 2.1 Materiali*)

Sulla base dello spettro FTIR si possono identificare alcuni legami che determinano la presenza del silano per i grafici di S4 (Fig.30) e S4BCu(Fig.31).

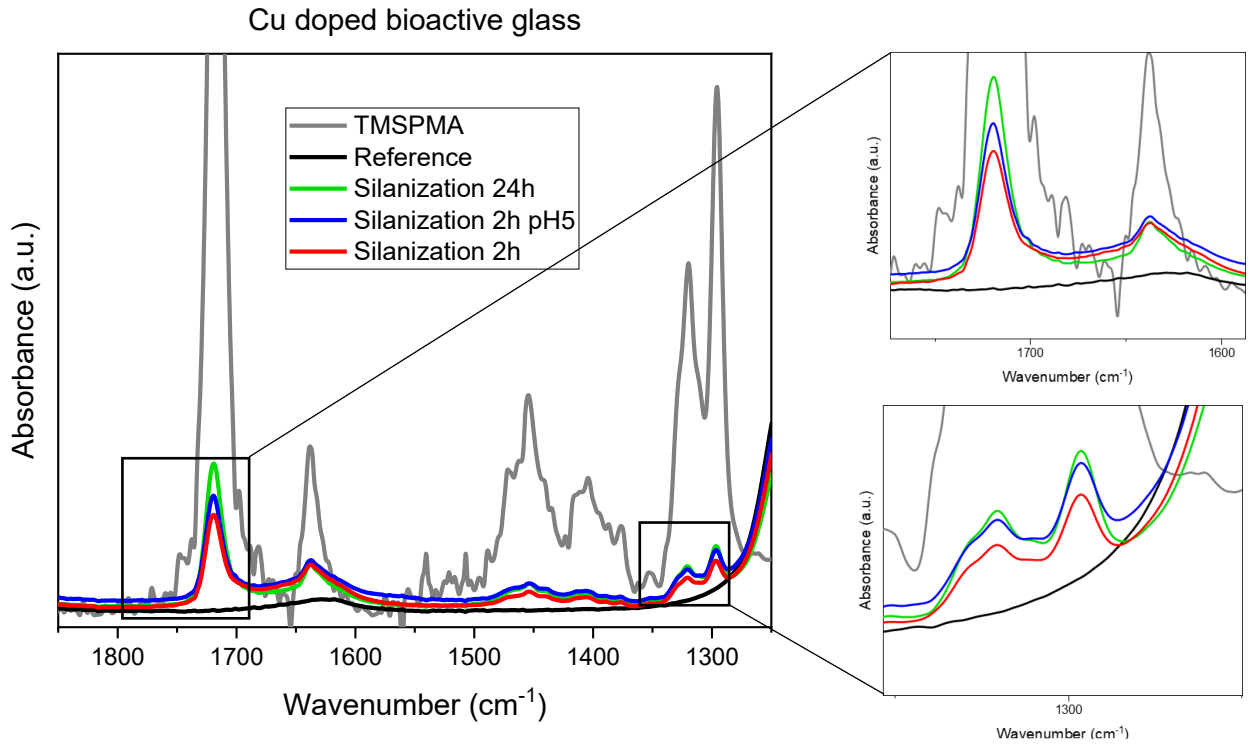
1. Picco C=C ( $1635-1640\text{ cm}^{-1}$ ): questo picco è legato al doppio legame C=C nel gruppo metacrilato del silano mostrato nel grafico in grigio (TMSPMA) e a quello in verde chiaro "silanization 24h" che mostrano questo picco, il che conferma la presenza del gruppo metacrilato. [5]
2. Picco C=O ( $1700-1750\text{ cm}^{-1}$ ): indica la presenza del gruppo carbonilico (C=O) presente nel gruppo funzionale del silano. Il picco è ben visibile nei campioni "silanization 24h" mostrando che la funzionalizzazione con il silano è riuscita.
3. Picco Si-O (intorno a  $1300\text{ cm}^{-1}$ ): Il picco in questa regione rappresenta lo stretching del legame Si-O, tipico della formazione di legami Si-O-Si o Si-O-C, confermando l'avvenuta silanizzazione della superficie del vetro bioattivo. [26]

Concludendo che nel campione "silanization 24h" la silanizzazione è avvenuta con successo. Con un effetto di assorbimento più marcato della presenza dei gruppi funzionali e dei legami specifici della silanizzazione.

Durante la silanizzazione delle nanoparticelle di silice, i gruppi  $-\text{OCH}_3$  del silano vengono idrolizzati in gruppi silanolici e questi si condensano con i gruppi idrossilici sulla superficie della silice, formando legami covalenti. I gruppi silanolici sui silani adiacenti possono anche condensarsi tra loro, formando un film polimerico sulla superficie della silice. [27]



*Fig.30 FTIR vetro S4\_Sil*



*Fig.31 FTIR vetro S4BCu\_Sil*

### 3.1.2 Angolo di Contatto

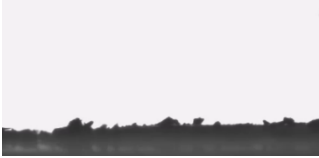
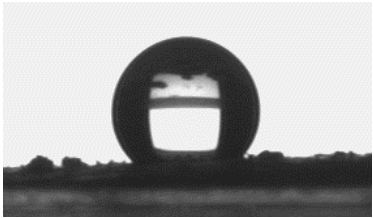
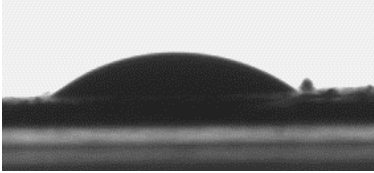
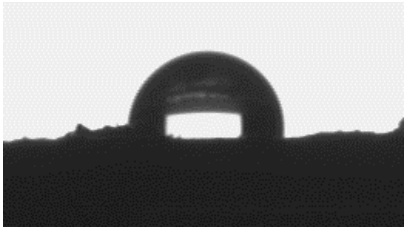
Dalle analisi in Tab.3 dell'angolo di contatto si osserva che, a seguito della silanizzazione, gli angoli di contatto aumentano, indicando un incremento dell'idrofobicità nel campione di vetro S4 trattato con il silano rispetto a quello non trattato, dove la goccia viene completamente assorbita. Il valore più elevato è stato rilevato nel trattamento con pH=3 utilizzando acido acetico. Questo aumento dell'idrofobicità è influenzato dal pH, che possiede un ruolo fondamentale nel processo di silanizzazione poiché influenza la reattività dei gruppi silanolicci e la formazione di legami silossanici Si-O-Si sulla superficie del vetro. In ambienti acidi o alcalini la reattività dei gruppi silanolicci aumenta creando più legami Si-O-Si. Grazie a una migliore organizzazione e a una maggiore densità dei legami covalenti si ottiene una struttura più solida e compatta. Man mano che la superficie diventa più ricca di legami Si-O-Si e meno di Si-OH la superficie diventa idrofobica. [28]

Nel caso del vetro bioattivo silanizzato con ioni rame in Tab.4, la superficie risulta meno idrofoba rispetto al vetro bioattivo silanizzato non dopato, poiché la goccia tende ad appiattirsi. Infatti, sembrerebbe che i legami Cu-O entrino in competizione con l'agente silanizzante [29], riducendo il legame del silano con la superficie vetrosa.




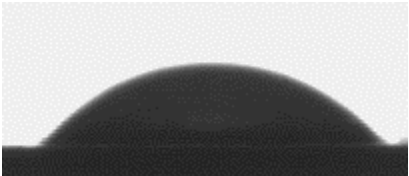
Le analisi del vetro con ioni tellurio sono state eseguite considerando il vetro trattato con l'agente silanizzante solo per le 24h di miscelazione, poiché è ritenuto il tempo di miscelazione ottimale insieme allo studio delle analisi ATR-FTIR.

Il vetro con tellurio in Tab.5 mantiene un comportamento simile a quello del vetro S4 silanizzato.

In conclusione, la silanizzazione aumenta l'idrofobicità nei campioni di S4 e S4BTe, in generale per la presenza del gruppo  $-CH_3$  [30] utile nel garantire una scarsa adesione batterica utile in ambiente biologico.

Campione	Angolo di Contatto	Risultato
S4 non trattato	Totale assorbimento, nessuna goccia	
S4 2h silanizzato @ pH=5 (reale pH=3)	120,6° 118,0° 119,3±1,8	
S4 2h silanizzato	12,1° 35° 23,6±16,3	
S4 24h silanizzato	97,6° 95,2° 96,4±1,7	

*Tab.3 Angolo di contatto S4 vs S4\_Sil*

<b>Campione</b>	<b>Angolo di Contatto</b>	<b>Risultato</b>
<b>S4BCu non trattato</b>	Totale assorbimento, nessuna goccia	
<b>S4BCu 2h silanizzato @ pH=5</b>	44° 41° 43±2	
<b>S4BCu 2h silanizzato</b>	51° 67° 59±11	
<b>S4BCu 24h silanizzato</b>	49° 50° 49±0	

*Tab.4 Angolo di contatto S4BCu vs S4BCu\_Sil*

Campione	Angolo di Contatto	Risultato
S4BTe non trattato	Totale assorbimento, nessuna goccia	
S4BTe 24h silanizzato	87,2 ± 14,14	

*Tab.5 Angolo di contatto S4Te\_Sil*

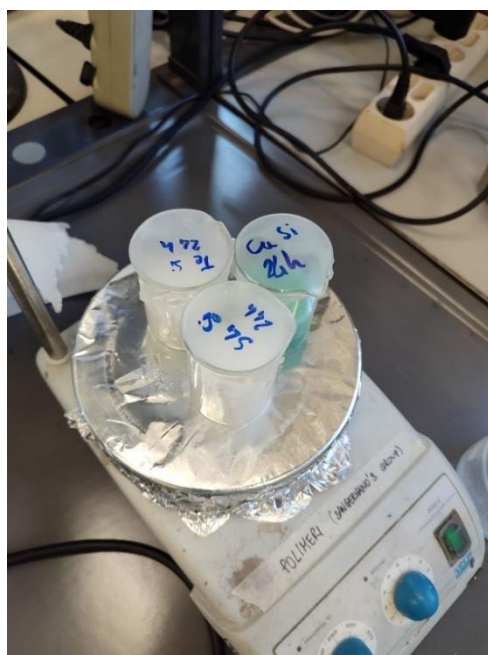


### 3.1.3 Potenziale Zeta e DLS

In questa sezione, vengono mostrati i risultati in particolar modo nei vetri silanizzati in cui, il diametro idrodinamico delle particelle di biovetro risultano superiori alla dimensione di 500 nm soprattutto per il vetro bioattivo di rame e tellurio come si nota dalla Tab.6 in basso. Questa misura riguarda la silanizzazione affrontata nella *Sezione 2.3.2* in cui la miscelazione è stata eseguita in miscelatore. Questo procedimento ha probabilmente sviluppato la formazione di aggregati, una situazione comune per particelle di dimensioni nanometriche. Quindi si è voluto procedere utilizzando le polveri pretrattate *Sezione 2.3.1*, Silanizzate in soluzione etanolo/silano. Le polveri sono state inserite in una cuvetta e agitate grazie allo strumento Vortex per un minuto a 3500rpm (Fig.32), in modo da disperdere in maniera ottimale le polveri di vetro. Solo dopo, si è proceduto con la miscelazione di 24h su piastra metallica con ancoretta magnetica(Fig.33), rieffettuando la procedura della misura del diametro idrodinamico. Inoltre anche l'agente silanizzante potrebbe aver contribuito a rivestire le nanoparticelle di cui si parla nella *Sezione 3.1.1 Analisi ATR-FTIR sui vetri bioattivi*, causando un aumento ulteriore del diametro.



Fig.32 Polveri in strumento Vortex



*Fig.33 Silanizzazione per 24 dei vetri bioattivi*

Nella Tab.7 risultante del nuovo metodo, sono riportati dei valori di diametro idrodinamico che risultano più ridotti, confermando l'efficacia della dispersione.

Il potenziale zeta ha mostrato invece, una stabilità della sospensione moderata, considerata tale tra  $\pm 30$  a  $\pm 40$  mV anche con il nuovo metodo utilizzato di miscelazione [31]

<i>Campione</i>	<i>Diametro idrodinamico [nm]</i>	<i>Potenziale zeta [mV]</i>
S4	671	-26,9±0,2
S4_Sil	751	-30,6±0,7
S4BCu	572	-28,3±0,6
S4BCu_Sil	9123	-29,0±0,5
S4BTe	849	-27,5±0,2
S4BTe_Sil	10919	-31,2±0,4

*Tab.6 Valori di diametro idrodinamico e potenziale zeta, prima della modifica della silanizzazione*

<i>Campione</i>	<i>Diametro idrodinamico [nm]</i>	<i>Potenziale zeta [mV]</i>
<i>S4</i>	470±11	-27,7±0,1
<i>S4_Sil</i>	748 ± 90	-28,0±0,6
<i>S4BCu</i>	555 ± 22	-27,3±0,3
<i>S4BCu_Sil</i>	977 ± 60	-29,0±0,4
<i>S4BTe</i>	1244 ± 88	-25,1±0,6
<i>S4BTe_Sil</i>	1003 ± 385	-28,9±0,3

*Tab.7 Valori di diametro idrodinamico e potenziale zeta dei vetri bioattivi silanizzati e non, dopo l'utilizzo dello strumento Vortex*

### 3.1.4 Analisi FESEM-EDS dei vetri bioattivi

In questo studio, si è voluto valutare la percentuale in peso di ciascun elemento rispetto alla massa totale del campione e la percentuale atomica, la frazione del numero totale di atomi di ciascun elemento nel campione. Sono stati considerati i campioni preparati nella *Sezione 2.3.2 Silanizzazione* di S4BCu nelle prove di 2 ore (Tab.8), 2 ore a pH=5 (Tab.9) e 24 ore (Tab.10) e del vetro a base di tellurio non silanizzato S4BTe (Tab.11)

Si può notare come gli ioni rame rimangano all'interno del network del vetro S4BCu silanizzato in tutte le prove analizzate; si può dire lo stesso anche per gli ioni tellurio nel vetro bioattivo S4BTe. L'analisi è stata eseguita nello specifico per verificare che gli ioni di Cu e Te non si disperdessero nella soluzione, in modo da non perdere le proprietà antibatteriche e pro-angiogeniche dovute al loro rilascio.

