

POLITECNICO DI TORINO

Collegio di Ingegneria Biomedica

**Corso di Laurea Magistrale
in Ingegneria Biomedica**

Tesi di Laurea Magistrale

**Stampa 3D di scaffold ossei fotoreticolati
a base di olio di soia epossidato acrilato
con aggiunta di vetro bioattivo dopato con
rame**



Relatori

Prof. Marco Sangermano
Prof.ssa Marta Miola

Candidato

Michele Grasso

Dicembre 2024

Sommario

1. Introduzione	4
1.1 Il tessuto osseo.....	4
1.2 Le cellule ossee.....	5
1.3 Morfologia e proprietà meccaniche del tessuto osseo	5
1.4 Il rimodellamento osseo.....	8
1.5 Ingegneria del tessuto osseo (bone tissue engineering - BTE).....	9
2. Scaffold	10
2.1 Requisiti biologici.....	10
2.2 Requisiti strutturali e proprietà meccaniche	11
2.3 Biomateriali utilizzati	12
2.4 Vetri bioattivi.....	14
2.5 Tecniche di produzione degli scaffold – Stampa 3D.....	16
3. Materiali e Metodi.....	20
3.1 Materiali.....	20
3.2 Sintesi dei vetri bioattivi.....	21
3.3 Preparazione delle formulazioni e fotoreticolazione	25
3.4 Tecniche di caratterizzazione	27
3.4.1 Spettroscopia infrarossa a trasf. di Fourier a riflettanza totale attenuata (ATR-FTIR). 27	
3.4.2 Foto calorimetria a scansione differenziale (Foto-DSC).....	29
3.4.3 Reologia.....	30
3.4.4 Analisi termiche dinamo-meccanica (DMTA).....	30
3.4.5 Processo di stampa 3D.....	32
3.4.6 Prove a compressione	33
3.4.7 Caratterizzazione degli scaffold compositi.....	34
3.5 Valutazione della citocompatibilità e dell'attività metabolica	35
3.5.1 Colture cellulari	35
3.5.2 Valutazione della citompatibilità.....	35
3.5.3 Valutazione dell'attività antibatterica.....	36
4. Risultati e discussione	37
4.1 Processo di fotoreticolazione.....	37
4.2 Proprietà termiche e meccaniche degli scaffold a base di AESO fotoreticolati.....	39
4.3 Reologia.....	41
4.4 Processo di stampa 3D.....	43

4.5 Prove di compressione.....	47
4.6.1 Valutazione della citocompatibilità.....	48
4.6.2 Valutazione dell'antibattericità.....	51
5. Conclusioni.....	53
6. Bibliografia.....	54
Ringraziamenti.....	58

1. Introduzione

Questo lavoro di tesi si propone come obiettivo la realizzazione di uno scaffold osseo fotoreticolato e stampato in 3D, a base di olio di soia epossidato acrilato (AESO), diluito con isobornil acrilato (IBOA) e a cui si aggiunge un fotoiniziatore (Irgacure 819), rinforzato con vetro bioattivo 77S dopato con rame. Esso nasce come prosecuzione del lavoro di ricerca di Bergoglio et al. [1], in cui gli scaffold fotoreticolati e realizzati tramite stampa 3D presentano essenzialmente la stessa composizione di base ma sono rinforzati con particelle di vetro bioattivo in cui non è presente il rame. Questo viene quindi aggiunto principalmente per sfruttarne le proprietà batteriche e angiogeniche ma, allo stesso tempo, per valutarne l'eventuale citotossicità e gli effetti sulla vitalità cellulare.

Qui di seguito si introdurranno le principali caratteristiche del tessuto osseo, in particolare la sua composizione e le sue proprietà meccaniche e morfologiche, necessarie per comprendere i vari aspetti presi in considerazione in questa ricerca. Si passerà poi all'analisi degli scaffold, in particolare gli scaffold per sostituzione di tessuto osseo, e si osserveranno i loro parametri e requisiti fondamentali. Si concluderà quindi con la trattazione specifica dei materiali impiegati e l'analisi della tecnica di stampa 3D utilizzata nella progettazione e produzione dello scaffold qui considerato.

1.1 Il tessuto osseo

Il tessuto osseo è una particolare tipologia di tessuto connettivo, plastico e dinamico, capace di modificare la propria struttura in risposta a stimoli di natura meccanica e organica. È continuamente soggetto a rimodellamento, maturazione, differenziazione e riassorbimento durante il suo ciclo vitale. Il rimodellamento osseo è ciò che permette all'osso di rinnovarsi e auto-ripararsi.

La principale funzione del tessuto osseo è quella di sostenere e proteggere il corpo umano e i suoi organi vitali, permettendo inoltre la locomozione e il movimento in combinazione con il sistema muscolare. Oltre alle funzioni strutturali l'osso svolge però altri importanti compiti, quali la sintesi dei fattori di crescita, la regolazione dell'omeostasi grazie alle riserve di sali minerali e, ospitando al suo interno il midollo osseo, ha anche funzione emopoietica. [2]

Il tessuto osseo è un tessuto complesso, altamente mineralizzato e caratterizzato da un'elevata vascolarizzazione. Esso è composto principalmente da una matrice extracellulare in cui sono immerse cellule ossee di vario tipo, può inoltre essere considerato un materiale composito dato che al suo interno si trovano sia componenti organiche sia componenti inorganiche. La matrice extracellulare e le varie cellule ossee sono infatti costituite da parti organiche (30-35% del peso) e parti inorganiche (65-70% del peso).

La componente organica della matrice extracellulare consiste principalmente in fibre di collagene di tipo I, che conferiscono flessibilità ed elasticità all'osso, insieme ad altre proteine non collageniche, proteoglicani e fattori di crescita. La fase inorganica, invece, è minerale e include al suo interno fosfati e carbonati di calcio sotto forma di cristalli di idrossiapatite, responsabili della durezza e della resistenza a compressione del tessuto osseo.

La restante componente organica dell'osso è formata in larga parte da osteociti, osteoblasti, osteoclasti e cellule osteoprogenitrici, che sono tutte coinvolte nei processi di crescita, produzione e riassorbimento del tessuto osseo. [3]

1.2 Le cellule ossee

Le varie tipologie di cellule che si possono ritrovare all'interno del tessuto osseo sono contraddistinte dalle seguenti caratteristiche e funzioni.

- **Cellule osteoprogenitrici o preosteoblasti:** sono cellule mesenchimali con proprietà staminali, possono infatti proliferare e differenziarsi in osteoblasti. Si trovano principalmente nel periostio e nell'endostio e, quando attivate, si occupano della formazione di nuovo tessuto osseo.
- **Osteoblasti:** precursori degli osteociti, sono cellule globose e altamente polarizzate. Sintetizzano componenti organiche per la matrice ossea e depositano componenti inorganiche dell'osso, hanno quindi funzioni osteogeniche. Sono localizzate nello strato osteogenico del periostio e dell'endostio e nelle zone di espansione. Quando termina la neoformazione di tessuto osseo, gli osteoblasti rimangono intrappolati nelle lacune della matrice prodotta da loro stessi, trasformandosi poi in osteociti.
- **Osteociti:** sono cellule dalla forma irregolare, il cui citoplasma presenta svariate estensioni e prolungamenti. Si trovano in cavità che si sono formate nelle lamelle della matrice, dette "lacune ossee". A partire da queste fessure ossee si dipartono dei canalicoli attraverso cui le cellule vicine riescono ad entrare in contatto; giunzioni comunicanti e capillari presenti all'interno di questi canali permettono scambi nutritivi e gassosi tra gli osteociti stessi e tra gli osteociti e il sangue. Gli osteociti sono coinvolti nel rimodellamento osseo e nel mantenimento della matrice extracellulare dell'osso.
- **Osteoclasti:** non fanno parte della linea osteoprogenitrice ma derivano dalla fusione di numerosi monociti precursori (fino a 30 unità) provenienti dal midollo osseo. Sono quindi cellule giganti polinucleate e sono mobili. Possiedono numerosi lisosomi e sono deputati al riassorbimento e quindi alla distruzione del tessuto osseo, permettendo quindi il rimodellamento osseo. Si trovano sulla superficie delle trabecole ossee in via di riassorbimento e sono accolti in fossette dette "lacune di Howship", che si creano in seguito all'erosione della matrice extracellulare del tessuto osseo.

1.3 Morfologia e proprietà meccaniche del tessuto osseo

Il tessuto osseo può essere classificato in due principali categorie: tessuto osseo trabecolare e tessuto osseo lamellare. Il primo rappresenta il tessuto osseo primario ed è presente principalmente durante la vita prenatale e nei neonati ma può tornare a comparire anche in età adulta ad esempio in seguito ad una frattura, o comunque in caso di neo-deposizione di tessuto osseo. L'osso lamellare costituisce invece la maggior parte del tessuto osseo nei mammiferi adulti ed è organizzato in lamelle, che consistono in fibre di collagene disposte longitudinalmente e contenenti piccole lacune in cui si trovano gli osteociti.

Il tessuto osseo lamellare, proprio grazie alla sua particolare organizzazione strutturale (figura 1.1) e alla sua composizione chimica, presenta grande resistenza a trazione, compressione e agli stress meccanici in generale.

L'osso lamellare si divide a sua volta in:

- Tessuto osseo lamellare compatto, composto principalmente da lamelle concentriche complete (come succede ad esempio nelle diafisi ossee).
- Tessuto osseo lamellare spugnoso o trabecolare, che invece è caratterizzato da strutture lamellari incomplete che presentano quindi cavità interconnesse (presente nelle epifisi).

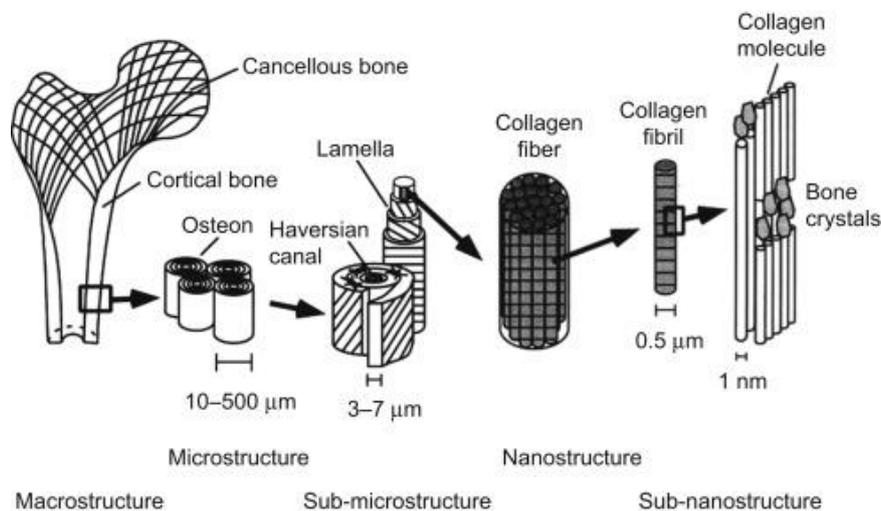


Figura 1.1: Struttura gerarchica dell'osso

Dal punto di vista della matrice i due tipi di tessuto presentano in realtà la stessa composizione complessiva ma ciò che cambia è la struttura tridimensionale, che li differenzia in termini funzionali e fisiologici, essendo caratterizzata da diversa densità e porosità e quindi da una diversa attività metabolica. [4]

Il tessuto osseo compatto (figura 1.2) è contraddistinto da una grande durezza ed è attraversato da numerosi canali contenenti vasi sanguigni e dotti linfatici, visibili soltanto al microscopio. Esso costituisce in peso circa l'80% del tessuto osseo presente in un individuo adulto e nasce dall'unione di lamelle ossee concentriche che si sviluppano intorno ad un vaso sanguigno longitudinale, detto canale di Havers, che fornisce nutrienti al tessuto circostante. Queste unità strutturali appena descritte vengono definite osteoni e sono collegate tra loro, ma anche con il canale midollare e con la superficie libera dell'osso, da dotti trasversali detti canali di Volkmann. Tra osteoni adiacenti troviamo invece l'osso interstiziale.

Il tessuto osseo compatto, o corticale, si trova principalmente nella porzione più esterna dell'osso (periostio) e deve il suo nome proprio alla ridotta porosità, compresa tra il 5% e il 30%. Possiede caratteristiche anisotrope in quanto vi è una direzione di carico preferenziale che è quella longitudinale, nella quale presenta proprietà meccaniche superiori rispetto alle altre. Questa è la componente dell'osso dotata di maggiore durezza e resistenza, caratterizzata da un modulo di compressione di 100-230 MPa e un modulo di Young di 7-30 GPa.

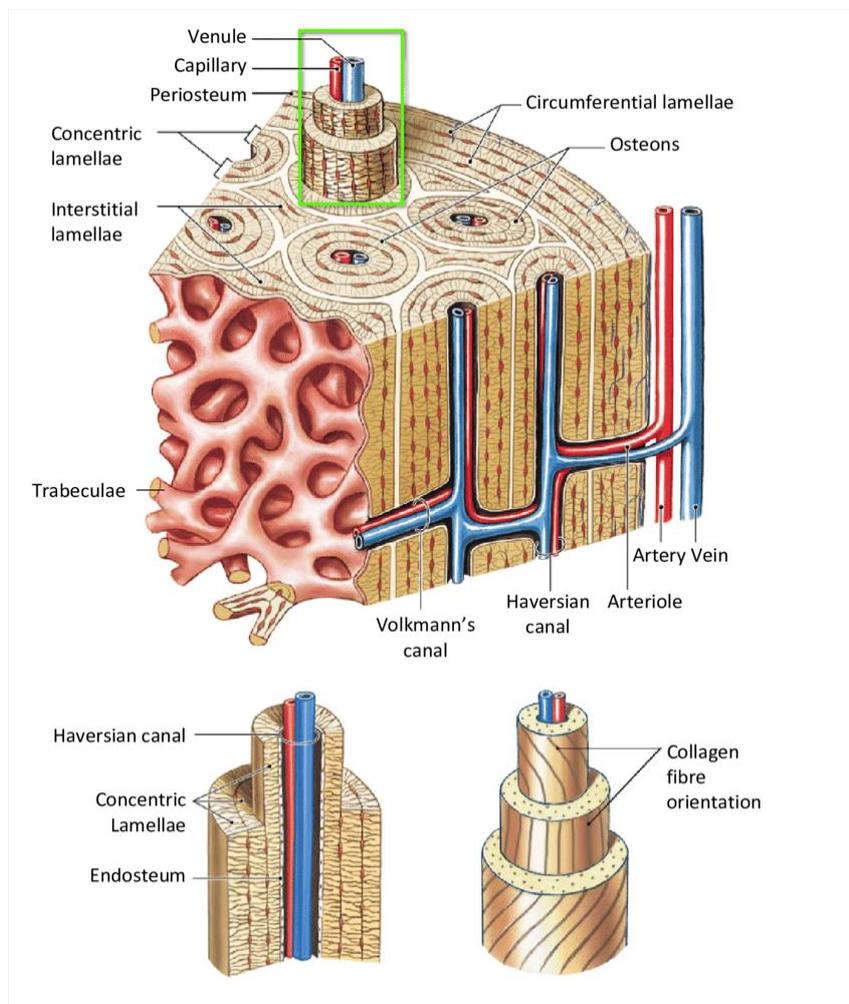


Figura 1.2: Struttura dell'osso compatto

L'osso spugnoso (figura 1.3) si presenta invece come un reticolo tridimensionale di osso trabecolare in cui gli spazi vuoti sono riempiti da midollo osseo, oltre a vasi e nervi, e sono appunto detti cavità midollari. Anche in questo caso sono presenti lamelle di collagene con depositi di idrossiapatite, ma non c'è un orientamento specifico e non è presente alcun canale di Havers. Il tessuto spugnoso è caratterizzato quindi da una struttura reticolata che si rivela molto porosa e che presenta di conseguenza un elevato rapporto superficie/volume, e ciò gli conferisce maggiore resistenza alla compressione nonostante la minore densità ossea. [3]

Anche il tessuto osseo spugnoso presenta un comportamento anisotropo, dovuto però al diverso orientamento delle trabecole ossee che cambia a seconda del carico a cui sono sottoposte e alla loro disposizione nello spazio.

