

## Politecnico di Torino

Corso di Laurea Magistrale in Ingegneria Biomedica

A.a. 2021/2022 Sessione di Laurea Marzo 2022

Tesi di laurea Magistrale

# Rivestimenti naturali su strutture porose in lega di magnesio per regolarne il degrado

Relatore: Proff.ssa Silvia Spriano Corelatore: Dr. Sara Ferraris Candidato: Filippo Rossi

## ABSTRACT

Il magnesio e le sue leghe stanno suscitando un crescente interesse per applicazioni biomedicali grazie alle loro proprietà di resistenza meccanica, elevata biocompatibilità e soprattutto alla capacità di essere degradate e riassorbite dall'organismo senza effetti tossici. Questo ultimo punto si presenta come un'interessante opportunità per avere impianti presenti in situ soltanto per il periodo necessario alla rigenerazione dei tessuti. Tuttavia, proprio questo ultimo aspetto è anche il punto critico di tali materiali: a causa dell'elevato rate di degradazione in condizioni fisiologiche le tempistiche di riassorbimento non sono attualmente compatibili con quelle di rigenerazione e i processi di degradazione sono coinvolti nello sviluppo di reazioni infiammatorie. Pertanto, l'utilizzo delle leghe di magnesio per applicazioni ortopediche e cardiovascolari è ancora limitato. I rivestimenti superficiali rappresentano oggi la via più promettente per regolare la degradazione delle leghe di magnesio. Alcuni studi hanno evidenziato come coating di polifenoli, una classe di molecole naturali derivanti dal metabolismo secondarie delle piante, sembrino avere effetti benefici nell'abbassare il rate di corrosione di diversi metalli. Queste sostanze sono inoltre note per le loro proprietà anti-infiammatorie. L'obiettivo principale di questa tesi è stato la produzione di coating sottili di acido tannico su strutture porose in lega di magnesio AZ91 senza l'impiego di reagenti tossici. I rivestimenti sono stati prodotti mediante la tecnica di dip coating, adatta anche a strutture porose di forma complessa. I coating sono stati caratterizzati mediante microscopia elettronica, microscopia a fluorescenza, tomografia computerizzata e test di degrado in vitro. Nella tesi verranno in primo luogo descritte le caratteristiche principali, le criticità e le possibili applicazioni delle leghe di magnesio; successivamente verranno presentati i fenoli con le loro principali proprietà. Infine, verranno valutati i risultati di rivestimento tramite dip coating di una lega AZ91 con acido tannico e l'esito di test sperimentali di degrado su tali campioni.

### INDICE

1.	Introduzione	5
2.	Magnesio e leghe di magnesio	7
	2.1 Proprietà	7
	2.2 Biocompatibilità	3
	2.3 Corrosione	)
	2.4 Applicazioni 1	1
3.	Polifenoli 1	٤4
	3.1 Proprietà 1	L <b>4</b>
	3.2 Applicazioni 1	16
4.	Coating in polifenoli di leghe di magnesio1	19
	4.1 Rivestimenti in campo biomedicale1	19
	4.2 Rivestimenti polifenolici su superfici metalliche	20
	4.3 Rivestimenti polifenolici su leghe di magnesio	22
5.	Coating di campioni di lega di magnesio AZ91 con acido tannico	10
	5.1 Materiali e metodi	10
	5.1.1 Materiali	10
	5.1.2 Funzionalizzazione con acido tannico (TA)	
		11
	5.1.3 Caratterizzazione morfologica e chimica	11 12
	5.1.3 Caratterizzazione morfologica e chimica 5.1.4 Analisi della deposizione di TA tramite fluorescenza	11 12 14
	5.1.3 Caratterizzazione morfologica e chimica 5.1.4 Analisi della deposizione di TA tramite fluorescenza	11 12 14 15
	5.1.3 Caratterizzazione morfologica e chimica 5.1.4 Analisi della deposizione di TA tramite fluorescenza 5.1.5 Test di Folin&Ciocalteau	11 12 14 15 16
	5.1.3 Caratterizzazione morfologica e chimica	11 12 14 15 16 17
	5.1.3 Caratterizzazione morfologica e chimica	11 12 14 15 16 17 18
	5.1.3 Caratterizzazione morfologica e chimica45.1.4 Analisi della deposizione di TA tramite fluorescenza45.1.5 Test di Folin&Ciocalteau45.1.6 Test di degrado per immersione45.1.7 Analisi spettroscopica UV45.1.8 Test rilascio magnesio45.1.9 Tomografia computerizzata (CT)4	11 12 14 15 16 17 18 18
	5.1.3 Caratterizzazione morfologica e chimica       4         5.1.4 Analisi della deposizione di TA tramite fluorescenza       4         5.1.5 Test di Folin&Ciocalteau       4         5.1.6 Test di degrado per immersione       4         5.1.7 Analisi spettroscopica UV       4         5.1.8 Test rilascio magnesio       4         5.1.9 Tomografia computerizzata (CT)       4	11 12 14 15 16 17 18 18
	5.1.3 Caratterizzazione morfologica e chimica       4         5.1.4 Analisi della deposizione di TA tramite fluorescenza       4         5.1.5 Test di Folin&Ciocalteau       4         5.1.6 Test di degrado per immersione       4         5.1.7 Analisi spettroscopica UV       4         5.1.8 Test rilascio magnesio       4         5.1.9 Tomografia computerizzata (CT)       4         5.2 Risultati       4         5.2.1 Funzionalizzazione       4	11 12 14 15 16 17 18 18 19
	<ul> <li>5.1.3 Caratterizzazione morfologica e chimica</li> <li>5.1.4 Analisi della deposizione di TA tramite fluorescenza</li> <li>5.1.5 Test di Folin&amp;Ciocalteau</li> <li>5.1.6 Test di degrado per immersione</li> <li>5.1.7 Analisi spettroscopica UV</li> <li>5.1.8 Test rilascio magnesio</li> <li>5.1.9 Tomografia computerizzata (CT)</li> <li>5.2 Risultati</li> <li>5.2.1 Funzionalizzazione</li> <li>5.2.2 Test di degrado</li> </ul>	11 12 14 15 16 17 18 18 19 19 54
	5.1.3 Caratterizzazione morfologica e chimica       4         5.1.4 Analisi della deposizione di TA tramite fluorescenza       4         5.1.5 Test di Folin&Ciocalteau       4         5.1.6 Test di degrado per immersione       4         5.1.7 Analisi spettroscopica UV       4         5.1.8 Test rilascio magnesio       4         5.1.9 Tomografia computerizzata (CT)       4         5.2.1 Funzionalizzazione       4         5.2.2 Test di degrado       6         5.2.3 Tomografia computerizzata (CT)       7	11 12 14 15 16 17 18 18 19 19 54 74
	5.1.3 Caratterizzazione morfologica e chimica       4         5.1.4 Analisi della deposizione di TA tramite fluorescenza       4         5.1.5 Test di Folin&Ciocalteau       4         5.1.6 Test di degrado per immersione       4         5.1.7 Analisi spettroscopica UV       4         5.1.8 Test rilascio magnesio       4         5.1.9 Tomografia computerizzata (CT)       4         5.2 Risultati       4         5.2.1 Funzionalizzazione       4         5.2.2 Test di degrado       4         5.2.3 Tomografia computerizzata (CT)       4	11 12 14 15 16 17 18 19 19 54

#### 1. INTRODUZIONE

Ormai da molti anni in campo biomedico si sta assistendo ad un crescente interesse verso i biomateriali, ossia materiali in grado di integrarsi con l'organismo senza provocare, o limitando al massimo, possibili reazioni avverse da parte dell'ambiente biologico. In tempi più recenti tuttavia l'attenzione del mondo clinico si è concentrata su biomateriali che non solo evitino il presentarsi di pericolose complicazioni, ma che possano invece stimolare una ben determinata risposta dell'organismo o avere una funzionalità specifica: essa può essere per esempio data dalla proliferazione o dalla differenziazione cellulare, dalla guarigione e dalla ricrescita di un tessuto, dall'attivazione di specifici tipi cellulari, da effetti anti-infiammatori, ecc. I materiali utilizzati per questi scopi in ambito biomedico possono essere divisi in tre classi principali, ovvero metalli, polimeri e materiali ceramici, e i componenti di queste hanno diverse caratteristiche che li rendono più o meno adatti all'uso a seconda della specifica applicazione.

In particolare, la classe dei metalli è caratterizzata da materiali con notevoli proprietà meccaniche e di resistenza che li rendono adatti ad applicazioni in cui è richiesta la sopportazione di carichi anche molto elevati. Tuttavia, essi possono portare a dei problemi di tossicità a causa del possibile rilascio di ioni dovuto alla loro degradazione causata da corrosione in ambiente fisiologico. La corrosione in particolare è la principale causa di fallimento dei dispositivi medici costruiti con materiali metallici. L'organismo è infatti un ambiente estremamente ostile per i corpi estranei a causa della presenza di specie corrosive come i cloruri e dai processi di infiammazione che portano alla creazione di una ambiente aggressivo che porterebbe, in condizioni normali, all'eliminazione del corpo stesso. Questo processo è comune a qualsiasi impianto inserito all'interno del corpo umano e si è cercato negli anni di limitarne gli effetti con l'utilizzo di biomateriali "inerti", ossia che suscitano una risposta minima dell'ambiente biologico circostante e che per questo possono rimanere sostanzialmente intatti anche nel lungo periodo. Nonostante questo, nel caso in cui sia necessaria la ricrescita di una porzione di tessuto danneggiato questo approccio non è possibile in quanto non si permetterebbe la formazione di nuovo tessuto, con una conseguente perdita di funzionalità per il sito anatomico interessato dal difetto.

Per questo motivo si sta ricorrendo sempre di più all'utilizzo di materiali biodegradabili, ossia capaci di essere eliminati gradualmente dal corpo in modo da permettere la contemporanea crescita del tessuto circostante fino alla completa guarigione del difetto, il tutto senza il rilascio di prodotti di degradazione tossici. In particolare, la comprensione sui meccanismi che regolano la corrosione e le avanzate tecniche produttive odierne stanno permettendo lo sviluppo di metalli e leghe metalliche biodegradabili che utilizzano materiali non tossici. In particolare, il magnesio sta diventando sempre più popolare grazie alle sue caratteristiche meccaniche e di biocompatibilità, che ne fanno un interessante candidato per lo sviluppo di leghe metalliche bioriassorbibili per svariate applicazioni biomedicali. Queste leghe hanno dimostrato però un importante limite nel loro utilizzo in impianti: esse, infatti, degradano molto velocemente a causa dei meccanismi di corrosione.

L'obiettivo di questa tesi parte proprio da questo limite: l'attività svolta presso i laboratori del Dipartimento di Scienza Applicata e Tecnologia è stata finalizzata a creare tramite immersione un rivestimento di polifenoli su campioni di lega di magnesio, ed in seguito verificarne l'efficacia nella riduzione del rate di degradazione del metallo. L'approccio di coating per immersione è stato scelto perché presenta una serie di vantaggi rispetto ad altri metodi di funzionalizzazione chimici e fisici. In primo luogo, l'immersione è un processo estremamente semplice, economico e che può essere effettuato senza l'utilizzo di apparecchiature complesse; è possibile evitare l'uso di solventi o reagenti tossici con un conseguente minor rischio di contaminazione superficiale; infine, esso permette di funzionalizzare anche componenti con geometrie complesse.

Il lavoro svolto è stato diviso principalmente in due step: nella prima parte si è cercato di individuare la condizione di funzionalizzazione che garantisse la formazione di un coating omogeneo e stabile sulla superficie dei campioni attraverso analisi al SEM/EDS, in fluorescenza e test chimici (Folin&Ciocalteau) ; nella seconda parte, la migliore scelta di parametri di funzionalizzazione è stata utilizzata per preparare i campioni per test di degrado in soluzione PBS, al termine dei quali è stata valutata la capacità dei rivestimenti di proteggere la lega di magnesio dalla corrosione attraverso osservazioni al SEM/EDS ed analisi di rilascio del magnesio.

#### 2. MAGNESIO E LEGHE DI MAGNESIO

#### 2.1 Proprietà

Il magnesio, allo stato puro, è un metallo leggero di colore grigio-bianco lucido che tipicamente si ossida se esposto all'aria a causa dell'elevata reattività, assumendo un aspetto più opaco. È un elemento abbastanza comune essendo l'ottavo più abbondante nella crosta terrestre, e a causa delle scarse proprietà meccaniche è utilizzato specialmente all'interno di leghe metalliche, di cui può migliorare sensibilmente le proprietà. L'aggiunta del magnesio infatti permette di ottenere leghe leggere, dall'alto rapporto resistenza-peso e con ottime caratteristiche di lavorabilità: per questo, le leghe di magnesio sono usate in modo estensivo in molti campi industriali, come ad esempio l'aereonautico e l'automobilistico.

In campo biomedico, le proprietà meccaniche delle leghe di magnesio sono estremamente interessanti per quanto riguarda la possibilità di utilizzarle in impianti per i tessuti duri, in particolare per l'osso. Rispetto all'osso corticale esse possiedono infatti una densità molto simile che varia nell'intervallo 1.7-2.0 g/cm<sup>3</sup> (contro 1.8-2.1 g/cm<sup>3</sup> dell'osso corticale), un carico di snervamento maggiore (150 – 350 MPa contro 100-200 MPa) ed un modulo elastico leggermente più alto (circa 40-45 GPa contro 20 GPa) [4,19]. In particolare quest'ultima caratteristica permette, a differenza di altri metalli già utilizzati in ortopedia come il titanio o le leghe cromo-cobalto che presentano un modulo elastico molto più elevato (Fig.1), di evitare il fenomeno dello stress shielding che può portare al riassorbimento osseo e al fallimento dell'impianto stesso.



*Figura 1*. Confronto tra modulo elastico e carico di snervamento dell'osso rispetto ad altri materiali tipicamente utilizzati in ambito ortopedico [4]. Si può notare la vicinanza delle leghe di magnesio alle caratteristiche dell'osso naturale.

Una delle principali criticità del magnesio è la sua tendenza alla corrosione a causa della sua elevata reattività, specialmente quando posto in un ambiente acquoso in cui sono presenti specie chimiche aggressive come i cloruri: il corpo umano presenta entrambe queste caratteristiche. È quindi indispensabile prendere in considerazione la biocompatibilità dei prodotti di degradazione del magnesio ed analizzare i processi che portano alla degradazione di questi materiali.

#### 2.2 Biocompatibilità

Il magnesio è un elemento traccia fondamentale anche per i sistemi biologici. All'interno del corpo umano, il magnesio è presente principalmente in forma mineralizzata all'interno dello scheletro (60-60%), una parte (32-35%) è legato a proteine e acidi nucleici mentre il resto è localizzato nel plasma e nei liquidi intracellulari [1]. Esso ricopre un importante ruolo come cofattore per numerosi enzimi, nella stabilizzazione delle membrane cellulari, nella conduzione neuromuscolare e per la corretta funzionalità del sistema nervoso: è infine fondamentale per il metabolismo cellulare in quanto essenziale per tutti i processi biologici che prevedono l'utilizzo di ATP, in quanto componente dei complessi ATP-magnesio, e regola l'attività dei canali ionici della membrana.

Oltre a questa compatibilità intrinseca con l'organismo il magnesio sembra avere degli effetti benefici se rilasciato nell'ambiente biologico, ad esempio in seguito alla degradazione di componenti in lega, ed in particolare sui processi ossei. È stato infatti riportato [4] come ioni magnesio aggiunti a colture di cellule staminali mesenchimali del midollo osseo umano e osteoblasti in differenziazione abbiano promosso la mineralizzazione della matrice extracellulare aumentando la produzione di collagene di tipo X, favorendo quindi il processo di osteogenesi. Inoltre, è stata osservata anche un aumento dell'espressione del VEGF, fattore di crescita fondamentale nel processo di angiogenesi.

Il magnesio e le sue leghe hanno mostrato anche altre interessanti caratteristiche biologiche grazie anche all'integrazione di elementi secondari come stronzio, zinco, calcio ed altri elementi traccia naturalmente presenti nel corpo in basse concentrazioni (Tabella 1) [1,2,20]. In particolare, diversi studi hanno evidenziato come queste leghe abbiano presentato, a seconda della composizione, proprietà antibatteriche, anti-infiammatorie, osteconduttive [1,2], rendendole estremamente interessanti per future applicazioni in ambito clinico.

Elementi traccia	Proprietà biologiche	
	Ruolo nel metabolismo dell'osso: se	
Ma	presente in quantità inadeguata, può	
	portare allo sviluppo di osteoporosi	
	e aterosclerosi.	
	Fondamentale nella struttura e nel	
	rimodellamento osseo; ha un ruolo	
Са	fondamentale anche nella	
	contrazione muscolare e nel	
	metabolismo cellulare.	
75	Co-fattore per enzimi dell'osso, della	
Zn	cartilagine e dei muscoli.	
6-	Promuove la maturazione degli	
Sr	osteoblasti.	

Tabella 1: Elementi traccia e principali proprietà biologiche

#### 2.3 Corrosione

Come già accennato il principale problema delle leghe di magnesio, e dei metalli biomedici in generale, è la degradazione causata da processi corrosivi che avvengono a seguito dell'esposizione all'ambiente biologico. Questi processi sono frutto di reazioni elettrochimiche di dissoluzione anodica del metallo e riduzione catodica delle specie presenti nell'ambiente circostante con la conseguente formazione di prodotti di degradazione che diffondono nelle vicinanze dell'impianto, che possono a loro volta aumentare la velocità del processo stesso oppure risultare tossici per l'organismo se rilasciati in quantità significative.

Il magnesio, a causa del suo potenziale di riduzione standard di – 1.7 V [19], è estremamente reattivo ed in ambiente biologico è sottoposto alla formazione di un layer di idrossido di magnesio con il rilascio di idrogeno gassoso secondo la reazione:

 $2Mg + 2H^+ + 2H_2O \rightarrow 2Mg^{2+} + 2OH^- + 2H_2$  $Mg^{2+} + 2OH^- \rightarrow Mg(OH)_2$ [1,19] Questo strato passivato, che in principio protegge il materiale sottostante dalla corrosione, reagisce con i cloruri presenti nei fluidi circostanti trasformandosi in cloruro di magnesio che è al contrario altamente solubile:

$$Mg(OH)_2 + 2Cl^- \rightarrow MgCl_2 + 2OH^-$$
[1,19]

La presenza di questo layer solubile è responsabile dell'innesco di fenomeni di corrosione per vaiolatura, che portano alla progressiva degradazione del metallo ed al possibile fallimento dell'impianto a partire dai siti più esposti all'azione delle specie corrosive.