**Composizione S4BCu silanizzato (2 ore)**

<i>Element</i>	<i>Weight [%]</i>	<i>Atomic [%]</i>
O	53,3±1,3	68,3±1,0
Si	39,4±0,8	28,7±0,9
P	0,5±0,3	0,3±0,2
Ca	2,7±0,2	1,4±0,1
<b>Cu</b>	<b>4,1±1,0</b>	<b>1,3±0,3</b>

*Tab.8 Analisi composizionale FESEM-EDS di S4BCu\_Sil con tempo di miscelazione di silanizzazione di 2h*

**Composizione S4BCu silanizzato (2 ore a pH=5)**

<i>Element</i>	<i>Weight [%]</i>	<i>Atomic [%]</i>
O	53,1±0,4	68,0±0,2
Si	39,8±0,2	29,0±0,1
P	0,4±0,1	0,3±0,0
Ca	2,6±0,1	1,3±0,1
<b>Cu</b>	<b>4,1±0,6</b>	<b>1,3±0,2</b>

*Tab.9 Analisi composizionale FESEM-EDS di S4BCu\_Sil con tempo di miscelazione di silanizzazione di 2h a pH=5*

*Composizione S4BCu silanizzato (24 ore)*

<i>Element</i>	<i>Weight [%]</i>	<i>Atomic [%]</i>
O	54,6±1,5	69,3±1,0
Si	38,4±0,6	27,8±0,7
P	0,5±0,1	0,3±0,0
Ca	2,6±0,1	1,3±0,1
<b>Cu</b>	<b>3,9±1,0</b>	<b>1,3±0,3</b>

*Tab.10 Analisi composizionale FESEM-EDS di S4BCu\_Sil  
con tempo di miscelazione di silanizzazione di 24h*

### *Composizione S4BTe*

<i>Element</i>	<i>Weight [%]</i>	<i>Atomic [%]</i>
<b>O</b>	51,3±0,0	63,6±0,0
<b>Si</b>	61,7±23,0	64,6±34,3
<b>P</b>	0,8±0,8	0,8±0,9
<b>Ca</b>	12,2±5,6	9,1±5,5
<b>Te</b>	<b>6,6±4,7</b>	<b>1,6±1,3</b>

*Tab.11 Analisi morfologia e composizionale FESEM-EDS di S4BTe*



Un'ulteriore indagine è mostrata dall'immagine seguente in Fig.34 che mostra nanoparticelle di Tellurio (Te), le particelle hanno valori che vanno da 548,2 nm a 598 nm, confermando le dimensioni nanometriche dei vetri bioattivi. Questa analisi è stata utile per comprendere anche la variazione del diametro idrodinamico. Infatti, per le nanoparticelle di Tellurio i valori si discostano di un ordine di grandezza dai valori del diametro idrodinamico come riportato nella *Sezione 3.1.3 Potenziale zeta e DLS*

I piccoli sedimenti sulla superficie, potrebbero essere aggregati che si sono depositati durante il processo di sintesi.

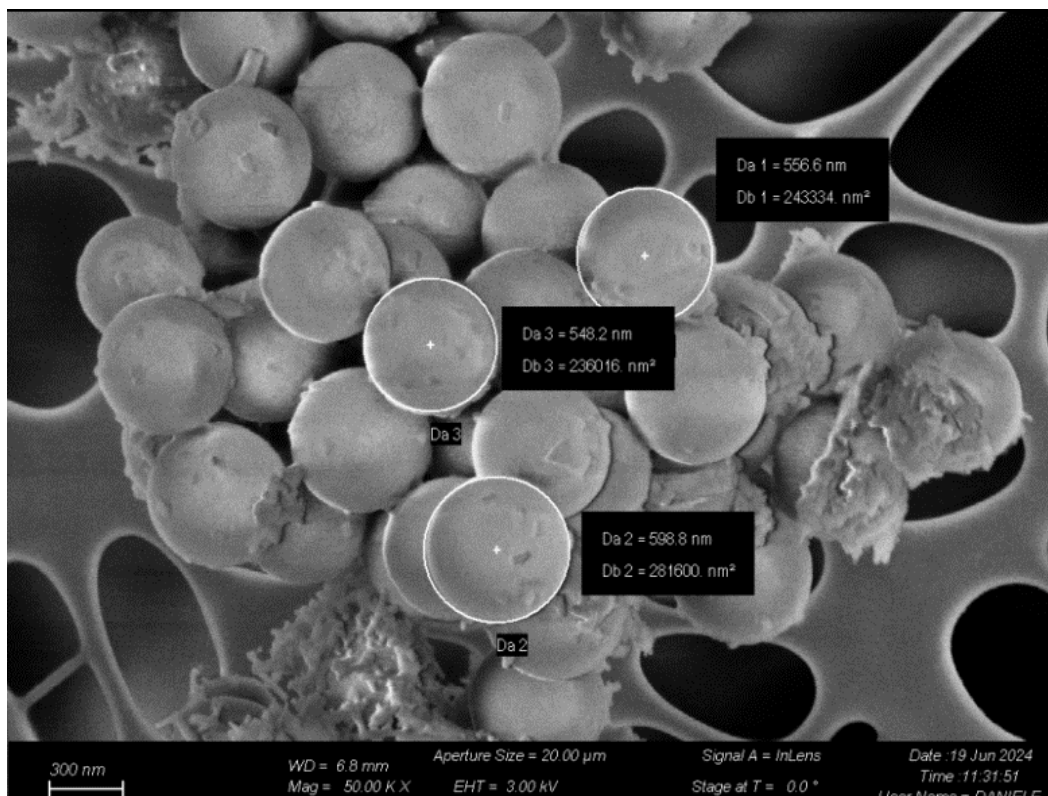


Fig.34 Immagine al SEM di S4BTe

Dopo aver confermato l'efficacia della silanizzazione attraverso le analisi FTIR e verificato la stabilità degli ioni dopanti con l'analisi EDS, e considerando anche l'angolo di contatto che ha evidenziato una buona idrofobicità della superficie, è stato deciso di optare per una miscelazione di 24 ore come metodo ottimale. Questa scelta è stata fatta non solo per le sue ottime performance, ma anche per adottare un approccio più sostenibile evitando l'uso di acidi, sebbene il campione con il miglior rendimento presentasse un pH acido. Questa decisione è stata supportata ulteriormente dalle immagini SEM, che mostra come la silanizzazione ha avuto successo, e che, come vedremo, contribuirà a ottenere risultati positivi nelle proprietà meccaniche.

## 3.2 Valutazione della Reattività delle Formulazioni e Stampa 3D

Di seguito verranno riportati i risultati dei test di caratterizzazione delle resine liquide e dei test riferiti al processo di stampa 3D: ottenimento dei campioni per la prova a trazione e compressione e dello scaffold composito rinforzato con i vetri bioattivi.

### 3.2.1 Analisi ATR-FTIR sulle resine liquide

Per l'analisi infrarossa vengono prese in considerazione le formulazioni liquide in *Sezione 2.4*.

Nei grafici sottostanti (Fig.35, Fig.36) è possibile notare gli spettri delle formulazioni liquide monitorando i picchi caratteristici che variano con il tempo di esposizione a 0s, 10s, 20s, 30s, 60s, 120s dall'esposizione alla radiazione UV. Si è scelto di monitorare il picco, caratteristico del gruppo acrilato, intorno a  $1620\text{ cm}^{-1}$ . Inoltre è stato eseguito successivamente il calcolo della conversione in percentuale dei legami che si formano con la fotopolimerizzazione dopo l'esposizione alla luce UV in riferimento alla Fig. 35

L'abbassamento dei picchi intorno alla regione  $1620\text{ cm}^{-1}$ , indica una diminuzione dell'intensità del doppio legame C=C, poiché si sta verificando la polimerizzazione. Con l'avanzare del tempo di esposizione alla luce UV, i doppi legami vengono convertiti in legami singoli durante il processo di reticolazione (cross-linking), portando a una diminuzione dell'intensità del picco (Fig.35, Tab.11).

In generale, l'abbassamento progressivo dei picchi con l'aumento del tempo di irradiazione conferma il processo di polimerizzazione foto iniziato, in cui i doppi legami acrilici si trasformano gradualmente in legami singoli, formando la struttura polimerica reticolata.

Nello specifico nelle immagini vengono mostrati i comportamenti delle diverse formulazioni in merito all'abbassamento del picco, in base alla cinetica del processo di polimerizzazione.

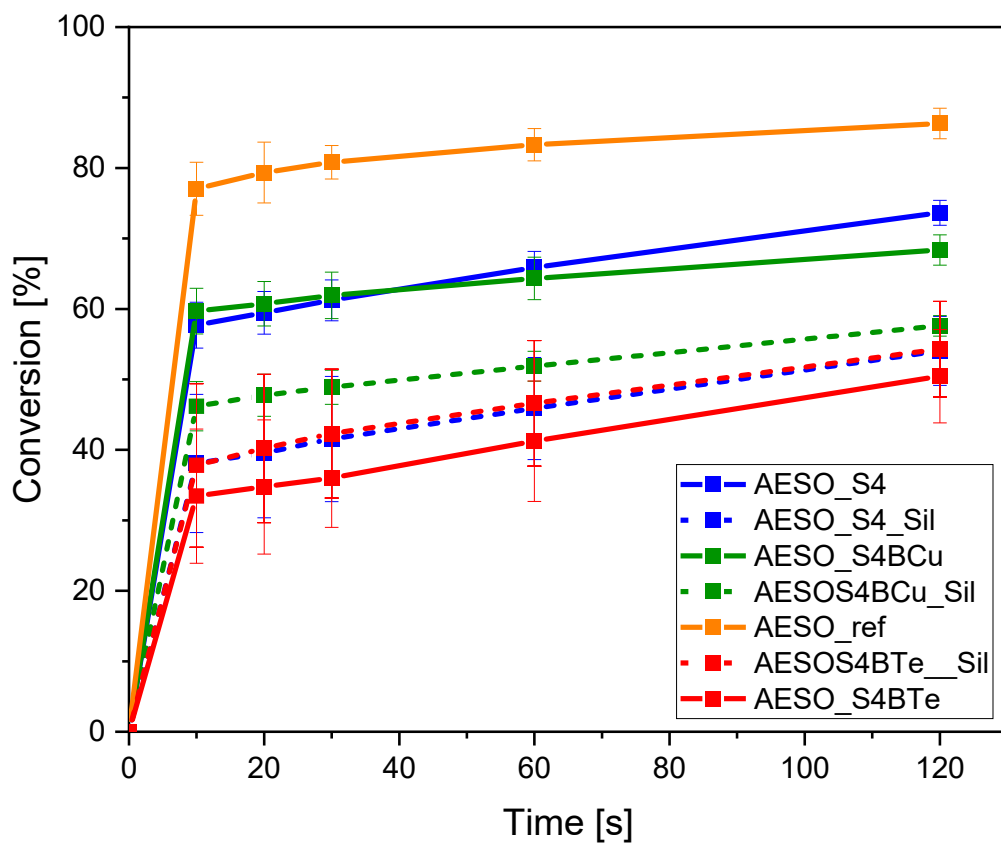


Fig.35 Grafico della conversione in percentuale

<i>Campione</i>	<i>Conversione dopo 120s</i> <i>[%]</i>
AESO reference	86±2
AESO S4	73±2
AESO S4 Sil	54±5
AESO S4BCu	68±2
AESO S4BCu Sil	57±2
AESO S4BTe	50±7
AESO_S4BTe_Sil	54±7

Tab.11 Conversione dei legami C=C dopo un irradiazione alla sorgente UV dopo 120s

Le immagini mostrano la conversione dei legami C=C durante la fotopolimerizzazione:

AESO\_reference : Mostra la più alta conversione, raggiungendo circa l'86% dopo 120 secondi. Questo indica che il sistema senza vetri bioattivi ha un'alta conversione.

AESO\_S4 e AESO\_S4Cu : La presenza di vetri bioattivi S4 e S4\_Cu tende a ridurre leggermente la conversione rispetto alla formulazione di riferimento, suggerendo una leggera diminuzione della fotopolimerizzazione, probabilmente dovuto a effetti di competizione tra i fotoiniziatori e i vetri bioattivi che assorbono la luce UV. [5]

AESO\_S4\_Sil, AESO\_S4BCu\_Sil, AESO\_S4BTe\_Sil: La conversione diminuisce ulteriormente per i campioni funzionalizzati. Si ha quindi una diminuzione della reattività dei doppi legami probabilmente a causa della presenza dei gruppi silanolicci.

AESO\_S4BTe e AESO\_S4BTe\_Sil : Entrambi i campioni mostrano una conversione più bassa, con AESO\_S4BTe che raggiunge solo il 50%. La presenza di tellurio sembra ridurre ulteriormente l'efficienza del processo di polimerizzazione.

Risultati ottenuti dalle analisi dei picchi in Fig.35 e Fig.37 in cui si mostra l'intero spettro.

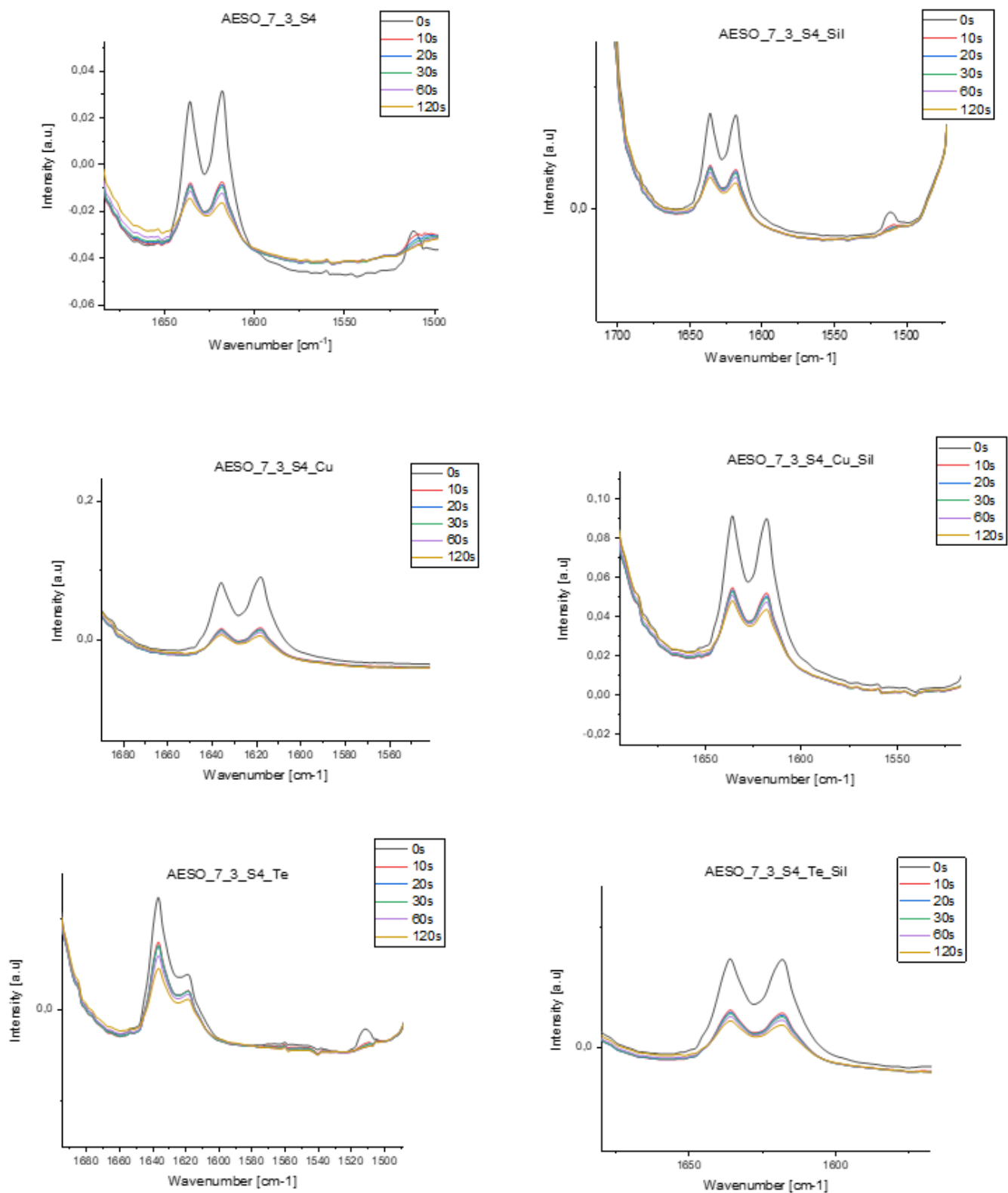
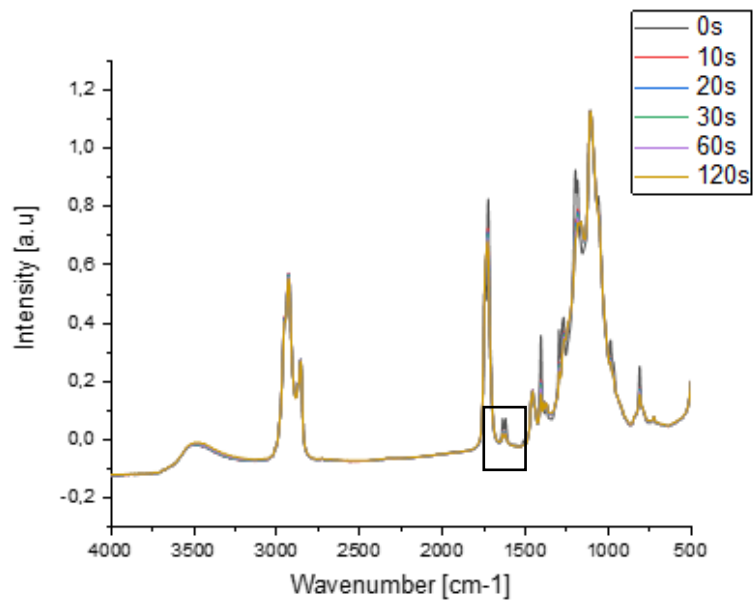