L'osso spugnoso è collocato per la maggior parte nella porzione più interna dell'osso (endostio) e presenta una porosità elevata, compresa tra il 30% e il 90%. Esso è meno rigido e meno resistente dell'osso compatto ma la sua struttura lo rende più leggero ed elastico e capace comunque di sopportare e sorreggere dei carichi. Il suo modulo a compressione varia tra i 2 MPa e i 12 MPa, mentre il modulo di Young è compreso tra 0,05 GPa e 0,5 GPa. [5]

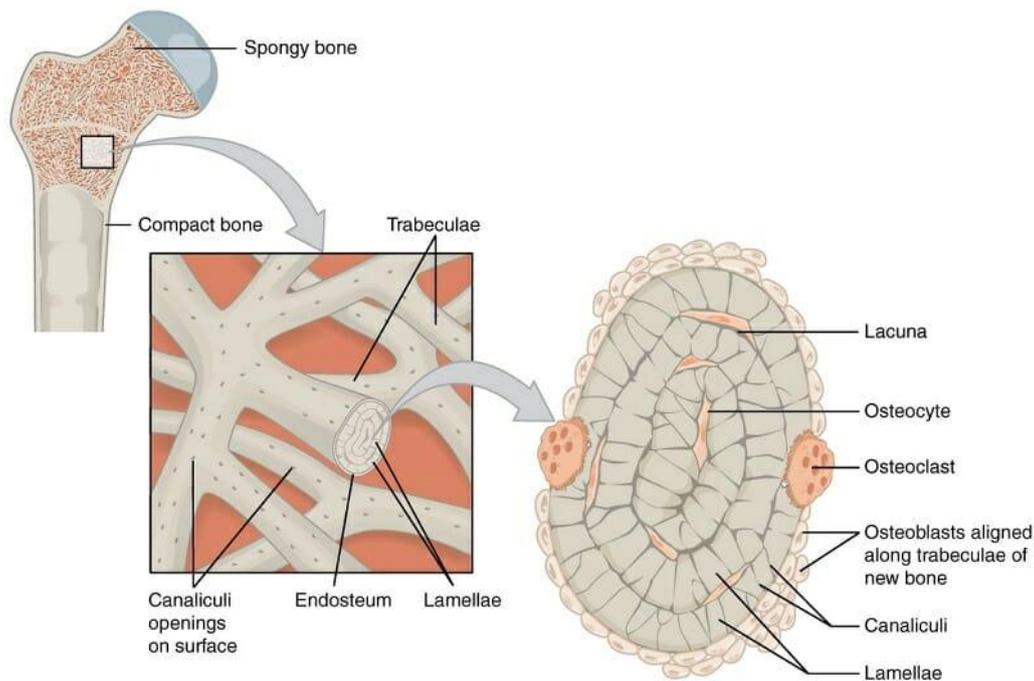


Figura 1.2: Struttura dell'osso spugnoso

1.4 Il rimodellamento osseo

Il tessuto osseo non è statico ma è caratterizzato da un continuo rimodellamento, un processo di adattamento strutturale in cui sono coinvolti osteoblasti e osteoclasti e che permette all'osso di rinnovarsi e risanarsi ciclicamente. [6,7]

A questo proposito, la legge di Wolff (1892) afferma proprio che l'osso si rimodella costantemente, adattandosi agli sforzi meccanici e ai carichi a cui è sottoposto. Il tessuto osseo è quindi in grado di rispondere e reagire a stimoli organici e meccanici, siano essi statici o dinamici, attraverso il riadattamento e il rimodellamento della sua struttura interna.

Ciò significa che un aumento di carico imposto all'osso porterà, in determinate condizioni, ad un processo di rimodellamento che renderà l'osso resistente a quel carico, principalmente grazie alla capacità delle trabecole di adattarsi e di addensarsi. Allo stesso modo però, se il carico trasmesso all'osso dovesse diminuire il tessuto osseo diventerà più debole e peggioreranno le sue proprietà meccaniche. [8]

Quando l'osteometabolismo, cioè l'equilibrio tra osteoblasti e osteoclasti, viene meno si presentano malattie ossee. La più comune è sicuramente l'osteoporosi, caratterizzata da una progressiva demineralizzazione dell'osso con un conseguente aumento di fragilità dello stesso. Oltre ad essa, però, possono presentarsi molte altre patologie tra cui infezioni, tumori delle ossa, malattie congenite date da alterazioni genetiche o anche fratture ossee. [9]

Grazie alla grande capacità rigenerativa dell'osso, la maggior parte delle fratture non richiede un intervento chirurgico, ma non si può dire lo stesso in casi gravi dove il danno è esteso e la funzione dell'osso è compromessa e la chirurgia si rende quindi necessaria.

1.5 Ingegneria del tessuto osseo (bone tissue engineering - BTE)

Quando le patologie o le fratture a carico dell'osso sono molto gravi esso non è in grado di auto-ripararsi e di guarire in modo autonomo, e ciò è dovuto principalmente al fatto che in questi casi anche la vascolarizzazione e la capacità del tessuto di differenziarsi sono seriamente compromesse.

In epoca moderna, fortunatamente, la medicina si è evoluta in ogni campo e anche nel restauro dei tessuti ossei sono stati raggiunti grandi risultati.

Ovviamente i trattamenti e le tecniche utilizzate variano a seconda della patologia, ma tra le pratiche più ricorrenti possiamo trovare la terapia protesica, l'utilizzo di innesti ossei (che si distinguono in autologhi o allogenici a seconda del donatore) e l'ingegneria del tessuto osseo o BTE – Bone Tissue Engineering. [7]

Negli ultimi decenni, la medicina rigenerativa e l'ingegneria tissutale si sono affermate come soluzioni promettenti nella ricostruzione dell'osso e nella cura delle problematiche ossee causate da traumi, infortuni, patologie o semplicemente dall'età media dei pazienti, costantemente in crescita. Questo tipo di ingegneria ha l'obiettivo di creare innesti (grafts) e scaffold che siano efficaci e riproducibili nella riparazione dell'osso, grazie alla loro capacità di promuovere neo-formazione di tessuto osseo.

L'ingegneria tissutale si presenta come un approccio alternativo ma dalle grandi potenzialità nella branca della medicina rigenerativa ed è stata definita da Langer e Vacanti nel 1993 come “un campo interdisciplinare che applica i principi dell'ingegneria e della scienza della vita con il fine di sviluppare sostituti biologici che ripristinino, mantengano o migliorino le funzioni dei tessuti e degli organi”. [10]

I sostituti biologici così riprodotti, al fine di promuovere la formazione e la crescita di nuovo tessuto osseo (osteosintesi), devono garantire importanti funzioni di adesione cellulare, migrazione e differenziazione delle cellule, diffusione dei nutrienti e delle sostanze secrete dalle cellule stesse, oltre a permettere la vascolarizzazione e il supporto delle funzioni meccaniche e biologiche del tessuto. [6]

In particolare nell'ambito dell'ingegneria tissutale ossea ci si pone l'obiettivo di realizzare degli scaffold ossei, cioè strutture tridimensionali in grado di emulare la matrice extracellulare e capaci di promuovere e sostenere la rigenerazione cellulare dell'osso e che siano idealmente biocompatibili, biodegradabili, biomimetici e bioattivi. [11] È inoltre possibile incrementare l'osteosintesi e l'osteoinduzione, ovvero la capacità di stimolare la sintesi di nuovo tessuto osseo attraverso specifici segnali biologici e chimici, grazie all'introduzione nello scaffold di fattori di crescita specifici (Grow Factors – GF). Si possono quindi ottenere risultati ancora più soddisfacenti nella rigenerazione o nella sostituzione del tessuto osseo danneggiato, grazie a studi e ricerche che combinano i metodi ingegneristici con l'utilizzo di apposite sostanze e fattori biochimici. [12, 13, 14]

2. Scaffold

Nel campo dell'ingegneria tissutale ossea, lo scaffold è un impianto di biomateriale utilizzato per riparare i difetti ossei. Si tratta di un'impalcatura tridimensionale artificiale che supporta e stimola il tessuto osseo durante lo sviluppo e la crescita.

Per permettergli tutto questo, lo scaffold è realizzato in modo da imitare la matrice extracellulare del tessuto osseo, possiede la corretta struttura e simula l'ambiente adatto alla migrazione e all'adesione cellulare, promuovendo la crescita e la differenziazione delle cellule stesse. È infatti fondamentale che favorisca l'osteogenesi e la vascolarizzazione al suo interno, per consentire la sintesi di nuovo tessuto osseo.

Gli scaffold devono inoltre prevenire la risposta infiammatoria dei tessuti circostanti in seguito alla loro introduzione nell'organismo e devono essere in grado di comunicare con le strutture circostanti all'interno del corpo umano. Per facilitare e rendere possibili questi processi, gli scaffold vengono funzionalizzati e possono contenere cellule e proteine (ad esempio fattori di crescita) capaci di rilasciare particolari molecole in grado di promuovere l'adesione cellulare e che possono partecipare attivamente nei processi rigenerativi dell'osso. [15]

Prima di tutto il resto, lo scaffold è una struttura temporanea che verrà sostituita nel tempo dalla neo-formazione di tessuto osseo. Per questo motivo la sua architettura deve essere in grado di supportare dei carichi durante la sintesi di nuovo tessuto, e inoltre la sua degradazione non deve rilasciare sostanze tossiche nell'organismo.

2.1 Requisiti biologici

Nella progettazione di uno scaffold devono essere rispettati vari requisiti di diversa natura che promuovano e consentano la formazione e lo sviluppo del nuovo tessuto, evitando però di dare vita a reazioni avverse.

Tra i requisiti biologici richiesti possiamo trovare:

- **Biocompatibilità:** si riferisce alla capacità dello scaffold di minimizzare il rischio di citotossicità, evitando quindi risposte infiammatorie, e di permettere l'integrazione nel tessuto ospite. È un requisito indispensabile per permettere l'interazione con le cellule e i tessuti circostanti, consentendo quindi l'adesione e la crescita cellulare. Ciò significa che la superficie dello scaffold deve essere assimilabile all'ambiente fisiologico in cui si sviluppano naturalmente le cellule.
- **Biodegradabilità e biorisorbibilità:** sono aspetti fondamentali che permettono allo scaffold di essere gradualmente sostituito dal nuovo tessuto osseo senza che vi sia la necessità di rimuoverlo attraverso un intervento chirurgico. La velocità di degradazione e riassorbimento dello scaffold è molto importante in quanto deve garantire la corretta stabilità meccanica durante la sintesi di nuovo tessuto osseo. Se la degradazione dello scaffold dovesse risultare troppo lenta questo andrebbe ad interferire con il rimodellamento del tessuto ma, al contrario, se fosse troppo rapida lo scaffold non avrebbe possibilità di sostenere nel modo corretto la sintesi del tessuto. I prodotti di degradazione inoltre non devono essere tossici e devono essere facilmente metabolizzati dall'organismo. [16]

- **Bioattività:** riguarda la capacità dello scaffold di interagire e comunicare con l'ambiente circostante. Ha l'obiettivo di promuovere la migrazione delle cellule, la formazione di nuovo tessuto, evitando una possibile risposta infiammatoria da parte del sistema immunitario.

Si richiede quindi che lo scaffold sia osteoinduttivo e osteoconduttivo. L'osteoinduttività induce il processo osteogenico, permettendo alle cellule di aderire, proliferare e differenziarsi. Questo significa stimolare la differenziazione delle cellule osteoprogenitrici nel sito del difetto osseo, e per migliorare questo processo spesso si ricorre alla funzionalizzazione della superficie dello scaffold con peptidi osteogenici. L'osteoconduttività riguarda invece la capacità dello scaffold di permettere la produzione di matrice mineralizzata, la creazione di un forte legame con il tessuto e di evitare la formazione di una capsula di tessuto fibroso intorno a tutta la struttura (risposta infiammatoria).

L'osteointegrazione fa invece riferimento al fissaggio tra lo scaffold e l'osso. Nel caso di cattiva osteointegrazione la stabilità meccanica e la vascolarizzazione dello scaffold saranno compromesse, aumentando le possibilità di rigetto dell'impianto.

I requisiti biologici sono a loro volta influenzati da altri parametri quali la morfologia e le proprietà meccaniche e strutturali dello scaffold, oltre alle caratteristiche del biomateriale utilizzato. [7,17,18]

2.2 Requisiti strutturali e proprietà meccaniche

Per permettere una buona adesione cellulare e consentire una corretta osteogenesi, la prima porzione dello scaffold da considerare è sicuramente la sua superficie dato che, dopo l'impianto, questa si trova direttamente a contatto con le cellule e con il tessuto circostante. Studi hanno evidenziato che la superficie dello scaffold deve essere permeabile per consentire lo scambio di fluidi biologici, quali nutrienti e scarti cellulari, ma anche per permettere la migrazione cellulare. (È stato inoltre dimostrato che una superficie porosa/ruvida è capace di trattenere matrice di fibrina, che facilita la migrazione delle cellule osteogeniche dal tessuto alla superficie del materiale.)

Un altro fattore critico da considerare è sicuramente la struttura tridimensionale dello scaffold, questa deve infatti emulare l'architettura non omogenea dell'osso e per questo si dovrà ricorrere ad una geometria stratificata e a più livelli, che possa mimare la naturale morfologia del tessuto osseo.

Lo scaffold ideale deve presentare una struttura porosa interconnessa con una dimensione ottimale dei pori compresa tra i 100 μm e i 500 μm , necessaria per ospitare le cellule ossee appena formate e per favorire quindi la crescita cellulare. Le interconnessioni dei pori sono invece dei canali che collegano tra loro pori adiacenti e sono fondamentali per garantire una buona vascolarizzazione e la formazione di un'adeguata rete angiogenica del tessuto, favorendo quindi lo scambio di ossigeno e nutrienti ma anche l'eliminazione di scarti metabolici. [17, 19]

La percentuale di porosità influisce sulle proprietà di resistenza meccanica e strutturale dello scaffold e le dimensioni dei pori, invece, influiscono sull'adesione e sulla crescita cellulare. Oltre alle dimensioni dei pori è possibile variare anche il loro orientamento, con tecniche apposite, per favorire l'osteosintesi lungo una specifica direzione.

Il grado di porosità influisce direttamente sull'adesione cellulare, sulla biodegradazione dello scaffold e sulla velocità di rilascio dei farmaci con cui questo è stato funzionalizzato, poiché varia di fatto la quantità di superficie disponibile per lo scambio e le interazioni tra cellule e scaffold. Un elevato livello di porosità è infatti associato ad un maggiore rapporto superficie/volume e questo agevola l'adesione cellulare e quindi la sintesi di nuovo tessuto osseo. Valori di porosità troppo alti rischiano però di ridurre eccessivamente le proprietà meccaniche dello scaffold, rendendolo inadatto al compito di supportare carichi e sforzi esterni. Ciò significa che la porosità e la dimensione dei pori non sono parametri fissi ma derivano dalla ricerca di un equilibrio tra osteosintesi e caratteristiche meccaniche dello scaffold. [20, 21]

2.3 Biomateriali utilizzati

Vi sono diverse categorie di materiali che possono essere utilizzati nell'ingegneria tissutale dell'osso (BTE):

- Metallici;
- Ceramici;
- Polimerici, che possono essere naturali o sintetici;
- Compositi.

Ogni materiale presenta ovviamente proprietà diverse, con annessi vantaggi e svantaggi, e si rende quindi più o meno adatto a seconda dell'applicazione finale e del sito d'impianto. La scelta dovrà quindi basarsi non soltanto sulla biocompatibilità e sulle proprietà osteoinduttive e osteoconduttive del materiale ma anche e soprattutto sulle caratteristiche meccaniche che dovrà garantire una volta impiantato.