Inoltre, in presenza di elettroliti il magnesio e le sue leghe sono soggetti anche ad altri tipi di corrosione, in particolare corrosione galvanica dovuta alla presenza di impurità all'interno della lega e di fenomeni di tenso-corrosione. Questi ultimi in particolare sono estremamente pericolosi in quanto nel caso di impianti sottoposti a carichi, anche ridotti, la presenza contemporanea di fenomeni di corrosione può portare alla rottura del componente a causa della "cooperazione" tra questi fattori: il risultato è il cedimento, spesso rovinoso, dell'impianto anche in presenza di sollecitazioni che in condizioni normali sarebbero state tranquillamente tollerate [3].

A causa della sua tendenza alla degradazione e delle scarse proprietà meccaniche, il magnesio puro non è mai utilizzato in applicazioni biomediche, ma vengono invece usate le sue leghe. In particolare, gli elementi che vengono utilizzati a questo scopo sono scelti non solo per aumentare le caratteristiche fisiche della lega, ma anche per aumentare le caratteristiche biofunzionali della stessa: quelli principalmente utilizzati sono Al, Ca, Li, Zn, Mn e terre rare come l'ittrio (Y) e il neodimio (Nd) [3,19]. Naturalmente, questi elementi possono essere tossici se rilasciati in quantità troppo elevate nell'organismo, e per questo un adeguato controllo della corrosione di questi materiali è fondamentale per un futuro utilizzo estensivo in ambito clinico. Nella Tab.2 sono elencati i principali effetti sulla lega dei tipici elementi di lega e i loro possibili effetti tossici.

Elemento	Effetto sulla lega	Concentrazione sicura nel	Tossicologia
		siero	
AI	Passivazione, migliora la	2.1-4.8 μg/L	Neurotossico se
	resistenza a corrosione		presente in quantità
			elevate, accumulo
			nelle ossa diminuisce
			la vitalità degli
			osteoclasti
Са	Aumenta la resistenza a	0.919-0.993 mg/L	Un disequilibrio nella
	corrosione (se in		quantità di calcio può
	concentrazione <1%),		portare a problemi
	stabilizzazione dei grani		renali e disturbi
			cardiaci
Li	Migliora la resistenza a	2-4 ng/L	Disturbi renali e
	corrosione		respiratori
Zn	Aumenta la	12.4-17.4 μmol/L	Una quantità elevata
	compatibilità con l'osso		può portare a
	variando le proprietà		neurotossicità, crampi
	meccaniche della lega,		e problemi intestinali
	rende meno efficace		
	l'effetto corrosivo di		
	eventuali impurità		
Y	Aumenta la duttilità e la	< 47 μg	Possibile accumulo
	resistenza a corrosione		epatico
Mn	Migliora la resistenza a	< 0.8 μg/L	Possibili disturbi
	corrosione		neurologici e motori
Nd	Riduce la dimensione	/	Citotossico
	dei grani, aumentale la		
	resistenza a corrosione.		

Tabella 2. Principali elementi di lega del magnesio, il loro effetto e i possibili rischi per l'organismo [3].

#### 2.4 Applicazioni

Ad oggi, in campo biomedico il magnesio e le sue leghe sono di interesse principalmente per il settore ortopedico e cardiovascolare.

Nel settore ortopedico le leghe metalliche tipicamente utilizzate hanno elevate caratteristiche meccaniche e di resistenza a fatica, fondamentali negli impianti protesici e di fissaggio che devono sopportare carichi anche molto elevati in sostituzione del tessuto osseo o delle articolazioni. I materiali utilizzati a questo scopo sono per lo più leghe di titanio, leghe cobalto-cromo-molibdeno e più raramente acciai, ma nonostante le ottime caratteristiche meccaniche essi presentano anche alcune criticità. Innanzitutto questi

materiali, essendo tipicamente impiegati in impianti permanenti, nonostante le ottime caratteristiche di resistenza sono soggetti ad una lieve degradazione per corrosione, che resta una delle principali cause di fallimento di questi componenti: difetti nella microstruttura o danni superficiali subiti anche successivamente alla produzione facilitano fenomeni di corrosione che possono portare non solo alla rottura del dispositivo, ma anche al rilascio di ioni tossici nei tessuti circostanti con conseguenti reazioni infiammatorie locali, fenomeni di metallosi o complicazioni sistemiche. Nei casi più gravi, la tossicità dei prodotti di degradazione può portare al riassorbimento osseo nelle immediate vicinanze dell'impianto, con la conseguente mobilizzazione del componente e dolore per il paziente che deve quindi sottoporsi ad un intervento di rimozione. Recentemente l'interesse del mondo ortopedico per le leghe metalliche bioriassorbibili è aumentato grazie ai vantaggi che questi materiali innovativi presentano rispetto ai metalli tradizionali: il principale è sicuramente un parziale o totale recupero della funzionalità fisiologica in quanto il riassorbimento consente la contemporanea crescita ed espansione del tessuto circostante, a patto che la degradazione del materiale avvenga con tempistiche compatibili. Questo permette inoltre di evitare la programmazione di interventi chirurgici per la rimozione degli impianti temporanei, con un impatto positivo sia sulla salute del paziente che sul servizio ospedaliero.

Attualmente, le leghe di magnesio sono già utilizzate in ambito clinico, tipicamente in impianti di piccole dimensioni come viti ortopediche. Per esempio, la vite MAGNEZIX (brevettata da Syntallix AG) in lega MgYReZr è stata utilizzata per il trattamento dell'alluce valgo, con risultati comparabili agli impianti in titanio ed il recupero della mobilità dell'articolazione. La viti K-MET in lega MgCaZn, fabbricate da U&I Corporation, sono state utilizzate per curare 53 pazienti affetti da frattura distale del radio: a distanza di 12 mesi dall'intervento, la frattura era completamente guarita e l'impianto era stato totalmente riassorbito [4] (Fig.2).



*Figura 2*. Vite K-MET utilizzata per fratture distali del radio.

In campo cardiovascolare, in particolare nella fabbricazione degli stent, i metalli riassorbibili sono di grande interesse in quanto permettono di evitare i tipici problemi degli impianti permanenti in metalli tradizionali, ossia il rischio di infiammazione e di restenosi. Le caratteristiche principali che deve avere uno stent cardiovascolare sono un'adeguata resistenza meccanica per fornire il giusto supporto al vaso, l'assenza di trombogenicità per evitare la formazione di coaguli e, se possibile, deve interferire il meno possibile con il processo di guarigione del tessuto endoteliale interno al vaso. I materiali tradizionalmente utilizzati per questo scopo, tipicamente leghe Ni-Ti (Nitinol) e acciai rivestiti di carbonio pirolitico, soddisfano i primi due requisiti, ma possono causare uno stato di infiammazione cronica delle pareti del vaso ed innescare fenomeni di restenosi. Recentemente sono state sviluppate delle soluzioni più innovative come i DES (drug eluting stent), ossia dispositivi metallici rivestiti con uno strato polimerico (tipicamente PLLA o PLGA) contenente farmaci anti-infiammatori o anti-coagulanti che vengono rilasciati mano a mano che lo strato polimerico bioriassorbibile si degrada. Nonostante ciò, resta comunque il rischio di incorrere nei problemi sopra citati una volta che il farmaco sia esaurito o che venga esposta la struttura in metallo sottostante. Per questo, la possibilità di utilizzare leghe e metalli riassorbibili che vengano degradati a mano a mano che il tessuto interno al vaso guarisce è una nuova fonte di interesse per il mondo clinico, e il magnesio in particolare è, con le sue leghe, un candidato fondamentale grazie alle sue caratteristiche biocompatibili, meccaniche e di bassa trombogeneticità [5].

Nonostante rimangano estremamente promettenti, le leghe di magnesio sono purtroppo ancora soggette a delle criticità: il rischio di infiammazione locale e, soprattutto, una corrosione decisamente rapida in ambiente biologico restano le più grandi limitazioni al loro impiego e tutt'oggi si sta lavorando per cercare di trovare delle soluzioni efficaci.

In particolare, in questo lavoro di tesi verrà affrontata la problematica della degradazione attraverso lo studio sulla deposizione di un possibile rivestimento organico che permetta un maggiore controllo sul rate di corrosione delle leghe di magnesio, attraverso l'uso di composti organici facilmente reperibili e totalmente biocompatibili: i polifenoli.

#### 3. POLIFENOLI

#### 3.1 Proprietà

I fenoli sono una grande famiglia di molecole organiche di origine vegetale caratterizzati da una struttura chimica aromatica costituita da anelli benzenici, al cui interno uno o più atomi di idrogeno sono sostituiti con gruppi ossidrili. Sono composti tipicamente solidi, cristallini e caratterizzati da un forte odore caratteristico. In natura sono tipicamente prodotti del metabolismo secondario degli organismi vegetali, in cui hanno un ruolo nella protezione da raggi UV, batteri e parassiti, nella pigmentazione della pianta e nella colorazione ed odore dei suoi prodotti. Tuttavia, essi possono essere ottenuti anche tramite la lavorazione dei residui e degli scarti del cibo, che possono rappresentano una fonte di composti fenolici economica e con una conseguente riduzione degli sprechi [6].



Figura 3: Struttura chimica di componenti delle varie classi di fenoli. (A) fenolo, il più semplice componente della classe dei fenoli; (B) acido gallico, compreso negli acidi fenolici; (C) quercetina, appartenente alla classe dei flavonoidi; (D) acido tannico, componente della classe dei tannini; (D) Resveratrolo, rappresentante degli stilbeni.

A seconda della struttura chimica, i fenoli sono divisi in alcuni gruppi principali: acidi fenolici, flavonoidi, tannini, stilbeni e lignani [6,9].

Gli acidi fenolici possiedono una struttura costituita da un singolo anello fenolico con l'aggiunta di un gruppo carbossilico (-COOH) e si trovano nella verdura, nella frutta e nel grano: acido gallico, acido caffeico e acido ferulico sono alcuni dei rappresentati di questa classe.

I flavonoidi sono di gran lunga il gruppo più numeroso, essendo presenti in frutta, verdura e all'interno di alcuni tipi di piante, dove svolgono importanti attività nella sintesi di enzimi, vitamine e nella colorazione. La loro struttura base è costitutita da due anelli aromatici collegati da un anello di tetraidropirano, mentre le differenze tra i gruppi funzionali legati a quest'ultimo e la connessione tra i due composti aromatici permettono di individuare diversi sottogruppi ognuno con particolari funzionalità. Appartenenti a questa classe di fenoli sono ad esempio la quercitina, la catechina e l'apigenina.

I tannini sono i composti fenolici maggiormente diffusi all'interno delle piante, dove svolgono ruoli di protezione dai raggi UV e dai radicali liberi, segnalazione chimica e difesa contro i microorganismi. Sono fenoli complessi che possono essere divisi in idrolizzabili, composti da un nucleo carboidrato legato a gruppi fenolici, e condensati, formati dalla condensazione di più molecole di flavonoidi. I tannini sono una delle classi di fenoli più interessanti, sia per le proprietà biologiche che per la capacità di formare complessi con un gran numero di macromolecole.

Gli stilbeni sono caratterizzati da una struttura con due anelli benzenici connessi da un doppio legame e sono presenti in alcuni tipi di piante. Infine, i lignani sono fenoli la cui struttura base è costituita da dimeri fenilpropanoidi collegati dalle catene laterali.

Data la loro origine, i composti fenolici sono quindi già presenti nella nostra vita quotidiana essendo contenuti in piccole quantità all'interno di frutta e verdura. La loro assunzione sembra portare benefici nella prevenzione di malattie come il diabete, l'obesità o patologie cardiovascolari, neurodegenerative e osteoporotiche [9] in particolare grazie alle loro importanti proprietà anti-infiammatorie ed anti-ossidanti.

Il processo infiammatorio è un comune meccanismo di difesa dell'organismo contro un gran numero di minacce come infezioni, radiazioni, intossicazioni, esposizione ad allergeni o a corpi estranei. È importante sottolineare che un normale processo infiammatorio è fondamentale per la guarigione, ma può diventare dannoso se esso rimane prolungato nel tempo, andando a creare una situazione di infiammazione cronica. Nonostante esso dipenda in una certa misura dal tipo e dall'ubicazione dello stimolo esterno, può essere ricondotto ad una precisa struttura: in primo luogo, le cellule della parte di tessuto interessato riconoscono lo stimolo tramite i recettori posti sulla membrana, attivando le vie di segnalazione infiammatorie e rilasciando marker specifici nell'ambiente circostante. La presenza di specifici marker porta quindi al reclutamento delle cellule adibite alla neutralizzazione delle minacce [7]. I polifenoli sembrano interferire con questa catena di eventi, in particolare inibendo l'attività di enzimi associati ai processi infiammatori come la tirosin-chinasi e la serina/treonina protein-chinasi, responsabili del reclutamento dei linfociti B e della proliferazione delle cellule T, di alcuni fattori di trascrizione (per esempio

il NF-κB, regolatore della risposta immunitaria), della proteina attivatrice AP-1 e di diversi enzimi, tutti coinvolti nei processi infiammatori [8].

I polifenoli sembrano inoltre avere un ruolo importante nel contenimento di un altro processo strettamente legato agli stati di infiammazione, lo stress ossidativo. All'interno delle cellule vi è in condizioni normali un equilibrio delle specie chimiche ossidanti, come i radicali liberi e le specie reattive dell'ossigeno (ROS), che vengono eliminate da specifici enzimi in modo da mantenerne controllata la concentrazione. In caso di rottura di questo equilibrio, un aumento della quantità di queste specie reattive può portare al danneggiamento di proteine, componenti lipidiche e di altre importanti strutture cellulari con la conseguenza di poter incorrere in stati di infiammazione cronica e con un possibile sviluppo di patologie più gravi come problemi cardiovascolari, neurologici o anche alcuni tipi di diabete. I composti polifenolici hanno mostrato di poter ridurre gli effetti di un eventuale stato ossidativo in diversi modi: la loro particolare struttura, ricca di gruppi ossidrilici, permette a queste molecole di "ripulire" la cellula dagli agenti ossidanti attraverso la riduzione di specie altamente reattive. Inoltre, i polifenoli possono agire da "barriere" per i lipidi della membrana cellulari legandosi ai componenti idrofobici della stessa ed impedendo l'accesso agli ossidanti. Infine, essi sembrano anche agire come inibitori degli enzimi responsabili dell'ossidazione, come cicloossigenasi (COX) e lipossigenasi (LOX) [8].

Infine, i polifenoli sono visti con interesse per le loro capacità chelanti: essi sono infatti capaci di legare ioni metallici grazie alla presenza di gruppi ossidrili, carbonili e porzioni di catecoli, che formano siti di attacco preferenziali per gli ioni [34].

#### 3.2 Applicazioni

Ad oggi, i polifenoli sono visti con interesse per applicazioni in molti settori industriali (Fig.4). Attualmente, essi sono già utilizzati nell'industria agroalimentare: le loro proprietà antiossidanti ed antimicrobiche li rendono adatti come conservanti in alternativa ai composti sintetici, o come coloranti [6-9]. Nell'industria cosmetica, i fenoli sono utilizzati come additivi principalmente grazie alla loro capacità di assorbire la radiazione ultravioletta, dovuta alla presenza di gruppi cromofori, e alle loro capacità antiossidanti, che permettono di eliminare le specie reattive che possono intaccare proteine, come elastina e collagene, ed enzimi responsabili del mantenimento della pelle.

Nonostante questo, sono allo studio numerose possibili applicazioni di questi composti: per esempio, le proprietà biologiche di cui si è discusso in precedenza li rendono potenziali candidati per l'utilizzo in campo farmaceutico: alcuni studi hanno evidenziato come possano essere utilizzati per contenere l'evoluzione di patologie come il diabete, che sembra avere come precursori disturbi dovuti allo stress ossidativo. Inoltre, effetti cardioprotettivi come dilatazione dei vasi sanguigni, riduzione della pressione e controllo del livello di colesterolo [6] potrebbero portare all'uso dei composti fenolici nei trattamenti di disturbi cardiovascolari.

Un'altra possibile applicazione dei composti fenolici è la creazione di film bioattivi, utilizzabili anche per forme di packaging "intelligente": ad esempio, l'incorporazione di queste molecole all'interno della composizione degli imballaggi può permettere il loro graduale rilascio e il conseguente effetto antiossidante ed antimicrobico, oltre ad un miglioramento delle proprietà fisiche del rivestimento stesso. Oppure, è stato mostrato come il cambio di colore in relazione al pH di alcuni fenoli come gli antociani, appartenenti al gruppo dei flavonoidi, possa essere utilizzato per produrre film in grado di indicare il deterioramento dei cibi [6-9].

Nell'industria tessile, l'utilizzo di coloranti sintetici può non solo essere causa di reazioni allergiche, ma contribuisce anche all' inquinamento di cui questa filiera è responsabile. I fenoli potrebbero trovare posto in questo campo come coloranti naturali e altamente biodegradabili.

Infine, l'utilizzo dei fenoli in campo biomedico è un tema attualmente allo studio e di grande interesse. Le loro proprietà anti-ossidanti ed anti-infiammatorie, oltre al basso costo e all'elevata biocompatibilità, hanno generato un grande interesse nel loro utilizzo come rivestimenti per biomateriali. In particolare, diversi studi hanno evidenziato una interessante proprietà dei rivestimenti fenolici, ossia la loro capacità di proteggere i materiali metallici dalla corrosione causata dall'ambiente organico e rallentare il rate di degradazione. Le possibilità di questa applicazione verranno discusse nei paragrafi seguenti.