Fig.36 Grafico dell'abbassamento dei picchi convertiti delle formulazioni



*Fig.37 Grafico totale FTIR con i picchi dei legami C=C evidenziati nel riquadro*

### 3.2.2 Foto-DSC

Le immagini seguenti mostrano i grafici risultanti (Fig.41) della foto DSC , in cui si valuta il flusso di calore in funzione del tempo per le formulazioni con i vetri bioattivi silanizzati e non, messi a confronto. Di seguito i risultati della formulazione con vetro S4 e S4\_Sil (Fig.38)

Entrambi i campioni mostrano un picco riguardante il flusso di calore, che rappresenta la reazione esotermica di fotopolimerizzazione. Si può osservare come il campione contenente vetro non silanizzato (colore rosso) mostra un picco più alto, indicando una maggiore reattività rispetto al campione con vetro silanizzato (colore blu).

La reazione inizia contemporaneamente ma il picco di massimo del campione non silanizzato viene raggiunto più rapidamente. La presenza del silano potrebbe infatti rallentare leggermente la cinetica di fotopolimerizzazione.

L'area del picco (l'integrale del calore rilasciato) indica l'energia totale rilasciata durante la reazione. La curva di colore rosso ha un picco più alto, ovvero il campione senza silanizzazione rilascia più energia, il contrario invece per la curva blu in cui si ha cinetica più lenta della fotopolimerizzazione.

In ogni caso come si nota dal grafico, e dai valori in tabella, ogni formulazione ha un integrale del calore rilasciato minore rispetto a quello di riferimento senza l'introduzione di vetro.

Nonostante ciò, il comportamento della formulazione con i vetri bioattivi contenenti Tellurio silanizzato (Fig.39) ha un comportamento opposto a quello delle formulazioni contenente vetro S4 e S4\_Cu trattati (Fig.40)

In conclusione, la silanizzazione del vetro sembra ridurre leggermente la reattività del sistema.

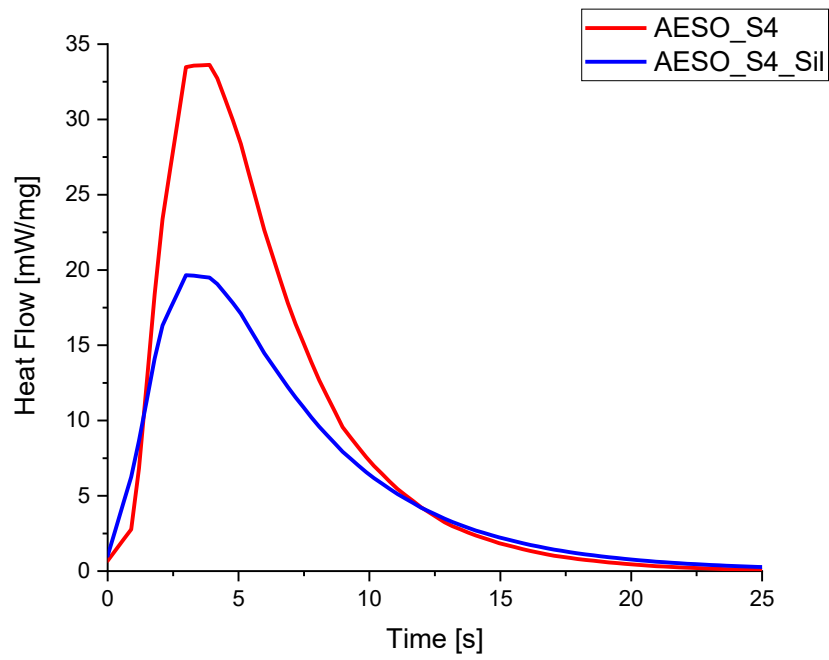


Fig.38 Grafico foto-DSC AESO\_S4 e AESO\_S4\_Sil

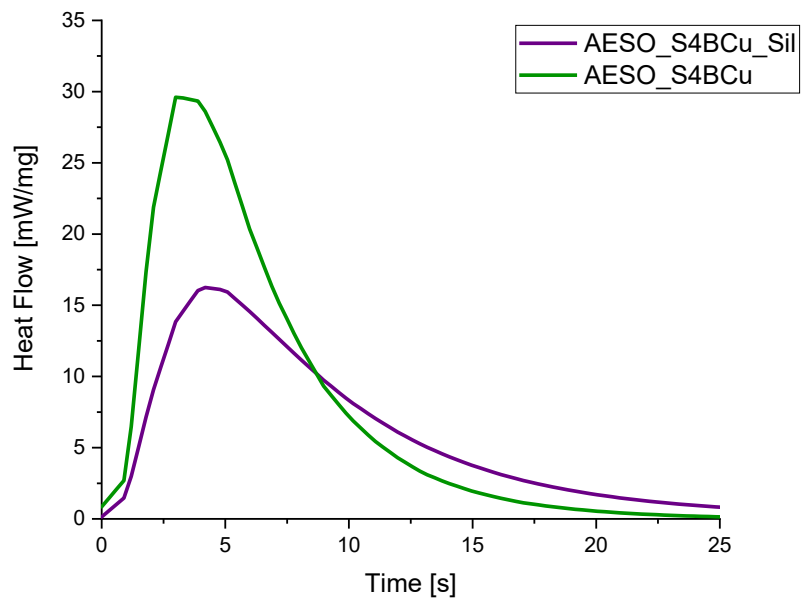


Fig.39 Grafico foto-DSC AESO\_S4BCu e AESO\_S4BCu\_Sil



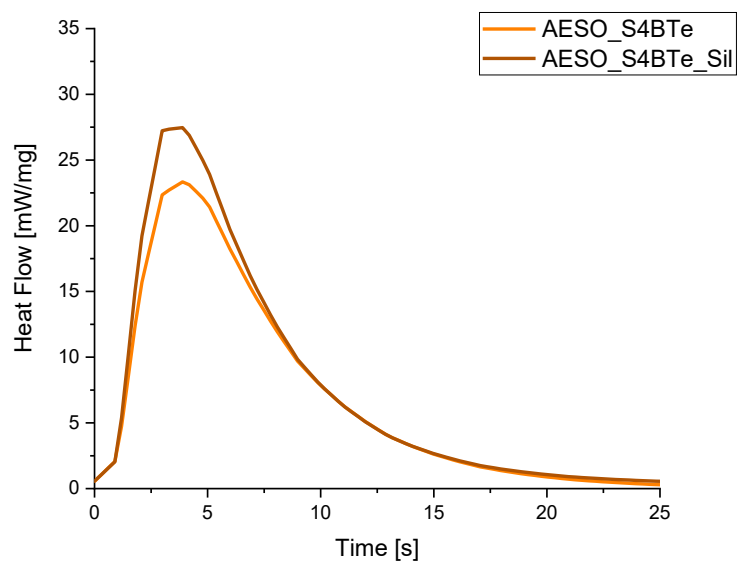


Fig.40 Grafico foto-DSC AESO\_S4BTe e AESO\_S4BTe\_Sil

Campione	Integrale [J/g]	Tempo picco[s]
AESO_S4	215, 4 ± 16,4	3,5±0,7
AESO_S4_Sil	144, 2 ± 25,2	4,0 ± 0
AESO_S4BCu	203, 8 ± 10,2	3,5 ±0,7
AESO_S4BCu_Sil	156, 3 ± 5,4	4,0 ± 0
<b>AESO_S4BTe</b>	<b>175, 5 ± 7,5</b>	<b>4,5 ± 0</b>
<b>AESO_S4BTe_Sil</b>	<b>189, 5 ± 1,2</b>	<b>4,0 ± 0</b>
AESO_reference	256, 3±32,8	4,0

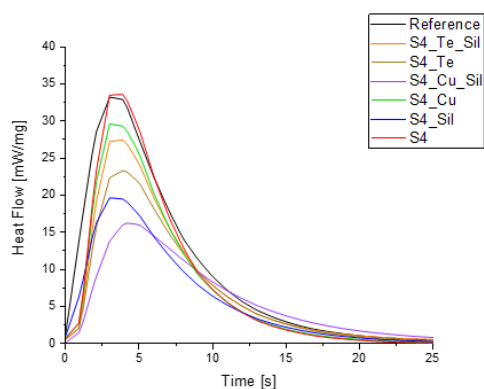


Fig.41 Valori del calore e della reattività delle formulazioni

### 3.2.3 Fotoreologia

Le analisi in Fig.42 mostrano il modulo di conservazione  $G'$  delle formulazioni liquide *Sezione 2.4* che rappresenta la risposta elastica prima dell'esposizione alla luce UV, prima e dopo 60 secondi con l'inizio della fotopolimerizzazione. Il  $G'$  indica un aumento di rigidità dopo 60 secondi. Tutti i campioni hanno lo stesso tipo di andamento, sia con i vetri bioattivi silanizzati che non.

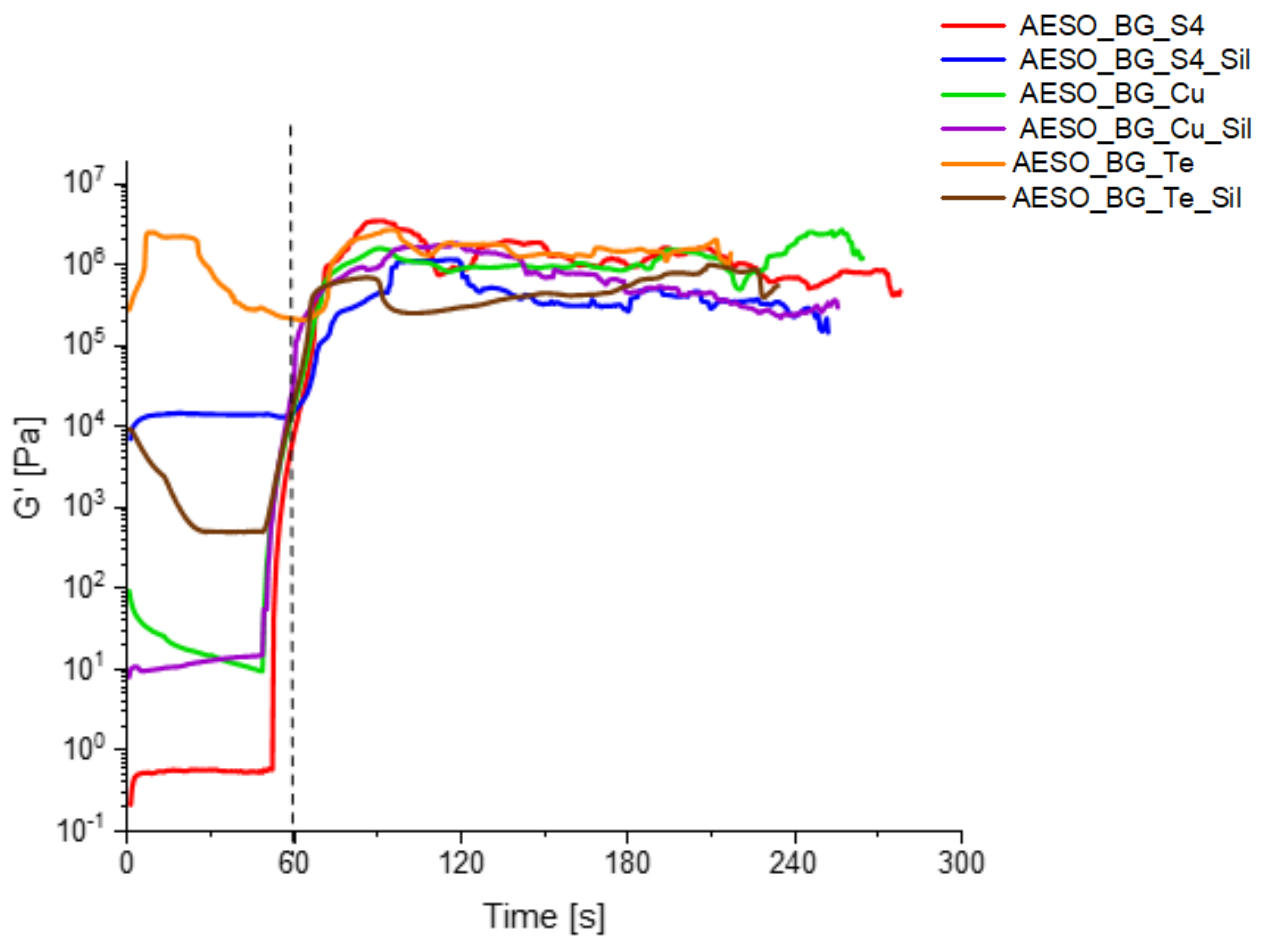


Fig.42 Grafico delle analisi fotoreologiche delle formulazioni

### 3.2.4 Reologia

Nelle analisi reologiche in Fig.43 delle formulazioni liquide *Sezione 2.4*, la viscosità decresce con l'aumento dello shear rate in tutte le formulazioni e la resina diventa più fluida.