I materiali metallici, come ad esempio il titanio e le leghe a base di titanio ma anche le leghe di cromo-cobalto, vengono solitamente preferiti ed utilizzati negli impianti ortopedici, soprattutto in caso di protesi articolari e trattamento di fratture ossee (fissatori interni ed esterni). Ciò è dovuto sicuramente alle loro ottime proprietà meccaniche, in particolare all'elevata resistenza a deformazione, ma anche alla biocompatibilità e ai costi di produzione relativamente bassi. A loro sfavore giocano però la non biodegradabilità e la tendenza alla corrosione in vivo all'interno dell'organismo. [22]

La famiglia dei materiali ceramici racchiude al suo interno composti inorganici non metallici, che possono essere cristallini oppure amorfi. I bioceramici ricoprono un ruolo di particolare importanza nell'ingegneria tissutale dell'osso soprattutto grazie alla loro elevata bioattività, per la resistenza alla corrosione e la bassa velocità di degradazione. Possiedono poi ottime caratteristiche meccaniche di durezza e resistenza a compressione ma si rivelano fragili se sollecitati a sforzi di trazione o di taglio e, inoltre, i costi di lavorazione sono piuttosto alti. Vengono solitamente prodotti tramite sinterizzazione o fusione di materie inorganiche e trovano largo impiego come rivestimento di elementi protesici e impianti ossei metallici (es. protesi d'anca). [23]

I materiali ceramici cristallini maggiormente utilizzati nell'ambito dell'ingegneria tissutale ossea sono sicuramente l'idrossiapatite (HAp), il tricalcio fosfato e i loro compositi. Questi composti sono infatti presenti all'interno della matrice inorganica dell'osso e sono quindi capaci di stimolare la formazione di nuovo tessuto osseo, risultano perciò osteoconduttivi oltre che altamente biocompatibili. [24]

Per quanto riguarda i materiali ceramici amorfi, risultano particolarmente interessanti in ambito osseo i vetri bioattivi (detti anche biovetri), grazie appunto alla loro elevata bioattività. Essi, infatti, sono caratterizzati da un particolare meccanismo che si innesca in seguito all'impianto nel tessuto osseo e che porta alla formazione di uno strato di idrossiapatite proprio sulla superficie del vetro bioattivo. Questo strato è molto attivo dal punto di vista biologico e ciò permette al vetro bioattivo di interagire con l'ambiente circostante, favorendo la sintesi di nuovo tessuto osseo, a tal punto da osteointegrarsi perfettamente all'interno dell'osso in cui è stato impiantato. Una volta concluso questo processo sarebbe infatti necessario rompere il tessuto osseo circostante per prelevare il vetro bioattivo e rimuoverlo dal sito d'impianto. [25]

Tra le varie categorie citate troviamo poi i materiali polimerici, siano essi naturali oppure sintetici [22]. Anch'essi hanno trovato largo impiego nell'ambito dell'ingegneria dei tessuti, principalmente grazie alla loro processabilità, alla biodegradabilità e alla biocompatibilità.

I polimeri naturali possono essere ottenuti sia dal mondo animale (ad esempio nel caso del collagene o dell'acido ialuronico) sia dal mondo vegetale (come per la cellulosa e l'alginato) e questo significa che gran parte di essi sono dotati di ottima biocompatibilità e buoni livelli di bioattività, poiché già presenti nel nostro organismo. Il loro principale svantaggio risiede certamente nelle proprietà meccaniche che, nel caso dei tessuti ossei, non risultano sicuramente adatte a supportare strutturalmente l'osso durante la sua crescita e nella formazione di nuovo tessuto.

Al contrario, i polimeri sintetici, come l'acido polilattico (PLA) o il policaprolattone, possono garantire caratteristiche meccaniche migliori, adeguate al sostegno dell'osso durante i processi di osteosintesi, e sono inoltre riproducibili in larga scala, facilmente processabili e molto versatili, poiché le loro proprietà possono essere modulate. [17] A differenza dei polimeri naturali, però, i polimeri sintetici presentano livelli di bioattività più bassi e minori interazioni con il tessuto circostante e, inoltre, durante la loro degradazione rischiano di rilasciare prodotti tossici che potrebbero scatenare una forte risposta infiammatoria. Si deve poi anche notare che spesso questi polimeri sintetici derivano da lavorazioni del petrolio o da loro sottoprodotti per quanto riguarda le materie prime e non risultano quindi sostenibili dal punto di vista ambientale [26]

A questo proposito, recenti sviluppi nelle alterazioni chimiche dei biopolimeri naturali promettono soluzioni interessanti nelle applicazioni dell'ingegneria dei tessuti. L'olio di soia epossidato acrilato (AESO) ne è un esempio e consiste in una struttura di trigliceridi funzionalizzati con gruppi acrilati, che possono essere sfruttati per il processo di reticolazione UV. [27, 28, 29] Questi trigliceridi sono composti da acidi grassi naturali, non risultano quindi citotossici e sono facilmente degradabili dai processi metabolici umani. Grazie a tutte queste caratteristiche, l'olio di soia epossidato acrilato ha riscosso molto interesse come possibile matrice polimerica per la realizzazione di scaffold in ambito biomedico. [30, 31]

Quando si utilizzano materiali polimerici, inoltre, si deve tenere in forte considerazione il loro impatto ambientale e la loro sostenibilità. Da questo punto di vista, sarebbe molto vantaggioso riuscire a realizzare uno scaffold dotato di tutte le proprietà fondamentali di un materiale biocompatibile e che risulti anche sostenibile. Il gruppo di ricerca di Bergoglio et al. [1] ha esaminato attentamente i processi di sintesi dei polimeri, in particolare prendendo in considerazione la fotochimica come alternativa ai processi di sintesi più convenzionali, maggiormente dispendiosi dal punto di vista energetico. [32, 33, 34] Il processo di fotopolimerizzazione UV è più efficiente della classica polimerizzazione termica poiché utilizza raggi UV meno energetici e i tempi sono decisamente minori in quanto richiedono minuti e non ore per completare il processo. I processi foto-indotti possono essere divisi in due categorie a seconda del meccanismo utilizzato: radicalico o cationico. [35, 36, 37]. Diversi

articoli [31, 38, 39] hanno dimostrato che la fotopolimerizzazione radicalica è particolarmente efficace in presenza di monomeri acrilati in condizioni inerti, ed è questo infatti il meccanismo che avviene nella fotopolimerizzazione dell'AESO.

Concludendo, si può osservare che ogni categoria di materiali analizzata fino ad ora presenta dei vantaggi ma anche degli svantaggi nel cercare di riprodurre le caratteristiche e le proprietà del tessuto osseo ed è proprio per questo motivo che sono stati messi a punto i materiali compositi. Come abbiamo visto, l'osso è composto principalmente da una porzione organica di fibre di collagene e da una parte inorganica formata da cristalli di apatite, quindi probabilmente la soluzione migliore è combinare due materiali differenti. I biomateriali compositi (detti anche biocompositi) sono appunto combinazioni di materiali ceramici e polimerici, oppure metallici e polimerici oppure ancora polimeri naturali e polimeri sintetici, il cui scopo è proprio quello di sviluppare le caratteristiche migliori per il fine proposto.

Molto spesso i materiali compositi sono formati da una porzione polimerica, che conferisce caratteristiche di durezza, resistenza alla compressione e biocompatibilità, e da una metallica o ceramica, che rappresenta la fase inorganica e migliora le proprietà meccaniche e la velocità di degradazione del composito. [6, 7, 15, 17, 18]

Una buona combinazione di materiali, in grado di compensare vantaggi e svantaggi reciproci, è risultata essere negli anni quella tra polimeri e ceramici. I materiali polimerici risultano infatti deboli dal punto di vista meccanico ma l'aggiunta di bioceramici è in grado di rinforzarli strutturalmente, oltre che di aumentarne la bioattività e migliorarne le cinetiche di degradazione. [40] In questo particolare lavoro di tesi si analizzerà un materiale composito formato da una parte polimerica, l'olio di soia epossidato acrilato (AESO) che forma la matrice di base, in cui è stato incorporato un materiale ceramico, cioè il vetro bioattivo 77S rinforzato con rame che funge invece da fase di rinforzo.

2.4 Vetri bioattivi

I vetri bioattivi sono ceramici amorfi molto utilizzati nelle applicazioni di ingegneria tissutale poiché, così come l'idrossiapatite, sono in grado di stimolare la formazione di nuovo tessuto osseo. Essi sono infatti capaci di riprodurre una superficie simile per forma e composizione alla matrice extracellulare del tessuto osseo, grazie al loro singolare meccanismo di bioattività. Questo consiste essenzialmente nella formazione di uno strato di idrossiapatite, biologicamente attivo e chimicamente molto simile alla fase minerale dell'osso, in corrispondenza della superficie esposta ai fluidi biologici. [41, 42]

Le caratteristiche principali di questi vetri possono variare con l'aggiunta di ossidi. [43]

I vetri bioattivi sono stati oggetto di studio da parte del professor Larry Hench a partire dal 1969, anno in cui egli stesso ha sintetizzato il primo vetro bioattivo poi denominato 45S5 Bioglass®. Questo vetro bioattivo è caratterizzato dalla seguente composizione: 45%mol SiO₂ - 24.5%mol Na₂O - 24.5%mol CaO - 6%mol P₂O₅, ed essendo un vetro silicato è composto da tetraedri di silice che condividono ai vertici quattro atomi di ossigeno, formando ponti Si-O-Si. All'interno della struttura reticolata, il sodio (Na) e il calcio (Ca) rivestono il ruolo di modificatori e quindi "rompono" il reticolo, come si può notare nella figura 2.1. [13]

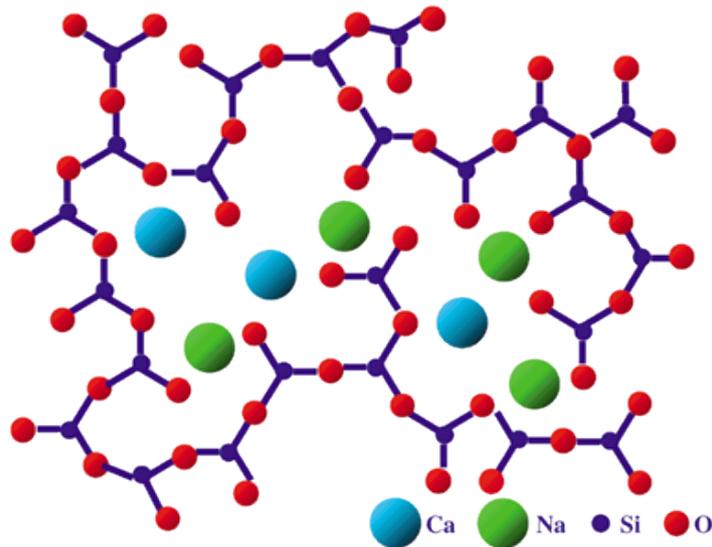


Figura 2.1: Struttura del Bioglass® 45S5

I Bioglass® 45S5 venivano inizialmente prodotti tramite la tradizionale tecnica di fusione e colata (“melting and quenching”) ma questa comportava numerosi svantaggi, tra cui le elevate temperature richieste, la formazione di una superficie troppo compatta (scarsa porosità) e poneva limiti sulla composizione del vetro bioattivo. Un contenuto di SiO_2 in peso superiore al 60% porta, infatti, alla costituzione di una struttura molto compatta che rende difficoltoso lo scambio di ioni e comporta dunque una forte riduzione di bioattività. [13, 44]

Per porre rimedio a queste problematiche il gruppo di ricerca di Li et al. [44] nel 1990 sviluppò la cosiddetta tecnica sol-gel per la sintesi di vetri bioattivi. La tecnica sol-gel permette di ottenere, grazie all’aiuto di un surfattante, un gel (sistema bifasico composto da una fase solida e da una liquida) a partire da un sol (dispersione di particelle colloidali in un liquido). Questo procedimento avviene a basse temperature operative e garantisce la possibilità di realizzare vetri microporosi, quindi con pori di dimensioni inferiori ai 2 nm, ad alto contenuto di SiO_2 . Tutto ciò prima non era realizzabile ma in questo modo si possono ottenere biovetri contenenti fino al 90% di SiO_2 e comunque fortemente bioattivi, grazie al maggior rapporto superficie-volume conferito dalle microporosità. [44, 45]

Per migliorare ulteriormente gli scambi e le interazioni tra il vetro bioattivo e l’organismo si è poi passati alla sintesi di nanoparticelle di vetro bioattivo. Queste particolari strutture permettono, infatti, di accrescere ancora di più la superficie di scambio rendendo il materiale più reattivo e accelerando i processi rigenerativi di differenziazione e proliferazione cellulare. Le nanoparticelle di vetro bioattivo a base di silice vengono solitamente sintetizzate con una tecnica detta metodo di Stöber, che prevede l’impiego di ammoniaca o di una soluzione di idrossido di ammonio come catalizzatore per la formazione di particelle di forma sferica. Attraverso questo metodo, combinato alla tecnica sol-gel, è stato sintetizzato il vetro bioattivo 77S dopato con rame utilizzato nello scaffold oggetto di questa tesi.

La composizione chimica dei biovetri garantisce un’ottima biocompatibilità ma anche una spiccata capacità di osteointegrazione, degradazione e riassorbimento, caratteristiche fondamentali per la sostituzione del materiale con la matrice del tessuto osseo. [46]

Essendo dei materiali bioattivi, questi biovetri hanno la capacità di legarsi a tessuti viventi e sono in grado di indurre una risposta biochimica nell'organismo attraverso il rilascio di ioni. Nel caso del tessuto osseo, infatti, è stato dimostrato che viene sfruttato il rilascio di ioni calcio (Ca^{2+}) e ioni silicio (Si^{4+}) per stimolare la proliferazione e la differenziazione cellulare degli osteoblasti, rendendo possibile l'effetto osteogenico. Grazie al processo appena descritto questi vetri bioattivi possono quindi essere considerati materiali osteoconduttivi. [47, 48]

È stato inoltre provato che si possono modulare le concentrazioni degli ioni formatori e modificatori dei biovetri in modo da regolare la risposta biologica dell'organismo, andando anche ad aggiungere alla formulazione altri elementi specifici, in grado di fornire particolari proprietà al materiale. È questo il caso, ad esempio, del rame (Cu) che è stato utilizzato come dopante del vetro bioattivo 77S in questo lavoro di tesi ed è noto per le sue proprietà antibatteriche e pro-angiogeniche, entrambe molto utili nel caso di uno scaffold per un impianto osseo.

Il rame, infatti, è in grado di stimolare l'espressione di un fattore di crescita endoteliale vascolare denominato (VEFG)62-65 e proprio questa sua peculiarità gli permette di indurre un effetto angiogenico in vivo, oltre a stimolare la proliferazione delle cellule endoteliali. Le particolari caratteristiche degli ioni rame sono molto utilizzate in ambito biomedico e molti materiali vengono appunto dopati con rame per sfruttarne le capacità di differenziazione e proliferazione cellulare, unite alle proprietà antibatteriche ed angiogeniche. [49, 50] Anche se non è ancora del tutto chiaro, è probabile che il potere battericida del rame risieda nelle dimensioni ridotte dei suoi ioni, capaci quindi di penetrare e distruggere la membrana cellulare dei batteri, ostacolando il normale funzionamento degli enzimi e la loro proliferazione. [51]

2.5 Tecniche di produzione degli scaffold – Stampa 3D

Nel corso degli anni sono state introdotte e sviluppate svariate tecniche al fine di ottenere scaffold in grado di soddisfare le esigenze di controllo sulla dimensione, sulla geometria e sulle interconnessioni tra i pori. Come abbiamo visto, questi parametri sono di fondamentale importanza nel processo poiché influiscono direttamente sulle proprietà meccaniche e morfologiche dello scaffold, ma anche sulla sua biodegradabilità. [52]

L'aspetto più complesso nella creazione di uno scaffold a base polimerica consiste probabilmente nella realizzazione fisica dell'oggetto e della sua struttura. Si deve infatti tenere in considerazione che ogni caso clinico avrà le proprie peculiarità e le proprie esigenze, rendendo ogni scaffold unico e realizzato appositamente per quelle specifiche circostanze.