Nonostante le grandi possibilità di applicazione, prima di poter arrivare ad un utilizzo espansivo dei fenoli nell'industria bisognerà cercare di superare una serie di criticità. In primis, la quantità limitata di questi composti ricavabile dal mondo vegetale potrebbe impedire di avere la disponibilità di grandi quantità per l'uso estensivo nelle catene produttive. È necessario sottolineare che tipicamente i sottoprodotti che contengono quantità notevoli di polifenoli possono essere disponibili in grandi volumi, e che quindi un primo approccio potrebbe essere l'efficientamento dei processi di estrazione. Un ulteriore soluzione è data da metodi di produzione alternativi, oggi allo studio, che potrebbero permettere di ottenere dei maggiori volumi di polifenoli, come l'elicitazione o l'ingegneria metabolica. Il primo è un processo tramite il quale si cerca di aumentare la produzione dei prodotti metabolici secondari attraverso l'esposizione dei vegetali a delle condizioni di stress accentuato, come temperature estreme, riduzione dei nutrienti ed altre; l'ingegneria metabolica invece prevede l'utilizzo di microorganismi che producano direttamente i composti di interesse in una delle tappe del loro processo metabolico: in questo modo è inoltre possibile evitare processi di estrazione e di purificazione. Infine, come già suggerito, la possibilità di estrarre polifenoli dagli scarti di cibo e dai prodotti dell'industria agroalimentare permetterebbe di espandere ulteriormente le possibili fonti di approvigionamento [6].

Un ulteriore problema riguarda la stabilità dei composti fenolici: essi infatti sono estremamente sensibili a fattori esterni come luce e calore che possono comprometterne la struttura e causarne la degradazione con la conseguente perdita delle proprietà. In un'ottica di utilizzo estensivo, è quindi fondamentale disporre di adeguati sistemi di conservazione che permettano lo stoccaggio efficace di questi composti. Metodi di incapsulamento che utilizzano tecniche di spray drying e freeze drying sono attualmente allo studio [6].



Figura 4: Possibili applicazioni dei polifenoli [6].

#### 4. COATING IN POLIFENOLI DI LEGHE DI MAGNESIO

#### 4.1 Rivestimenti in campo biomedicale

Lo sviluppo delle tecniche di modifica superficiale ha aperto diverse strade alla possibilità di ottenere componenti e materiali resistenti all'utilizzo in condizioni sfavorevoli, in particolare attraverso la creazione di rivestimenti che possano isolare il componente dall'ambiente circostante [21]. Si possono distinguere tre principali classi di metodi di modifica superficiale: meccanici, chimici e fisici. Le tecniche meccaniche comprendono tutte quelle lavorazioni (lavorazione meccanica, fresatura, tornitura, ecc) che permettono di modificare la superficie attraverso l'utilizzo di utensili: si cerca in questo modo di ottenere una migliore integrità superficiale che porta di conseguenza ad una migliore resistenza alla degradazione. Esse necessitano però di macchinari appositi e portano ad una perdita di materiale. Le tecniche chimiche comprendono una serie di metodi che sfruttano una reazione chimica od elettrochimica per la formazione di uno strato di rivestimento sulla superficie: tra di esse ci sono i coating di conversione, l'ossidazione anodica o a micro-arco, l'elettrodeposizione, trattamenti sol-gel, ecc. Questa classe di metodologie consente una grande versatilità dovuta alla possibilità di utilizzare una grande varietà di materiali e di cambiare i parametri di processo a seconda della tipologia di modifica che si vuole ottenere, ma ci sono anche svantaggi come attrezzature non sempre economiche o l'utilizzo di reagenti tossici. Infine, le tecniche di modifica di tipo fisico comprendono una serie di metodologie anche avanzate come l'impianto di ioni, l'utilizzo di plasmi, deposizioni fisica da vapore, e altre.

Tra queste classi di tecniche alcuni tipi di modifiche chimiche, come il rivestimento con molecole organiche o la formazione di strati di conversione, permettono di utilizzare molecole organiche per la creazione di coating in modo economico e semplice, oltre al vantaggio di poter utilizzare dei composti biocompatibili e spesso senza l'utilizzo di apparecchiature costose o procedimenti complessi.

Come è stato già illustrato il principale problema delle leghe di magnesio è l'elevata velocità di corrosione in condizioni fisiologiche, fatto che ne limita fortemente l'uso in campo biomedico. Per questo, la ricerca negli ultimi anni ha cercato di sviluppare delle soluzioni che permettessero di regolare il rate di degrado di queste leghe, e l'applicazione di coating superficiali sembra sia una delle strategie maggiormente efficaci. L'utilizzo di rivestimenti ha infatti dei vantaggi significativi rispetto ad altri tipi di trattamenti. In primis essi permettono di non modificare l'intera massa di materiale dell'impianto preservando così le sue caratteristiche meccaniche e fisiche, aspetto di fondamentale importanza specialmente se l'impianto ha funzioni strutturali o deve sostenere carichi. Un secondo vantaggio è la possibilità di modificare la composizione e le caratteristiche del rivestimento in modo da adattarsi al meglio alla specifica applicazione: è infatti possibile utilizzare diverse tipologie di materiali, sia organici che inorganici, e scegliere tra diverse tecniche di modifica superficiale che permettono di ottenere coating con caratteristiche differenti.

Infine, l'applicazione di un rivestimento avviene solo alla fine del processo di produzione del dispositivo e può quindi essere applicato senza dover intervenire sulle fasi di costruzione precedenti.

In applicazioni biomedicali, un rivestimento deve avere una serie di caratteristiche:

- Deve essere aderente al substrato: in caso di mancata adesione si può verificare il fenomeno di delaminazione, ossia di rottura del coating e di allontanamento dalla superficie in caso di sollecitazioni. Questo si ottiene sia cercando di ottenere un forte legame tra le molecole e la superficie sia evitando di creare rivestimenti di spessore troppo elevato, che sono più suscettibili a questa evenienza.
- Biocompatibilità: il coating deve essere non tossico e biocompatibile.
- Può essere funzionalizzato per poter indurre una risposta specifica dell'ambiente circostante.

Partendo da queste proprietà, ogni rivestimento dovrebbe poi essere attentamente studiato in modo da avere delle specifiche caratteristiche in base al tipo di ambiente con cui deve interfacciarsi, alle sollecitazioni ed alla funzionalità.

#### 4.2 Rivestimenti polifenolici su superfici metalliche

L'utilizzo di rivestimenti per proteggere i materiali dalla degradazione è estremamente importante in ambito industriale. La corrosione ha infatti ripercussioni su qualunque tipo di applicazione che utilizzi materiali metallici, sia a livello economico che ambientale [22]: per esempio, un report [22] ha indicato come il costo annuale dei danni imputabili alla corrosione negli Stati Uniti sia pari a circa 276 miliardi di dollari, pari al 3.4 % del prodotto interno lordo annuale. Questo sta portando ad un generale interesse verso lo sviluppo di tecniche efficaci per il contenimento della degradazione dei materiali metallici, e la possibilità offerta dall'utilizzo di rivestimenti è una delle più promettenti grazie al mix di efficienza, economicità e versatilità. Il settore biomedico, seppur ancora ristretto, non è esente da questa necessità: come già accennato, i materiali metallici ad oggi ancora utilizzati in dispositivi da impianto possono soffrire di complicazioni legate alla corrosione, con il rischio ulteriore di poter creare delle situazioni pericolose per la salute del paziente. Per questo, la ricerca di soluzioni efficaci e sicure dal punto di vista biologico ha portato l'attenzione sui fenoli, che sembrano essere dei potenziali candidati all'uso come inibitori della corrosione. Diversi studi hanno infatti mostrato come questi composti abbiano mostrato un effetto benefico nella riduzione del rate di degradazione di vari tipi di metalli. Uno di questi studi [23] ha per esempio osservato questo risultato utilizzando composti fenolici estratti dai frutti della pianta P.ginseng tramite l'utilizzo di solventi. Questi estratti, composti da un gran numero di specie fenoliche, sono stati inseriti in soluzioni di HCL con un range di concentrazione tra 100 e 1000 ppm. In queste soluzioni sono stati poi immersi

dei campioni di rame per 3 ore a temperatura ambiente ed è stata poi valutata la variazione di peso come indice di efficienza dell'inibizione della corrosione (IE%). I risultati hanno mostrato come all'aumentare della concentrazione degli estratti nella soluzione il peso dei campioni abbia subito minori variazioni, con un'efficienza di inibizione pari ad un massimo del 96% nel caso di 1000 ppm. Valutazioni morfologiche tramite FESEM (Fig.7) hanno poi confermato questa conclusione, mostrando come in assenza di inibitori siano avvenuti fenomeni di corrosione superficiali come vaiolature ed altri danni.





Questo comportamento è probabilmente dovuto alla formazione di un layer di composti fenolici sulla superficie del metallo attraverso l'interazione chimica tra i gruppi funzionali delle molecole organiche e siti catodici ed anodici disponibili della superficie: la presenza di questo strato ha agito in parte come barriera fisica contro la diffusione delle specie corrosive, ed in parte la saturazione dei legami chimici superficiali ha ulteriormente rallentato la reazione con l'ambiente circostante. Infine, gli estratti hanno mostrato forti proprietà anti-ossidanti avendo esercitato un'azione di "pulizia" sul monossido di azoto, un radicale libero, tramite riduzione.

Risultati simili sono stati raggiunti anche da un altro studio [24] in cui sono state studiate le proprietà degli estratti di *Amni visnaga*, ottenuti mediante utilizzo di diversi tipi di solventi. In particolare, sono stati effettuati test di polarizzazione potenziodinamica su elettrodi di acciaio dolce utilizzando una soluzione di HCl in cui sono stati inseriti, a diverse concentrazioni, gli estratti che avevano mostrato un maggior contenuto di componenti fenolici, in particolare flavonoidi e tannini. È stata valutata poi l'efficienza di inibizione in base alla variazione della densità di corrente di polarizzazione misurata dal test, rispetto alle condizioni di assenza dei composti nella soluzione. I risultati hanno mostrato come l'aumento della concentrazione degli estratti rallenti le reazioni di degradazione, abbassando la densità di corrente tra elettrolita e metallo e aumentando l'efficienza di inibizione in modo significativo. Anche in questo caso, questo comportamento è

probabilmente dovuto all'adsorbimento delle molecole fenoliche sulla superficie del metallo con la conseguente formazione di un rivestimento superficiale.

Oltre alle loro capacità anti-corrosive ed anti-ossidanti, è importante notare come rivestimenti con composti fenolici sono sviluppabili anche su metalli di interesse biomedico: campioni di titanio puro, metallo ampiamente utilizzato per impianti protesici, sono stati sottoposti a rivestimenti di timolo, a scopi antibatterici, [25] o con acido tannico [26] tramite dei semplici trattamenti di immersione in soluzione, mostrando così anche la relativa semplicità con cui questi coating possono essere ottenuti. Layer di polifenoli sono stati ottenuti anche su acciaio inossidabile con metodi di polimerizzazione tramite irraggiamento UV [27] e hanno mostrato effetti benefici sulla bioattività del substrato grazie all'aumento della rugosità e della bagnabilità della superficie, aspetti che potrebbero favorire l'adesione e l'attività cellulare o l'adsorbimento di proteine.

#### 4.3 Rivestimenti polifenolici su leghe di magnesio

Per quanto riguarda le leghe di magnesio, l'utilizzo dei polifenoli come rivestimento è abbastanza recente. Non sono molti gli studi compiuti in tale direzione, ma essi sembrano essere principalmente concordi nel riconoscere gli effetti benefici di un coating organico sulla riduzione del rate di degradazione del metallo, oltre che sulla proliferazione di determinati tipi cellulari e sulle caratteristiche anti-infiammatorie. Nel corso di questo paragrafo, verranno mostrati i risultati di alcuni di questi studi.

Bo Zhang et al. [10] hanno utilizzato uno dei maggiori componenti funzionali dei polifenoli del tè verde, l'epigallocatechina gallato (EGCG), creando un layer di conversione sulla superficie di campioni in lega AZ31. Un layer di conversione consiste in uno strato originato da una reazione chimica od elettrochimica con il metallo della superficie, ed è tipicamente caratterizzato da uno spessore ridotto: in questo caso, è stato prodotto dalla reazione tra il magnesio e EGCG con la formazione di complessi metallo-polifenolo. Sono stati prodotti due diversi tipi di campioni, alcuni tramite incubazione in una soluzione acquosa contenente EGCG ed altri in una contenente EGCG e MgSO4. Tutti i campioni sono stati trattati con un approccio layer-by-layer, con 5 cicli di risciaquo e ri-immersione. I campioni immersi in EGCG/Mg hanno mostrato il formarsi di uno strato omogeneo e privo di difetti, differentemente dal caso dei campioni AZ31-EGCG in cui il rivestimento presentava anche delle crepe probabilmente causate dal rilascio di idrogeno gassoso durante il processo di conversione (Fig.8)



*Figura 8*: sopra, immagini al SEM della superficie dei campioni di controllo e rivestiti. Sotto, analisi al microscopio a forza atomica.

Attraverso test di corrosione, i ricercatori hanno dimostrato come la presenza del coating abbia migliorato la resistenza alla degradazione dei campioni trattati rispetto a quelli in lega non trattata. Lo studio attraverso polarizzazione potenziodinamica ha mostrato come la densità di corrente di corrosione (i<sub>corr</sub>) di AZ31-EGCG e AZ31-EGCG/Mg sia molto inferiore al valore di 16.2  $\mu$ A/cm<sup>2</sup> misurato per la lega AZ31, con rispettivamente 0.684  $\mu$ A/cm<sup>2</sup> e 0.104  $\mu$ A/cm<sup>2</sup>, indicando quindi una effettiva azione di protezione. Inoltre, test di degradazione in vitro hanno mostrato l'evoluzione del rilascio di idrogeno e del pH della soluzione durante prove di immersione in una soluzione SBF a 37 C° per 240 ore: la minor quantità di H<sub>2</sub> prodotta dai campioni rivestiti e la stabilizzazione del pH a causa del minor rilascio dei prodotti di degrado hanno confermato ulteriormente il rallentamento del processo di corrosione (Fig.9).





**Figura 9**: In alto a sinistra, il rilascio di idrogeno dei campioni durante l'immersione di 240 ore. A destra, i livelli di pH. Sotto, immagini al SEM della superficie dei campioni dopo l'immersione: si nota come il coating AZ31-EGCG/Mg abbia mantenuto una certa omogeneità, indicando una maggiore resistenza a corrosione anche rispetto al solo rivestimento con EGCG.

Infine, sono stati effettuai test di citocompatibilità con cellule endoteliali (ECs) e cellule muscolari lisce (SMCs) coltivate sui campioni trattati. I risultati hanno evidenziato come i coating di EGCG e EGCG/Mg sembra abbiano una tendenza ad incentivare la vitalità e la proliferazione delle ECs rispetto alla lega pura. Oltre a ciò, non vi erano segni di una crescita eccessiva delle SMCs sulle superfici trattate. Questo comportamento potrebbe essere un vantaggio in future applicazioni vascolari come il coating di stent, in quanto uno degli obiettivi principali di questi dispositivi è di evitare la restenosi causata dall'eccessiva proliferazione delle SMCs sulle pareti del lume e di ottenere invece una reendotelizzazione.

L'EGCG è stato utilizzato in maniera simile da Hao Zhang et al. [17] per creare uno strato di conversione su substrati in lega MgZnMn, incubando i campioni in soluzioni di Tris buffer (pH=8.5) con un rapporto superficie/volume di 0.08 cm<sup>2</sup>/mL e con diverse concentrazioni del polifenolo, in particolare 0.1 mg/mL, 0.5 mg/mL e 2.5 mg/mL.



Figura 10: immagini SEM della superficie dei substrati rivestiti.

Dal punto di vista morfologico, si può vedere (Fig.10) che in tutti e tre i casi si sia formato uno strato di conversione MgZnMn-EGCG, con la presenza di alcune crepe superficiali all'aumentare della concentrazione dovute forse al processo di asciugatura o all'idrogeno formatosi durante il processo di conversione. Per quanto riguarda la resistenza a corrosione, test di polarizzazione potenziodinamica hanno evidenziato come la presenza del coating aumenti il potenziale di corrosione da -1.59 V a, rispettivamente, -1.17 V, -1.22 V e -1.33 V, indicando una minor tendenza alla degradazione. Ciò è confermato anche dai successivi test di immersione in PBS dove la presenza di EGCG sembra migliorare la resistenza a corrosione grazie alla formazione di cristalli che ricoprono la superficie del campione in modo maggiormente omogeneo all'aumentare della concentrazione del fenolo (Fig. 11). Inoltre, l'analisi del pH della soluzione all'aumentare del tempo di immersione conferma la degradazione accelerata del controllo rispetto ai campioni rivestiti.



*Figura 11*: Sopra, le immagini al SEM della superficie dei campioni dopo 300 h di immersione in PBS. Sotto, la variazione di pH delle soluzioni.

Un altro gruppo di ricerca si è invece concentrato sulla possibile applicazione in ambito ortopedico [11], valutando l'utilizzo di acido tannico (TA) per creare un rivestimento sulla superficie di campioni in lega di magnesio/zinco. In particolare, sono stati preparati diversi campioni immergendoli prima in NaOH in modo da creare uno nanofilm superficiale di ossido di magnesio e, in seguito, in una soluzione contenente ioni Mg<sup>2+</sup> in diverse concentrazioni e acido tannico. Quest'ultimo passaggio, ripetuto due volte, ha portato alla creazione di un network superficiale di complessi Mg/TA, con uno spessore ed omogeneità maggiori con il crescere della concentrazione degli ioni magnesio nella soluzione (Fig.12).



*Figura 12*: (a) immagini SEM della superficie dei campioni dopo l'immersione in NaOH e alla fine del processo di rivestimento. (b) Immagini della sezione trasversale dei campioni.

Anche in questo caso, un'analisi di corrosione tramite polarizzazione potenziodinamica ha evidenziato un netto calo del valore di densità di corrente di corrosione (da 5.616  $\mu$ A/cm<sup>2</sup> del controllo scendendo costantemente fino al 1.191  $\mu$ A/cm<sup>2</sup> del 3.6%Mg@TA) con l'aggiunta di un aumento del potenziale di corrosione (da -1.896 V a -1.561 V). Sono poi state effettuate prove di corrosione tramite immersione in PBS a 37 C° e sono stati osservati il rilascio di Mg, la formazione di idrogeno gassoso e la variazione di pH. Dopo 21 giorni di incubazione, i risultati hanno dimostrato come gli strati ottenuti abbiano effettivamente diminuito il rate di degradazione rispetto ai campioni non trattati: oltre ad una diminuzione nel rilascio di magnesio è stata osservata anche la formazione di una minor quantità di H<sub>2</sub> (Fig.13).