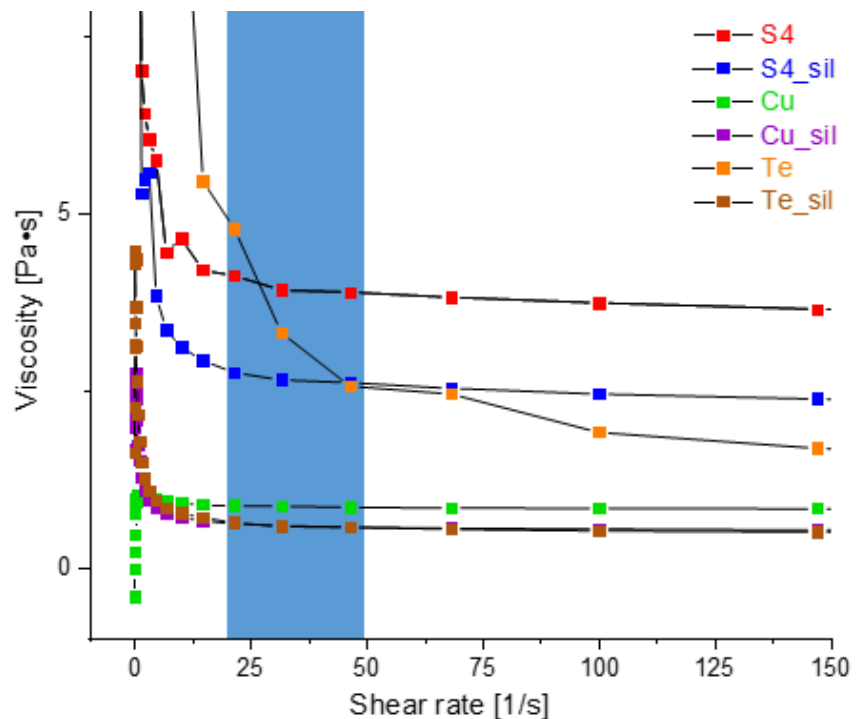
La formulazione S4 presenta una viscosità alta mentre la versione silanizzata ha una viscosità più bassa.

Nell'AESO\_Cu e AESO\_Cu\_Sil, si ha una viscosità iniziale più bassa rispetto a S4, con Cu sil più bassa rispetto al Cu non silanizzato.

Le formulazioni con tellurio e tellurio silanizzato presentano una viscosità più bassa rispetto alle altre formulazioni, anche qui, il campione non silanizzato mostra una viscosità inferiore rispetto a quella non silanizzata. L'andamento del campione con tellurio invece sembra aver un andamento meno lineare.

La zona evidenziata in blu rappresenta l'area in cui la viscosità sembra essere stabile, determinando l'intervallo fondamentale per la stampa 3D.[5]

<i>Sample</i>	<i>Viscosity [Pa•s] at 30s<sup>-1</sup></i>
AESO_S4	4,0
AESO_S4_Sil	2,6
AESO_S4BCu	0,8
AESO_S4BCu_Sil	0,6
AESO_S4BTe	3,3
AESO_S4BTe_Sil	0,6



*Fig.43 Grafico delle analisi reologiche delle formulazioni*

Per concludere la valutazione della reattività delle formulazioni:

nel caso dei grafici FTIR confrontati con i grafici del flusso di calore (come quelli ottenuti dai test foto-DSC *Sezione 3.2.2*), è possibile correlare la quantità di calore rilasciato durante la polimerizzazione con la conversione del legame doppio. L'abbassamento rapido dei picchi FTIR sarebbe coerente con il picco di calore elevato e una discesa rapida nella curva della foto-DSC, che indica una polimerizzazione veloce e più efficiente.

Il grafico del modulo  $G'$  (rigidità) può essere collegato ai grafici FTIR nel senso che, man mano che la reazione di polimerizzazione procede, l'aumento della rigidità del materiale e quindi del modulo  $G'$  coincide con la diminuzione dei picchi FTIR associati ai legami doppi  $C=C$ . In pratica, una maggiore conversione dei legami doppi, come osservato nell'analisi FTIR, porta a una rete polimerica più solida, riflessa nel rapido aumento del modulo  $G'$ .

### 3.3 Caratterizzazione Termomeccanica e Meccanica dei Provini Stampati

Di seguito le analisi termomeccaniche e meccaniche dei provini che si sono ottenuti dalla stampa 3D.

#### 3.3.1 DMTA

Per l'analisi dinamomeccanica sono state utilizzate le resine solide in *Sezione 2.6.7*.

Nel campione di AESO\_S4\_Sil in Fig.44 si osserva una diminuzione della temperatura di transizione vetrosa rispetto al campione non silanizzato. Lo stesso risultato è stato ottenuto per i campioni con Cu e Te silanizzati. Il modulo di conservazione, aumenta invece nel caso di S4\_Sil in maniera importante rispetto agli altri. Per il campione con il rame il modulo non varia significativamente (Fig 45). Il tellurio silanizzato invece ha un comportamento opposto, il suo modulo è maggiore rispetto al campione con Tellurio non trattato (Fig.46)

Inoltre nella tabella in Fig 47 viene mostrato il numero di crosslinks di ogni campione, evidenziando ancora una volta un comportamento differente per quanto riguarda la formulazione contenente i vetri bioattivi di tellurio silanizzato, il quale possiede un numero più elevato di crosslinks rispetto agli altri campioni.

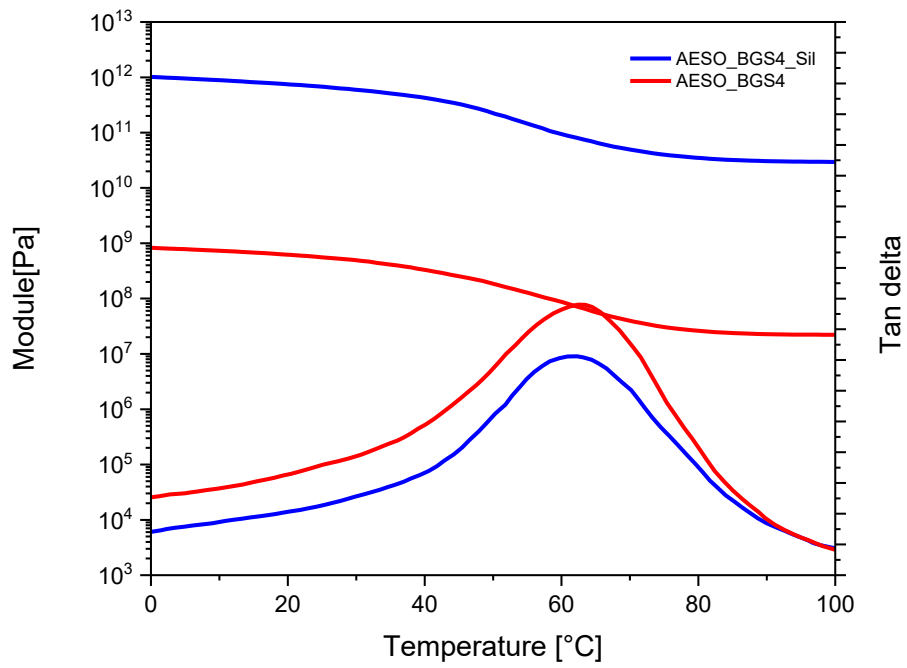


Fig.44 Curve DMTA S4 vS S4\_Sil

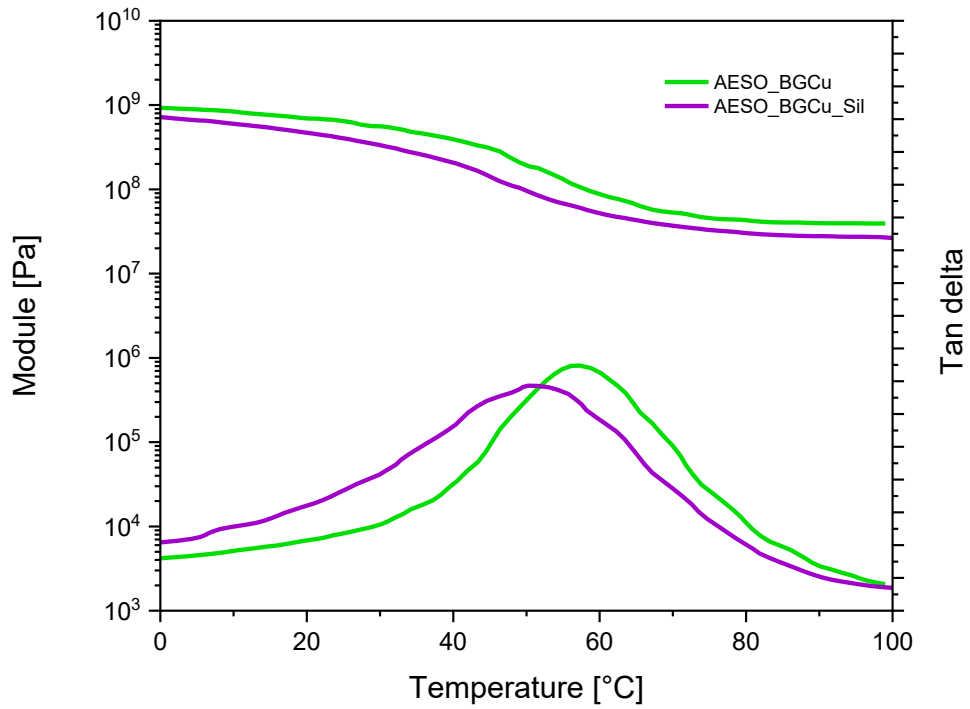


Fig.45 Curve DMTA S4BCu vS S4BCu\_Sil

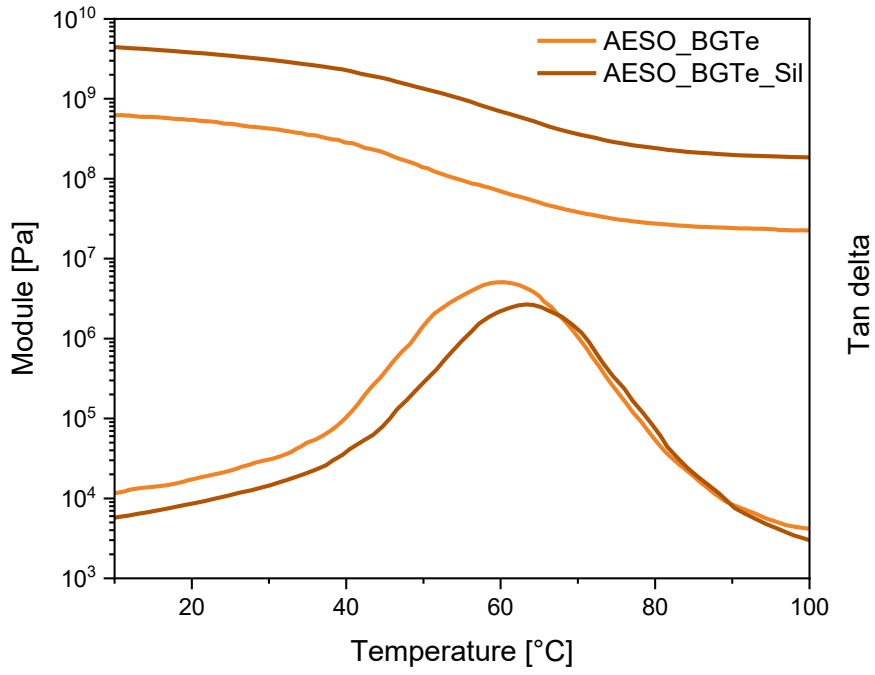


Fig.46 Curve DMTA S4BTe vS S4BTe\_Sil

Campione	T <sub>g</sub> [°C]	n° di crosslinks per volume vc [mol/m <sup>3</sup> ]
AESO_S4	61,1±1,7	2080
AESOS4_Sil	60,7±2,1	1160
AESO_S4BCu	56,1±0	3668
AESO_S4BCu_Sil	49,6±0,8	3000
AESO_S4BTe	61,5±1,5	1350
<b>AESO_S4BTe_Sil</b>	<b>60,8±4,9</b>	<b>7200</b>

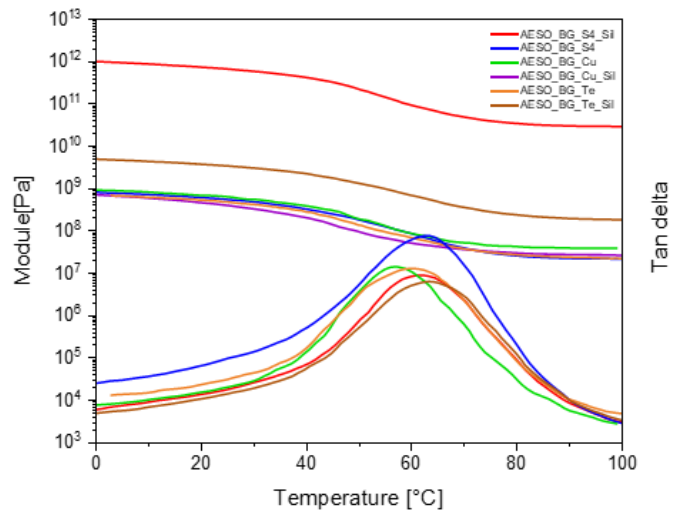


Fig.47 Valori di T<sub>g</sub> e n° di crosslinks delle resine solide

### 3.3.2 Prove a Trazione e Compressione

Il grafico risultante delle prove a trazione in Fig.48 mostra l'andamento dello sforzo in funzione della deformazione in percentuale per i campioni post stampa(vedi sezione Provini 3D) con vetri bioattivi trattati con la silanizzazione e non. La tabella invece, riassume i dati di modulo elastico, sforzo a rottura e deformazione a rottura per ogni campione.

Analisi dei risultati ottenuti (Tab.12):

Nei campioni silanizzati si ha un miglioramento nello sforzo a rottura rispetto ai campioni non trattati. Questo definisce l'efficacia della silanizzazione nel migliorare la resistenza meccanica del materiale, per esempio in AESOS4\_Sil e AESOS4BCu\_Sil

Anche il modulo elastico tende ad aumentare, quindi la silanizzazione determina anche una maggiore rigidità del materiale, per esempio nei campioni S4\_Sil e S4.

La deformazione a rottura invece si riduce nei campioni silanizzati indicando una minore duttilità. Il campione AESO\_S4\_Sil mostra un valore inferiore rispetto agli altri. I valori confrontati con il campione di riferimento mostrano come l'inserimento dei vetri bioattivi e dei vetri bioattivi silanizzati determinano un significativo miglioramento delle proprietà meccaniche in termini di resistenza e rigidità.