Inoltre, l'aggiunta di fasi inorganiche bioattive nelle matrici polimeriche, soprattutto se di origine naturale, riveste un ruolo fondamentale nella progettazione di scaffold ossei, in quanto è possibile imitare in modo più preciso la composizione del tessuto da mimare, permettendo di ottenere caratteristiche meccaniche più consone e una migliore distribuzione del carico. [53]

Le tecniche convenzionali adoperate nell'ambito dell'ingegneria tissutale ossea (BTE) adottano solitamente un approccio sottrattivo, che non permette però di mantenere un controllo ottimale sulla geometria finale della struttura. Con questo tipo di metodiche, inoltre, è molto complesso assicurare una precisa dimensione dei pori e delle loro interconnessioni.

Proprio per questi motivi sono stati sviluppati altri metodi, basati sulle tecniche di additive manufacturing (AM) e capaci di generare geometrie più precise. Come riporta la definizione dell'ASTM, la manifattura additiva è “un processo di unione dei materiali per creare oggetti dai

dati del modello 3D, di solito strato su strato, in contrapposizione alla produzione con metodi sottrattivi". La natura additiva di queste tecniche permette di avere grande controllo sulla geometria, sulla riproducibilità e sulla scalabilità delle strutture prodotte e assicura, inoltre, il minimo spreco di materiali che spesso sono molto costosi.

Le tecniche di additive manufacturing (AM) permettono quindi di realizzare nel dettaglio complesse architetture e strutture tridimensionali, che possono anche essere facilmente adattate caso per caso. [54, 55]

Nelle applicazioni biomediche, solitamente, si parte da immagini ottenute tramite tomografia computerizzata (TC) o risonanza magnetica (MRI) per ricostruire fedelmente i dettagli della zona danneggiata. Grazie a queste tecniche di imaging, le singole immagini bidimensionali vengono unite e convertite in un modello 3D, per poi essere processate al fine di rimuovere rumore ed eventuali errori di conversione e di qualità nella riproduzione dell'oggetto. Per la progettazione e il design di sistemi di supporto, come gli scaffold, ci si serve di modelli CAD (computer-aided design). [56] Il CAD risulta fondamentale in questi processi perché assicura conformità anatomica nel singolo caso specifico e definisce la geometria strutturale del pezzo, entrambe fondamentali per l'osteointegrazione dell'impianto. I modelli 3D CAD sono in realtà formati da sottili strati sovrapposti, detti "layer", e più questi layer sono sottili maggiore sarà la risoluzione e quindi l'accuratezza nell'architettura dell'oggetto stampato.

Nel processo di stampa 3D devono essere seguiti tre passi fondamentali:

1. Modellazione 3D;
2. Divisione in strati (slicing);
3. Stampa vera e propria.

Spesso possono essere svolte anche delle fasi aggiuntive di pre-processing, per migliorare precisione e dettagli del modello 3D, e di post-processing, cioè di "pulizia" e rifinitura dell'oggetto stampato. Nel nostro caso, ad esempio, si ricorre ad una fase di post curing cioè ad una fotoreticolazione successiva alla stampa, per consentire di completare il processo sulle superfici esposte dell'oggetto stampato.

Tra le varie tecniche di stampa 3D, la fotopolimerizzazione in vasca (vat photo-polymerization) è una metodologia che si basa sulla polimerizzazione selettiva di un materiale, contenuto appunto in una vasca, attraverso una fonte di energia luminosa. Questa tecnica risulta molto promettente in quanto consente di ottenere un'ottima finitura superficiale e una delle risoluzioni di stampa più elevate in questo contesto. [57, 58]

La fotopolimerizzazione in vasca comprende all'interno della sua categoria diversi sistemi, tra cui la stampa 3D a elaborazione digitale della luce (digital light processing – DLP). La stampa 3D DLP garantisce risoluzioni molto alte che variano tra i 15 e i 100 μm e che permettono quindi la realizzazione di geometrie e strutture complesse, dotate anche di cavità e porosità (figura 2.2).

La tecnica di stampa 3D a elaborazione digitale della luce si serve di un dispositivo digitale a microspecchi (digital micromirror device – DMD) utilizzato per controllare e reindirizzare la luce UV, con una lunghezza d'onda λ compresa tra 380 e 450 nm, al fine di manovrarla in modo preciso e per creare quindi un pattern. Questo pattern è rappresentato in realtà da un singolo strato bidimensionale di un modello CAD (computer-aided design) e viene impresso su una resina fotoattiva. In questo modo il processo di stampa viene ripetuto strato per strato (layer-by-layer) mentre la piattaforma su cui aderisce la struttura stampata si muove verticalmente fino a quando non verrà terminata la struttura tridimensionale finale. [59, 60, 61, 62]

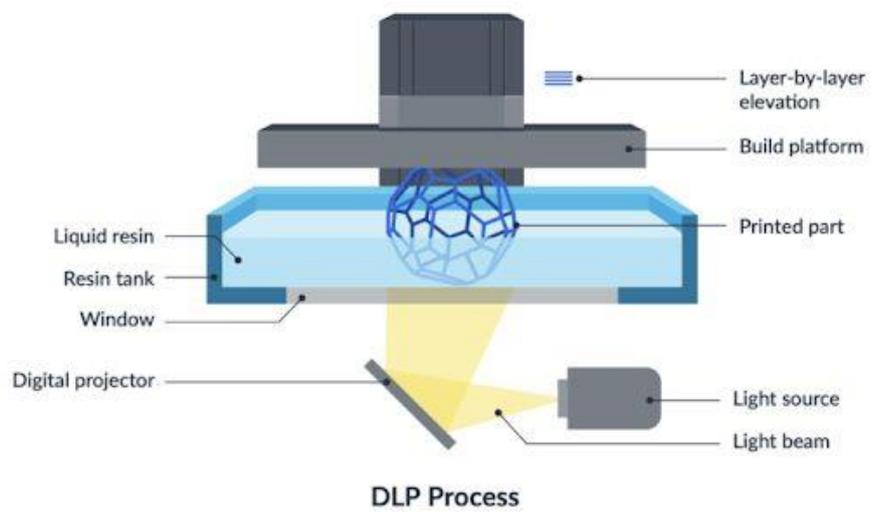


Figura 2.2: Schema del processo di stampa 3D DLP

3. Materiali e Metodi

3.1 Materiali

Per preparare le formulazioni sono stati impiegati i seguenti materiali:

- Olio di soia epossidato acrilato (AESO), derivante da fonte bio-based al 100%, acquistato da Sigma-Aldrich, Milano, Italia.

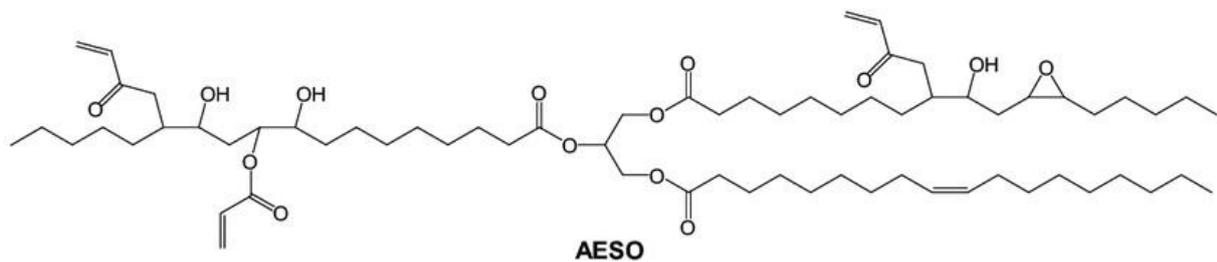


Figura 3.1: struttura dell'olio di soia epossidato acrilato (AESO)

- Isobornil acrilato (IBOA), utilizzato come diluente reattivo per migliorare la viscosità delle formulazioni e renderle stampabili tramite stampa 3D, acquistato anch'esso da Sigma-Aldrich, Milano, Italia.

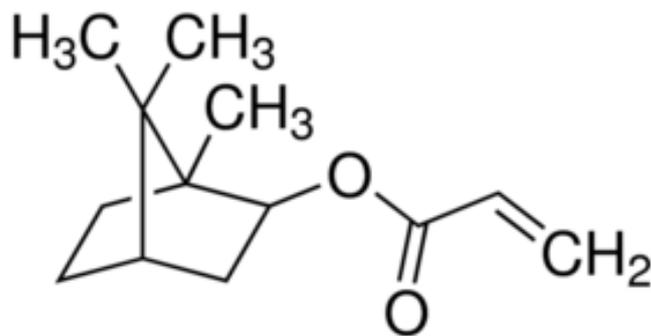


Figura 3.2: struttura dell'isobornil acrilato (IBOA)

- Ossido di difenil(2,4,6-trimetilbenzoi)fosfina (Irgacure® 819), fornito da BASF, Italia.

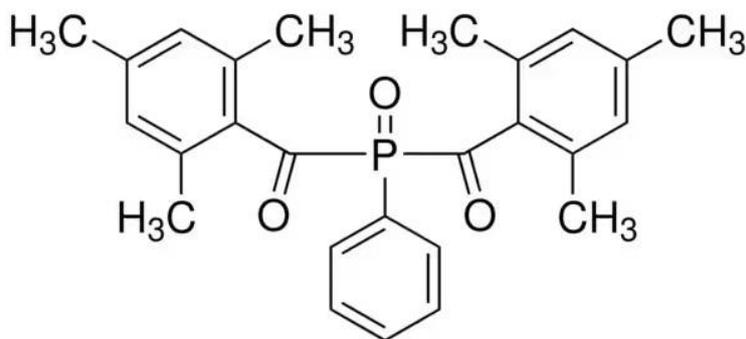


Figura 3.3: struttura dell'Irgacure® 819

- Idrossido di ammonio (NH₄OH) e tetraetil ortosilicato (TEOS), trietil fosfato (TEP), nitrato di calcio tetraidrato (Ca(NO₃)₂·4H₂O) e nitrato di rame triidrato (Cu(NO₃)₂·3H₂O), precursori di silicio, fosforo, calcio e rame nel vetro bioattivo 77S_Cu, sono stati acquistati da Sigma-Aldrich, Milano, Italia.

3.2 Sintesi dei vetri bioattivi

Per questo lavoro di Tesi sono state preparate due composizioni di vetro bioattivo tramite la tecnica sol-gel, seguendo il metodo di Stöber modificato. La composizione dei due vetri è riportata in Tabella 3.1: il vetro 77S è “di controllo”, mentre il vetro 77S_Cu è dopato con ioni rame e, grazie alle sue proprietà antibatteriche e proangiogeniche, risulta molto promettente nelle applicazioni biomedicali.

Composizione wt%	SiO ₂	P ₂ O ₅	CaO	CuO
77S	77	9	14	-
77S_Cu	77	9	9	5

Tabella 3.1: Composizione dei biovetri

Vetro 77S

Per la sintesi del vetro bioattivo 77S sono state preparate inizialmente due soluzioni, che verranno chiamate soluzione I e soluzione II.

La soluzione I è caratterizzata dalla seguente composizione:

- 46 ml H₂O bidistillata;
- 30 ml EtOH;
- 17 ml NH₄OH (al 28-30%).

La soluzione II, invece, è composta da:

- 93 ml EtOH;
- 11,2 ml TEOS.

Dopo aver preparato la soluzione II, questa è stata mantenuta in agitazione per 30 minuti sullo stirrer grazie ad un'ancoretta magnetica e in seguito la soluzione I è stata aggiunta nella soluzione II. Il sistema ottenuto in questo modo è stato miscelato per altri 30 minuti. In pochi minuti, la sospensione si opacizza e assume un colore bianco (come si può notare nella Figura 3.4 a), e ciò indica la formazione delle nanoparticelle di silice.

In seguito si è proceduto alla centrifugazione della sospensione a 7000 rpm per un tempo di 5 minuti, al fine di rimuovere i solventi utilizzati. Nella Figura 3.4 b si può notare la separazione tra le fasi ottenuta in seguito alla centrifugazione.



Figura 3.4 a) Soluzione opacizzata, **b)** Soluzione dopo la centrifugazione, in cui si nota la separazione delle fasi

Dopo aver rimosso l'eccesso di solvente servendosi di una pipetta, le nanoparticelle di SiO_2 ottenute sono state trasferite in un becher (insieme a poca acqua bidistillata, necessaria per evitare un'eccessiva perdita di materiale nel trasferimento dalle provette di centrifugazione al becher). Sono stati poi aggiunti 0,84 ml di TEP (precursore del fosforo) ed il sistema è stato mantenuto in agitazione sullo stirrer per 3 ore. Successivamente si sono aggiunti nel becher 2,31 g di $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (precursore del calcio) ed il tutto è stato nuovamente miscelato per 90 minuti.

A questo punto, come in precedenza, il sistema è stato centrifugato a 7000 rpm per 5 minuti. Dopo aver eliminato il solvente in eccesso grazie ad una pipetta, le polveri sono state trattate in stufa a 60°C per 48 ore. Durante questo primo trattamento termico le polveri sono state mantenute all'interno della cuvetta di centrifugazione: una volta aperta, la cuvetta è stata coperta con un foglio di alluminio su cui sono stati praticati dei piccoli fori, per evitare la contaminazione del campione permettendo però la fuoriuscita dei gas sviluppati nel processo.

Concluso l'essiccamento, le polveri sono state trasferite in un contenitore in quarzo e infine sottoposte al trattamento termico di calcinazione a 700°C per 2 ore, con rampa di temperatura di $5^\circ\text{C}/\text{min}$ (sia per il riscaldamento sia per il raffreddamento) al fine di rimuovere tutti i composti organici. Il prodotto finale è visibile in figura 3.5.



Figura 3.5: Vetro bioattivo 77S

Vetro 77S_Cu

Per quanto riguarda la sintesi del vetro bioattivo 77S_Cu, la parte iniziale del procedimento è del tutto analoga a quella seguita per la sintesi del vetro 77S. La soluzione I è stata quindi aggiunta nella soluzione II ed il sistema è poi stato miscelato per 30 minuti, con una seguente centrifugazione a 7000 rpm per 5 minuti.

Dopo aver rimosso il liquido in eccesso ed aver ottenuto le polveri di SiO_2 , si sono aggiunti al sistema 1,04 ml di TEP e il tutto è stato miscelato per 3 ore sullo stirrer magnetico. Si sono poi inseriti nel becher 1,48 g di $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$. Dopo aver mantenuto il sistema in agitazione per 90 minuti, sono stati aggiunti 0,59 g di $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ e si è proceduto alla miscelazione per altri 30 minuti, in modo da favorire l'ingresso del Cu nel network vetroso. La dispersione assume a questo punto il caratteristico colore blu, dovuto alla presenza del rame. Nella figura 3.6 è possibile osservare il sistema prima e dopo la centrifugazione.



Figura 3.6 a) Sospensione prima della centrifugazione, b) Fasi separate in seguito alla centrifugazione

Infine la sospensione è stata centrifugata a 7000 rpm per 5 minuti. Una volta rimosso il liquido in eccesso, le polveri all'interno della cuvetta, coperta con un foglio di alluminio dotato di piccoli fori, hanno subito un primo trattamento a 60°C per 48 ore (figura 3.7). Terminato l'essiccamento, le polveri sono state poste in un crogiolo in quarzo per affrontare il secondo trattamento termico, detto calcinazione, a 700°C per 2 ore, con rampa di temperatura di $5^\circ\text{C}/\text{min}$ sia per il riscaldamento sia per il raffreddamento. Le polveri così ottenute sono riportate nella figura 3.8.