*Figura 13*: Andamenti nel tempo della concentrazione di magnesio in soluzione, della formazione di idrogeno gassoso e del pH.

Infine, test di citocompatibilità e l'osservazione della morfologia di cellule murine MC3TC-E1, progenitrici degli osteoblasti, hanno mostrato come dopo 24 ore di coltura i substrati, specialmente quelli ottenuti con 2.4%Mg@TA 3.6%Mg@TA, abbiano incentivato l'adesione e la proliferazione cellulare. Questo sembra indicare una particolare affinità con le cellule ossee e quindi una possibile osteocompatibilità (Fig.14)



*Figura 14*: immagini al SEM di cellule MC3TC-E1 sulla superficie dei campioni dopo 1 e 3 giorni di incubazione. È possibile notare lo spreading cellulare, indice di un'elevata attività.

Risultati simili sono stati ottenuti anche da Xiaoming Chen et al. [16], che hanno utilizzato l'acido tannico per creare uno strato di conversione tramite immersione in soluzione di campioni di lega AZ91D. In particolare, i ricercatori hanno osservato la morfologia del coating risultante tramite SEM per tempi di immersione che variavano tra 50 e 720 secondi: è risultato che sui substrati trattati per tempi compresi tra i 300 e 600 secondi si siano formati coating abbastanza spessi (1.1-1.6  $\mu$ m) ed omogenei, mentre per tempi di trattamento inferiori si sono ottenuti rivestimenti troppo sottili. Per tempi superiori invece, il coating è risultato più spesso ma molto disomogeneo (Fig.15).



Figura 15: A) substrato non trattato, B) 50 s, C) 70 s, D) 120 s, E) 300 s, F) 600 s, G) 720 s.

L'efficacia del coating nel proteggere il substrato dalla corrosione ha confermato le osservazioni morfologiche: valutando il potenziale di corrosione ( $E_{corr}$ ) e la densità di corrente di corrosione ( $i_{corr}$ ) tramite polarizzazione elettrochimica è stato notato come per tempi di trattamento compresi tra i 300 e 600 secondi lo strato di conversione faccia aumentare  $E_{corr}$  da -1.32 V della lega pura fino a circa -0.5 V, mentre  $i_{corr}$  diminuisca da 14.6  $\mu$ A/cm<sup>2</sup> a circa 2-3  $\mu$ A/cm<sup>2</sup>. Allo stesso tempo, trattamenti sotto i 120 secondi non hanno portato a variazioni significative dei valori di  $E_{corr}$  e  $i_{corr}$  rispetto alla lega di partenza, mentre per tempi di immersione di 720 s i valori passano a -0.68 V e 4.58  $\mu$ A/cm<sup>2</sup>, indicando una maggiore tendenza alla degradazione (Fig.16). Questi risultati mostrano come lo spessore del coating non sia l'unico aspetto di fondamentale importanza per una protezione efficace dalla degradazione, in quanto uno strato spesso ma disomogeneo può compromettere la sua funzionalità a causa probabilmente della presenza di siti particolarmente suscettibili all'attacco delle specie corrosive.

Samples	Corrosion potential vs. SCE, E <sub>corr</sub> /V	Corrosion current density, $i_{\rm corr}/\mu{\rm A~cm^{-2}}$
AZ91D alloy substrate (a)	-1.43	927
Sample treated for 50 s (b)	-1.36	8.40
Sample treated for 70 s (c)	-1.27	3.75
Sample treated for 120 s (d)	-1.32	14.6
Sample treated for 300 s (e)	-0.53	2.55
Sample treated for 600 s (f)	-0.48	2.16
Sample treated for 720 s (g)	-0.68	4.58

*Figura 16*: valori del potenziale di corrosione e della densità di corrente di corrosione al variare del tempo di immersione.

Si Chen et al. [12] hanno sviluppato un rivestimento di esametilen-diammina (HD) e acido gallico (GA) su una superficie di lega MZM. Anche in questo caso, l'obiettivo era produrre uno strato di conversione incubando i campioni in una soluzione contenente GA e HD a differenti rapporti di peso a 37 C° per 6 ore. L'aggiunta dell'HD in particolare ha fatto sì che il rivestimento abbia inoltre mostrato la presenza di tre principali gruppi funzionali, ossia gruppi carbossilici (-COOH), amminici (-NH<sub>2</sub>) e gruppi chinone, utili per immobilizzare biomolecole sulla superficie dell'impianto (Fig.17).



Figura 17: schema dello strato di conversione ottenuto.

Tramite analisi di polarizzazione potenziodinamica, sono stati ricavati i valori dei potenziali di corrosione e di densità di corrente di corrosione dei vari substrati: sia i valori di E<sub>corr</sub> che di i<sub>corr</sub> sono risultati più bassi rispetto a quelli della lega di partenza, indicando un effetto di protezione. Anche i test di immersione in PBS hanno portato alle stesse conclusioni, con i campioni rivestiti che hanno mostrato un minor rilascio di magnesio e una minor perdita di peso dopo 30 giorni.

È stata infine valutata la degradazione in vivo di questi campioni, impiantandoli sottopelle nella schiena di topi: estratti a vari intervalli di tempo (10,20 e 40 giorni) essi hanno confermato come il rivestimento in GAHD sia stato efficace nel contenere la corrosione della lega, ed in particolar modo rispetto alla formazione di buchi o cavità a causa della corrosione per vaiolatura.

Mentre i gruppi presentati fino ad ora hanno utilizzato unicamente semplici tecniche di immersione per ricoprire i campioni, Hung-Pang Lee et al. [13] hanno utilizzato una tecnica al plasma, l'ossidazione a micro-arco (MAO), come pre-trattamento per creare uno strato di ossido poroso con l'esposizione di gruppi ossidrili -OH: la formazione di questo rivestimento intermedio aumenta l'area superficiale su cui poter aggraffare l'acido gallico (GA) utilizzando i gruppi funzionali esposti. In particolare, i campioni di lega ZK60, dopo essere stati trattati attraverso MAO, sono stati immersi in una soluzione contenente GA per 24 ore, con la formazione di uno strato di circa 10 nanometri di spessore (Fig.18)



*Figura 18*: a sinistra, la superficie della lega ZK60 dopo la MAO; a destra, dopo MAO e immersione in GA. La differenza è minima a causa del ridotto spessore del coating in GA.

Anche in questo caso, si è osservata una riduzione della tendenza a corrosione della lega: in particolare, nel caso di superfici trattate unicamente con MAO si è osservata una riduzione dei potenziali di corrosione (da -1.564 V della lega non trattata a -1.485 V) e della densità di corrente (da 9.6025  $\mu$ A/cm<sup>2</sup> a 0.583  $\mu$ A/cm<sup>2</sup>). Nel caso invece delle superfici MAO-GA, si passa a -1.453 V e 0.372  $\mu$ A/cm<sup>2</sup>, valori che indicano un'aumentata resistenza alla corrosione. Inoltre, il gruppo di ricerca ha osservato come, mentre i rivestimenti in sola MAO hanno mostrato comunque una certa sensibilità ai fenomeni di corrosione in fessura a causa della presenza di pori, i campioni MAO-GA non abbiano presentato questo problema: anche in questo caso, sembrerebbe che il coating in GA permetta di agire non solo sulla corrosione generalizzata dell'impianto ma in particolare sulla riduzione dell'effetto della corrosione in fessura.

Sono stati effettuati dei test biologici per ottenere informazioni sull'interazione tra GA e cellule. Test di vitalità cellulare hanno evidenziato come in soluzioni a basse concentrazioni di GA (circa 0.0025 g/L e inferiori) non siano stati osservati problemi per cellule di tipo osteoblastico, mentre è stata notata una soppressione della crescita di linee fibroblastiche. Per quanto riguarda la citotossicità i risultati sono stati simili, con gli estratti delle superfici MAO-GA che sembra abbiano stimolato la crescita delle cellule osteoblastiche e diminuito la crescita di quelle fibroblastiche: questi effetti sembrano essere legati alla presenza nella soluzione di ioni Mg, che hanno effetti benefici sul metabolismo degli osteoblasti, e di GA rispettivamente (Fig.19).



*Figura 19*: a sinistra, la vitalità cellulare di linee simil-osteoblastiche (MG63) e fibroblastiche (NIH-3T3) in funzione della concentrazione di GA in soluzione. A destra, valutazione della citocompatibilità su NIH-3T3 (a) e MG63 (b).

Un'ulteriore conferma è stata data dal risultato dei test di adesione cellulare, in cui le cellule osteoblastiche hanno mostrato un'elevata affinità con le superfici MAO e MAO-GA rispetto alla superficie non trattata, al contrario dei fibroblasti che non hanno aderito in modo efficace. Questi risultati sono estremamente interessanti: oltre alla normale proprietà antinfiammatoria espressa dai polifenoli e al miglioramento della resistenza alla corrosione in seguito alla formazione del rivestimento, l'inibizione della proliferazione fibroblastica può essere estremamente vantaggiosa in applicazioni ortopediche in quanto evitare la formazione di una capsula fibrotica spessa attorno all'impianto è di

fondamentale importanza per evitarne il fallimento e permettere una buona osteointegrazione.

L'affinità con le cellule ossee, oltre alle proprietà anti-corrosione, è stata verificata da un altro studio condotto da Hao Zhang et al. [14] su campioni in lega MgMzMn. I ricercatori si sono concentrati sullo sviluppo di una tecnica di coating basata sull'immersione alternata in soluzioni contenenti EGCG e polietileninima (PEI): l'immersione in EGCG ha portato alla creazione di uno strato di complessi Mg-EGCG sulla superficie del campione mentre la successiva immersione in PEI ha fatto sì che questa reagisse con il fenolo, cross-linkando le catene e stabilizzando lo strato, migliorandone le caratteristiche di rivestimento. Questo processo è stato ripetuto per 1,3,5,7 e 9 strati.

Anche in questo caso, l'effetto positivo sulla resistenza a corrosione è stato verificato: tramite spettroscopia dielettrica (EIS) si è verificato che i tutti i campioni rivestiti hanno mostrato un'impedenza maggiore rispetto a quelli non trattati, e analisi di polarizzazione potenziodinamica (PDP) hanno confermato questo aspetto con l'aumento del potenziale di corrosione da -1.33 V della lega normale ai -1.23 del rivestimento a 7 layer, con un incremento graduale all'aumentare del numero di strati.



*Figura 20*: il metodo di rivestimento a più immersioni utilizzato nello studio.

Come sottolineato all'inizio anche in questo studio è stato confermato l'affinità con le cellule osteoblastiche, dato che test di citocompatibilità eseguiti coltivando osteoblasti murini sia in contatto diretto che indiretto con i campioni hanno mostrato una tendenza all'adesione ed allo "stretching" cellulare, segno di elevata vitalità e attivazione (Fig.21).



*Figura 21*: test di citocompatibilità su osteoblasti murini. (a) Fluorescenza e SEM delle cellule aderenti ai campioni per 1 giorno. (b) cellule coltivate in contatto indiretto. (c) Numero di cellule sui campioni e (d) sul vetrino.

Inoltre, è stata valutata anche la citocompatibilità per i macrofagi (MA), cellule che hanno un ruolo primario del processo infiammatorio. È stato evidenziato che su campioni non trattati i macrofagi siano risultati attivi, come suggerito dall'evidente spreading (Fig.22), anche attraverso l'osservazione del rilascio di specifici fattori infiammatori come il TNF-a e l'IL-6: questo è probabilmente dovuto al rilascio di prodotti di degrado e nell'alcalinizzazione locale. Nei campioni trattati invece, i MA sembrano essere inattivi grazie all'ambiente più stabile e all'azione anti-infiammatoria dell'EGCG, aspetto confermato anche dalla notevole riduzione della concentrazione di fattori infiammatori.

Infine, è stata comparata la vitalità e la proliferazione a diretto contatto con i campioni, oltre ad osteoblasti e MA, anche di cellule endoteliali (ECs) e muscolari lisce (SMCs). I risultati sono simili a quelli già ottenuti in studi già presentati [10,13]: il coating con polifenoli sembra favorire la crescita di osteoblasti e ECs inibendo invece la proliferazione delle SMCs (Fig.23)


*Figura 22*: test di citocompatibilità su macrofagi. (a) Fluorescenza e SEM delle cellule aderenti ai campioni per 1 giorno. (b) cellule coltivate in contatto indiretto. (c) Numero di cellule sui campioni e (d) sul vetrino.



Figura 23: test di vitalità dei vari tipi cellulari a contatto con i campioni.

Uno studio di M.Bertuola et al. [15] ha mostrato un'ulteriore interessante proprietà dei rivestimenti in polifenoli, ossia la capacità di prevenire la formazione di biofilm batterici sulla superficie. I biofilm sono aggregazioni di batteri che formano una matrice dalle caratteristiche protettive ed adesive, che permette ai microorganismi di sopravvivere anche a trattamenti con farmaci e proliferare in modo indisturbato. I biofilm possono essere responsabili, anche a causa della loro capacità di "rompersi" e migrare, del fallimento di impianti e dispositivi medici ed è quindi di fondamentale importanza prevenire la contaminazione della superficie con specie batteriche che possano portare alla loro formazione.

In questo lavoro, i ricercatori hanno utilizzato dei campioni in lega di magnesio AZ31 su cui sono stati creati dei layer di polimerici a partire dal timolo (TOH) tramite elettropolimerizzazione. Poi, sono state preparate delle colture batteriche di *Staphylococcus aureus* in seguito disseminate sui vari substrati per effettuare dei test microbiologici di distribuzione e proliferazione batterica. In particolare, mentre sui campioni di AZ31 i microrganismi hanno aderito, in particolare sui prodotti di degradazione, sui substrati trattati di AZ31-poliTOH la fluorescenza ha mostrato che il numero di batteri fosse inferiore (Fig.24).



*Figura 24*: epifluorescenza dopo l'esposizione dei campioni alle colture batteriche. È stato utilizzato un campione di titanio come ulteriore controllo.

Per valutare la risposta alla degradazione, i campioni sono stati sottoposti a test elettrochimici in una soluzione contente cloruri. I risultati hanno mostrato una leggera diminuzione del potenziale di corrosione da circa -1.67 V della lega pura a -1.72 V per i campioni AZ31-poliTOH, ma con una significativa riduzione della densità di corrente di corrosione da 96.90  $\mu$ A/cm<sup>2</sup> a 6.74  $\mu$ A/cm<sup>2</sup>, indicando come il rivestimento abbia effettivamente protetto il metallo sottostante. La leggera diminuzione del potenziale, spiegano gli autori, potrebbe essere dovuta alla formazione di un film di idrossido durante l'immersione per l'elettropolimerizzazione. Le immagini al SEM hanno confermato i dati, mostrando una superficie omogenea anche dopo i test effettuati: è stato osservato qualche sito isolato in cui invece la corrosione è avvenuta probabilmente a causa di disomogeneità nel rivestimento, con la conseguente liberazione di idrogeno gassoso che ha danneggiato il rivestimento sovrastante (Fig.25).



*Figura 25*: A) superficie non corrosa di AZ31-poliTOH. B) sito in cui è iniziato il processo di corrosione. Entrambe lo immagini sono corredate con l'analisi EDS della superficie.

Nella Tab.4 sono riassunti i materiali, le condizioni di funzionalizzazione e le tecniche di analisi utilizzate negli studi appena presentati.

Riferimento	Substrato	Polifenoli (tipo,	Condizioni di	Caratterizzazioni
	(tipo e	concentrazione,	rivestimento	
	preparazione)	soluzione)		
[10]	Lega di magnesio AZ31 (2.89 wt % Al, 0.92 wt % Zn)	epigallocatechina gallato (EGCG) 2 tipi di soluzioni acquose (pH ~ 6.5): -0.4 mg/mL EGCG -mix of 0.8 mg/mL EGCG e 1.6 mg/mL MgSO	LbL: immersione ed incubazione per 15 minuti a 80°C. Risciaquo tramite ultrasuoni in etanolo. Ripetuto 5 volte.	Morfologia: FEG, SEM, AFM. Chimica: EDS, spettroscopia fotoelettronica a raggi X, ATR-IR, angolo di contatto. Corrosione (in PBS): spettroscopia dielettrica (da 10 <sup>-1</sup> a 10 <sup>5</sup> Hz, segnale sinusoidale a 20 mV), polarizzazione potenziodinamica (scanning rate 1 mV/s, da -2 a -1 V), degradazione in vitro tramite immersione in in SBF (pH=7.4, 37 C°).
[11]	Billette di lega Mg- 2.8% Zn, macchinate e lucidate con fogli SiC. Lavaggio ad ultrasuoni in acetone/etanolo. Risciaquo in acqua dionizzata.	Acido tannico. NaOH soluzione (pH=10) con acido tannico (1 mg/mL) e MgCl2 in differenti concentrazioni.	Dip-coating (immersione per 30 minuti), in seguito 3 lavaggi con NaOH. Ripetuto 2 volte in soluzione rinnovata.	Morfologia: SEM. Chimica: AFM, XPS, angolo di contatto. Corrosione: EIS in PBS (200 KHz a 100 mHz, segnale sinusoidale a 10 mV), polarizzazione potenziodinamica (scanning rate 1 mV/s), immersione in PBS (pH=7.4, 3 settimane a 37 C°).
[13]	Cilindri di lega ZK60, lucidati con fogli di SiC. Lavaggio ad ultrasuoni in etanolo. Risciaquo in acqua deionizzata.	Acido gallico. Soluzione di etanolo con 5 g/L di acido gallico.	Immersione nella soluzione per 24 ore, risciacquo con acqua distillata ed etanolo (Grafting sulla superfice di magnesio pre-ossidata tramite ossidazione a microarco)	Morfologia: SEM, EDS, TF-XRD, XPS. Corrosione: polarizzazione con cella elettrochimica (scanning rate 1 mV/s da -1.8 V a -0.8 ) in SBF.
[14]	Dischi di MZM (1 wt% Zn, 0.2 % wt Mn) lucidati con fogli SiC. Lavaggio ad ultrasuoni in acetone/etanolo	Epigallocatechina gallato (EGCG) Due soluzioni (EGCG e PEI) tramite dissoluzione di 1 mg/mL di EGCG e PEI in Tris buffer	LbL: immersione in soluzione di ECGC (30 minuti a 37°C), risciacquo, immersione in soluzione PEI (30 minuti a 37°C). Ripetuto diverse volte.	Morfologia: FESEM, XRS. Chimica: FTIR, XPS. Resistenza legame del coating: cross- cut tape test. Corrosione (in PBS): polarizzazione potenziodinamica (scanning rate 1 mV/s da -2 V a -1 V), spettroscopia dielettrica (da 10 <sup>5</sup> a 10 <sup>-2</sup> Hz, segnale sinusoidale a 20 mV)
[12]	Campioni di lega MZM (1% wt Zn, 0.2% Mn)	Acido gallico Soluzione GA e HD (esametilendiammina) in rapporto di peso 1:3, 1:1, 1:0.5.	Immersione in soluzione e incubazione a 37°C per 6 ore.	Morfologia: SEM. Chimica: FTIR, XPS. Corrosione: polarizzazione potenziodinamica in soluzione PBS (scanning rate 1 mV/s da -2 V a -1 V), spettroscopia dielettrica (200 KHz a 100 mHz, segnale sinusoidale a 10 mV), immersione in soluzione PBS (massimo 30 giorni).
[15]	Campioni di lega magnesio AZ31	Timolo Soluzione elettrolita: 0.1 M TOH in acqua/etanolo (70:30) con 0.5 M di salicilato di sodio	Elettropolimerizzazione su elettrodi di AZ31 immersi nell'elettrolita. Voltammetria tra -0.5 V e 1.5 V per 5 cicli successivi (rate 50 mV/s)	Morfologia: SEM ed EDS. Chimica: ATR-FTIR Corrosione: polarizzazione anodica (scanning rate 1 mV/s da -1.8 V a 1.1 V).