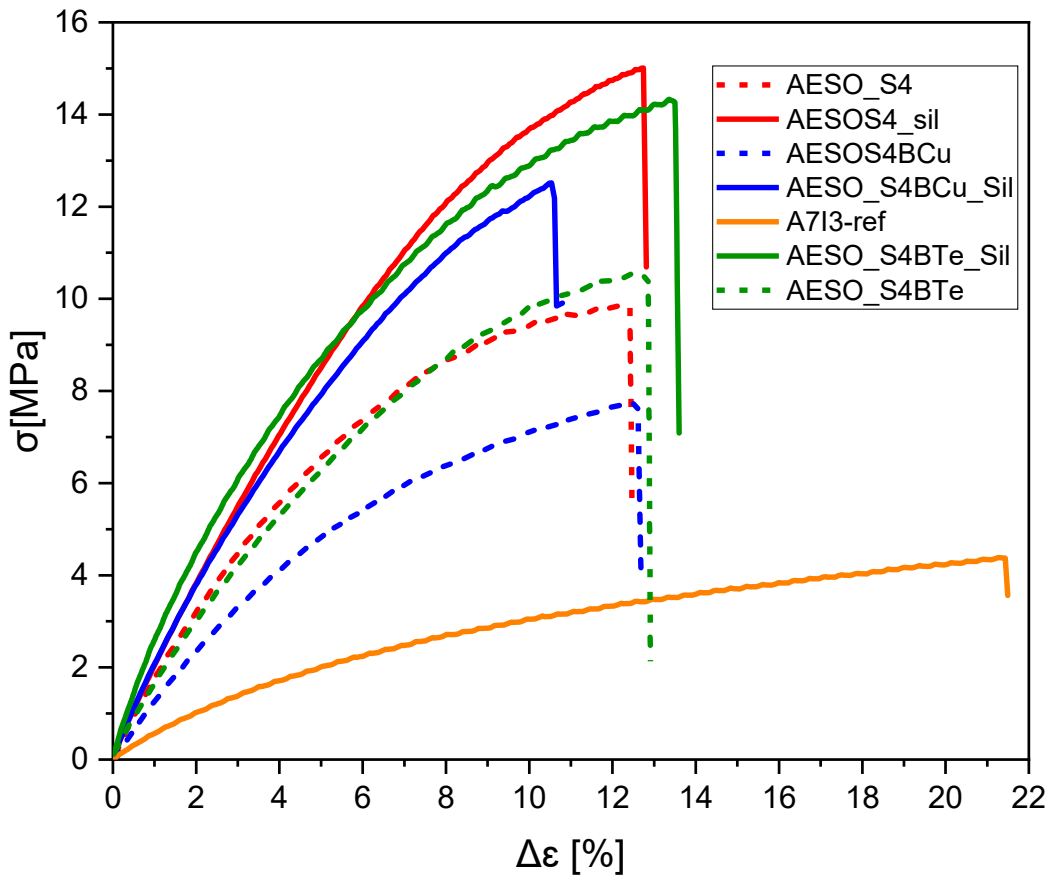


Fig.48 Prove meccaniche a Trazione dei provini post stampa 3D

<i>Campione</i>	<i>Modulo elastico [MPa]</i>	<i>Sforzo a rottura [MPa]</i>	<i>Deformazione a rottura[%]</i>
<b>AESO_ref</b>	0,5±0,1	4,8±0,8	28±5
<b>AESO_S4</b>	0,6±0,1	10±1	12±0
<b>AESO_S4_Sil</b>	2±0	15±0	13±0
<b>AESO_S4BCu</b>	1±0	8±2	15±3
<b>AESO_S4BCu_Sil</b>	2±0	13±2	11±0
<b>AESO_S4BTe</b>	1,4±0	10,5±0,0	10±0
<b>AESO_S4BTe_Sil</b>	1,5±0,1	14±0	13±2

Tab.12 Valori definiti dalle prove a trazione



Anche nelle prove a compressione (Fig.49, Fig.50) si è potuto notare un aumento del modulo elastico rispetto ai campioni non silanizzati, quindi un aumento di rigidità per il vetro S4 silanizzato, invece rimane invariato per il vetro con rame e rame silanizzato (Tab.13). Si ha un miglioramento della resistenza meccanica con un aumento del 25% nel caso dei silanizzati da 82MPa a 100MPa.

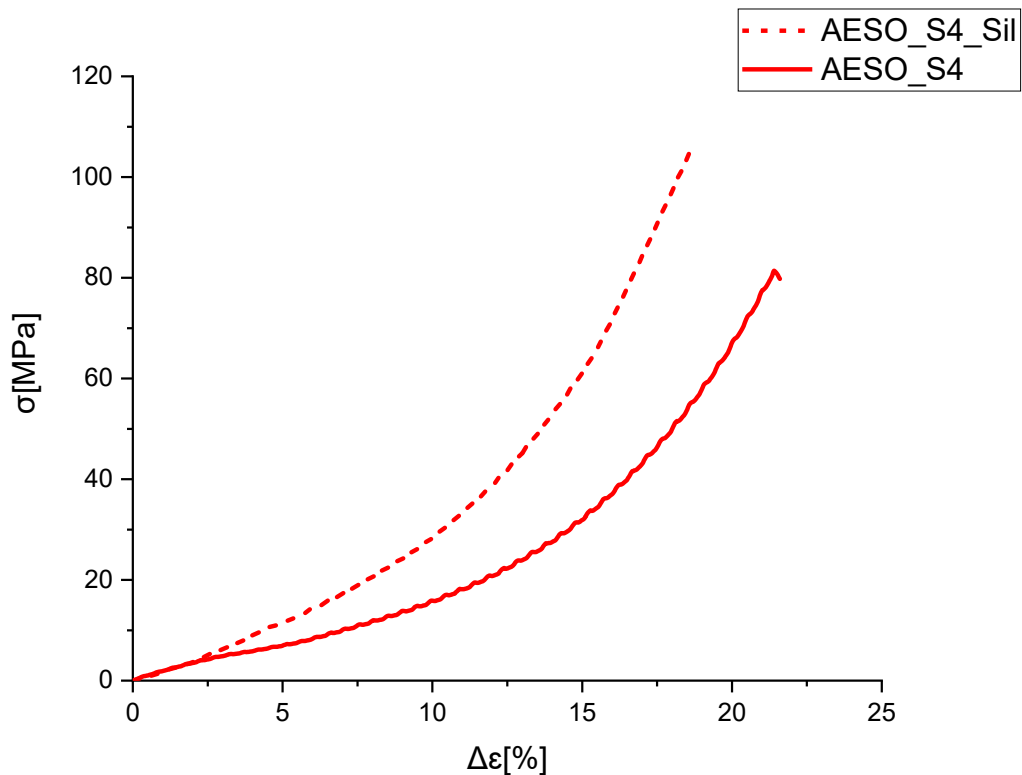


Fig.49 Prove meccaniche a compressione dei provini post stampa 3D di S4 e S4\_Sil

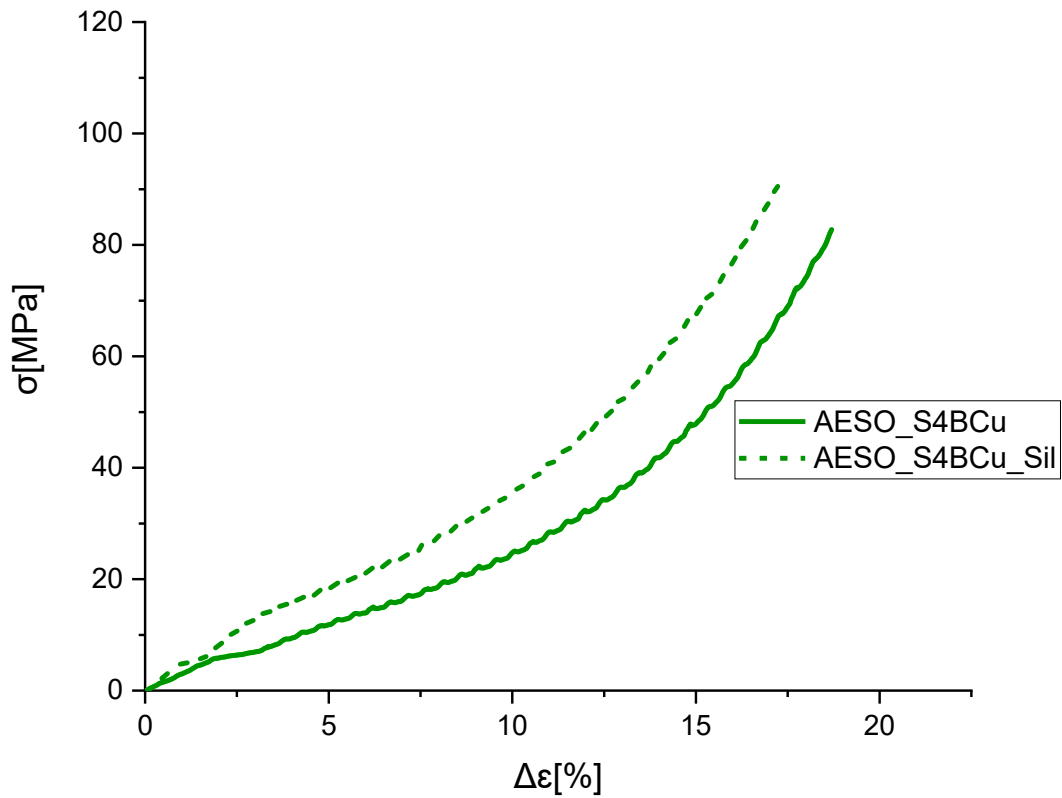


Fig.50 Prove meccaniche a compressione dei provini post stampa 3D di SBCu e S4\_Sil

<i>Campione</i>	<i>Modulo elastico [MPa]</i>
<b>AESO_S4</b>	0,4±0,1
<b>AESO_S4_Sil</b>	0,8±0,3
<b>AESO_S4BCu</b>	0,2±0,1
<b>AESO_S4BCu_Sil</b>	0,2±0

Tab.13 Valori definiti dalle prove a compressione

### 3.4 Caratterizzazione del processo di stampa 3D

La tecnica di stampa 3D ha permesso di ottenere i provini a trazione e compressione e, gli scaffold compositi di tutte le formulazioni elencate nella *Sezione 2.4*. Ogni formulazione è stata trattata in maniera diversa poiché alcune come quelle contenenti rame e tellurio, sono state problematiche.

#### 3.4.1 Provini ottenuti con il processo di stampa 3D

Il processo di stampa è stato eseguito modificando il tempo di esposizione del primo layer e di ogni layer (Tab.14) a tentativi impostando “alta viscosità” per far sì che il primo layer reticolasse e si attaccasse alla piattaforma di stampa. La difficoltà molto spesso si riferiva alla scarsa distribuzione e agglomerazione delle particelle di vetro come si può vedere nell’*Analisi al FE-SEM Sezione 3.5.2*, soprattutto nelle formulazioni con vetri bioattivi silanizzati e nei vetri bioattivi con rame e tellurio non trattati. La formulazione risultava più omogenea dopo l’utilizzo dello strumento Thinky Mixer (Sezione 2.4 Preparazione formulazioni) che ha agevolato il processo di stampa. In merito al colore vi è una differenza di colore nei provini AESO\_S4BCu, alcuni infatti mostrano un colore verdastro. Probabilmente durante la preparazione della formulazione il calore degli strumenti potrebbe aver definito un’ossidazione del rame.

<i>Campione</i>	<i>Tempo di esp. 1° layer [s]</i>	<i>Tempo di esp. x layer [s]</i>
<b>AESO70:30 S4</b>	45	4,5
<b>AESO70:30 S4 Sil</b>	45	4,5
<b>AESO70:30 S4BCu</b>	75	5,0
<b>AESO70:30 S4BCu Sil</b>	120	5,0
<b>AESO70:30 S4BTe</b>	120	5,0
<b>AESO70:30 S4BTe Sil</b>	120	5,0

*Tab.14 Parametri di stampa delle formulazioni*

Sono stati stampati 5 provini a trazione, 4 a compressione (Fig.51) utilizzati nelle prove Meccaniche (Sezione 3.3.2).

Per la prova a trazione si sono utilizzati provini di dimensione media 1.5 x 3.5 x 12 mm<sup>3</sup> a forma di osso di cane come indicato dalla normative ISO 527-2:2012(E) tipo 5A e 5B spessi 2mm circa

Per la prova a compressione invece hanno dimensione 10x10x4 mm<sup>3</sup> secondo ISO 604:2002 Risultato fondamentale è stato l'ottenimento degli scaffold compositi, tema principale di questo lavoro di Tesi, ottenuti con la stesse impostazioni di stampa della tabella Tab 12.