Figura 3.7: Trattamento termico in stufa



Figura 3.8: Vetro bioattivo 77S_Cu

3.3 Preparazione delle formulazioni e fotoreticolazione

Per preparare le formulazioni si è partiti dalla resina di olio di soia epossidato acrilato (AESO) a cui è stato aggiunto l'1%wt del fotoiniziatore radicalico Irgacure® 819 e in seguito quantità variabili del diluente reattivo (isobornil acrilato) e del vetro bioattivo drogato con rame (77S_Cu). Le quattro componenti delle formulazioni – AESO, IBOA, le particelle di vetro bioattivo 77S_Cu e il fotoiniziatore Irgacure 819 – sono state miscelate in modo uniforme e omogeneo grazie all'Ultra-Turrax T10 Basic (figura 3.9).

Sono state preparate in tutto 6 formulazioni, le cui composizioni sono consultabili nella tabella 3.2. Le varie formulazioni sono poi state conservate in un ambiente buio, al riparo dalla luce, per evitare una fotoreticolazione prematura. Dopo il periodo di stoccaggio, le formulazioni sono state fotoreticolate all'interno di stampi in silicone (figura 3.10) utilizzando la lampada DYMAX ECE (Dymax Europe GmbH, Wiesbaden, Germania) ad un'intensità di 130 mW/cm² per 60 s (figura 3.11). In alternativa, le formulazioni sono state stampate in 3D utilizzando una stampante Prusa SL1S SPEED (Prusa Research, Praga, Repubblica Ceca) e poi post-reticolate per 60 s sotto la lampada DYMAX ECE.

AESO (%wt)	IBOA (%wt)	BG 77S_Cu	Nome del campione
70	30	0	AESO_70.30_0BGCu
		10	AESO_70.30_10BGCu
		30	AESO_70.30_30BGCu
80	20	0	AESO_80.20_0BGCu
		10	AESO_80.20_10BGCu
		30	AESO_80.20_30BGCu

Tabella 3.2: Formulazioni AESO:IBOA con quantità variabili di vetro bioattivo 77S_Cu



Figura 3.9: Ultra-Turrax T10 Basic



Figura 3.10: Formulazioni negli stampi in silicone

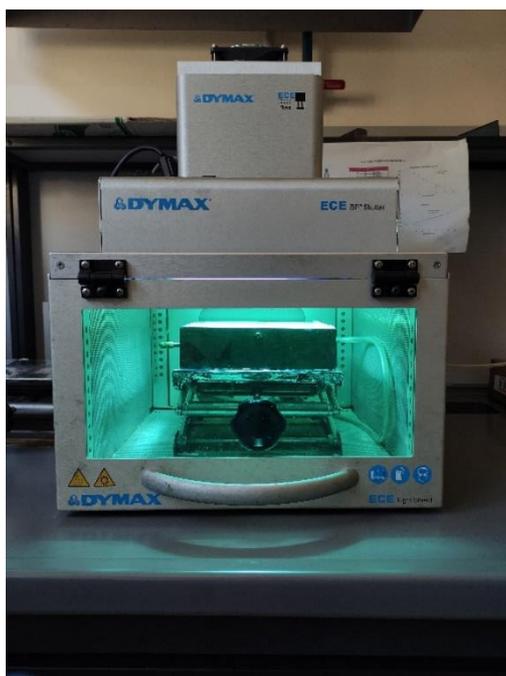


Figura 3.11: Lampada DYMAX ECE

3.4 Tecniche di caratterizzazione

3.4.1 Spettroscopia infrarossa a trasf. di Fourier a riflettanza totale attenuata (ATR-FTIR)

La spettroscopia infrarossa (IR) è una particolare tecnica che si basa sull'assorbimento della radiazione infrarossa da parte di molecole dotate di momento di dipolo. Esse, infatti, sono capaci di assorbire fotoni infrarossi e ciò comporta la transizione dal loro stato fondamentale ad uno stato vibrazionale eccitato. L'energia ceduta dalla radiazione viene quindi convertita in energia vibrazionale e si attivano modi di vibrazione diversi a seconda dei legami chimici eccitati. La frequenza e l'intensità di ogni banda di assorbimento permettono di formare lo spettro complessivo di assorbimento IR e questo fornisce informazioni dettagliate sulla struttura chimica del materiale considerato. Il risultato delle analisi consiste quindi in uno spettro infrarosso con le frequenze sull'asse delle ascisse e i valori di assorbanza su quello delle ordinate. Ogni picco perciò si trova in corrispondenza della frequenza a cui avviene un determinato assorbimento di energia.

In questo caso specifico, il processo di reticolazione è stato monitorato utilizzando uno spettrometro Nicolet iS 50 FTIR (Thermo Scientific, Milano, Italia), al fine di analizzare la

reazione e la cinetica di fotoreticolazione delle formulazioni durante l'esposizione alla luce UV. La resina viscosa è stata depositata in modo uniforme su un supporto di silice spesso 32 μm servendosi di una barra stendi-film, che consentiva di raggiungere spessori intorno ai 12 μm . Ogni formulazione veniva quindi irraggiata con luce UV per un tempo di circa 3 minuti, utilizzando una lampada a mercurio Lightningcure Hamamatsu LC8 (lunghezza d'onda: 365 nm), montata su di un supporto all'interno della camera a infrarossi (figura 3.12). Gli spettri così ottenuti hanno una risoluzione di 4 cm^{-1} . Tutti i dati sono stati raccolti e elaborati utilizzando il software OmnicTMSpectra di proprietà della Thermo Fisher Scientific.

La conversione dei doppi legami è stata valutata seguendo la discesa del picco del doppio legame carbonio-carbonio caratteristico degli acrilati, posizionato a circa 1620 cm^{-1} , mentre il picco presente a 2930 cm^{-1} è stato preso come riferimento per effettuare il calcolo della % di conversione.

È stata utilizzata la seguente equazione (1) per valutare il tasso di conversione durante l'irraggiamento:

$$\text{Conversione (\%)} = \frac{\left(\frac{A_{fun}}{A_{rif}}\right)_{t=0} - \left(\frac{A_{fun}}{A_{rif}}\right)_t}{\left(\frac{A_{fun}}{A_{rif}}\right)_{t=0}} \times 100 \quad (1)$$

Dove A_{fun} corrisponde all'area del picco del gruppo funzionale preso in considerazione (in questo caso acrilato), mentre A_{rif} è l'area del picco di riferimento che si trova a 2930 cm^{-1} . Con $t=0$ e t si indicano i tempi di pre e post curing.



Figura 3.12: Configurazione utilizzata per l'analisi FTIR

3.4.2 Foto calorimetria a scansione differenziale (Foto-DSC)

Il progresso della reazione di fotoreticolazione è stato valutato anche utilizzando uno strumento di foto-DSC. Questo tipo di analisi calorimetrica permette di misurare il calore prodotto o assorbito da un campione durante l'irraggiamento con luce UV, a seguito di reazioni chimiche o fisiche. Il setup sperimentale, visibile nella figura 3.13, consisteva nel macchinario Mettler TOLEDO DSC-1 (Milano, Italia) affiancato da un Regolatore del Gas GC100 (Milano, Italia) e da una lampada a mercurio, l'Hamamatsu Lightningcure LC8 (Hamamatsu Photonics, Milano, Italia).

Si è utilizzata una radiazione UV con una lunghezza d'onda di 365 nm e l'intensità è stata impostata al 50% del valore massimo. Campioni di resina liquida dal peso compreso tra i 5 e i 15 mg sono stati posti in un crogiolo di alluminio aperto da 40 μ L, mentre un crogiolo vuoto è stato usato come riferimento. Tutte le prove sono state condotte in condizioni inerti, sotto un flusso costante di azoto a 40 mL/min e a temperatura ambiente (25 °C). Per ogni formulazione sono stati analizzati tre campioni.

Il metodo utilizzato per valutare la fotoreticolazione prevedeva l'assestamento del campione nel crogiolo per due minuti a lampada spenta, e in seguito un'esposizione ai raggi UV per due differenti step di irraggiamento da 5 minuti ciascuno. La seconda esposizione alla luce UV era necessaria per assicurarsi la completa conversione dei gruppi funzionali e per creare la "baseline". La seconda curva veniva poi infatti sottratta alla prima per ottenere in modo più preciso la curva del processo di fotoreticolazione. Si sono così ottenuti i grafici dell'entalpia [W/g] in funzione del tempo [s].

Tutti i dati sono stati raccolti e elaborati dal software Mettler TOLEDO STARe v9.2.



Figura 3.13: Strumentazione necessaria per le analisi Foto-DSC

3.4.3 Reologia

Le prove reologiche della resina termoindurente sono state effettuate utilizzando lo strumento Anton Paar MCR302 (Torino, Italia), un reometro a piatti paralleli (figura 3.14). La reologia è stata valutata per analizzare la viscosità delle formulazioni preparate in laboratorio, in modo tale da determinare quella più adatta al processo di stampa 3D. Quest'analisi prevede l'utilizzo di due piatti con diametro di 25 mm, separati da un gap di 1 mm. I valori di viscosità sono stati raccolti sottoponendo le formulazioni a velocità di taglio ("shear rate") comprese tra 0,01 e 1000 s⁻¹.

Le misure sono state svolte alla frequenza costante di 1 Hz e ad una temperatura ambiente costante di 25 °C. In queste analisi si misurano due particolari parametri in funzione del tempo, i moduli G' (G0) e G'' (G00). G' rappresenta la componente elastica del materiale durante la deformazione ed è detto "modulo conservativo", mentre G'' corrisponde alla componente viscosa e viene definito "modulo dissipativo".



Figura 3.14: Reometro Anton Paar MCR302

3.4.4 Analisi termiche dinamo-meccanica (DMTA)

I materiali fotoreticolati con raggi UV sono stati caratterizzati tramite analisi dinamo-meccaniche termiche, condotte attraverso uno strumento della Triton Technology (figura 3.15), in modalità "tension mode". Durante le prove, il campione viene sottoposto ad una sollecitazione ciclica ad una determinata frequenza e con una certa rampa termica. Si utilizza l'azoto per raffreddare la camera fino a raggiungere la temperatura iniziale. L'analisi ha inizio a una temperatura di 0 °C e la misura termina a 100 °C, con una velocità di riscaldamento pari a 5 °C/min. Uno stato di sollecitazione a trazione monoassiale (uniassiale) viene applicato al campione alla frequenza di 1 Hz.

Questo tipo di analisi permette di misurare le caratteristiche viscoelastiche dei materiali polimerici. L'obiettivo primario dell'analisi è quello di determinare la temperatura di transizione vetrosa (T_g) del materiale, che si trova in corrispondenza del picco della curva "tan δ ". La curva tan δ è data dal rapporto tra due grandezze caratteristiche del materiale analizzato: E' ed E'' , che corrispondono rispettivamente al modulo conservativo ed al modulo dissipativo del polimero. Il primo rappresenta la deformazione elastica del materiale mentre il secondo tiene conto della sua deformazione viscosa, ed entrambi possono essere misurati grazie a questo tipo di analisi. Di conseguenza si potrà ottenere anche il modulo di tan δ in funzione della temperatura (in $^{\circ}\text{C}$), definito come $\tan \delta = E'' / E'$.

La temperatura finale delle prove è stata selezionata in base alla regione di plasticità del materiale, al raggiungimento del plateau gommoso. I campioni utilizzati per le analisi avevano mediamente le seguenti dimensioni: 1,5 x 3,12 x 12 mm. Essi sono stati realizzati grazie a stampi rettangolari in silicone, poi fotoreticolati utilizzando la lampada UV DYMAX ECE (Dymax Europe GmbH, Wiesbaden, Germania) ad un'intensità luminosa di 130 mW/cm² per un tempo di 60 s, oppure attraverso la stampa 3D realizzata con la stampante Prusa SL1S Speed (Praga, Repubblica Ceca).

Sono state eseguite 3 prove di analisi termogravimetrica per ogni formulazione.

È stata inoltre calcolata la densità volumetrica di crosslinking (densità di reticolazione) v_c , utilizzando la seguente formula:

$$v_c = \frac{E'}{3RT} \quad (2)$$

dove E' (in kPa) corrisponde al modulo nel plateau gommoso della regione plastica del materiale ($T = T_g + 50 \text{ }^{\circ}\text{C}$), T è la temperatura a cui viene misurato E' (in kelvin [K]), mentre R è la costante universale dei gas perfetti, pari a 8,314 L·kPa/mol·K.

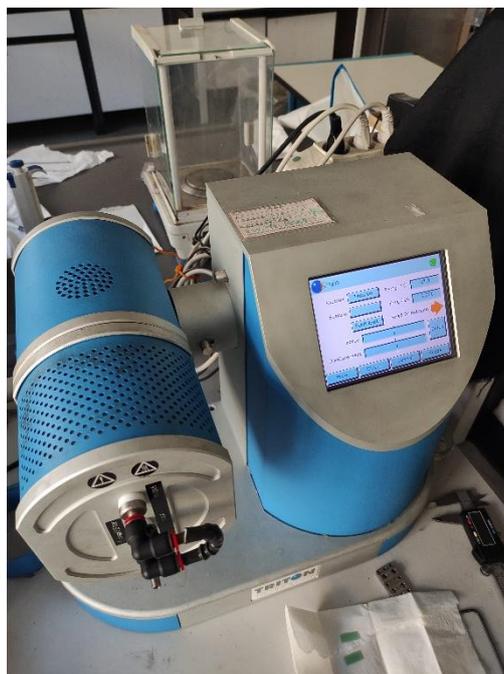


Figura 3.15: Strumento utilizzato per le analisi DMTA

3.4.5 Processo di stampa 3D

Il processo di stampa 3D è stato condotto attraverso un apparato di stampa a stereolitografia mascherata (MSLA – Masked Stereolithography Apparatus): la stampante PRUSA SL1S Speed (acquistata da Prusa, Praga, Repubblica Ceca), visibile nella figura 3.16.

La stampante era equipaggiata con una sorgente LED di luce UV monocromatica con una lunghezza d'onda di 405 nm e una potenza di 25 W. Il processo di stampa 3D era poi seguito da un'ulteriore reticolazione (post curing) in una lampada DYMAX (Dymax Europe GmbH, Wiesbaden, Germania) per un tempo di 60s, in modo da completare il meccanismo di foto-reticolazione.



Figura 3.16: Stampante 3D Prusa SL1S Speed

3.4.6 Prove a compressione

Le proprietà meccaniche a compressione sono state valutate attraverso l'analisi di curve tensione-deformazione ottenute utilizzando uno strumento di compressione (MTS QTest™/10 Elite, MTS System Corporation, Eden Prairie, MN, USA), presente in figura 3.17.

La velocità di spostamento del carico è stata impostata a 1 mm/min, e i campioni avevano dimensioni medie di 10 x 10 x 4 mm³, come previsto dallo standard ISO 604:2002. Il modulo a compressione E_c è stato ricavato dalla regione lineare della curva ottenuta con l'equazione (3), dove E_c è il modulo a compressione espresso in MPa, σ è la tensione in MPa ed ε è la deformazione nominale espressa come un rapporto adimensionale. Tutti i risultati derivano da una media di 3 campioni.

$$E_c = \frac{\sigma_2 - \sigma_1}{\varepsilon_2 - \varepsilon_1} \quad (3)$$



Figura 3.17: MTS QTest™/10 Elite, MTS System Corporation

3.4.7 Caratterizzazione degli scaffold compositi

È stata effettuata una caratterizzazione complessiva degli scaffold compositi stampati in 3D, concentrandosi in particolar modo sulla morfologia, la composizione e la reattività in vitro in condizioni di immersione in SBF (Simulated Body Fluid), seguendo il protocollo di Kokubo [63]. Si sono inoltre valutate la citocompatibilità, l'attività metabolica e l'attività antibatterica in vitro.

Gli scaffold compositi sono stati analizzati servendosi del microscopio elettronico a scansione a emissione di campo (FESEM) con capacità di spettroscopia a dispersione di energia – raggi X (EDS) (SUPRA™ 40, Zeiss, Oberkochen, Germania), al fine di osservarne le caratteristiche morfologiche e la composizione (figura 3.18). I campioni analizzati sono stati fissati a degli stub di alluminio (Al) grazie ad un adesivo a base di argento, in seguito metallizzati con il platino (Pt) e infine esaminati.