[16]	Campioni di lega magnesio AZ91D, lucidati e sgrassati in 10% KOH. Risciacquo in acqua deionizzata.	Acido tannico Soluzione di conversione: Na2B7O4 (5 g/L), NH4VO3 (1 g/L), K2ZrF6 (1.1 g/L), Na3PO4 (1 g/L), acido tannico (0.8 g/L)	Immersione nella soluzione a temperatura ambiente per differenti intervalli di tempo.	Morfologia: SEM. Chimica: XPS, IR. Corrosione (soluzione acquosa 3 wt% NaCl) in cella elettrochimica: sweep potenziodinamico (scanning rate 50 mV/min), spettroscopia dielettrica (10 <sup>-1</sup> a 10 <sup>6</sup> Hz, ampiezza segnale 10 mV)
[17]	Dischi di lega MgZnMn lucidati con fogli di SiC, lavaggio ad ultrasuoni con acetone, etanolo e acqua distillata.	EGCG Dissoluzione in Tris buffer (pH=8.5) a concentrazioni di 0.1 mg/mL, 0.5 mg/mL e 2.5 mg/mL	Immersione nella soluzione e incubazione a 22 C° per 12 ore.	Morfologia: FESEM. Chimica: FTIR, XPS. Corrosione: polarizzazione potenziodinamica in soluzione PBS (scanning rate 1 mV/s da -2 V a -1 V), spettroscopia dielettrica (10 <sup>-1</sup> a 10 <sup>5</sup> Hz, ampiezza segnale 20 mV)

Tabella 4: riassunto dei lavori svolti negli studi presentati in questo paragrafo.

## 5. COATING DI CAMPIONI DI LEGA DI MAGNESIO AZ91 CON ACIDO TANNICO

## 5.1 Materiali e metodi

## 5.1.1 Materiali

I campioni per lo studio sono stati ricavati da componenti tridimensionali in lega AZ91 (Tab.5) prodotti al Dipartimento di Ingegneria degli Elementi Leggeri, Fonderia e Automazione dell'Università di Scienza e Tecnologia di Breslavia, Polonia. Attraverso un processo di investment casting, sono stati ottenuti componenti a celle esagonali di dimensioni 30x20.4 mm, con uno spessore di bordo di 0.6 mm (Fig.26 A).

Dopo aver ricevuto queste strutture, sono stati ottenuti campioni planari di dimensione ridotta a partire dalle superfici più esterne dei componenti tridimensionali come mostrato in Fig.26 B. Questi campioni, di dimensioni di circa 5.1x3.4 mm e con una superficie totale media di 51 mm<sup>2</sup>, sono stati poi utilizzati per la funzionalizzazione e per i test di caratterizzazione e degrado.



*Figura 26*: A) in alto a sinistra, componenti tridimensionali in lega AZ91. B) in alto a destra, i campioni ottenuti tagliando le superfici esterne. Sotto, dimensioni delle strutture in millimetri.

Ogni campione è stato lavato prima tramite immersione in etanolo e poi in acqua ultrapura, in entrambi i casi con trattamento ad ultrasuoni per 5 minuti. In seguito, i campioni sono stati fatti asciugare per 10 minuti. Come polifenolo, è stato utilizzato acido tannico 403040-100G (C<sub>76</sub>H<sub>52</sub>O<sub>46</sub>) prodotto da Sigma-Aldrich Chemical Co.. Per le soluzioni di funzionalizzazione e di degrado è stato utilizzato un tampone fosfato (PBS) preparato sciogliendo una pastiglia di PBS (79382-50TAB, Sigma-Aldrich Chemical Co.) in 200 mL di acqua ultrapura (0.01 M buffer fosfato, 0.0027 M KCl, 0.137 M NaCl, pH=7.4 a 25 C°).

Lega di magnesio AZ91								
Elemento	Al	Zn	Mn	Si	Си	Ni	Fe	Mg
%wt	8.3-9.7	0.35-1.0	0.15-0.5	0.01	0.03	0.002	0.005	restante

Tabella 5: composizione tipica delle leghe AZ91 [40].

# 5.1.2 Funzionalizzazione con acido tannico (TA)

Il primo obiettivo del lavoro sperimentale è stato quello di individuare le migliori condizioni di funzionalizzazione, in modo da ottenere un coating omogeneo. Per i campioni planari sono state preparate due differenti soluzioni contenenti acido tannico, una a base di PBS (PBS/TA) ed una di acqua ultrapura (H<sub>2</sub>O/TA). Ad entrambe è stata aggiunto acido tannico in polvere in concentrazione 5 mg/mL, dopodiché le soluzioni sono state mescolate tramite agitazione magnetica per 1 ora a 200 rpm. La scelta di utilizzare due diversi tipi di soluzioni deriva dal fatto che si è voluta testare l'efficacia della funzionalizzazione a due pH diversi, uno acido (H<sub>2</sub>O/TA, pH=3.55) e uno più vicino al valore neutro (PBS/TA, pH=6.14).

In seguito, sono stati valutati diversi tempi di funzionalizzazione, in particolare 15 minuti, 30 minuti, 1 ora e 3 ore. Per ogni intervallo temporale sono stati immersi due campioni planari, uno in 5 mL di soluzione PBS/TA e uno in 5 mL di H<sub>2</sub>O/TA, e successivamente incubati a 37 C°. Sono stati inoltre valutati, in soluzione H<sub>2</sub>O/TA ottenuta in modo analogo e nelle stesse condizioni di incubazione, anche delle funzionalizzazioni per immersione a 2 ore e 3 ore con ricambio della soluzione ogni ora e una funzionalizzazione continua per 24 ore.

Una volta selezionate le condizioni di funzionalizzazioni migliori, sono state effettuate prove di coating di un componente a celle esagonali tridimensionale di circa 10x10 mm per verificare la formazione del rivestimento anche nelle zone interne delle strutture: i componenti sono stati immersi in 15 mL di soluzione di H<sub>2</sub>O/TA per 3 ore a 37°C.

Alla fine della funzionalizzazione, tutti i campioni sono stati risciacquati in acqua ultrapura e poi lasciati asciugare. Sono stati misurati i pH delle soluzioni ed i pesi dei campioni sia prima che dopo la funzionalizzazione.

#### 5.1.3 Caratterizzazione morfologica e chimica

Per la caratterizzazione morfologica dei campioni è stato utilizzato un SEM da banco JCM-6000Plus (JEOL Ltd., Giappone) equipaggiato con un rivelatore EDS JED 2300 (JEOL Ltd., Giappone).

Il microscopio elettronico a scansione permette di ottenere delle immagini ad alta risoluzione della superficie di un materiale grazie all'utilizzo di un raggio di elettroni in sostituzione alla luce utilizzata dai classici microscopi ottici [39]. Nel SEM infatti un filamento di metallo, tipicamente tungsteno, viene riscaldato per emettere un fascio di elettroni primari che vengono in seguito accelerati da una differenza di potenziale nell'ordine di 0.3-30 kV. Il fascio primario viene concentrato e diretto sulla superficie da una serie di lenti elettromagnetiche e l'ultima di queste, chiamata lente obiettivo, permette di deflettere il fascio in modo da effettuare la scansione del campione. L'intero sistema deve funzionare in condizioni di alto vuoto (10<sup>-2</sup>-10<sup>-3</sup> Pa) in modo da evitare che l'interazione aria-elettroni generi fenomeni di diffusione e quindi per ottenere immagini ad elevatissimi ingrandimenti ed alta risoluzione: tipicamente, un SEM può operare fino ad ingrandimenti di 200 mila volte con risoluzioni dell'ordine dei nanometri. L'immagine viene ottenuta attraverso la rilevazione degli elettroni secondari, emessi dagli strati più superficiali del materiale da studiare. Il vantaggio principale dell'utilizzo del SEM è la possibilità di ottenere immagini altamente dettagliate e ad alta profondità di campo, consentendo quindi una visualizzazione quasi tridimensionale del campione.

In questo caso, essendo il campione metallico, non è stato necessario una preparazione preliminare. Per ognuno dei campioni funzionalizzati e per un campione di controllo sono state catturate diverse immagini ad ingrandimenti x22, x100, x400, x1000, x2000 e x4000. Nelle stesse condizioni sono state ottenute immagini di tutti i campioni utilizzati per i test di degrado, in modo da poter osservare eventuali cambiamenti di morfologia dovuti agli effetti della corrosione.

Il rilevatore per la spettroscopia EDS permette di rilevare e quantificare gli elementi presenti sulla superficie del campione attraverso l'emissione di raggi X dovuta all'impatto del fascio elettronico primario. La radiazione rilevata possiede una determinata lunghezza d'onda, e quindi una determinata energia, che è funzione dal numero atomico dell'atomo che l'ha emessa: dalla misurazione dello spettro di energia emesso è quindi possibile risalire agli elementi costituenti degli strati superficiale del campione e alla loro quantità. Le analisi EDS sono state acquisite a 15 kV su immagini ad ingrandimento x100 e sono state effettuate, per ognuno dei campioni planari funzionalizzati e per un campione planare di controllo, tre differenti misure di concentrazione atomica in tre differenti aree superficiali: i risultati sono stati poi mediati per ottenere dei valori di concentrazione media degli elementi. Le misure sono state eseguite anche su un componente tridimensionale per verificare l'avvenuta funzionalizzazione anche all'interno della struttura: per fare questo, il componente è stato tagliato in modo da ottenere pezzi che potessero essere utilizzati per l'analisi delle superfici esterna (E), interna (I) ed interna centrale (IC) evidenziate in Fig.27. Infine, nella seconda parte del lavoro sono state effettuate analisi di composizione superficiali anche sui campioni planari utilizzati nei test di degrado



*Figura 27*: Superfici scelte per l'analisi EDS della struttura tridimensionale funzionalizzata e relativi pezzi ricavati tagliando i raccordi. Superfice esterna (rosso), superfice interna (verde), superfice interna centrale (blu).

# 5.1.4 Analisi della deposizione di TA tramite fluorescenza

Per verificare l'effettiva deposizione di uno strato di fenoli sulla superficie dei campioni di magnesio, sono stati effettuate delle osservazioni utilizzando un microscopio confocale LSM 900 (ZEISS) equipaggiato con lampada a fluorescenza. In questa analisi si è sfruttato la proprietà di autofluorescenza dei polifenoli, ossia la capacità di riemettere sotto forma di emissione luminosa le radiazioni ultraviolette assorbite dalle molecole. Questa particolare caratteristica deriva dalla particolare struttura chimica dei composti fenolici caratterizzata da un gran numero di gruppi aromatici i cui doppi legami, se eccitati adeguatamente, sono responsabili dell'emissione elettromagnetica. È quindi possibile osservare, tramite un microscopio dotato di lampada ultravioletta, un'emissione luminosa da parte dei polifenoli se illuminati con luce UV ad una adeguata lunghezza d'onda [28]: in particolare, i tannini possiedono un'emissione per fluorescenza che si concentra nel range dello spettro del visibile compreso tra 500-650 nm (Fig.28).



*Figura 28*: fluorescenza di diverse molecole organiche contenute nelle piante e range di emissione dei tannini [28].

Le osservazioni sono state fatte sui campioni funzionalizzati e su un campione di controllo, e hanno permesso di ottenere dei risultati qualitativi di distribuzione dei polifenoli sulla superficie; sono state catturate due immagini per ogni campione, rispettivamente ad ingrandimenti x5 e x10. Le analisi sono state condotte utilizzando il canale Rodamina con eccitazione a 573 nm della macchina, che permette di tracciare emissioni luminose nel colore arancione-rosso. Per ottenere delle immagini più quantitative, sono state acquisite delle immagini in fluorescenza dei campioni anche attraverso ChemiDoc<sup>™</sup> MP Imaging System (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA). In particolare, sono state acquisite due immagini, una utilizzando il canale Rodamina ed una utilizzando il canale Alexa546 (emissione a 546 nm, verde). Entrambe le immagini sono state acquisite utilizzando l'illuminazione Green Epi della macchina.

# 5.1.5 Test di Folin & Ciocalteau

Il test Folin & Ciocalteau è utilizzato per la determinazione della quantità di polifenoli totali per via colorimetrica. Consiste nell'utilizzo di un determinato reagente, il reattivo di Folin & Ciocalteau (F&C), composto da una soluzione acquosa di acido fosfomolibdico e acido tungstico, che viene miscelato con la soluzione campione contenente polifenoli e con carbonato di sodio (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>). Una volta miscelati, il reattivo di Folin reagisce con i polifenoli che si ossidano nell'ambiente basico indotto dal carbonato di sodio: questo avviene in contemporanea alla riduzione dei metalli del reagente con la produzione di ossido di tungsteno e ossido di molibdeno, che colorano la soluzione di blu. Tramite successivi test fotometrici, è possibile determinare la quantità di polifenoli presenti nella soluzione misurando l'intensità del picco di assorbanza del blu a 760 nm: la misura di concentrazione (mg/mL) viene fatta a partire da una retta di calibrazione costruita sull'acido gallico (Fig.29).

Il test F&C è stato condotto su 3 campioni di magnesio funzionalizzati per 3 ore in una soluzione acqua/TA come precedentemente descritto. Dato che l'obiettivo del test era di ottenere una stima della quantità di acido tannico presente sulla superficie dei campioni solidi, è stato utilizzato un protocollo modificato del test F&C descritto da Sara Ferraris *et al.* [29]: i campioni sono stati immersi in una soluzione contenente 8 mL di acqua ultrapura, 0.5 mL di reagente F&C e 1.5 mL di soluzione acquosa di Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (20% w/V). Sono quindi stati lasciati immersi per 2 ore e in seguito estratti. Infine, le soluzioni sono state analizzate tramite spettrofotometro UV-VIS per misurarne l'assorbimento a 760 nm.

Il test è stato poi fatto anche sulle soluzioni di degrado dei campioni Mg/TA agli step di tempo di 1,2,7 e 14 giorni per verificare e quantificare un eventuale rilascio di acido tannico durante la degradazione dei campioni. In questo caso, sono stati utilizzati 2 mL di soluzione di analizzare, 6 mL di acqua ultrapura, 0.5 mL di reagente F&C e 1.5 mL di soluzione acquosa di Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (20% w/V).



Figura 29: Schema riassuntivo del test F&C.

#### 5.1.6 Test di degrado per immersione

Una volta selezionata la migliore condizione di rivestimento tra quelle precedentemente descritte, la si è utilizzata per la funzionalizzazione dei campioni per i test di degrado. I test di degrado sono stati effettuati tramite immersione e sono stati impostati in condizioni simili a test analoghi in letteratura [10,11,12]. In tutti gli esperimenti eseguiti è stata utilizzata come soluzione il tampone fosfato (PBS). Il pH della soluzione prodotta è pari a 7.4.

In primo luogo, due strutture tridimensionali a celle esagonali, una non trattata e una funzionalizzata in 15 mL di soluzione scelta con le condizioni selezionate, sono state immerse in 15 mL di soluzione di degrado e poi incubate per 24 ore a 37 C°. Il volume di soluzione utilizzato è stato in questo caso scelto in modo arbitrario. Dopo l'immersione, le strutture sono state estratte e risciacquate in acqua ultrapura.

Per il secondo test, otto campioni planari sono stati funzionalizzati nelle condizioni scelte (Mg/TA). Altri otto campioni planari non funzionalizzati (Mg tq.) sono stati usati come controlli. Tutti i sedici campioni sono stati immersi separatamente nella soluzione di degrado ed incubati a 37 C°. In questo caso, il volume di soluzione da utilizzare per il test è stato attentamente valutato: in particolare, seguendo i protocolli utilizzati da altri studi similari [30,31,32] e le linee guida della normativa ASTM G31-72 [33] sui test di corrosione per immersione dei metalli, si è proceduto determinando la superficie totale media esposta dei campioni planari (0.51 cm<sup>2</sup>) e selezionando il corretto volume di soluzione usata nel test e S<sub>c</sub> la superficie del campione. Il volume di soluzione stimato in questo modo è risultato essere di almeno 15.3 mL; tuttavia, si è deciso di utilizzare 20 mL di soluzione di degrado per mantenersi al di sopra del valore limite ed evitare fenomeni di corrosione troppo rapidi (Fig.30) [35]. I campioni sono stati divisi in quattro gruppi, corrispondenti a

quattro tempi di immersione (1,2,7 e 14 giorni), in modo che ogni gruppo fosse costituito da due campioni funzionalizzati (Mg/TA 1 e Mg/TA 2) e due controlli (Mg tq. 1 e Mg tq. 2). Per gli intervalli temporali di 7 e 14 giorni sono stati effettuati dei ricambi ciclici di soluzione ogni 2 giorni, in modo similare a quello che è stato fatto per tempi di immersioni analoghi in altri studi [36,37,38]. Tutti campioni sono stati pesati prima e dopo l'immersione. I pH delle soluzioni di degradazione sono stati misurati alla fine del periodo di immersione e durante i ricambi.