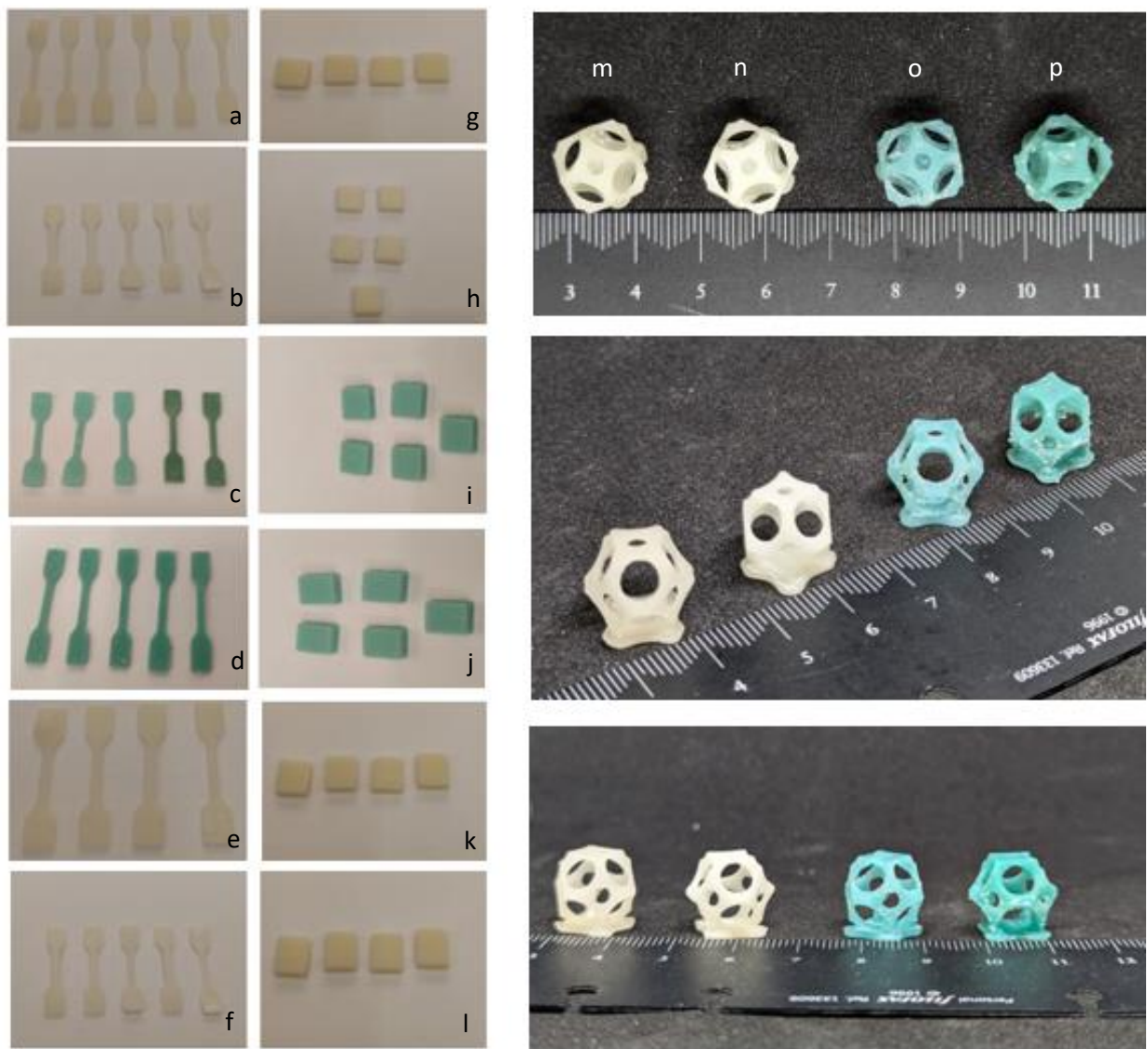
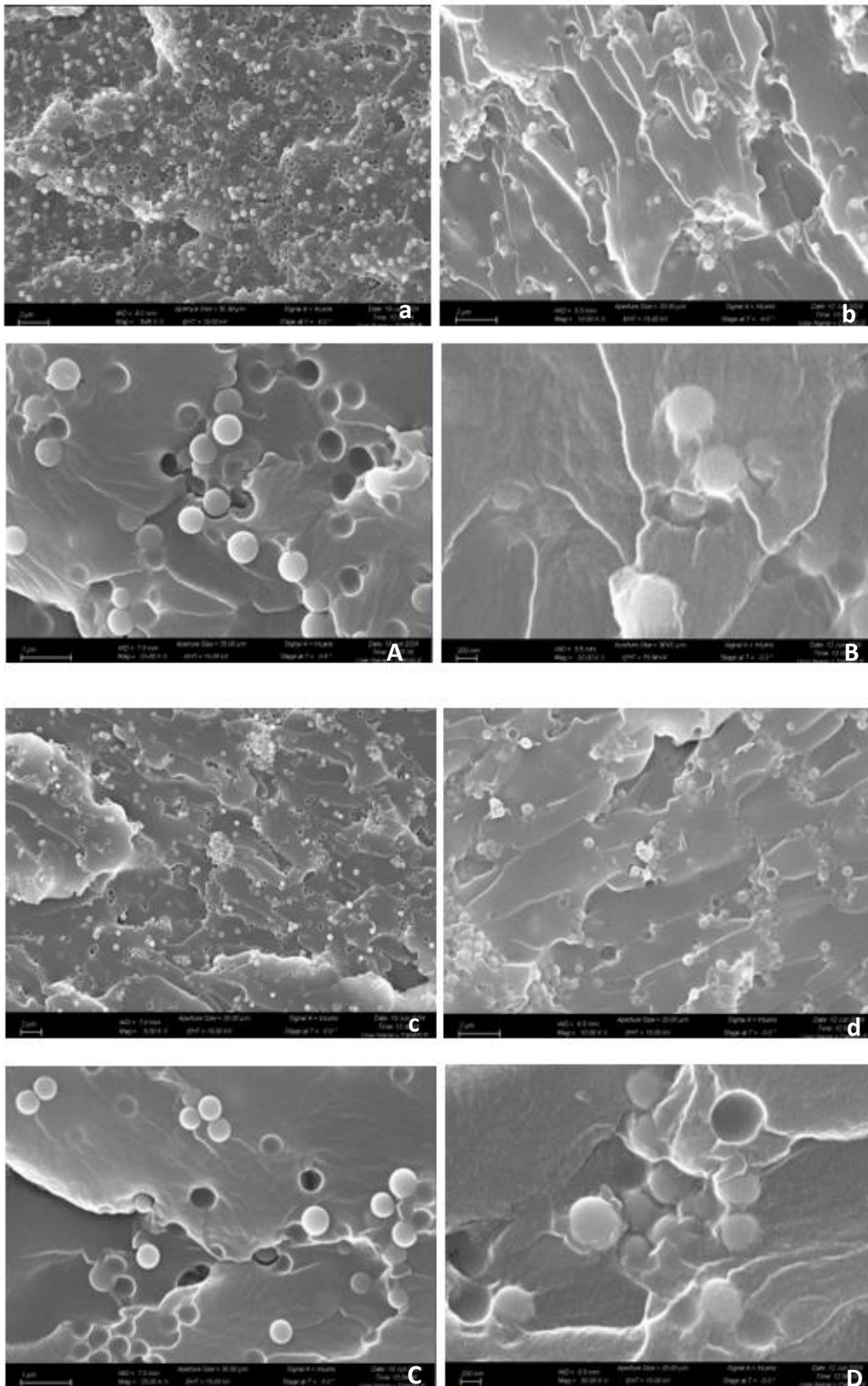
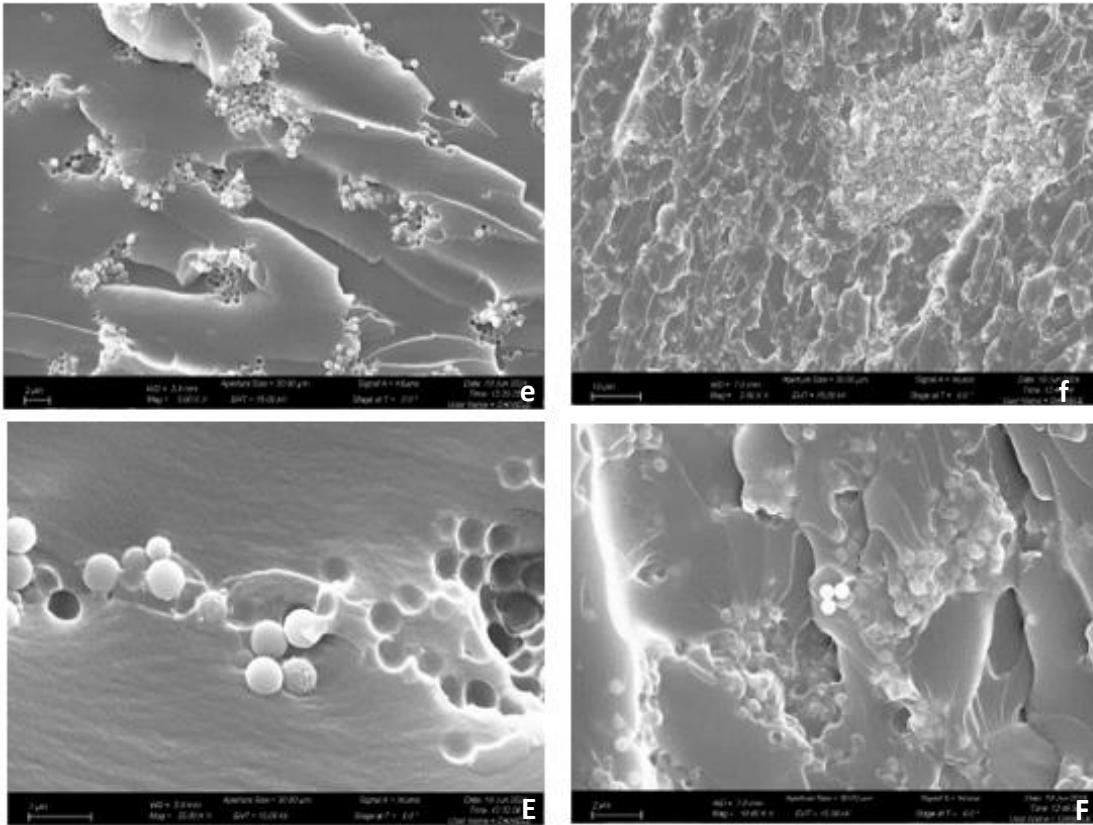


Fig.51 Provini a trazione: a.AESO\_S4; b.AESO\_S4\_Sil; c.AESO\_S4BCu; d.AESO\_S4BCu\_Sil; e.AESO\_S4BTe f.AESO\_S4BTe\_Sil; Provini a compressione g.AESO\_S4; h.AESO\_S4\_Sil; i.AESO\_S4BCu; j.AESO\_S4BCu\_Sil; k.AESO\_S4BTe l.AESO\_S4BTe\_Sil; Scaffold compositi m.AESO\_S4; n.AESO\_S4\_Sil; o.AESO\_S4BCu; p.AESO\_S4BCu\_Sil

### 3.4.2 Analisi SEM dei campioni post prova a trazione



*Fig.52 a.distribuzione delle nanoparticelle di vetro in AESO\_S4 ,A.adesione tra vetro e matrice in AESO\_S4;  
b.distribuzione delle nanoparticelle di vetro in AESO\_S4\_Sil ,B.adesione tra vetro e matrice in AESO\_S4\_Sil;  
c.distribuzione delle nanoparticelle di vetro in AESO\_S4BCu ,C.adesione tra vetro e matrice in AESO\_S4BCu;  
d.distribuzione delle nanoparticelle di vetro in AESO\_S4BCu\_Sil ,D.adesione tra vetro e matrice in AESO\_S4BCu\_Sil;*



*Fig.52 e.distribuzione delle nanoparticelle di vetro in AESO\_S4BTe ,E.adesione tra vetro e matrice in AESO\_S4BTe; f.distribuzione delle nanoparticelle di vetro in AESO\_S4BTe\_Sil ,F.adesione tra vetro e matrice in AESO\_S4BTe\_Sil*

Le immagini FESEM in Fig.52 rappresentano i campioni stampati con Prusa slicer sls1s dopo prova a trazione *Sezione 3.4.1*. Sono state considerate l'interfacce di frattura di S4, S4BCu, S4BTe e i rispettivi silanizzati. In queste immagini sarà considerata la superficie di frattura successivamente alla prova di trazione, per valutare le differenze con la silanizzazione in merito all'adesione dei vetri bioattivi con la matrice polimerica.

L'immagine SEM mostra particelle di vetro S4 che sono state sottoposte al trattamento di silanizzazione. La silanizzazione sembra aver creato una migliore adesione della matrice polimerica con le particelle dei vetri bioattivi; infatti, le particelle mostrano una definizione ridotta dovuta al fatto che sulla loro superficie è presente della resina e la frattura non è quindi avvenuta fra particelle e matrice.

Questo suggerisce che il trattamento di silanizzazione è stato efficace, migliorando la compatibilità con la matrice polimerica. Tuttavia l'immagine rivela anche aree di agglomerazione delle nanoparticelle e una distribuzione non ottimale.

Questo è evidente anche in campioni di S4 non trattati, dove si osservano vuoti derivanti dalla fuoriuscita delle particelle. Le particelle invece circondate da un alone scuro, indicano una scarsa integrazione all'interno della matrice, nonostante una migliore distribuzione.

Il comportamento è simile sia per S4 con ioni Cu che con ioni Te. Dove appunto, la silanizzazione conferisce una migliore adesione rispetto alle nanoparticelle non trattate.

### 3.5 Test Biologici e Bioattività

#### 3.5.1 Valutazione della crescita di idrossiapatite e analisi XRD

Di seguito viene mostrata una tabella (Tab.15) riguardante la misura del pH misurato durante il test di bioattività. Se il valore del pH tende ad aumentare può indicare uno scambio ionico con l'SBF e quindi una probabile formazione di idrossiapatite. I provini ottenuti dalla prova a trazione sono stati suddivisi in piccoli pezzi e sono stati immersi nella SBF (*Sezione 2.7.1*). Sono stati considerati due campioni per ogni tipo di formulazione di stampa *Sezione 3.5.1.* I risultati mostrano come inizialmente si ha un aumento del pH della soluzione SBF dopo 7gg, partendo da un valore di pH pari a 7,42 (pH rilevato alla fine della preparazione dell'SBF), evidenziando lo scambio ionico fra vetro e SBF. Dopo 14 giorni si ha un leggero aumento del pH. Invece alla conclusione dei 28 giorni si ha una stabilizzazione del pH. Questo suggerisce lo scambio ionico tra la superficie dei provini e quella dell'SBF.

<i>Campione</i>	<i>pH</i>	<i>pH</i>	<i>pH</i>
	<i>7gg</i>	<i>14gg</i>	<i>28gg</i>
AESO_S4	7,5	7,7	7,6
AESOS4_Sil	7,5	7,7	7,6
AESO_S4BCu	7,5	7,6	7,4
AESO_S4BCu_Sil	7,5	7,6	7,4
AESO_S4BTe	7,5	7,6	7,4
AESO_S4BTe_Sil	7,5	7,7	7,4

*Tab.15 Valori del pH in SBF dei campioni stampati in 3D*



In merito allo studio della bioattività si è riscontrata la crescita dell'idrossiapatite dopo il periodo in esame (28 giorni di immersione in SBF). Come si evince dalle immagini SEM in Fig.53, determinando la fase cristallina di cui abbiamo parlato nella *Sezione 1.3.2* che si forma sulla superficie dei campioni. È evidente che dopo 14 giorni (Fig.53a) i primi cristalli di idrossiapatite cominciano a formarsi, mentre osservando la Figura 53b, che riporta l'immagine della superficie del campione dopo 28 giorni di immersione in SBF, è possibile notare la completa formazione dei cristalli di HaP sulla superficie. In questo caso, a titolo esemplificativo il campione analizzato corrisponde a AESO\_S4BCu. Nonostante si siano introdotti ioni  $\text{Cu}^{2+}$ , che portano a una riduzione della formazione dell'idrossiapatite, quest'ultima si è formata sulla superficie del campione. [36] Se l'idrossiapatite riesce a svilupparsi anche in queste condizioni limitanti, possiamo dedurre che possa formarsi anche sulla superficie dei campioni che non prevedono la presenza di rame.