Figura 3.18: FESEM - SUPRA™ 40, Zeiss

3.5 Valutazione della citocompatibilità e dell'attività metabolica

3.5.1 Colture cellulari

Per le prove di citocompatibilità, svolte presso i laboratori dell'Università del Piemonte Orientale (UPO) nella sede di Novara, sono state utilizzate linee cellulari immortalizzate. Le cellule mesenchimali staminali derivanti dal midollo osseo umano (bMSC) sono state acquistate da Promo-Cell (C-12974) e coltivate nel terreno di Eagle modificato da Dulbecco a basso contenuto di glucosio (DMEM; Sigma-Aldrich, Milano, Italia) addizionato al 10 % di siero bovino fetale (FBS; Sigma-Aldrich, Milano, Italia) e l'1% di antibiotici (penicillina, streptomina) in un ambiente a 37 °C e con una concentrazione di CO₂ al 5%. Le cellule sono state nutrite e coltivate fino a raggiungere una confluenza dell'80-90 % (ovvero la percentuale di area nella coltura coperta con le cellule), poi distaccate grazie ad una soluzione di tripsina EDTA (0,25 % di PBS), raccolte e utilizzate per gli esperimenti.

3.5.2 Valutazione della citocompatibilità

Al fine di analizzare e confrontare la citocompatibilità e la bioattività dei campioni, alcuni di essi sono stati immersi per una notte nel mezzo di coltura completo (DMEM + 15% FBS) e poi lasciati asciugare, dopo aver scartato il mezzo di coltura in eccesso.

Le cellule sono poi state seminate direttamente sulla superficie dei campioni, posti in una piastra multiwell da 24 pozzetti, rispettando una densità predefinita per campione di circa 2×10^4 cellule, contenute in 50 µL di mezzo di coltura. Dopo un tempo di 4 ore, necessario per consentire l'adesione cellulare, sono stati aggiunti altri 500 µL di mezzo di coltura ad ogni campione. In seguito, le cellule sono state lasciate in incubazione a 37 °C per 24 e 48 ore. Ad ogni intervallo di tempo, la vitalità delle cellule è stata valutata utilizzando il saggio metabolico alamar blue per determinarne l'attività metabolica (alamarBlue™, ready-to-use solution - Life Technologies, Milano, Italia). Dopo aver trasferito i campioni in una nuova piastra multiwell, vengono aggiunti 500 µL di soluzione con il colorante alamar blu (in concentrazione di 0,015 % nella soluzione tampone salino fosfato (phosphate buffered saline, PBS)) direttamente sui campioni seminati, per valutare l'attività metabolica delle cellule adese. In seguito a 4 ore di incubazione in un ambiente buio a 37 °C, i segnali fluorescenti (espressi come unità fluorescenti relative (RFU)) sono stati rilevati rispettivamente a lunghezze d'onda di 570 e 590 nm per la lettura di eccitazione e emissione, grazie all'utilizzo di uno spettrofotometro (Spark, Tecan, Svizzera). Inoltre, è stato impiegato un saggio a fluorescenza per la conta delle cellule vive/morte per poter controllare visivamente la vitalità cellulare (LIVE/DEAD, Viability/Cytotoxicity Kit for mammalian cells, Invitrogen, Milano, Italia) grazie ad un microscopio digitale EVOS Fluid Microscope (Life Technologies, Milano, Italia).

Infine, un microscopio elettronico a scansione (SEM; JSM-IT500, JEOL, Giappone) ha permesso di valutare tramite imaging la morfologia delle cellule adese alla superficie dei campioni. Per spiegare in breve il procedimento, i campioni sono stati disidratati mediante scala alcolica (70 – 90 – 100% etanolo, 1 h per ogni step), asciugati con esametildisilossano, montati su stub con tape conduttivo al carbonio e ricoperti con uno strato d'oro. Le immagini sono poi state catturate a differenti livelli di ingrandimento utilizzando elettroni secondari, che evidenziano con maggiore precisione la topologia superficiale.

3.5.3 Valutazione dell'attività antibatterica

Per valutare le proprietà antibatteriche indotte dal rame è stato testato un ceppo di *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) ottenuto dall'American Type Culture Collection (ATCC). Il batterio è stato isolato e selezionato usando piastre selettive di Agar sale mannitolo (Sigma).

In seguito il brodo è stato diluito usando altro brodo LB (Luria – Bertani) fresco, fino a raggiungere la densità finale di 1×10^5 CFU/ml e una densità ottica di 600 nm, corrispondenti a 0.0001.

Successivamente i campioni con vetro bioattivo “classico” (77S) e con vetro bioattivo contenente rame (77S_Cu) sono stati infettati, seguendo il protocollo standard ISO 22196: una goccia di 50 μ l di brodo di coltura, contenente 1×10^3 batteri, è stata posta sulla superficie dei materiali. Dopo 24 ore è stata testata l'attività metabolica batterica, usando il test alamar blue, ovvero un test basato sulla conversione del sale di sodio resazurina in un metabolita secondario fluorescente in caso di corretta attività, mentre la loro vitalità è stata valutata analizzando i batteri planctonici e il biofilm aderente. In particolare, tramite l'utilizzo di una colorazione fluorescente Live/Dead (Thermo Fisher), è stata analizzata con il microscopio digitale a fluorescenza (EVos Fluid, ThermoFisher) una goccia presa dopo 24 ore di infezione e posta in una piastra multi-well sterile da 96. Poi la valutazione dei batteri aderenti è avvenuta con il conteggio delle Unità Formanti Colonie (CFU): prima sono stati lavati i campioni con un tampone fosfato salino (PBS), trasferiti in una provetta con PBS sterile, poi sottoposti a 3 fasi di sonicazione e vortex (per 5'; 30''); successivamente sono stati raccolti 100 μ l e diluiti in PBS a 1:10 per 6 volte. Da ognuna di queste diluizioni sono stati presi 20 μ l e posti su piastre agar LB, per poi incubarle per 24 ore a 37 °C; formatesi le colonie, si esegue il conteggio delle CFU (Unità Formanti Colonie) per ml come segue:

CFU number = [(n. colonie x fattore di diluizione) \times 10[^] (diluizione seriale)]

4. Risultati e discussione

4.1 Processo di fotoreticolazione

Il processo di fotoreticolazione UV delle formulazioni a base di olio di soia epossidato acrilato (AESO) è stato analizzato a fondo utilizzando tre diverse modalità: spettroscopia ATR-FTIR, foto DSC e prove reologiche.

Le analisi ATR-FTIR in real time sono state condotte per valutare il livello di conversione del doppio legame acrilato sotto irraggiamento UV, seguendo la decrescita del picco centrato a circa 1620 cm^{-1} .

Le curve di conversione in funzione del tempo di irraggiamento sono riportate nella figura 4.1 per le diverse formulazioni 70:30, contenenti quantità crescenti di vetro bioattivo dopato con rame. Le stesse analisi sono state effettuate per le formulazioni 80:20. La formulazione 70:30_30BGsCu viene presa come esempio poiché, come si vedrà in seguito, essa sarà la formulazione scelta ed utilizzata per la stampa 3D e verrà ulteriormente analizzata nelle seguenti sezioni del capitolo. I dati di conversione relativi a tutte le formulazioni analizzate sono contenuti nella tabella 4.1.

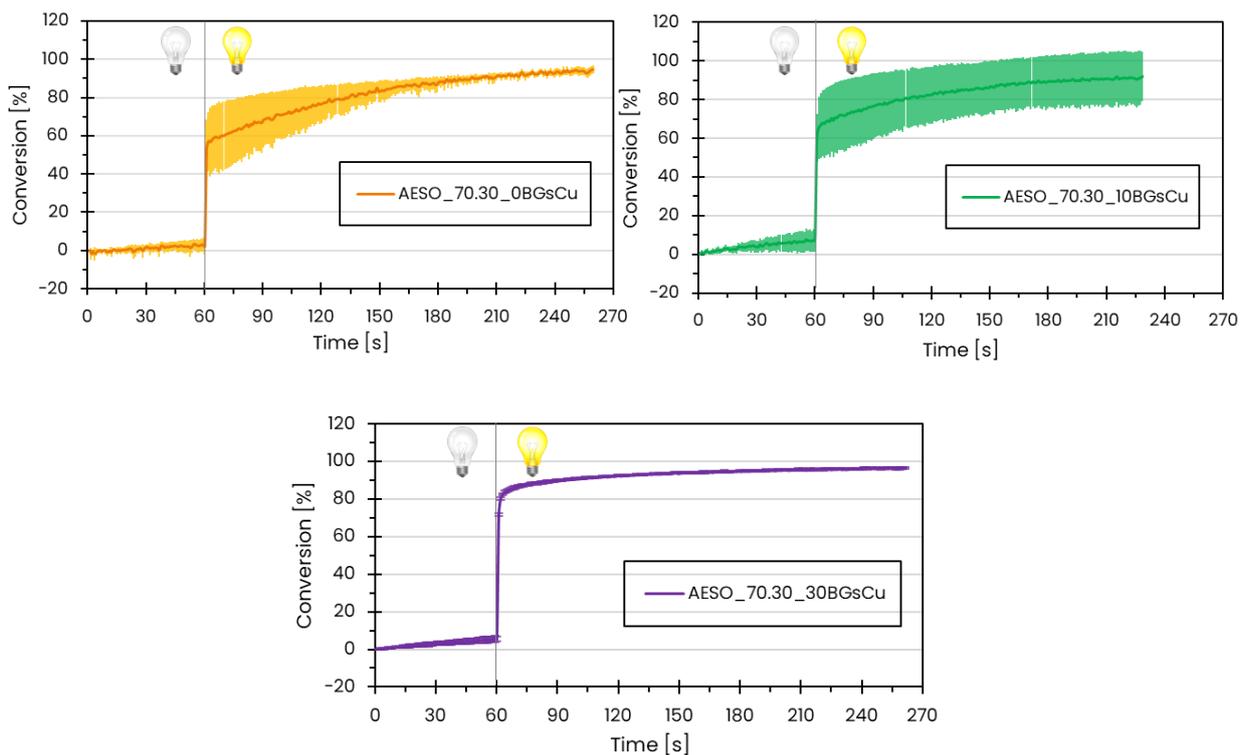


Figura 4.1: Curve di conversione % in funzione del tempo per le formulazioni AESO 70:30

AESO_70:30	Final conversion [%] (1620 cm ⁻¹)	AESO_80:20	Final conversion [%] (1620 cm ⁻¹)
0BGsCu	94,5 ± 2,2	0BGsCu	93,1 ± 4,7
10BGsCu	91,8 ± 12,8	10BGsCu	96,8 ± 1,7
30BGsCu	96,3 ± 0,4	30BGsCu	95,3 ± 0,8

Tabella 4.1: Valori di conversione finale per le formulazioni AESO 70:30 e AESO 80:20

A partire dai risultati riportati nella tabella 4.1, ottenuti dalle analisi ATR-FTIR, è possibile osservare l'elevato tasso di conversione del doppio legame acrilato raggiunto dalle formulazioni "pure" AESO-IBOA, cioè quelle prive di vetro bioattivo. Quando aumenta il contenuto di IBOA nelle formulazioni pure si ottiene un leggero incremento nella conversione sotto irraggiamento UV. Questo potrebbe essere attribuito a un ritardo nella vetrificazione, indotto da una diminuzione nella densità di fotoreticolazione a causa dell'incremento nel contenuto di IBOA, che permette un tasso di conversione del doppio legame più elevato. L'aggiunta del vetro bioattivo dopato con rame non comporta invece variazioni significative del livello di conversione finale del doppio legame. Questo nonostante una possibile competizione nell'assorbimento di luce tra le particelle di vetro bioattivo e il fotoiniziatore (Irgacure).

Esperimenti di Foto-DSC sono stati effettuati per confermare l'esito delle analisi ATR-FTIR, e i risultati ottenuti sono riportati nella tabella 4.2. Nella figura 4.2 si può osservare il calore rilasciato dalle formulazioni AESO-IBOA 70:30 con differenti contenuti di vetro bioattivo, misurato durante la Foto-DSC.

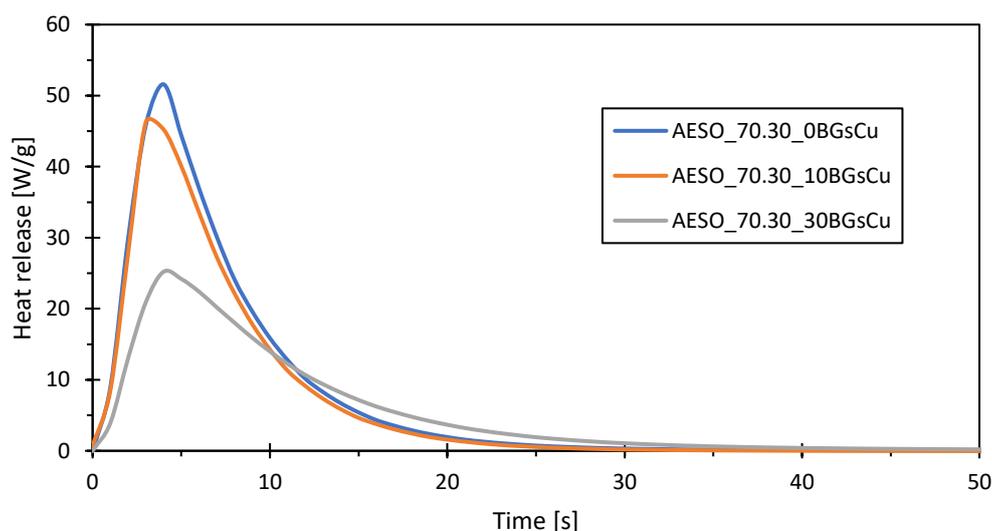


Figura 4.2: Calore rilasciato in funzione del tempo durante l'irraggiamento con luce UV delle formulazioni AESO 70:30, nelle analisi DSC

AESO_70:30	Integral [J/g]	AESO_80:20	Integral [J/g]
0BGsCu	377,2 ± 3,5	0BGsCu	374,2 ± 6,0
10BGsCu	345,4 ± 2,1	10BGsCu	316,0 ± 7,3
30BGsCu	275,2 ± 2,8	30BGsCu	238,4 ± 5,6

Tabella 4.2: Calore totale rilasciato dalle formulazioni AESO 70:30 e AESO 80:20, durante le analisi DSC

I dati riportati nella tabella 4.2, ottenuti tramite Foto-DSC, sono in accordo con le analisi spettroscopiche FTIR. È possibile osservare un leggero incremento nell'esotermicità delle formulazioni AESO 70:30, dovuto al maggior contenuto di IBOA, come si può notare dai dati FTIR. Allo stesso modo, analizzando i dati ottenuti con la foto-DSC, è possibile osservare una riduzione dell'integrale di reticolazione al crescere del contenuto di vetro bioattivo S77Cu. Questo comportamento è riscontrabile anche nelle analisi FTIR. È però importante notare che la riduzione complessiva nell'intero processo è trascurabile e non impatta in modo significativo sull'esito sperato, cioè quello di ottenere un composto con una buona fotoreticolazione.