*Figura 30*: andamento della perdita di massa di Mg puro in funzione del rapporto V/S: è possibile notare che per rapporti maggiori di circa 30 mL/cm<sup>2</sup> la velocità di degradazione non cambia, anche aumentando la quantità di soluzione utilizzata a parità di superficie [35]. È quindi raccomandabile utilizzare sempre grandi volumi di soluzione per i test di immersione.

#### 5.1.7 Analisi spettroscopica UV

Analisi spettroscopiche sono state effettuate usando uno spettrofotometro UV-VIS (UV-2600, Shimadzu Corporation, Giappone) con tre obiettivi principali. Nella prima parte di lavoro, le analisi sono state condotte sulle soluzioni di funzionalizzazione PBS/TA e acqua/TA per rilevare la presenza di tannini misurando l'assorbanza a 280 nm e per individuare eventuali picchi spettrali dovuti alla presenza di complessi Mg-TA. Per queste analisi, è stata utilizzata una soluzione diluita al 0.5% in volume costituita da 19.9 mL di acqua ultrapura e 0.1 mL di soluzione di funzionalizzazione. La diluizione è stata eseguita per evitare che durante l'analisi spettroscopica l'uso della soluzione non diluita facesse saturare il picco di assorbanza, falsando la misura. In seguito sono state analizzate le soluzioni di degrado, in questo caso con l'obiettivo di valutare l'eventuale rilascio di acido tannico durante la degradazione. Infine, lo spettrometro è stato utilizzato per quantificare la presenza di fenoli sui campioni sottoposti al test Folin & Ciocalteau, valutando l'assorbanza a 765 nm. In questi ultimi due casi, le soluzioni per l'analisi non sono state diluite.

# 5.1.8 Test rilascio magnesio

Il kit utilizzato per l'analisi (Calcium & Magnesium Photometer HI97752, Hanna Instruments, USA) sfrutta un reagente che opera come indicatore metallocromico, legandosi agli ioni Mg ed assumendo una colorazione nota la cui intensità viene poi letta dallo strumento per ricavare il valore di concentrazione del metallo in soluzione. Utilizzando il fotometro compreso nel kit è stato misurata la quantità di magnesio rilasciata dai campioni a vari step temporali per verificare l'efficacia del coating nel prevenire la degradazione della lega. In particolare, dopo la rimozione dei campioni dai contenitori, le soluzioni di degrado sono state sottoposte al test ed è stata quantificata la concentrazione di magnesio in mg/L.

# 5.1.9 Tomografia computerizzata (CT)

Due campioni tridimensionali, uno funzionalizzato e uno di controllo, sono stati analizzati tramite tomografia computerizzata per valutare la struttura interna della lega ed eventuali cambiamenti della morfologia delle pareti della cella a seguito della formazione del coating di acido tannico.

La tomografia computerizzata è una tecnica diagnostica che permette di ottenere sezioni ed immagini tridimensionali di un oggetto attraverso il rilevamento dell'attenuazione di un fascio di raggi X che attraversa l'oggetto stesso. Gli elementi principali che costituiscono un tomografo sono una sorgente di raggi X (tubo radiogeno) capace di ruotare attorno all'oggetto di analizzare, un anello di sensori disposti attorno all'oggetto capaci di rilevare la radiazione in arrivo ed un sistema di elaborazione che permette di ricostruire l'immagine. La sorgente, ruotando attorno all'asse dell'oggetto, permette di ottenere una serie di proiezioni radiologiche da diverse angolazioni: in seguito algoritmi dedicati ricostruiscono la specifica sezione andando ad unire le varie proiezioni acquisite. Facendo poi avanzare l'oggetto lungo l'asse di scansione e ripetendo il processo, vengono a mano a mano ottenute le immagini di tutte le sezioni che compongono il volume che si vuole analizzare: unendo infine tutte le sezioni, si ottiene una ricostruzione 3D della struttura interna dell'oggetto.

## 5.2 RISULTATI

#### 5.2.1 Funzionalizzazione

Le prime prove di funzionalizzazione sono state effettuate sugli otto campioni planari di lega di magnesio. A seguito dell'estrazione tutti i campioni hanno mostrato un simile cambiamento di colore, dal grigio chiaro della lega originaria ad un colore più bronzeo, derivato dalla deposizione di acido tannico, composto di colore arancione, sulla superficie (Fig. 31).



**Figura 31**: campione planare in lega AZ91 prima (A) e dopo la funzionalizzazione in soluzione TA/H<sub>2</sub>O (B-E) e TA/PBS (F-I).

Le soluzioni di funzionalizzazione sono state sottoposte ad analisi UV e ne è stata misurata la variazione di pH. La spettroscopia UV ha mostrato, come ci si aspettava, una simile presenza di acido tannico in tutte le soluzioni, evidenziata dalla presenza di un picco di assorbanza alle lunghezze d'onda nell'intorno di 280 nm (Fig.32)



*Figura 32*: analisi spettroscopica UV delle soluzioni di funzionalizzazione. Spettri di riferimento delle soluzioni di partenza (A); spettri delle soluzioni dopo la funzionalizzazione dei campioni (B, C).

Non è stato notato nessun picco secondario relativo alla presenza di complessi magnesioacido tannico: probabilmente, la formazione di questi complessi è avvenuta senza alcun rilascio ed esclusivamente sulla superficie del campione permettendo la deposizione del polifenolo e la formazione del rivestimento.

Analizzando il pH, si è invece evidenziato una leggera variazione nel comportamento delle due soluzioni (Fig. 33): in particolare nella soluzione TA/H<sub>2</sub>O si è osservato un leggero aumento del pH all'aumentare del tempo di funzionalizzazione, mentre nella soluzione TA/PBS si è osservato un leggera crescita iniziale seguita da una stabilizzazione.





Nonostante in entrambi i casi le variazioni siano molto piccole, questa differenza potrebbe derivare dal differente pH di partenza della soluzione che ha influito sul rate di rilascio iniziale di magnesio: nel caso della soluzione TA/H<sub>2</sub>O, l'ambiente acido potrebbe aver comportato una maggiore dissoluzione della lega con un conseguente lieve aumento di pH, mentre nel caso TA/PBS il rilascio potrebbe essere stato minore a causa dell'ambiente più vicino ad un valore neutro. Non sono invece stati osservati rilavanti variazioni di peso tra il prima e post funzionalizzazione in nessuno dei test eseguiti (Tab.6)

Per valutare ulteriormente la formazione del coating si è effettuata un'analisi dei campioni al SEM/EDS e tramite microscopio confocale a fluorescenza. Nell'analisi EDS in particolare si è valutata la concentrazione superficiale di carbonio, elemento costituente fondamentale delle molecole fenoliche e quindi indicatore della loro presenza superficiale. I risultati hanno mostrato che nei campioni immersi in TA/H<sub>2</sub>O la concentrazione media di carbonio è aumentata in modo sensibile a seguito della funzionalizzazione rispetto ai campioni di controllo (Fig.34 A), passando da 7.24 ± 1.62 % del Mg tq ad un massimo di 37.82 ± 2.30 %

Tempo di funzionalizzazione	PESO INIZIALE [g] POST IMMERSIONE [g]		VARIAZIONE%
H₂O /TA 15 min	0.0162	0.0163	0.61
H₂O /TA 30 min	0.0146	0.0145	-0.69
H₂O /TA 1 h	0.0153	0.0152	-0.66
H₂O /TA 3 h	0.0147	0.015	2.00
PBS/TA 15 min	0.0185	0.0185	0.00
PBS/TA 30 min	0.0161	0.016	-0.62
PBS/TA 1 h	0.0154	0.0154	0.00
PBS/TA 3 h	0.0183	0.0182	-0.55

Tabella 6: variazione dei pesi dei campioni prima e dopo la funzionalizzazione

I risultati hanno mostrato che nei campioni immersi in TA/H<sub>2</sub>O la concentrazione media di carbonio è aumentata in modo sensibile a seguito della funzionalizzazione rispetto ai campioni di controllo (Fig.34), passando da 7.24 ± 1.62 % del Mg tq ad un massimo di 37.82 ± 2.30 %. Essa inoltre cresce all'aumentare del tempo di immersione, indicando come tempi di funzionalizzazione più lunghi sembrino maggiormente efficaci nella deposizione del rivestimento. Al contrario il livello di carbonio superficiale rilevato sui campioni immersi in TA/PBS è molto inferiore, arrivando ad un massimo di 14.75 ± 5.84 % per il tempo di immersione più breve (15 minuti): per tempi più lunghi invece la concentrazione media rimane circa costante (Fig.34). Bisogna sottolineare che sebbene le analisi EDS sul carbonio siano soggette ad un certo errore (che può essere stimato intorno all'1%) ed il carbonio sia un elemento presente in modo diffuso anche nelle contaminazioni superfiuciali, la differenza riscontrata nelle analisi può considerarsi significativa in quanto molto elevata (10-30%). Le immagini al SEM non hanno evidenziato importanti cambiamenti morfologici tra i campioni trattati ed il controllo (Fig.35), indicando che lo strato di rivestimento sia estremamente sottile ed il processo di funzionalizzazione non induca un degrado significativo della lega.



Figura 34: concentrazione atomica media di carbonio sui campioni funzionalizzati in  $TA/H_2O$  e in TA/PBS.

Tuttavia, sembrerebbe che le superfici dei campioni funzionalizzati in PBS presentino asperità più accecentuate rispetto a quelli immersi in acqua (Fig.36) e simili a quelle del controllo: questo potrebbe essere riconducibile alla formazione di uno strato di polifenoli disomogeneo sulla superficie dei campioni, fatto che sarebbe confermato anche dalle osservazioni all'EDS. Infatti, è possibile notare come i valori di concentrazione di carbonio nei campioni Mg/TA/PBS non solo sono inferiori in valore assoluto rispetto a Mg/TA/H<sub>2</sub>O, ma presentano anche una maggiore varianza: questa corrisponde ad una maggiore dispersione delle misure nelle aree prese come riferimento per l'analisi e quindi indica una variazione più elevata nella distribuzione del carbonio. Al contrario una maggior concentrazione di acido tannico, una varianza meno accentuata e la superficie leggermente più liscia dei campioni Mg/TA/H<sub>2</sub>O indica la probabile formazione di un coating più denso ed omogeneo. È inoltre possibile notare come in questi campioni siano presenti degli agglomerati di particelle sferiche in alcuni punti della superficie, che potrebbero essere costituiti da precipitati di polifenoli (Fig.36 C,E). Sui campioni funzionalizzati in PBS non sono invece stati osservate formazioni di questo tipo.



**Figura 35**: immagini al SEM ad ingrandimento x100 della superficie dei campioni. (A) Mg tq.; (B) Mg/TA/H<sub>2</sub>O 15 min; (C) Mg/TA/H<sub>2</sub>O 30 min; (D) Mg/TA/H<sub>2</sub>O 1 h; (E) Mg/TA/H<sub>2</sub>O 3 h; (F) Mg/TA/ PBS 15 min; (G) Mg/TA/ PBS 30 min; (H) Mg/TA/ PBS 1 h; (I) Mg/TA/ PBS 3 h.



**Figura 36**: immagini al SEM ad ingrandimento x4000 della superficie dei campioni. (A) Mg tq.; (B) Mg/TA/H<sub>2</sub>O 15 min; (C) Mg/TA/H<sub>2</sub>O 30 min; (D) Mg/TA/H<sub>2</sub>O 1 h; (E) Mg/TA/H<sub>2</sub>O 3 h; (F) Mg/TA/PBS 15 min; (G) Mg/TA/PBS 30 min; (H) Mg/TA/ PBS 1 h; (I) Mg/TA/ PBS 3 h. Sono evidenziati gli agglomerati sulla superficie dei campioni. I risultati ottenuti al SEM/EDS sono stati confermati durante le osservazioni in fluorescenza al microscopio confocale. Sfruttando la proprietà di autofluorescenza dell'acido tannico è stata osservata un'emissione luminosa nell'arancione sulla superficie dei campioni funzionalizzati, in particolar modo accentuata nel gruppo Mg/TA/H<sub>2</sub>O (Fig.37,38): è evidente come su questi campioni si sia formato un rivestimento di acido tannico che diventa di volta in volta più omogeneo al crescere del tempo di funzionalizzazione (Fig.38 B,C,D). Al contrario, il gruppo di campioni Mg/TA/PBS ha mostrato una funzionalizzazione modesta e circa costante al variare del tempo di immersione (Fig.38 E,F,G).



Figura 37: osservazione di autofluorescenza del coating di acido tannico sulla superficie dei campioni ad ingrandimento x5. (A) Mg tq.; (B) Mg/TA/H<sub>2</sub>O 15 min; (C) Mg/TA/H<sub>2</sub>O 1 h; (D) Mg/TA/H<sub>2</sub>O 3 h; (E) Mg/TA/PBS 15 min; (F) Mg/TA/PBS 1 ora; (G) Mg/TA/PBS 3 ore;



Figura 38: osservazione di autofluorescenza del coating di acido tannico sulla superficie dei campioni ad ingrandimento x10. (A) Mg tq.; (B) Mg/TA/H<sub>2</sub>O 15 min; (C) Mg/TA/H<sub>2</sub>O 1 h; (D) Mg/TA/H<sub>2</sub>O 3 h; (E) Mg/TA/PBS 15 min; (F) Mg/TA/PBS 1 ora; (G) Mg/TA/PBS 3 ore;

I risultati di queste analisi sono state confermate anche dalle altre analisi in fluorescenza (Fig.39). Si può infatti notare come tutti campioni funzionalizzati siano visibili rispetto ai campioni non trattati (Fig.39-3), ad indicare la presenza del rivestimento di polifenoli. Tuttavia il gruppo Mg/TA/H<sub>2</sub>O (Fig.39-1) presenta una fluorescenza più omogena ed intensa, specialmente nel campione funzionalizzato a 3 ore, rispetto al gruppo Mg/TA/PBS (Fig.39-2).



**Figura 39**: osservazione di autofluorescenza dei campioni funzionalizzati utilizzando il canale Rodamina (A) e Alexa546 (B). (1) campioni Mg/TA/H<sub>2</sub>O, (2) campioni Mg/TA/PBS, (3) campioni Mg tq.. Da sinistra a destra: 15 min., 30 min., 1 h, 3 h.

Per testare altre condizioni di funzionalizzazione presentate in letteratura [11,13] sono stati funzionalizzati altri tre campioni tramite immmersione in soluzione TA/H<sub>2</sub>O a intervalli temporali di 2 e 3 ore con ricambio della soluzione ogni ora, e di 24 ore senza interruzioni. Sono stati misurati i pH di tutte le soluzioni di ricambio e alla fine della funzionalizzazione, mentre i pesi sono stati valutati prima e dopo l'immersione (Tab.7).

Peso	Peso PESO INIZIALE [g]		VARIAZIONE %
H <sub>2</sub> O/TA 2 x 1h	0.017	0.0174	2.30
H <sub>2</sub> O/TA 3 x 1 h	0.0201	0.0207	2.90
H <sub>2</sub> O/TA 24 h	0.0228	0.0245	6.94

Tempo di funzionalizzazione	1h	2h	3h	24 h
H <sub>2</sub> O/TA 2 x 1h	3.71	3.7	/	/
H₂O/TA 3 x 1 h	3.75	3.66	3.68	/
H <sub>2</sub> O/TA 24 h	/	/	/	4.9

**Tabella 7**: pH delle soluzioni di funzionalizzazione e pesi dei campioni per le prove di rivestimento conricambio della soluzione di 2 e 3 ore e della prova a 24 ore continuative.

Nel caso dei campioni funzionalizzati con ricambio della soluzione, tutti i valori di pH rilevati erano superiori a quelli della soluzione di partenza (pH=3.55) ma sono rimasti pressochè costanti in tutte le misurazioni: chiaramente, il ricambio con soluzione fresca ha impedito un aumento più accentuato del pH.

Si è invece osservato un leggero aumento, ma comunque contenuto, dei pesi rispetto a quanto visto nelle prove prevedenti. Il campione funzionalizzato per 24 ore ha invece mostrato un aumento sensibile sia del pH che del peso: la permanenza prolungata nella soluzione di funzionalizzazione ha portato, come confermato più avanti da altri tipi da analisi, ad un'evidente degradazione della lega con un sensibile rilascio di magnesio il quale ha portato all'aumento di pH osservato. Allo stesso tempo l'aumento di peso, che potrebbe sembrare controintuitivo, potrebbe essere dovuto alla riprecipitazione di ossidi e idrossidi di magnesio sulla superficie del campione.

Sono stati quindi effettuate analisi SEM/EDS e di fluorescenza. L'analisi EDS ha mostrato come i valori di concentrazione di carbonio ed ossigeno dei campioni funzionalizzati a 2 e 3 ore siano molto simili ai risultati ottenuti nelle prove precedenti (Fig.40), mentre nel campione funzionalizzato per 24 ore vi sia un aumento della percentuale di ossigeno senza un significativo aumento di carbonio: questo sembrerebbe confermare l'ipotesi della maggiore degradazione, in riferimento alla concentrazione di Mg sensibilmente inferiore, e della riprecipitazione di idrossidi e ossidi sulla superficie.



*Figura 40*: risultati dell'analisi EDS sui campioni della seconda prova di funzionalizzazione. Sono riportate le concentrazioni di carbonio,magnesio ed ossigeno

Dalle immagini al SEM è possibile osservare come la superficie del campione funzionalizzato a 24 ore sia maggiormente degradata (Fig.41 G,H) rispetto a quelle degli altri campioni (Fig.41 C,D,E,F), con la presenza di ampie crepe e buchi probabilmente creati dall'inizio di fenomeni di corrosione in fessura. I campioni funzionalizzati a 2 e 3 ore sembrano invece presentare superfici molto simili a quelle dei campioni delle prove precedenti, con la possibilità quindi che si sia formato un analogo sottile rivestimento di acido tannico.