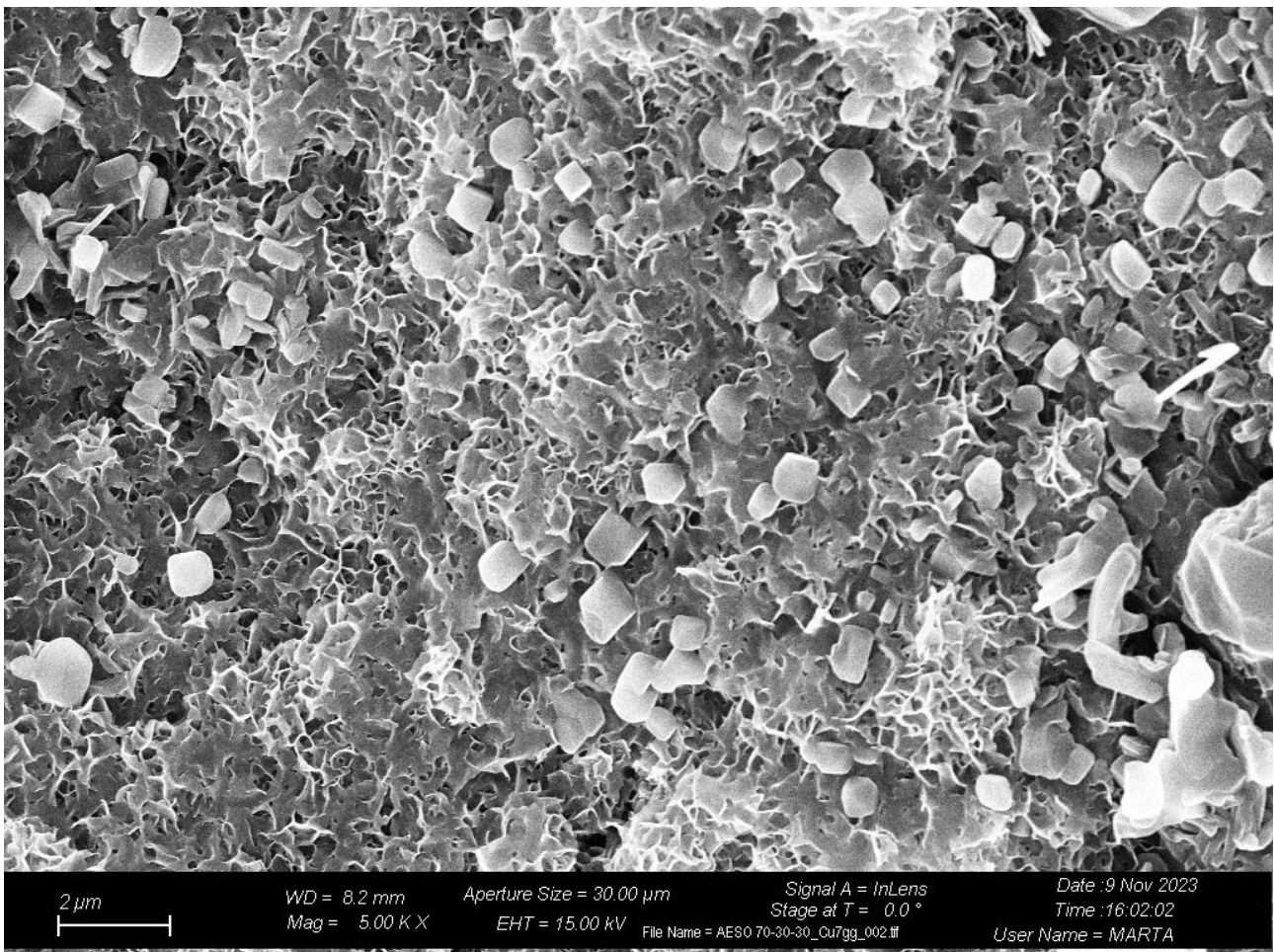
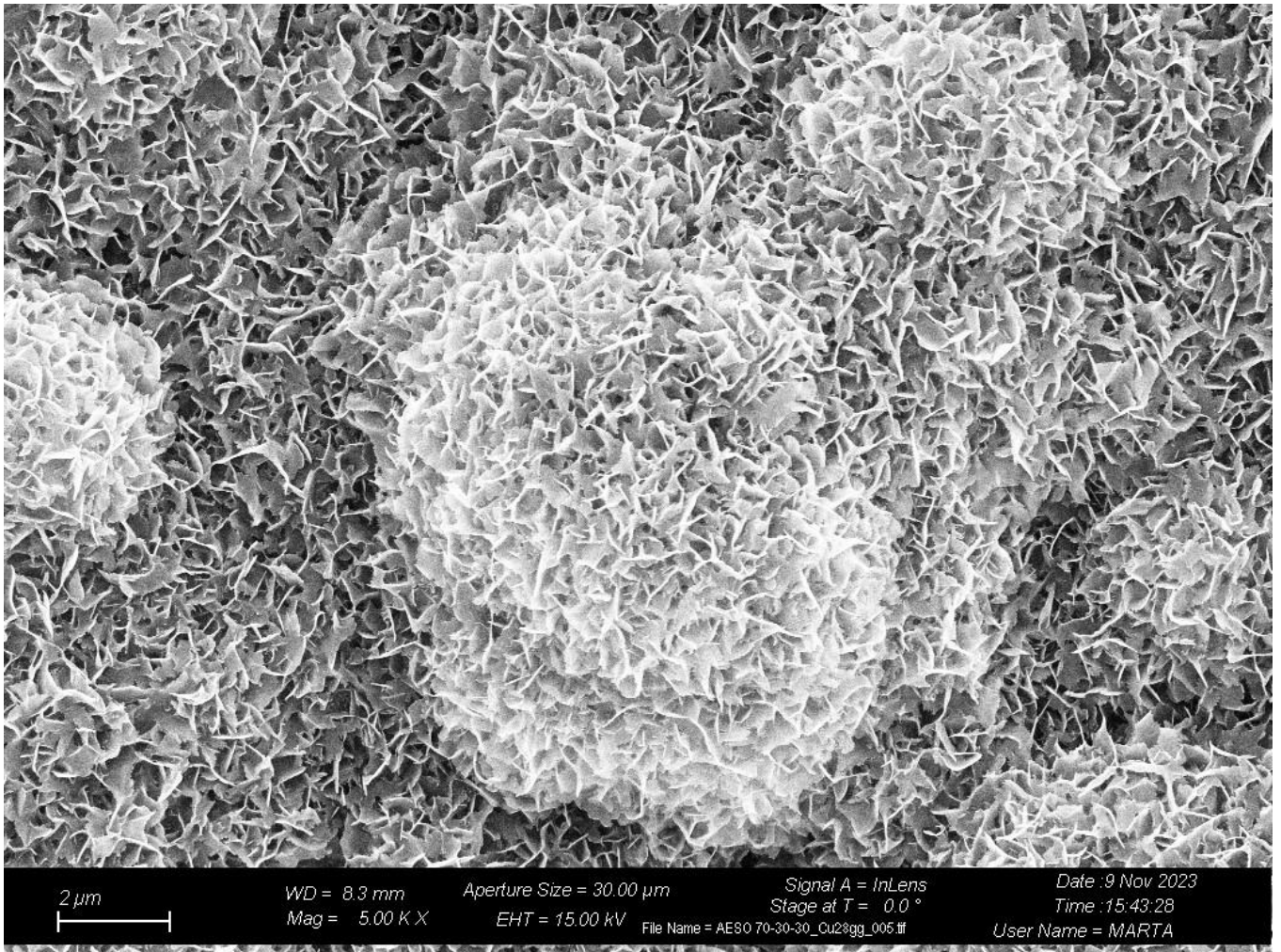
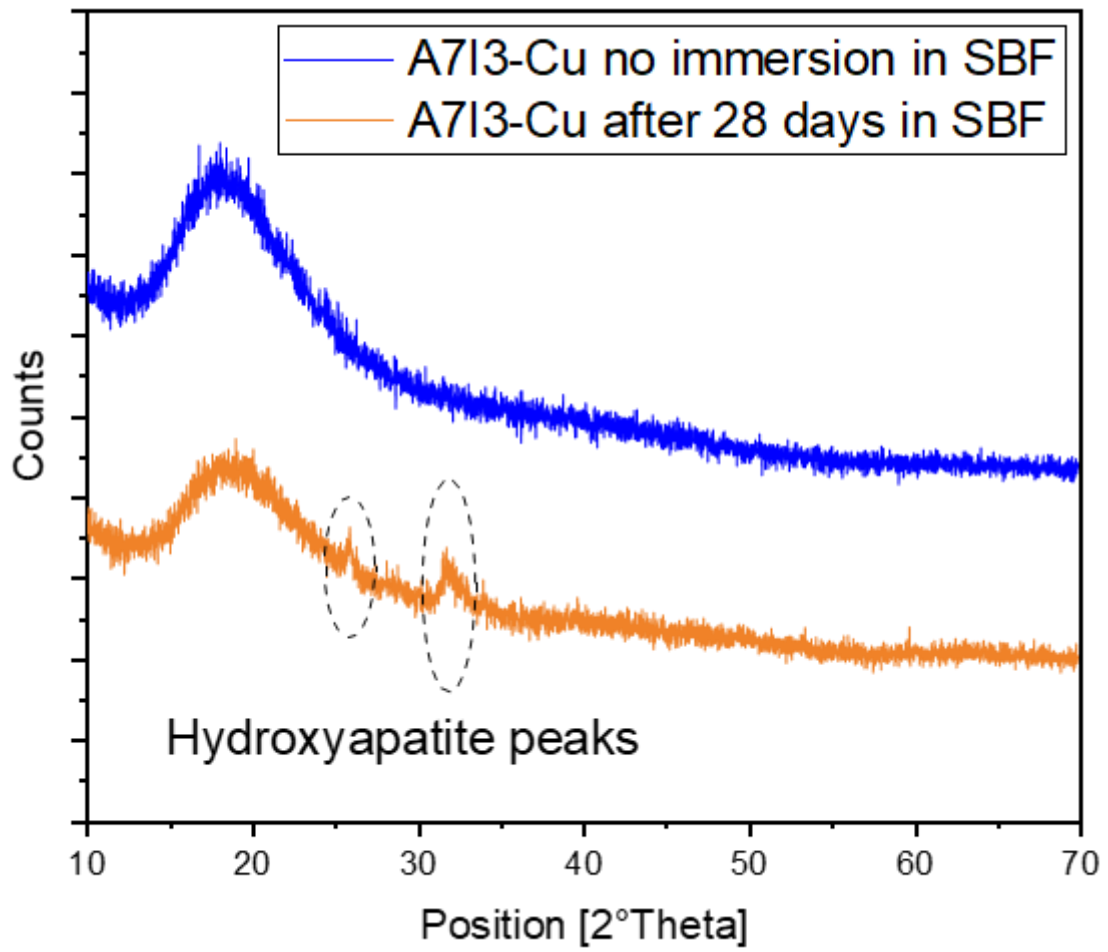


Fig.53a Formazione di idrossiapatite su AESO\_S4BCu dopo 14 giorni



*Fig.53b Formazione di idrossiapatite su AESO\_S4BCu dopo 28 giorni*

Inoltre la presenza dell'idrossiapatite è stata confermata dalle analisi XRD nell'immagine Fig.53c in cui vengono mostrati i picchi corrispondenti all'idrossiapatite riscontrati in AESO\_S4BCu dopo 28 giorni in SBF.



*Fig.53c Picchi corrispondenti all'idrossiapatite su AESO\_S4BCu(A7I3-Cu) dopo 28 giorni*

### 3.5.2 Test sulla citocompatibilità e sull'attività antibatterica

Lo studio prosegue con i test sull'attività metabolica e antibatterica delle superficie dei campioni riferiti alla preparazione in Sezione , valutando l'adesione e la proliferazione delle hbMSC che permettono una differenziazione in cellule ossee [38].

La valutazione dell'attività metabolica e dell'adesione delle cellule in superficie è stata eseguita attraverso alamar blue. In Fig. 54a,54b viene mostrato come l'attività metabolica dell'AESO-S4 e A7I3-Cu è simile a quella di A7I3\_ref (di riferimento).Le cellule invece sulle superfici dei campioni trattati con la silanizzazione, mostrano un attività metabolica inferiore rispetto a quella di controllo, evidenziate dalla freccia rossa sulla superficie dell'A7I3-S4-Sil. Inoltre le cellule che hanno aderito e sono evidenziate dalla freccia gialla, mostrano una morfologia tipica delle hbMSC. Questo risultato è coerente con l'aumento di idrofobicità nell'A7I3-S4-Sil (96°C)riscontrato nell'angolo di contatto (Sezione 3.1.2)[39], che potrebbe contribuire alla diminuzione osservata nell'attività metabolica.

Le immagini SEM delle cellule sulla superficie di A7I3-Cu\_Sil mostrano cellule ben distribuite ma con un attività metabolica bassa (definita da alamar blue basato sulla resazurina)

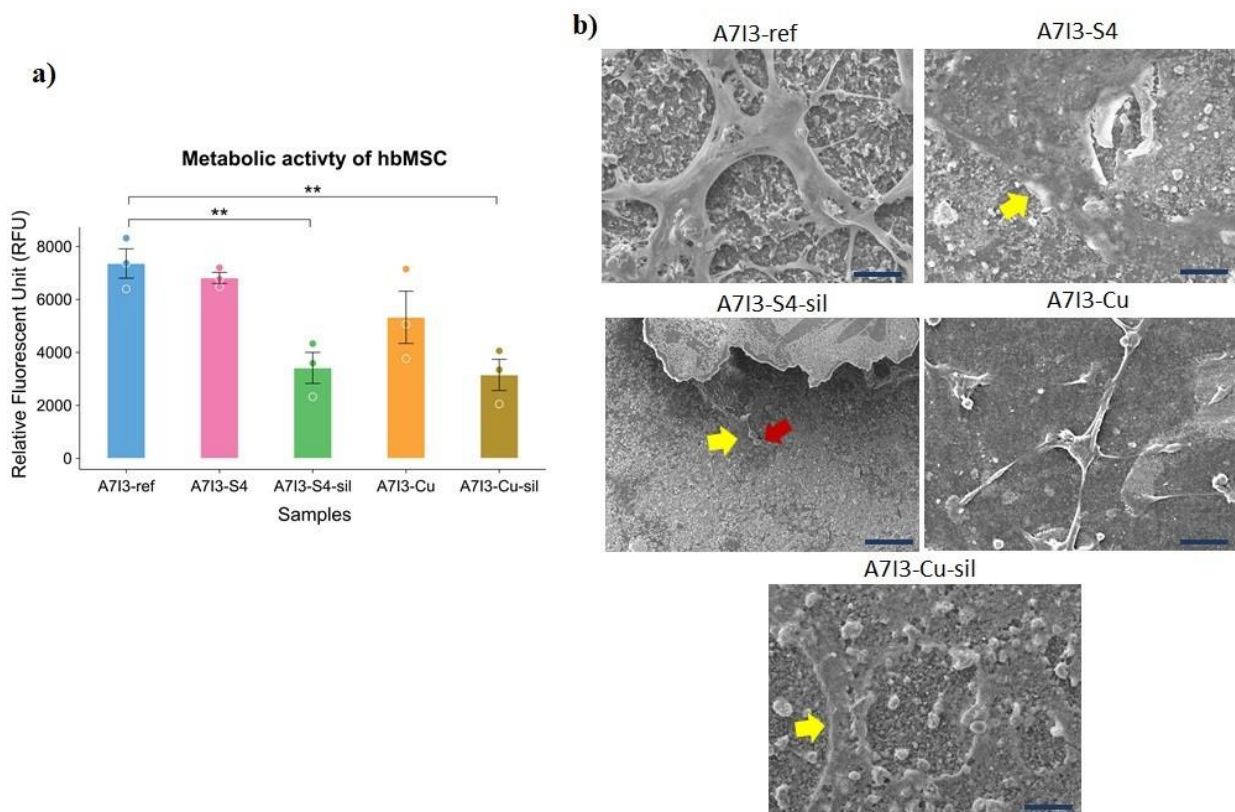


Fig.54 Valutazione in vitro della citocompatibilità dei campioni A7I3-ref, A7I3-S4, A7I3-S4sil, A7I3-Cu e A7I3-Cu-sil con cellule hbMSC per 24 ore a 37°C a) attività metabolica delle cellule attaccate alla superficie; b) immagini SEM, con frecce gialle che indicano le cellule diffuse sulla superficie e frecce rosse che mostrano le cellule non attaccate; Barra scala=50 µm.

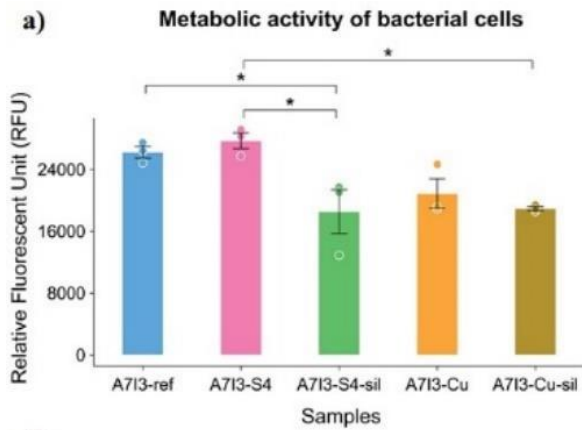
Per valutare invece l'effetto dei campioni silanizzati e non contro i patogeni batterici, è stato scelto il MRSA *S. aureus* che può causare infezioni ossee. Secondo il protocollo ISO 22196 i batteri sono stati inseriti direttamente sulla superficie dei campioni e incubati per 24h a 37°C. Dopo il periodo di incubazione sono stati valutati l'attività metabolica, la vitalità e la morfologia delle cellule batteriche (utilizzando alamar blu basato sulla resazurina) e, immagini al SEM.