4.2 Proprietà termiche e meccaniche degli scaffold a base di AESO fotoreticolati

Tramite le analisi termiche dinamo-meccaniche (DMTA), i cui grafici per le formulazioni AESO 70:30 sono riportati nella figura 4.3, si è ottenuta una completa caratterizzazione visco-elastica dei materiali fotoreticolati a base di AESO. I dati ottenuti sono stati raccolti nella tabella 4.3. Per quanto riguarda le formulazioni "pure" è possibile osservare un leggero incremento della temperatura di transizione vetrosa (T_g) all'aumentare del contenuto di IBOA. Questo potrebbe essere dovuto sia a un ritardo nella vetrificazione con un conseguente aumento del tasso di conversione finale sia alla struttura stessa dell'IBOA. I valori di densità di reticolazione (v_c) presenti nella tabella 5 dimostrano che un aumento di contenuto di IBOA conduce ad una decrescita di v_c . Questo è dovuto all'aggiunta di diluente reattivo monofunzionale. Di conseguenza, ci saremmo aspettati una temperatura T_g più bassa del materiale fotoreticolato, ma osserviamo in realtà una tendenza opposta con un aumento della T_g al crescere del contenuto di IBOA. Questo è attribuibile alla struttura chimica dell'isobornil acrilato (IBOA) che possiede un anello rigido, il quale conferisce una rigidità maggiore alla struttura reticolata del polimero, controbilanciando quindi la minore densità di reticolazione. Perciò, un contenuto maggiore di IBOA comporta un aumento di rigidità nella struttura finale del materiale e, di conseguenza, una temperatura T_g più elevata, anche se la densità di reticolazione v_c diminuisce. Ciò significa che il maggior contributo alla rigidità della struttura fotoreticolata del polimero è fornito dal monomero IBOA e dalle sue proprietà chimiche.

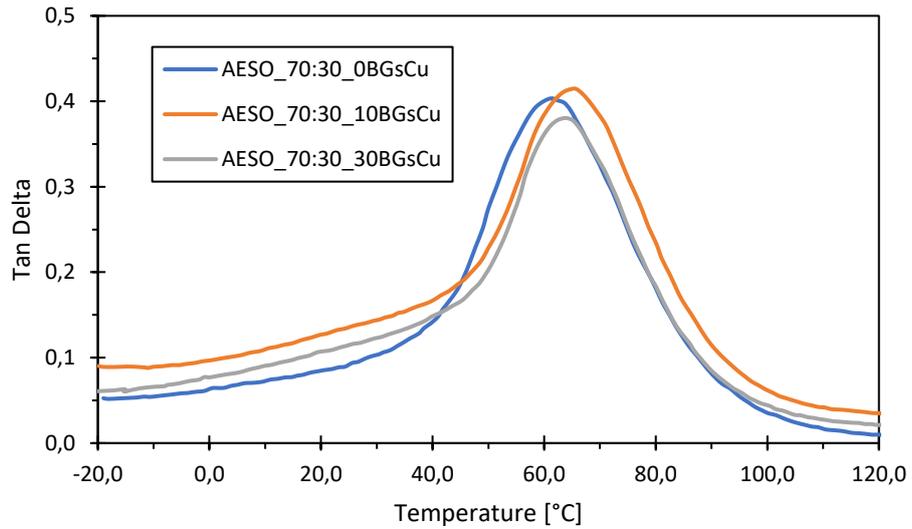


Figura 4.3: Analisi DMTA delle formulazioni AESO 70:30 con i diversi contenuti di vetro bioattivo

Sample	T _g [°C]	E' [MPa] (T _g +50°C)	v _c [mol/m ³]
70:30_0BGsCu	62,5 ± 1,4	16,6 ± 2,5	1726
70:30_10BGsCu	65,8 ± 1,4	18,9 ± 1,5	1948
70:30_30BGsCu	63,1 ± 1,0	32,1 ± 2,1	3332
80:20_0BGsCu	62,3 ± 1,3	22,1 ± 2,2	2298
80:20_10BGsCu	60,1 ± 2,4	25,8 ± 1,9	2699
80:20_30BGsCu	56,7 ± 1,3	32,2 ± 1,1	3399
70:30_30BGsCu_3D_post	65,6 ± 0,5	31,0 ± 1,8	3197

Tabella 4.3: Risultati ottenuti tramite analisi DMTA delle formulazioni AESO 70:30 e AESO 80:20, con contenuti variabili di vetro bioattivo

L'aggiunta di vetro bioattivo S77Cu comporta in genere una leggera diminuzione della temperatura finale di transizione vetrosa (T_g) se confrontata con quella della stessa formulazione "pura". La decrescita della T_g osservata all'aumentare del contenuto di vetro bioattivo può essere attribuita ad un parziale impedimento del processo complessivo di fotoreticolazione, come già citato in precedenza, dovuto ad un effetto di assorbimento competitivo della luce.

I campioni con formulazione AESO-IBOA 70:30_30BGsCu stampati in 3D mostrano una temperatura di transizione vetrosa maggiore rispetto a quella dei campioni con le stesse concentrazioni fotoreticolati negli stampi in silicone. Questo può essere spiegato andando ad analizzare il differente processo di fotoreticolazione.

Nel processo di stampa 3D la fotoreticolazione avviene strato per strato ("layer by layer"), quindi ogni livello spesso 50 μm reticola singolarmente. Al contrario nei campioni realizzati negli stampi in silicone l'intero spessore di 150 μm polimerizza nello stesso istante. Sulla superficie di quei 150 μm di spessore delle formulazioni, inoltre, si trovano particelle di vetro bioattivo che impediscono la penetrazione dei raggi di luce UV attraverso il campione.

La stampa 3D prevede inoltre un post-curing, cioè una sorta di fotoreticolazione finale che avviene all'interno della lampada Dymax per la durata di 1 minuto, e che consente un'ulteriore e maggiore conversione dei gruppi acrilati che ancora non avevano reagito. La temperatura di transizione vetrosa (T_g) maggiore è perciò dovuta alla migliore interazione tra la matrice polimerica e il vetro bioattivo dopato con rame S77Cu nei campioni stampati in 3D, conseguenza del processo di reticolazione che avviene "strato per strato" ("layer-by-layer").

4.3 Reologia

Le analisi reologiche sono state condotte per studiare la viscosità e il comportamento dinamico delle diverse formulazioni. La figura 4.4a mostra le curve della viscosità di tutte le formulazioni prese in analisi, in funzione dello "shear rate" applicato e compreso tra 1 e 1000 s^{-1} , mentre la figura 4.4b mostra la viscosità per le stesse formulazioni ma per uno "shear rate" limitato tra 10 e 100 s^{-1} , che risulta essere quello di nostro interesse.

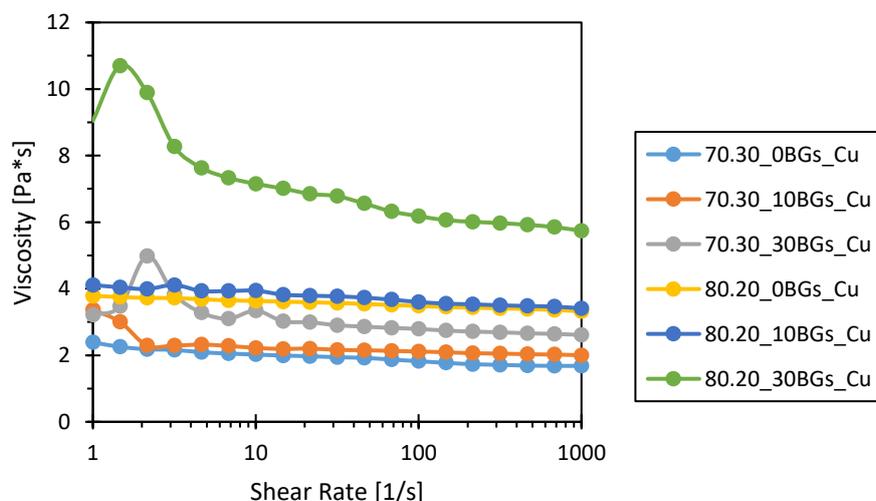


Figura 4.4a: Viscosità delle formulazioni ottenute per Shear Rates compresi tra 1 e 1000 s^{-1}

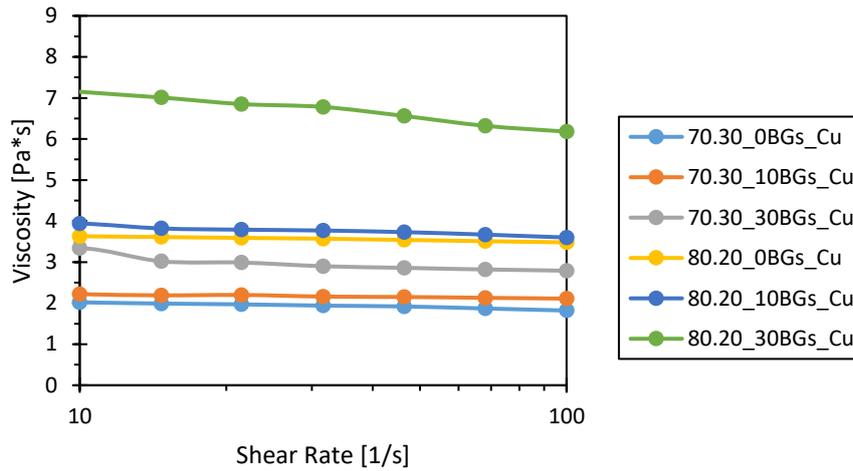


Figura 4.4b: Viscosità delle formulazioni ottenute per Shear Rates compresi tra 10 e 100 s⁻¹

La tabella 4.4 contiene i valori di viscosità delle varie formulazioni ottenuti per uno shear rate di 30 s⁻¹, tipicamente utilizzato nei processi di stampa 3D. Seguendo la letteratura, si riscontra che la formulazione ottimale per un processo di stampa 3D è quella composta da un rapporto 70:30 di AESO-IBOA e il 30% di vetro bioattivo S77Cu. Questa formulazione è stata evidenziata in tabella ed è stata quindi scelta per i consecutivi processi di stampa 3D.

Composition	Bioglasses	Viscosity [Pa*s] at 30 s ⁻¹
AESO 70:30	0	1,9
	10	2,2
	30	2,9
AESO 80:20	0	3,6
	10	3,8
	30	6,8

Tabella 4.4: Valori di viscosità ottenuti con il reometro per le varie formulazioni

4.4 Processo di stampa 3D

La formulazione AESO 70:30 “pura” e la stessa formulazione contenente anche il vetro bioattivo al 30 %, con e senza rame, sono state utilizzate con successo nei processi di stampa eseguiti con la stampante PRUSA SL1S (Praga, Repubblica Ceca).

Il processo di stampa è stato eseguito “strato per strato” (“layer-by-layer”), con spessori di 50 μm ciascuno, irraggiati sotto luce UV con una lunghezza d’onda di 405 nm per una durata di 5,0 s di esposizione per ogni layer. Dopo la stampa i campioni venivano posizionati all’interno della lampada DYMAX per 1 minuto al fine di completare la fotoreticolazione (fase di “post-curing”). Sono stati quindi stampati provini di diverse forme, inclusi quelli per le prove DMTA e i campioni per le prove a compressione e per le immersioni in SBF.

Nella figura 4.5 vengono mostrati esempi di strutture “complesse” ottenute con la stampante 3D utilizzando la formulazione AESO 70:30_30BGsCu, contenente quindi il 30% di vetro bioattivo dopato con rame. Sono state realizzate con successo tramite stampa 3D due strutture porose dotate di fori di circa 1 mm, dimostrando il fatto di poter utilizzare la formulazione scelta anche per la stampa di geometrie più elaborate.

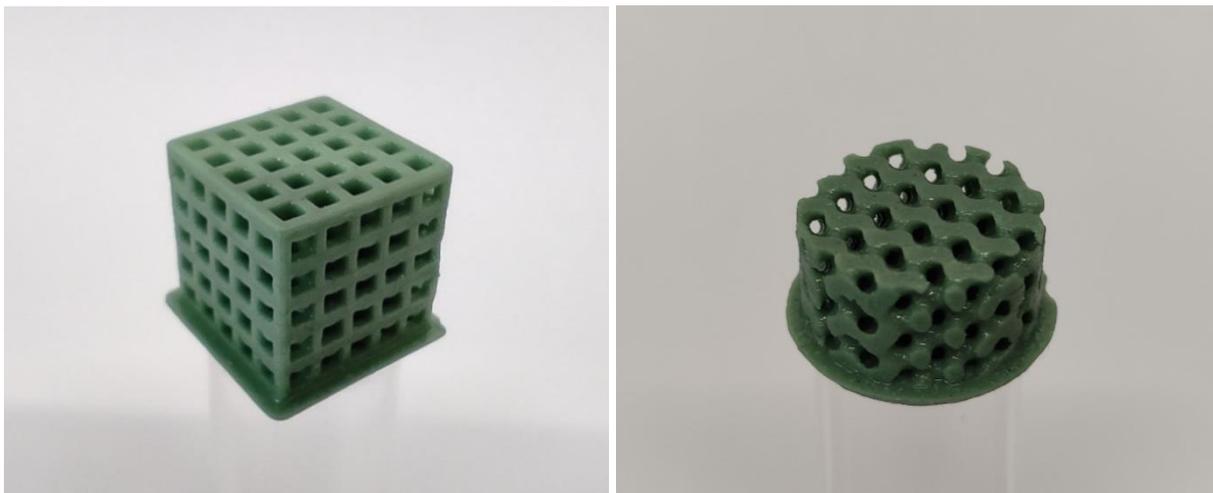


Figura 4.5: Geometrie complesse, stampate utilizzando la formulazione AESO 70:30_30BGsCu

Analisi SEM delle superfici dei campioni stampati in 3D hanno rivelato una distribuzione non del tutto omogenea del vetro bioattivo S77Cu all'interno della matrice polimerica. Le particelle infatti, probabilmente a causa della loro carica superficiale, tendono ad agglomerare maggiormente rispetto a quelle del vetro bioattivo non contenente rame. Ciò comporta inoltre una tendenza ad “emergere” maggiormente dalla superficie dei campioni, e questo fattore potrebbe in realtà essere favorevole per quanto riguarda la bioattività. La figura 4.6 riporta le immagini relative ai campioni contenenti il vetro bioattivo S77Cu al 30 %, a diversi fattori di ingrandimento. Le immagini mostrano che le particelle di vetro bioattivo non sono distribuite in modo ottimale ma tendono ad aggregarsi e a formare degli agglomerati. La figura 4.7, con un fattore di ingrandimento di 50k, mostra invece la presenza di singole particelle di vetro bioattivo S77Cu disperse con una dimensione media di $411,5 \pm 67,2$ nm, mentre le particelle di vetro bioattivo non contenente rame hanno dimensioni maggiori e misurano in media $482,1 \pm 58,8$ nm.