**Figura 41**: immagini al SEM ottenute con ingrandimenti x100 (colonna sinistra) e x2000 (colonna destra). (A,B) Mg tq.; (C,D) Mg/TA/H<sub>2</sub>O 2X1h; (E,F) Mg/TA/H<sub>2</sub>O 3X1h; (G,H) Mg/TA/H<sub>2</sub>O 24h.

Tuttavia, le osservazioni in fluorescenza hanno portato a risultati diversi rispetto a quelli ottenuti in precendenza (Fig.42). Tutti i campioni hanno mostrato una luminosità minore rispetto alle funzionalizzazioni effettuate per immersione in TA/H<sub>2</sub>O delle prove precedenti e simili ai risultati ottenuti con le soluzioni TA/PBS. In particolare il campione Mg/TA/H<sub>2</sub>O

24h (Fig.42 G,H) ha mostrato la minor presenza di acido tannico, probabilmente a causa della degradazione superficiale che non ha permesso la formazione di uno strato di rivestimento omogeneo.



**Figura 42**: osservazione di fluorescenza dei campioni funzionalizzati ad ingrandimenti x5 (colonna sinistra) e x10 (colonna destra). (A,B) Mg tq.; (C,D) Mg/TA/H<sub>2</sub>O 2X1h; (E,F) Mg/TA/H<sub>2</sub>O 2X1h; (G,H) Mg/TA/H<sub>2</sub>O 24h.

Non è però chiaro il motivo della discrepanza tra analisi EDS dei campioni Mg/TA/H<sub>2</sub>O 2X1h e Mg/TA/H<sub>2</sub>O 2X1h, molto simili a quelle dei campioni funzionalizzati in TA/H<sub>2</sub>O delle prime prove, e i risultati dell'osservazione della fluorescenza.

Le analisi fatte in questa prima parte di lavoro hanno avuto l'obiettivo di individuare la migliore condizione di funzionalizzazione per la lega AZ91. Considerando i risultati, i test sembrano indicare come il trattamento in TA/H<sub>2</sub>O per 3 ore senza ricambio di soluzioni sia il più efficace nella formazione di un coating omogeneo e ben distribuito di acido tannico su campioni planari: tutte le funzionalizzazioni per i successivi test sono state quindi ottenute con questa procedura.

Per verificare l'efficacia di questi parametri anche su campioni tridimensionali porosi, ed in particolare la capacità di rivestire in modo efficace anche le superfici interne, è stata funzionalizzata una struttura a celle esagonali di dimensioni 10x10. Anche in questo caso, dopo aver rimosso la struttura dalla soluzione ed aver eseguito risciacquo ed asciugatura, è stato possibile notare lo stesso cambiamento di colore che era stato osservato nei campioni planari (Fig.43).



*Figura 43*: Strutture porose tridimensionali. Si può notare facilmente il colore scuro del campione di destra dovuto al rivestimento di acido tannico.

Per poter analizzare le pareti interne si è poi proceduto al taglio della struttura come precedentemente indicato. I campioni ricavati sono stati analizzati tramite EDS (Fig.44) che ha rilevato una similarità della concentrazione di carbonio e degli altri elementi sulle superfici considerate con i risultati ottenuti sui campioni planari nelle stesse condizioni di funzionalizzazione.

	Elemento	Concentrazione atomica media %											
	С	32.29 ± 0.17		Con	contra	zion	o ato	omica	mo	dia			
Superfice	0	52.63 ± 1.11											
esterna	Mg	11.97 ± 0.76	40.00	0 33.77									
	Al	3.12 ± 0.17	35.00		32.29			T			30.54		
			30.00		Ŧ		_				I		
	С	33.77 ± 2.66	25.00		-								
Superfice	0	51.61 ± 0.10	20.00										
interna	Mg	11.45 ± 1.54	20.00										
	Al	3.18 ± 1.13	15.00										
			10.00				_						
	С	30.54 ± 0.60	5.00				_						
Superfice	0	49.62 ± 2.28	0.00										
centrale	Mg	16.32 ± 2.09		Supe	erficie est	terna	rna Superficie interna Sup			Supe	erficie int	erna	
	Al	3.53 ± 0.41									centrale		

*Figura 44*: analisi EDS sulla superficie esterna, interna ed interna centrale della struttura tridimensionale porosa funzionalizzata.

L'ultimo test svolto per valutare le caratteristiche dei coating ottenuti nelle condizioni di funzionalizzazione scelte è stato il test di Folin&Ciocalteau (Fig.45).



В

Campione	Concentrazione [mg/mL]	Assorbanza a 760 nm		
1	0.061	1.395		
2	0.066	1.502		
3	0.064	1.469		

*Figura 45*: (A) soluzione ottenuta dal test F&C. Si può osservare il colore blu dovuto alla reazione causata dalla presenza dell'acido tannico. (B) tabella dei risultati del test dopo l'analisi in assorbanza fotometrica.

Il risultato del test ha confermato la presenza di acido tannico attivo, in quanto contribuente alle reazioni di riduzione, sulla superficie del campione. Inoltre, ha anche mostrato come i valori di concentrazione siano praticamente identici per i diversi campioni: da questo si è potuto concludere che le condizioni di funzionalizzazione scelte sembrerebbero adatte per ottenere dei coating riproducibili.

#### 5.2.2 Test di degrado

I primi test di degrado sono stati condotti su due strutture tridimensionali porose (Fig.46), una con funzione di controllo (Mg tq.) e l'altra funzionalizzata (Mg/TA), secondo le condizioni scelte in precedenza.



Figura 46: Mg/TA (sinistra) e Mg tq. (destra) utilizzati per il primo test di degrado prima dell'immersione.

Dopo l'immersione di 24 ore (Fig.47), sul campione Mg/TA è stata osservata la presenza di una patina bianco-trasparente omogeneamente distribuita ed è stato ipotizzato si sia formata a causa della precipitazione di sali proveniente dalla soluzione di PBS e dalla riprecipitazione di idrossidi e ossidi di magnesio in seguito al rilascio di metallo dovuto all'evidente degradazione delle parti sottili del campione: in particolare, uno dei piani si è staccato dalla struttura principale a causa della corrosione subita sui raccordi. La soluzione di degrado, inoltre, si presentava di un colore giallo opaco, probabilmente a causa del rilascio di acido tannico a seguito della degradazione di parte della struttura. Il controllo invece si è presentato intatto, con un agglomerato della stessa patina bianca-trasparente localizzato su una zona laterale della struttura. La soluzione di degrado non ha subito alterazione evidenti, salvo presentarsi leggermente più opaca alla fine dell'immersione. Sono stati misurati i pH delle soluzioni, ed è stato misurato un incremento significativo rispetto alla soluzione di partenza (pH=7.4) in entrambe le soluzioni, che sono arrivate a toccare valori di 11.50 per il campione Mg tq. e di 12.23 per Mg/TA (Tab.8).



*Figura 47*: campioni tridimensionali dopo l'immersione di 24 ore. A sinistra il campione funzionalizzato, a destra il controllo.

Campione	PESO INIZIALE	PESO POST IMMERSIONE	VARIAZIONE %	pH INIZIALE	pH POST IMMERSIONE
Mg tq.	0.3823	0.4448	14.05	7.4	11.5
Mg/TA	0.3454	0.3706	6.80	7.4	12.23

Tabella 8: misure di peso e pH prima e dopo il test di degrado di 24 ore.

Infine, è stata valutata la variazione di peso dei due campioni: in entrambi i casi si è misurato un non trascurabile aumento di peso, maggiore nel caso del Mg tq., che sembrerebbe dovuto anche in questo caso alla precipitazione di un gran quantità di composti sulla superficie delle strutture.

Visti i risultati dei test di degradazione sulle strutture tridimensionali, come precedentemente indicato sono stati cambiati i parametri di immersione per gli esperimenti sui campioni planari: in particolare è stato fissato il volume di soluzione a 20 mL considerando una superficie totale media dei campioni pari a 0.51 cm<sup>2</sup>, seguendo le indicazioni di letteratura e della normativa ASTM G31-72 (rapporto V<sub>sol</sub>/ S<sub>c</sub> ≥ 30 mL/cm<sup>2</sup>).



Figura 48: Campioni planari prima (colonna sinistra) e dopo (colonna destra) i test di degrado.

L'uso di un volume di soluzione adeguato ha portato a risultati completamente diversi dalla prova di degrado precedente. In questo caso, è possibile notare come tutti i campioni funzionalizzati siano rimasti intatti, seppur assumendo un colore più scuro (Fig.48). Non sono stati osservati in nessun caso depositi o precipitazioni macroscopici di materiale sui campioni Mg/TA (Fig.48): è stata però evidenziata una leggera colorazione gialla della soluzione di degrado, segno di un rilascio di acido tannico nell'ambiente circostante. Questo fatto è stato in particolare evidenziato dalle analisi con spettrometro UV-VIS (Fig.49 A): la presenza di picchi alla lunghezza d'onda di assorbimento dei polifenoli (280 nm) ha confermato la presenza di acido tannico nelle soluzioni di degrado a 1 e 2 giorni dei campioni Mg/TA. Tuttavia, lo stesso picco risulta molto più contenuto nel caso dell'immersione a 7 e 14 giorni, indicando un rilascio più moderato. I risultati del test di F&C (Fig.49 B) mostrano invece che la concentrazione di acido tannico sia leggermente maggiore a 1 e 14 giorni, seppur le concentrazioni siano in generale tutte ridotte. È necessario sottolineare che le misure a 7 e 14 giorni sono state effettuate sulle ultime soluzioni di ricambio, e che quindi in realtà la quantità di polifenoli rilasciati durante tutto il tempo del test di degrado potrebbe essere maggiore.



Campione	Concentrazione [mg/mL]	Assorbanza a 760 nm
Mg/TA 1d	0.002	0.067
Mg/TA 2d	0.00155	0.2625
Mg/TA 7d	0.0005	0.0335
Mg/TA 14d	0.002	0.06

*Figura 49*: (A) Assorbanza delle soluzioni di degrado di un campione Mg tq. e dei Mg/TA immersi per 1,2,7 e 14 giorni. (\*) Le misure a 7 e 14 giorni sono state fatte sulle ultime soluzioni di ricambio. Il picco visibile a circa 250 nm nello spettro è dovuto al cambio della modalità di acquisizione della macchina. (B) risultati del test F&C.

Nel caso dei campioni di Mg tq., la morfologia macroscopica non è cambiata, anche se nei gruppi dei 7 e 14 giorni sono stati osservati invece depositi, anche importanti, di materiale (Fig.48).

Anche in questo caso, sono stati misurati i pesi dei campioni (Tab.9) prima e dopo l'immersione e i pH delle soluzioni (Fig.50). Le misure sui pesi dei campioni hanno evidenziato come, all'aumentare del tempi di immersione, i controlli (Mg tq.) presentino variazioni di peso più accentuate.

	PESO	PESO POST	VARIAZIONE %
Campioni degrado	INIZIALE [g]	IMMERSIONE [g]	
Mg TQ 1d (1)	0.0207	0.0204	-1.45
Mg TQ 1d (2)	0.0182	0.0176	-3.30
Mg/TA 1d (1)	0.0186	0.0188	1.08
Mg/TA 1d (2)	0.0198	0.0196	-1.01
Mg TQ 2d (1)	0.0198	0.0198	0.00
Mg TQ 2d (2)	0.0192	0.0188	-2.08
Mg/TA 2d (1)	0.0196	0.019	-3.06
Mg/TA 2d (2)	0.0234	0.0227	-2.99
Mg TQ 7d (1)	0.0216	0.1048	385.19
Mg TQ 7d (2)	0.0224	0.0252	12.50
Mg/TA 7d (1)	0.0205	0.02	-2.44
Mg/TA 7d (2)	0.0208	0.0205	-1.44
Mg TQ 14d (1)	0.0213	0.0199	-6.57
Mg TQ 14d (2)	0.0178	0.0236	32.58
Mg/TA 14d (1)	0.0198	0.0194	-2.02
Mg/TA 14d (2)	0.0209	0.0215	2.87

Tabella 9: Misure e variazione percentuale dei pesi dei campioni prima e dopo le prove di degrado



*Figura 50*: Variazione del pH delle soluzioni di degrado rispetto al tempo di immersione. (\*) misure prese sulle ultime soluzioni di ricambio per ciascun gruppo di campioni.

Le misure di pH hanno invece mostrato in modo evidente come le soluzioni del gruppo dei campioni Mg/TA non presentino una sensibile variazione di pH anche a tempi di immersione lunghi; al contrario, le soluzioni del gruppo dei controlli sono state caratterizzate da un significativo aumento del pH. In particolare, questo comportamento potrebbe essere una prova dell'azione protettiva dello strato di acido tannico, che evita l'innalzamento del pH dovuto al rilascio di magnesio in soluzione. Come ulteriore conferma a questa ipotesi, i risultati del test fotometrico sul rilascio di magnesio in soluzione hanno evidenziato come i campioni funzionalizzati siano soggetti ad un minor rilascio di ioni metallici in ogni intervallo temporale di osservazione (Fig.51).



*Figura 51*: Misure di rilascio di magnesio nelle soluzioni di degradazione.

Dopo queste analisi preliminari, i campioni sono stati osservati tramite SEM/EDS. Le osservazioni tramite EDS hanno permesso di evidenziare, in primo luogo, come la percentuale di carbonio sui campioni Mg/TA sia rimasta elevata (Tab.10) ad indicare la presenza di acido tannico sulla superficie anche per lunghi tempi di immersione (Fig.52). Dopodiché, è stato possibile evidenziare una decrescita significativa di elementi di lega subita dai controlli: le percentuali di Mg ed Al presenti sulle superfici sono infatti sempre minori all'aumentare del tempo di degradazione. Al contrario, sui campioni funzionalizzati la quantità di questi elementi rimane pressoché costante: è quindi possibile che il coating abbia protetto il metallo sottostante dall'azione corrosiva. Un altro dato significativo è la crescita costante della percentuale di ossigeno, segno della formazione di ossidi ed idrossidi, e la comparsa di elementi come cloro e potassio sui campioni Mg tq., entrambe dovute alla presenza di accumuli di materiale precipitato, anche in notevoli quantità, sulla superficie del campione. Questi effetti non sembrano invece essersi presentati nei campioni Mg/TA, in cui le percentuali di ossigeno sono rimaste costanti e non è stata rilevata la presenza di Cl e K.

	С	0	Mg	AI	Na	Р	Cl	К
Mg tq. 1 giorno	5.36 ± 4.94	55.45 ± 4.65	27.72 ± 0.96	7.96 ± 0.39	$1.21 \pm 0.44$	2.31 ± 0.69	/	/
Mg tq. 2 giorni	5.30 ± 6.17	64.92 ± 6.97	18.54 ± 5.32	3.74 ± 3.29	1.55 ± 1.47	5.95 ± 2.75	/	/
Mg tq. 7 giorni	6.05 ± 6	71.7 ± 5.92	10.95 ± 1.68	0.98 ± 0.43	1.98 ± 1.84	6.65 ± 0.48	1.39 ± 0.18	0.64 ± 0.21
Mg tq. 14 giorni	5.15 ± 2.48	71.05 ± 3.56	11.61 ± 0.78	0.57 ± 0.26	1.77 ± 0.78	7.97 ± 0.74	0.66	1.66 ± 0.52
Mg/TA 1 giorno	23.71 ± 3.58	53.54 ± 1.38	15.35 ± 1.97	4.59 ± 0.61	1.37 ± 0.33	$1.46 \pm 0.06$	/	/
Mg/TA 2 giorni	30.74 ± 1.99	53.79 ± 1.74	9.3 ± 0.47	2.44 ± 0.34	2.89 ± 0.24	0.85 ± 0.12	/	/
Mg/TA 7 giorni	21.56 ± 8.15	57.07 ± 3.06	13.03 ± 3.7	4.47 ± 0.04	1.19 ± 0.22	2.69 ± 1.22	/	/
Mg/TA 14 giorni	26.38 ± 0.67	55.54 ± 0.51	9.51 ± 0.49	4.01 ± 0.21	1.46 ± 0.24	2.99 ± 0.73	/	/

**Tabella 10**: Misure di concentrazione atomica media percentuale di diversi elementi sulla superficie deicampioni degradati.

In seguito, sono state acquisite le immagini al SEM della superficie dei campioni per monitorare eventuali cambiamenti di morfologia. È stato osservato che a bassi ingrandimenti (x100) la superficie dei campioni funzionalizzati (Fig.53 D, F, H), seppur presenti delle piccole crepe, è rimasta tendenzialmente molto più omogenea e liscia rispetto a quella dei controlli che al contrario è apparsa più rugosa e granulare (Fig.53 C, E, G) in particolar modo agli intervalli di tempo di 2 e 7 giorni. Comparando queste superfici con i corrispettivi campioni non degradati (Fig.53 A, B) è evidente come il gruppo Mg/TA abbia mantenuto una maggiore similarità morfologica.


*Figura 52*: andamento della concentrazione atomica media superficiale di carbonio, magnesio ed ossigeno rispetto ai tempi di degradazione scelti.

Ad ingrandimenti maggiori (Fig.54 E, G, I) è invece possibile notare il materiale precipitato sotto forma di cristalli micro e nanometrici sulla superficie dei campioni Mg tq., mentre nei campioni Mg/TA sono quasi totalmente assenti. Inoltre, in Fig.54 C è possibile notare quelli che sembrano pori dovuti alla formazione e al rilascio di bolle di idrogeno gassoso durante i processi di corrosione della lega.



**Figura 53**: Immagini al SEM ad ingrandimento x100 delle superfici dei campioni degradati. (A) Mg tq. non degradato; (B) Mg/TA non degradato; (C) Mg tq. 1 giorno; (D) Mg/TA 1 giorno; (E) Mg tq. 2 giorni; (F) Mg/TA 2 giorni; (G) Mg tq. 7 giorni; (H) Mg/TA 7 giorni; (I) Mg tq. 14 giorni; (J) Mg/TA 14 giorni.