Sono stati effettuati dei confronti con A7I3\_reference considerato come campione di controllo ottenendo i seguenti risultati nella Fig. 55. Si evince una differenza tra AESO reference e AESO\_S4\_Sil, così come tra A7I3\_S4, A7I3\_S4\_Sil e A7I3\_Cu\_Sil (Fig.55a). Inoltre, le cellule batteriche aderenti alla superficie di A7I3\_S4BCu hanno mostrato una riduzione anche in questo caso dell'attività metabolica nonostante la differenza rispetto a A7I3\_ref e al campione S4 non dopato non fosse significativa(Fig.55a)

Come mostrato nella Figura 55b il numero di cellule batteriche vitali aderenti alla superficie di A7I3\_S4\_Sil e A7I3Cu,A7I3Cu\_Sil è del 57% inferiore rispetto a quelle sulle superfici del campione di controllo A7I3ref e A7I3\_s4 dove invece occupano rispettivamente il 13% e 13,7% dell'area totale della superficie riscontrato dalle immagini SEM in 3D (utilizzando SMILE VIEW™ e ImageJ) in Fig.55c.

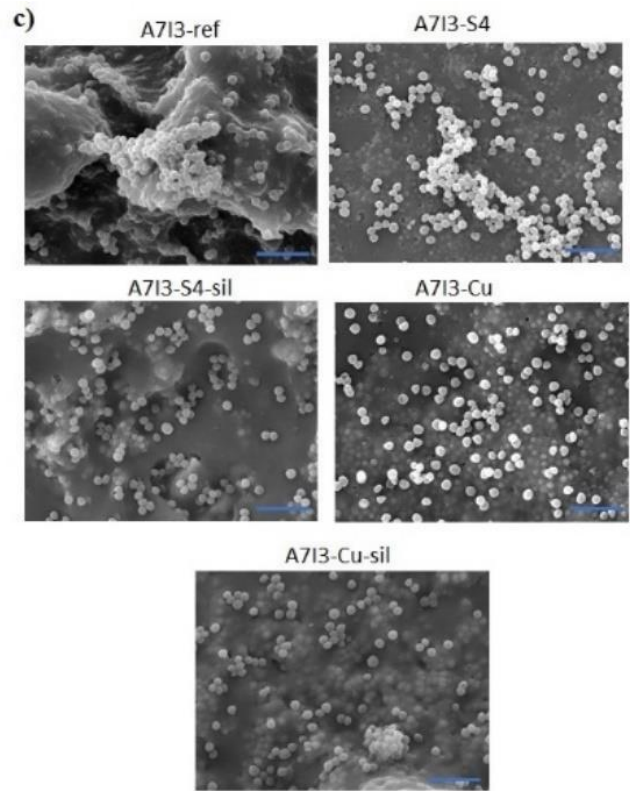
Al contrario sui campioni trattati con ioni Cu e Cu silanizzati, sono state osservate cellule batteriche sulle superfici in cui l'area occupata è diminuita dal 13-14% all'8-9%. La bassa attività metabolica e la ridotta adesione batterica in A7I3\_Cu e A7I3\_Cu\_Sil sono attribuite alla presenza di ioni Cu che possono interferire con il metabolismo delle cellule batteriche producendo specie reattive dell'ossigeno e interrompendo l'attività enzimatica e portando alla tossicità.[40]

I biovetri dopati con Cu hanno dimostrato un attività antibatterica contro *S.aureus* dopo 24h. [41]



**b) Viable surface-adhered bacterial colonies count**

Name of the samples	Number of colonies ( $\times 5 \times 10^9$ )	Reduction (%)
A713-ref	3.5 ( $\pm 0.7$ )	control
A713-S4	3.5 ( $\pm 0.7$ )	0
A713-S4-sil	1.5 ( $\pm 2$ )	57
A713-Cu	1.5 ( $\pm 0.7$ )	57
A713-Cu-sil	1.5 ( $\pm 2$ )	57



*Fig.55 Valutazione antibatterica in vitro dei campioni A713-ref, A713-S4, A713-S4sil, A713-Cu e A713-Cu-sil contro S.aureus dopo 24 ore di incubazione seguendo il protocollo ISO22196.a) Attività metabolica delle cellule batteriche aderite in superficie b) numero di cellule batteriche vitali aderite alla superficie (CFU) c) immagini SEM; barra scala = 5  $\mu$ m*

## Conclusione

Per la rigenerazione ossea è importante riuscire a trovare strategie che sostituiscano gli impianti autologhi e xenologhi per scarsa disponibilità. Così da ricreare template tridimensionali come gli scaffold che sono in grado di imitare a convenienza del paziente, i difetti e le lesioni ossee. Questo lavoro di Tesi ha dimostrato come l'utilizzo della silanizzazione abbia migliorato la compatibilità tra vetri bioattivi e la matrice polimerica, contribuendo a un incremento delle proprietà meccaniche, soprattutto quelle a trazione. Gli scaffold compositi dunque, riuscirebbero non solo a supportare la formazione di nuovo tessuto osseo degradandosi nel tempo ma a sopportare normalmente carichi localizzati grazie alle proprietà imposte dai vetri bioattivi.

Con l'utilizzo delle tecniche di stampa 3D come l'MSLA sono stati garantiti risultati ottimali che hanno permesso la creazione degli scaffold ,attraverso modelli personalizzabili. L'utilizzo inoltre, di polimeri derivati da risorse naturali rappresenta una soluzione ottimale per la biocompatibilità all'interno dell'organismo umano ,superando anche gli aspetti negativi dei polimeri sintetici che non contribuiscono alla sostenibilità ambientale.

Inoltre, nonostante si sia riscontrata una ridotta attività metabolica sui campioni in cui è presente il rame, al contrario la bioattività è risultata favorevole. Infatti il rame è un fattore limitante per la crescita dell'idrossiapatite, e anche sulla diffusione cellulare. Ma determina un'efficace antibattericità su agenti batterici come S.aureus.

L'introduzione di ioni tellurio all'interno di questo studio ha suscitato interesse soprattutto nel comportamento differente che ha avuto in ogni analisi di caratterizzazione. Sicuramente ha riscontrato risultati ottimali per la stampa 3D e in termini di bioattività e citocompatibilità nella rigenerazione ossea, promettendo soluzioni ancora più efficaci nel campo dell'ingegneria tissutale..

## Bibliografia

- [1] Ford, Simon, and Mélanie Despeisse. "Additive Manufacturing and Sustainability: An Exploratory Study of the Advantages and Challenges." *Journal of cleaner production* 137 (2016): 1573–1587.
- [2] Lan, Weiwei et al. "Progress in 3D Printing for Bone Tissue Engineering: A Review." *Journal of materials science* 57.27 (2022): 12685–12709.
- [3] Zhao, Xiangyu et al. "Beyond Hype: Unveiling the Real Challenges in Clinical Translation of 3D Printed Bone Scaffolds and the Fresh Prospects of Bioprinted Organoids." *Journal of nanobiotechnology* 22.1 (2024): 500–26.
- [4] Appunti STM Polimerici M. Sangermano
- [5] Bergoglio, Matteo et al. "UV-Cured Bio-Based Acrylated Soybean Oil Scaffold Reinforced with Bioactive Glasses." (2023)
- [6] Ramamoorthy, Sunil Kumar et al. "Performance of Biocomposites from Surface Modified Regenerated Cellulose Fibers and Lactic Acid Thermoset Bioresin." *Cellulose (London)* 22.4 (2015): 2507–2528.
- [7] Nason, Charles, John A Pojman, and Charles Hoyle. "Effect of a Trithiol and Inorganic Fillers on the Photo-Induced Thermal Frontal Polymerization of a Triacrylate." *Journal of polymer science. Part A, Polymer chemistry* 46.24 (2008): 8091–8096.
- [8] Kokubo, Tadashi, Hyun-Min Kim, and Masakazu Kawashita. "Novel Bioactive Materials with Different Mechanical Properties." *Biomaterials* 24.13 (2003): 2161–2175.
- [9]. Qu, Huawei et al. "Biomaterials for Bone Tissue Engineering Scaffolds: A Review." *RSC advances* 9.45 (2019): 26252–26262.
- [10] Sergi, Rachele, Devis Bellucci, and Valeria Cannillo. "A Review of Bioactive Glass/Natural Polymer Composites: State of the Art." *Materials* 13.23 (2020): 1–38.
- [11] Baino, Francesco, Sepideh Hamzehlou, and Saeid Kargozar. "Bioactive Glasses: Where Are We and Where Are We Going?" *Journal of functional biomaterials* 9.1 (2018): 25-.



- [12] Piatti, Elisa, Marta Miola, and Enrica Verné. "Tailoring of Bioactive Glass and Glass-Ceramics Properties for in Vitro and in Vivo Response Optimization: A Review." *Biomaterials Science* 12.18 (2024): 4546–4589.
- [13] Pantulap, Usanee, Marcela Arango-Ospina, and Aldo R Boccaccini. "Bioactive Glasses Incorporating Less-Common Ions to Improve Biological and Physical Properties." *Journal of materials science. Materials in medicine* 33.1 (2022): 3–3.
- [14] Kaur, Gurbinder et al. "A Review of Bioactive Glasses: Their Structure, Properties, Fabrication and Apatite Formation." *Journal of biomedical materials research. Part A* 102.1 (2014): 254–274.
- [15] Pajares-Chamorro, Natalia, and Xanthippi Chatzistavrou. "Bioactive Glass Nanoparticles for Tissue Regeneration." *ACS omega* 5.22 (2020): 12716–12726.
- [16] Kaur, Gurbinder et al. "Review and the State of the Art: Sol-Gel and Melt Quenched Bioactive Glasses for Tissue Engineering." *Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials* 104.6 (2016): 1248–1275.
- [17] Miola, M et al. "Sol-Gel Synthesis of Spherical Monodispersed Bioactive Glass Nanoparticles Co-Doped with Boron and Copper." *Journal of non-crystalline solids* 622 (2023): 122653-.
- [18] Kargozar, Saeid et al. "Functionalization and Surface Modifications of Bioactive Glasses (BGs): Tailoring of the Biological Response Working on the Outermost Surface Layer." *Materials* 12.22 (2019): 3696-.
- [19] Korzhikova-Vlakh, Evgenia, Mariia Antipchik, and Tatiana Tennikova. "Macroporous Polymer Monoliths in Thin Layer Format." *Polymers* 13.7 (2021): 1059-.
- [20] <https://3dprintingindustry.com/news/prusa-launches-the-s11s-speed-3d-printer-technical-specifications-and-pricing-191767/>
- [21] <https://www.3dsourced.com/3d-printing-technologies/msla-vs-sla/>

[22]<https://www.technipages.com/3d-printing-basics-what-is-msla-3d-printing/>

[23]<https://biomateriali.wordpress.com/wp-content/uploads/2012/12/ftir.pdf>

[24] Appunti Scienza e Tecnologia dei Materiali Funzionali, Pavese

[25] Kokubo, Tadashi, and Hiroaki Takadama. "How Useful Is SBF in Predicting in Vivo Bone Bioactivity?" *Biomaterials* 27.15 (2006): 2907–2915.

[26] Karabela, Maria M, and Irini D Sideridou. "Effect of the Structure of Silane Coupling Agent on Sorption Characteristics of Solvents by Dental Resin-Nanocomposites." *Dental materials* 24.12 (2008): 1631–1639.

[27] Tham, W.L, W.S Chow, and Z.A. Mohd Ishak. "The Effect of 3-(Trimethoxysilyl) Propyl Methacrylate on the Mechanical, Thermal, and Morphological Properties of Poly(Methyl Methacrylate)/Hydroxyapatite Composites." *Journal of applied polymer science* 118.1 (2010): 218–228.

[28] Rostami, Mehran, Mohsen Mohseni, and Zahra Ranjbar. "Investigating the Effect of pH on the Surface Chemistry of an Amino Silane Treated Nano Silica." *Pigment & resin technology* 40.6 (2011): 363–373.

[29] Fonseca Duarte, Camila Miranda et al. "Surface Energy Changes Involved in Apatite Formation in Copper-Containing Bioactive Glasses." *Materials research (São Carlos, São Paulo, Brazil)* 25 (2022): 1-

[30] Gandini, Alessandro, and Mohamed Naceur Belgacem. "Modifying Cellulose Fiber Surfaces in the Manufacture of Natural Fiber Composites." *Interface Engineering of Natural Fibre Composites for Maximum Performance*. Woodhead Publishing, 2011. 2–2.

[31] Dao, Phi Hung et al. "Assessment of Some Characteristics and Properties of Zirconium Dioxide Nanoparticles Modified with 3-(Trimethoxysilyl) Propyl Methacrylate Silane Coupling Agent." *Journal of chemistry* 2021 (2021): 1–10. Web.

- [32] Salerno, Simone. "Controllo Dell'angiogenesi Mediante Vetri e Vetroceramici Bioattivi = Modulating Angiogenesis by Bioactive Glasses and Glass-Ceramics." Politecnico di Torino, 2020. Print.
- [33 ] Hench, L.L, T.K Greenlee, and W.C Allen. An Investigation of Bonding Mechanisms at the Interface of a Prosthetic Material. N.p., 1970. Print.
- [34] Kaur, Gurbinder et al. "A Review of Bioactive Glasses: Their Structure, Properties, Fabrication and Apatite Formation." *Journal of biomedical materials research. Part A* 102.1 (2014): 254–274. Web.
- [35] Jones, Julian R. "Reprint of: Review of Bioactive Glass: From Hench to Hybrids." *Acta biomaterialia* 23 (2015): S53–S82. Web.
- [36] <https://www.nature.com/articles/s41598-024-53704-x>
- [37] Benedetto Mas, Alice. "Idrogeli Fotopolimerizzabili Derivanti Da Fonti Bio Contenenti Vetri Bioattivi = Bio-Based Photocurable Hydrogels Containing Bioactive Glasses." Politecnico di Torino, 2021.
- [38] Ramesh, Thiyagarajan. "Osteogenic Differentiation Potential of Human Bone Marrow-derived Mesenchymal Stem Cells Enhanced by bacoside-A." *Cell biochemistry and function* 39.1 (2021): 148–158.
- [39] Szafraniec, Małgorzata, and Danuta Barnat-Hunek. "Evaluation of the Contact Angle and Wettability of Hydrophobised Lightweight Concrete with Sawdust." *Budownictwo i Architektura* 19.2 (2020): 19–32.
- [40] Božić Cvijan, Bojana, Jelena Korać Jačić, and Milica Bajčetić. "The Impact of Copper Ions on the Activity of Antibiotic Drugs." *Molecules (Basel, Switzerland)* 28.13 (2023): 5133-.
- [41] Lallukka, Mari et al. "Cu-Doped Bioactive Glass with Enhanced in Vitro Bioactivity and Antibacterial Properties." *Ceramics international* 50.3 (2024): 5091–5103.