*Figura 54*: Immagini al SEM ad ingrandimento x2000 delle superfici dei campioni degradati. (A) Mg tq. non degradato; (B) Mg/TA non degradato; (C) Mg tq. 1 giorno; (D) Mg/TA 1 giorno; (E) Mg tq. 2 giorni; (F) Mg/TA 2 giorni; (G) Mg tq. 7 giorni; (H) Mg/TA 7 giorni; (I) Mg tq. 14 giorni; (J) Mg/TA 14 giorni

# 5.2.3 Tomografia computerizzata (CT)

Infine, sono state effettuate delle analisi CT-Scan di due strutture tridimensionali, una trattata ed una non trattata (Fig.55).



*Figura 55*: Immagini CT-Scan delle strutture porose tridimensionali non trattate (A) e rivestite con acido tannico (B).

Le sezioni trasversali mostrino come non ci siano evidenti differenze di morfologia superficiale tra le due strutture, a riprova che il rivestimento di polifenoli che si viene a formare è molto sottile e non incide a livello macroscopico sulle caratteristiche di rugosità superficiale.

Si è però notata una sostanziale differenza tra la sezioni dei piani e quelle delle regioni di raccordo: queste ultime si sono dimostrate molto più irregolari e disomogenee delle prime, con difetti imputabili principalmente al processo di produzione delle strutture. Questo potrebbe avere influito sui test di degradazione sulle strutture tridimensionali fatti in precedenza in quanto regioni potenzialmente più sensibili ai fenomeni corrosivi, a causa del ridotto spessore e delle disomogeneità superficiali.

# 6. DISCUSSIONE

Gli esperimenti effettuati hanno evidenziato che è possibile creare un rivestimento di acido tannico su strutture in lega di magnesio. In particolare, i test iniziali di funzionalizzazione hanno mostrato come le condizioni migliori tra quelle testate siano l'immersione continua per 3 ore in soluzione TA/H<sub>2</sub>O: il coating creato sui campioni così trattati si è dimostrato omogeneo su tutta la superficie, riproducibile e replicabile anche su strutture tridimensionali. Le analisi EDS hanno mostrato infatti una elevata concentrazione di carbonio, componente fondamentale dei polifenoli, sulla superficie dei campioni trattati in TA/H<sub>2</sub>O rispetto a quelli trattati in TA/PBS. Le osservazioni in fluorescenza hanno ulteriormente confermato questo fatto, con un'evidente emissione fluorescente nei campioni Mg/TA/H<sub>2</sub>O ad indicare la presenza di uno strato omogeneo di acido tannico.

Probabilmente, la migliore funzionalizzazione ottenibile in soluzione TA/H<sub>2</sub>O è dovuta alla presenza di un ambiente acido (pH=3.55) che permette un consistente rilascio iniziale di ioni Mg<sup>2+</sup>, i quali poi fungono da "ponte" tra l'acido tannico in soluzione e la superficie metallica per la formazione di un rivestimento. Allo stesso modo, un pH maggiore come quello della soluzione TA/PBS (pH=6.14) porta ad un rilascio di ioni minore e quindi alla creazione di un coating meno omogeneo.

Si tratta di un risultato estremamente interessante: potrebbe infatti significare che il solo rilascio di ioni, se avviene in quantità adeguata , da parte del metallo da rivestire può portare alla formazione di un coating in presenza di polifenoli nella soluzione. Ciò implica che si possa evitare di ricorrere all'utilizzo di reagenti o di ioni metallici aggiuntivi nel processo di funzionalizzazione, diminuendo la complessità della procedura e il rischio di contaminazione con sostanze tossiche. Inoltre, vista l'apparente efficacia della formazione del rivestimento anche nel caso di strutture tridimensionali, un processo di questo tipo potrebbe essere utilizzato per ricoprire impianti di forma più o meno complessa. Infine, è importante notare come la formazione del coating sembra non abbia influito in modo evidente sulla morfologia dei campioni, facendo intuire che lo strato formato sia molto sottile: questo potrebbe essere un vantaggio nel preservare eventuali porosità o rugosità in eventuali impianti commerciali, fattori fondamentali per ottenere determinate risposte biologiche da parte delle cellule e dei tessuti circostanti.

I test di degrado a loro volta hanno evidenziato come il coating sia effettivamente in grado di proteggere la lega dalla corrosione. Questo è evidente notando prima di tutto le differenze macroscopiche tra i campioni trattati e non trattati prima e dopo l'immersione: mentre i primi sono rimasti praticamente invariati durante tutti gli step temporali, i secondi hanno mostrato evidenti segni di degrado specialmente a 7 e 14 giorni, con la precipitazione di cristalli di fosfati e la formazione di ossidi come mostrato dalle analisi EDS. Questi depositi sono apparsi come agglomerati di cristalli o di fibre, e non è chiaro in quali condizioni una forma sia privilegiata rispetto all'altra: una possibilità è che la formazione di fibre sia catalizzata in caso di precipitazione di potassio, che è presente in entrambi i campioni Mg tq. a 7 e 14 giorni.

I test successivi hanno confermato la maggior degradazione subita dai campioni non trattati: nelle soluzioni di degrado è stato un misurato un pH sensibilimente maggiore nel gruppo dei controlli rispetto al gruppo Mg tq. in tutti gli step temporali, segno di un maggior rate di degradazione della lega. Nonostante ciò il rilascio di ioni magnesio sembra essere solo leggermente maggiore nel primo gruppo rispetto al secondo a 7 e 14 giorni: questo potrebbe essere dovuto alla deposizione e precipitazione di materiale sui campioni di controllo che, formando una sorta di "guscio" protettivo, hanno limitato la quantità di magnesio rilasciata in soluzione.

Il coating inoltre si è dimostrato stabile in quanto anche a tempi di immersione di 7 e 14 giorni il livello di carbonio superficiale sembra essere diminuito in modo marginale. Questo può significare che il rivestimento è ben aderente al substrato e previene in modo efficace la corrosione e la conseguente degradazione della superficie dei campioni. È stato comunque rilevato un modesto rilascio di acido tannico nelle soluzioni di degrado grazie alle analisi di spettroscopia UV e, in misura ridotta, al test F&C. Il rilascio di polifenoli nell'ambiente circostante non è però negativo in quanto potrebbe avere effetti antiinfiammatori in ambiente biologico.

### 7. CONCLUSIONI E SVILUPPI FUTURI

Con questo lavoro di tesi si è dimostrata la possibilità di creare dei rivestimenti di acido tannico su strutture in lega di magnesio tramite immersione per proteggerle dalla corrosione. L'acido tannico ed i polifenoli, composti di origine naturale, biocompatibili e con effetti anti-infiammatori ed anti-ossidanti, si stanno rivelando dei candidati molto promettenti per trattamenti di funzionalizzazione superficiale: inoltre, la futura possibilità di poter disporre di volumi di produzione adeguati potrebbe permettere il loro utilizzo estensivo in applicazioni industriali e biomedicali. La semplicità ed efficacia del processo di coating per immersione lo rende ideale per la funzionalizzazione di impianti di diverse forme e complessità senza l'utilizzo di ulteriori reagenti: si configura quindi come una strategia facilmente implementabile e potenzialmente scalabile anche ai bisogni di una produzione industriale. Il rivestimento in acido tannico ha inoltre dimostrato di essere in grado di rallentare il rate di corrosione della lega di magnesio AZ91 e di limitarne la corrosione in ambiente acquoso. L'utilizzo di impianti bioriassorbibili è sicuramente uno degli aspetti più promettenti in campo clinico grazie ai benefici che questo tipo di componenti possono portare nel trattamento di diversi tipi di patologie, come il recupero della funzionalità del tessuto interessato senza la necessità di effettuare ulteriori interventi chirurgici dopo l'impianto.

Questo è un importante primo passo per il potenziale sviluppo di coating per impianti in lega di magnesio, materiale con ottime proprietà meccaniche e di biocompatibilità per applicazioni ortopediche e cardiovascolari ma con scarsa resistenza alla corrosione, da utilizzare in ambito clinico.

Tuttavia, questo lavoro presenta dei limiti su alcuni aspetti che sarà necessario approfondire in studi successivi. In primis, non sono stati effettuati test biologici: questo passaggio sarà necessario per verificare la citocompatibilità e gli effetti anti-infiammatori sui componenti biologici, come cellule e tessuti, dei componenti in lega di magnesio e dei polifenoli. Un altro aspetto limitante di questo studio sono state le condizioni di degrado: nonostante si sia cercato di lavorare con soluzioni che permettessero di imitare alcune specie chimiche presenti in ambiente biologico e cercando di imitarne la dinamicità con il ricambio della soluzione, è evidente che le condizioni di degrado sono ancora ben lontane dalla complessità e dalle cinetiche di degradazione all'interno dell'organismo. Un possibile sviluppo sarà quindi quello di effettuare dei test in colture dinamiche od *in vivo* per poter verificare l'effettiva efficacia dei rivestimenti, una volta ottimizzate le condizioni di funzionalizzazione.

Nonostante ciò, questo lavoro rappresenta un primo passo nella giusta direzione per lo sviluppo di strategie di riduzione della corrosione delle leghe di magnesio, e che si proietta all'interno dell'attuale ricerca in questo ambito innovativo che, forse molto presto, sarà parte integrante di trattamenti clinici avanzati.

### 8. BIBLIOGRAFIA

- 1. J-M Seitz, R.Eifler, Fr-W. Bach, H. J. Maier, *Magnesium degradation products: Effects on tissue and human metabolism*, J Biomed Mater Res Part A, 102A, 3744-3753, 2014.
- 2. Junxiu Chen, Lili Tana, Xiaoming Yu *et al., Mechanical properties of magnesium alloys for medical application: A review*, Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials, Volume 87, 68-79, 2018.
- Sankalp Agarwal, James Curtin, Brendan Duffy, Swarna Jaiswal, Biodegradable magnesium alloys for orthopaedic applications: A review on corrosion, biocompatibility and surface modifications, Material Science and Engineering, vol. 68, 948-963, 2016.
- 4. Jia-Li Wang, Jian-Kun Xu, Chelsea Hopkins, Dick Ho-Kiu Chow, Ling Qin, Biodegradable Magnesium-Based Implants in Orthopedics—A General Review and Perspectives, Advanced Science 7, 1902443-1902462, 2020.
- 5. Maryam Moravej, Diego Mantovani, *Biodegradable Metals for Cardiovascular Stent Application: Interests and New Opportunities*, Int. J. Mol. Sci., 12, 4250-4270, 2011.
- 6. Bianca R. Albuquerque, Sandrina A. Heleno, M. Beatriz P.P. Oliveira, Lillian Barros, Isabel C.F.R. Ferreira, *Phenolic compounds: current industrial applications, limitations and future challenges*, Food Funct, 2(1), 14-29, 2020.
- 7. Linlin Chen, Huidan Deng, Hengmin Cui *et al.*, *Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs*, Oncotarget, vol. 9(6), 7204-7218, 2018.
- 8. Tarique Hussain, Bie Tan, Yulong Yin *et al.*, *Oxidative Stress and Inflammation: What Polyphenols Can Do for Us?*, Oxidative Medicine and Cellular Longevity, vol. 2016.
- 9. Fábio Fernandes de Araújo, David de Paulo Farias, Iramaia Angélica Neri-Numa, Glaucia Maria Pastore, *Polyphenols and their applications: An approach in food chemistry and innovation potential*, Food Chemistry 338, 2021.
- 10. Bo Zhang, Ruijuan Yao, Linhua Li *et al., Green Tea Polyphenol Induced Mg2+-rich Multilayer Conversion Coating: Toward Enhanced Corrosion Resistance and Promoted in Situ Endothelialization of AZ31 for Potential Cardiovascular Applications*, ACS Appl. Mater. Interfaces, 11, 41165-41177, 2019.
- 11. Mohammad Asgari, Ying Yang, Shuang Yang et al., Mg–Phenolic Network Strategy for Enhancing Corrosion Resistance and Osteocompatibility of Degradable Magnesium Alloys, ACS Omega, 4, 21931-21944, 2019.
- 12. Si Chen, Jiang Zhang, Yingqi Chen et al., Application Of Phenol/Amine Copolymerized Film Modified Magnesium Alloys: Anticorrosion And Surface Biofunctionalization, ACS Appl. Mater. Interfaces, 7, 24510-24522, 2015.
- 13. Hung-Pang Lee, Da-Jun Lin and Ming-Long Yeh, Phenolic Modified Ceramic Coating on Biodegradable Mg Alloy: The Improved Corrosion Resistance and Osteoblast-Like Cell Activity, Materials, 10, 2017.

- 14. Hao Zhang, Xiaolong Shen, Jin Wang et al., Multistep Instead of One-Step: A Versatile and Multifunctional Coating Platform for Biocompatible Corrosion Protection, Acs Biomater. Sci. Eng., 5, 6541-6556.
- 15. M. Bertuola, A. Miñána, C.A. Grillo *et al., Corrosion protection of AZ31 alloy and constrained bacterial adhesion mediated by a polymeric coating obtained from a phytocompound*, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 172, 187-196, 2018.
- 16. Xiaoming Chen, Guangyu Li, Jianshe Lian, Qing Jiang, Study of the formation and growth of tannic acid based conversion coating on AZ91D magnesium alloy, Surface & Coatings Technology, 204, 736-747, 2009.
- 17. Hao Zhang, Rifang Luo, Wenjun Li *et al.*, Epigallocatechin gallate (EGCG) induced chemical conversion coatings for corrosion protection of biomedical MgZnMn alloys, Corrosion Science, 94, 305-315, 2015.
- 18. Yaping Zhang, Lanbo Shen, Qi-Zhi Zhong, Jianhua Li, *Metal-Phenolic Network Coatings for Engineering Bioactive Interfaces*, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.
- *19.* Y. Xin, T. Hu, P.K. Chu, *In vitro studies of biomedical magnesium alloys in a simulated physiological environment: A review,* Acta Biomaterialia, 7, 1452-1459, 2011.
- 20. Sunil Kumar, Puneet Katyal, Factors affecting biocompatibility and biodegradation of magnesium based alloys, Materials Today: Proceedings.
- 21. Y.F. Zheng, X.N. Gu, F. Witte, *Biodegradable Metals*, Materials Science and Engineering, 77, 1-34, 2014.
- 22. Mehdi Honarvar Nazari, Yan Zhang, Ali Mahmoodi *et al.*, *Nanocomposite organic coatings for corrosion protection of metals: A review of recent advances*, Progress in Organic Coatings, 162, 2022.
- 23. Ramalingam Malathy, Mayakrishnan Prabakaran, Kathirvel Kalaiselvi *et al., Comparative Polyphenol Composition, Antioxidant and Anticorrosion Properties in Various Parts of Panax ginseng Extracted in Different Solvents,* Appl. Sci., 11, 93, 2021.
- 24. S. Aourabi, M. Driouch, M. Sfaira *et al.*, *Phenolic fraction of Ammi visnaga extract as environmentally friendly antioxidant and corrosion inhibitor for mild steel in acidic medium*, Journal of Molecular Liquids, 323, 114950, 2021.
- 25. Ariel Gonzalez, Alejandro Guillermo Minán, Claudia Alejandra Grillo *et al.*, *Characterization and antimicrobial effect of a bioinspired thymol coating formed on titanium surface by one-step immersion treatment*, Dental Materials, 36, 1495-1507, 2020.
- 26. Sebastian Geißler, Alejandro Barrantes, Pentti Tengvall, Phillip B. Messersmith, Hanna Tiainen, *Deposition Kinetics of Bioinspired Phenolic Coatings on Titanium Surfaces*, Langmuir, 32, 8050-8060, 2016.
- 27. Ludwig Erik Aguilar, Ji Yeon Lee, Chan Hee Park, Cheol Sang Kim, *Biomedical Grade Stainless Steel Coating of Polycaffeic Acid via Combined Oxidative and Ultraviolet Light-Assisted Polymerization Process for Bioactive Implant Application*, Polymers, 11, 584, 2019.

- 28. Lloyd Donaldson, Autofluorescence in Plants, Molecules, 25, 2020.
- 29. Sara Ferraris, Xin Zhang, Enrico Prenesti *et al., Gallic acid grafting to a ferrimagnetic bioactive glass-ceramic*, Journal of Non-Crystalline Solids, 432, 167-175, 2016.
- *30.* Jianfeng Wang, Yifan Zhou, Zhongyuan Yang et al., *Processing and properties of magnesium alloy micro-tubes for biodegradable vascular stents*, Material Science & Engineering C, 90, 504-513, 2018.
- 31. Min Zhang, Shu Cai, Feiyang Zhang et al., Preparation and corrosion resistance of magnesium phytic acid/ hydroxyapatite composite coatings on biodegradable AZ31 magnesium alloy, J Mater Sci: Mater Med, 28-82, 2017
- *32.* Isaiah Adekanmbi, Christopher Z. Mosher, Helen H. Lu et al., *mechanical behaviour of biodegradable AZ31 magnesium alloy after long term in vitro degradation,* Materials Science and Engineering C, 77, 1135-1144, 2017.
- 33. ASTM G31-21, Standard Guide for Laboratory Immersion Corrosion Testing of Metals
- 34. Johant Lakey-Beitia, Andrea M.Burillo, Giovanni La Penna et al., Polyphenols as Potential Metal Chelation Compounds Against Alzheimer's Disease, J Alzheimers Dis, 2021.
- 35. J.L. Gamble, *Chemical anatomy, physiology and pathology of extracellular fluid: a lecture syllabus*, Dept. of Pediatrics, Harvard Medical School, Cambridge, 1941.
- 36. Min Zhang, Shu Cai, Feiyang Zhang et al., Preparation and corrosion resistance of magnesium phytic acid/ hydroxyapatite composite coatings on biodegradable AZ31 magnesium alloy, J Mater Sci: Mater Med, 28-82, 2017
- *37.* Jemimah Walker,1 Shaylin Shadanbaz,1 Nicholas T. Kirkland et al., *Magnesium alloys: Predicting in vivo corrosion with in vitro immersion testing*, J Biomed Mater Res PartB, 1134–1141, 2012.
- 38. Isaiah Adekanmbi, Christopher Z. Mosher, Helen H. Lu et al., *mechanical behaviour* of biodegradable AZ31 magnesium alloy after long term in vitro degradation, Materials Science and Engineering C, 77, 1135-1144, 2017.

#### Siti web

39. http://www.icvbc.cnr.it/Strumentazione/SEM-EDS.html

40. https://www.dynacast.com/en/knowledge-center/material-information/die-castmetals/magnesium-casting-metals/az91d