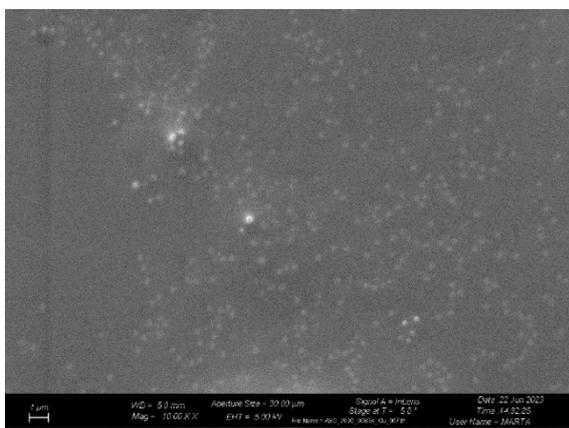


Figura 4.6a: Particelle di vetro S77Cu (5k x)

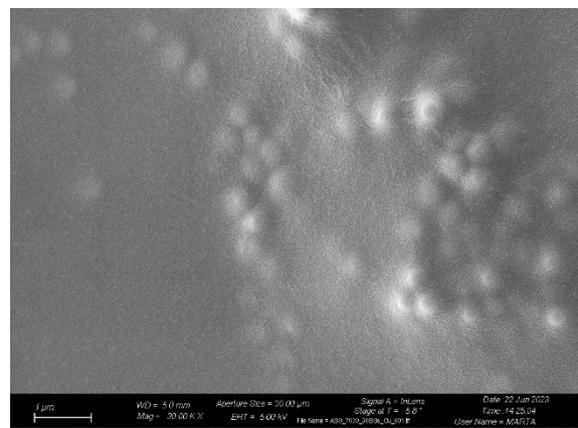


Figura 4.6b: Particelle di vetro S77Cu (10k x)

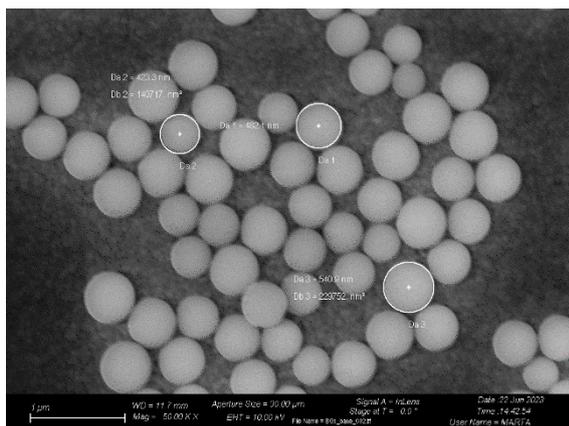


Figura 4.7a: Particelle di vetro “base” (50k x)

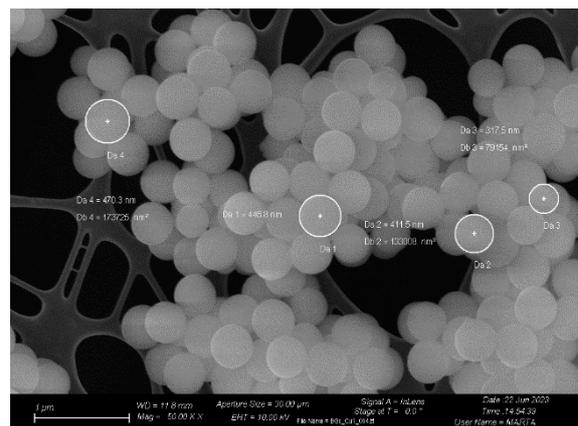


Figura 4.7b: Particelle di vetro S77Cu (50k x)

Dopo aver lasciato i campioni realizzati con la formulazione AESO 70:30_30BGsCu immersi in SBF (“Simulated Body Fluid”) ad una temperatura di 37 °C e mantenuti in agitazione a 120 rpm per una durata di 7, 14, 21 e 28 giorni, è stata inoltre valutata, sempre tramite FESEM, la presenza di idrossiapatite depositata sulla superficie dei campioni. L’esito è stato positivo, fornendo quindi buone prospettive per quanto riguarda l’osteconduttività del materiale. Nella figura 4.8 si può osservare la presenza e la classica struttura “aghiforme” dell’idrossiapatite presente sulla superficie dei campioni rimasti immersi in SBF rispettivamente per 7 e per 28 giorni.

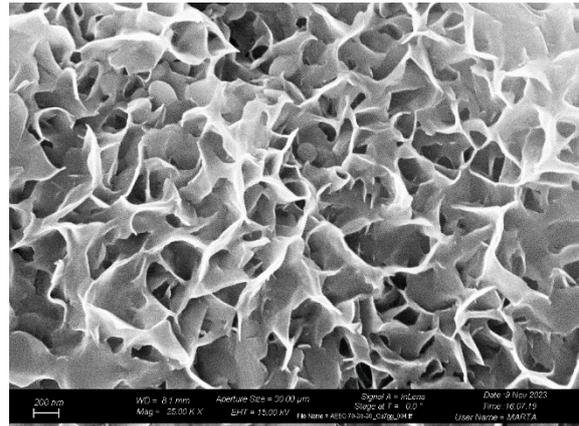
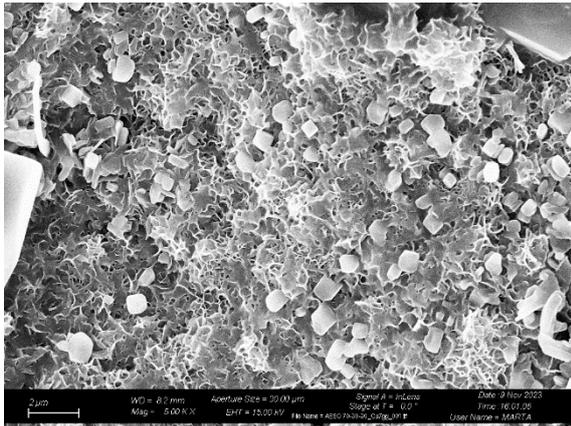


Figura 4.8a: Idrossiapatite depositata sui campioni AESO 70.30_30BGsCu rimasti immersi per 7gg (5k x e 25k x)

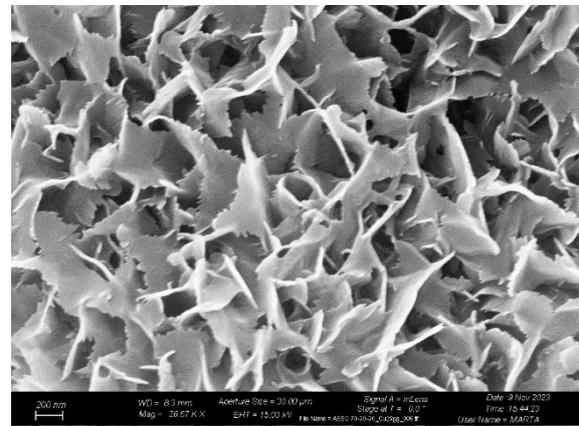
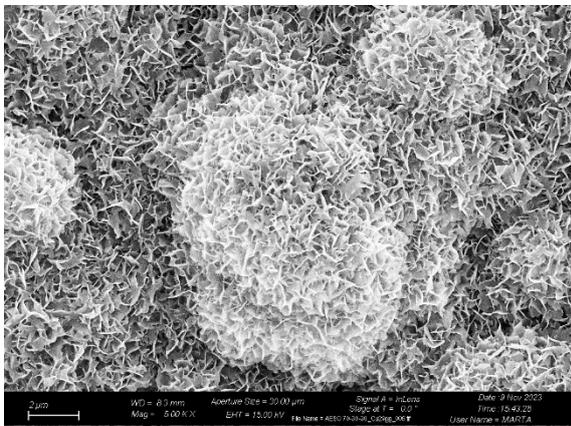


Figura 4.8b: Idrossiapatite depositata sui campioni AESO 70.30_30BGsCu rimasti immersi per 28gg (5k x e 26,7k x)

Per verificare la reale presenza di idrossiapatite sulla superficie dei campioni AESO 70:30_30BGsCu in seguito all'immersione in SBF, sono state svolte inoltre delle analisi di diffrazione a raggi X (XRD). Gli spettri così ottenuti hanno confermato l'effettiva precipitazione di idrossiapatite sulla superficie dei campioni considerati, attestando quindi una buona bioattività degli stessi. Di seguito viene riportato lo spettro di un campione AESO 70:30_30BGsCu rimasto immerso in SBF per 28 giorni (figura 4.8c), in cui si possono notare i caratteristici picchi dell'idrossiapatite (HAp).

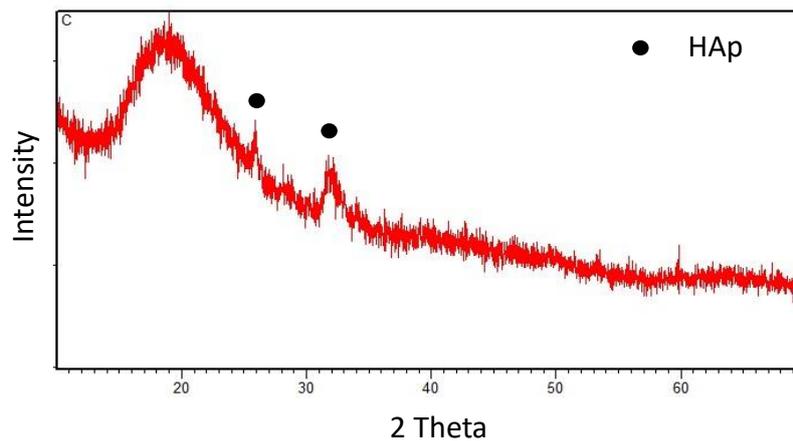


Figura 4.8c: Spettro XRD (X-Ray Diffraction) di un campione AESO 70:30_30BGsCu, 28gg in SBF

Come ulteriore prova di verifica della effettiva precipitazione di idrossiapatite sulla superficie dei campioni sono state effettuate anche delle analisi EDS () e, anche in questo caso, hanno dimostrato la reale presenza di HAp, come si può notare dai caratteristici picchi presenti nella figura 4.8d.

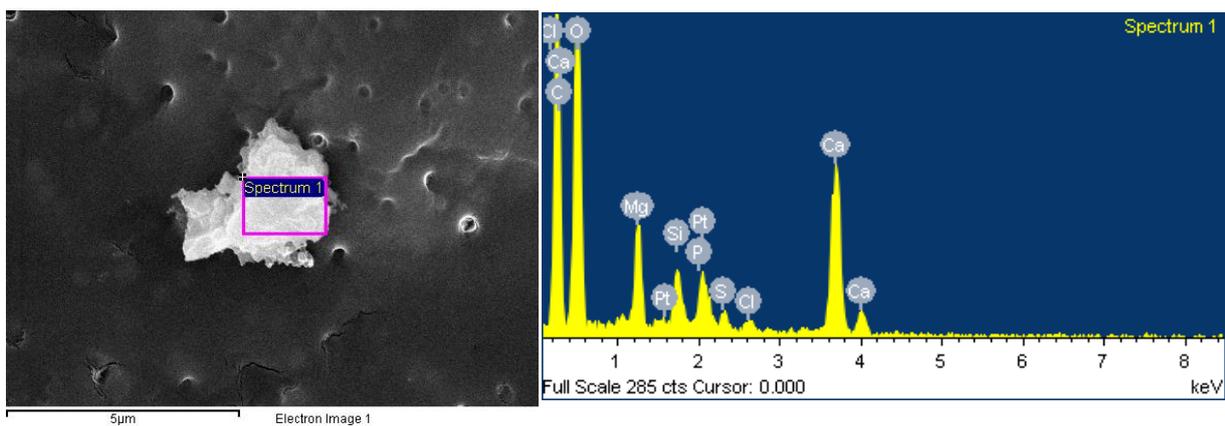


Figura 4.8D: Analisi EDS (X-Ray Diffraction) di un campione AESO 70:30_30BGsCu, 28gg in SBF

4.5 Prove di compressione

Le analisi a compressione sono state effettuate sulla formulazione ottimale per la stampa 3D, corrispondente quindi alla composizione AESO 70:30_30 BGsCu, “caricata” quindi con il 30% di vetro bioattivo S77Cu. Per poter realizzare un confronto è stata però presa in esame anche la formulazione pura AESO 70:30, senza contenuto di vetro bioattivo, e la formulazione AESO 70:30_30 BGs contenente invece il vetro bioattivo “base” al 30%. A partire dai test di compressione è stato determinato il modulo a compressione nella regione lineare della deformazione, ottenuto utilizzando l’equazione (3). I risultati riportati nella tabella 4.5 e nella figura 4.9 mostrano una decrescita del modulo a compressione nei campioni contenenti il vetro bioattivo dopato con rame (S77Cu), mentre tra la formulazione pura e quella contenente il vetro bioattivo “base” i moduli sostanzialmente si equivalgono. Ciò potrebbe essere dovuto alla struttura microscopica dei campioni con formulazione AESO 70:30_30BGsCu poiché, come abbiamo visto, gli agglomerati di particelle di vetro bioattivo potrebbero rendere la struttura più fragile e meno resistente a sollecitazioni anche di tipo compressivo. Inoltre, l’aggiunta del vetro bioattivo S77Cu riduce in parte le proprietà meccaniche del campione anche a causa della fotoreticolazione “schermata” proprio dalle particelle stesse di vetro bioattivo, che non consentono di ottenere il massimo della rigidità derivante, invece, da una fotoreticolazione completa.

Sample	Compression Modulus [MPa]
70:30_0BGs	65,0 ± 2,6
70:30_30BGs	66,6 ± 3,4
70:30_30BGs_Cu	46,9 ± 4,1

Tabella 4.5: Valori dei moduli a compressione ottenuti dalle prove di compressione

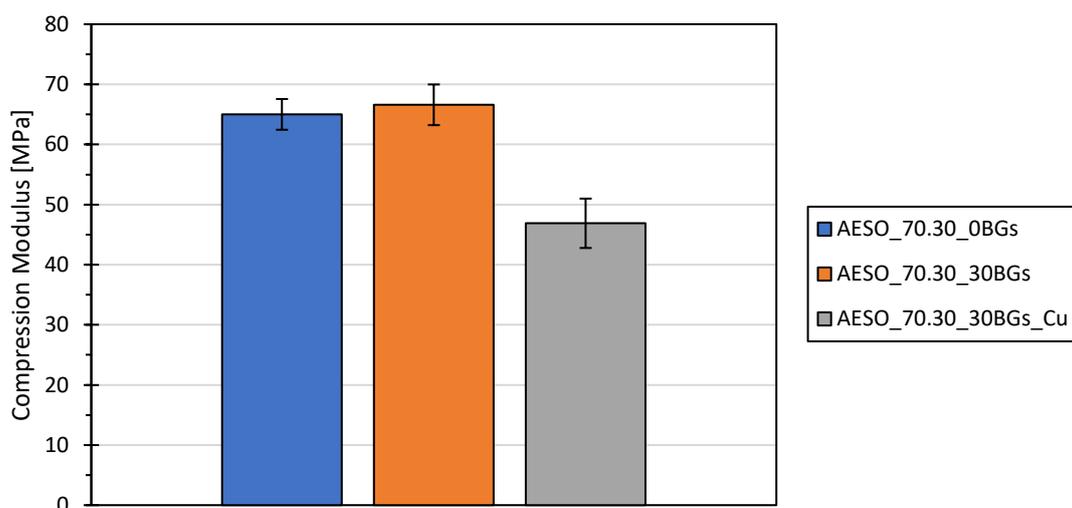


Figura 4.9: Moduli a compressione delle diverse formulazioni rappresentati in un istogramma

4.6.1 Valutazione della citocompatibilità

In accordo con i risultati ottenuti nei test precedenti, come le prove reologiche e le densità di reticolazione (crosslinking) calcolate grazie alle analisi DMTA, la formulazione AESO-IBOA 70:30 con il 30% di vetro bioattivo contenente rame ha dimostrato di possedere potenzialmente le proprietà ottimali per essere utilizzata nel processo di stampa 3D. Per analizzare ed approfondire i suoi effetti sulla citocompatibilità con le cellule del corpo umano, sono state selezionate ed utilizzate delle cellule staminali mesenchimali di midollo osseo umano come linea cellulare, a causa della loro capacità di auto-rinnovamento e di differenziazione che giocano un ruolo fondamentale nella cura e nella rigenerazione dei tessuti del corpo umano. Per verificare se l'attività di citocompatibilità dei campioni venisse alterata da una modifica nel contenuto di vetro bioattivo e quindi dalla presenza di rame, potenzialmente citotossico, sono stati selezionati i seguenti campioni: AESO 70:30 (senza vetro bioattivo), AESO 70:30_30BG (con il vetro bioattivo "base") e AESO 70:30_30BGsCu (contenenti vetro bioattivo dopato con rame), al fine di comparare i risultati della loro citocompatibilità nelle analisi in vitro. Le cellule hMSC coltivate nella piastra multiwell da 24 pozzetti senza alcun campione sono state considerate come campioni di controllo con il 100% di attività metabolica, e i risultati ottenuti sono stati normalizzati di conseguenza basandosi su quel valore.

In breve, le cellule mesenchimali staminali hMSC sono state seminate direttamente sulla superficie dei campioni, e dopo lassi di tempo di 24 e 48 h sono state analizzate la vitalità cellulare e la morfologia delle cellule adese e disperse tramite un saggio metabolico di resazurina (blu alamar), colorazione a fluorescenza per la conta delle cellule vive/morte ("live/dead") e immagini SEM, come riportato nella figura 4.10 a, b e c.

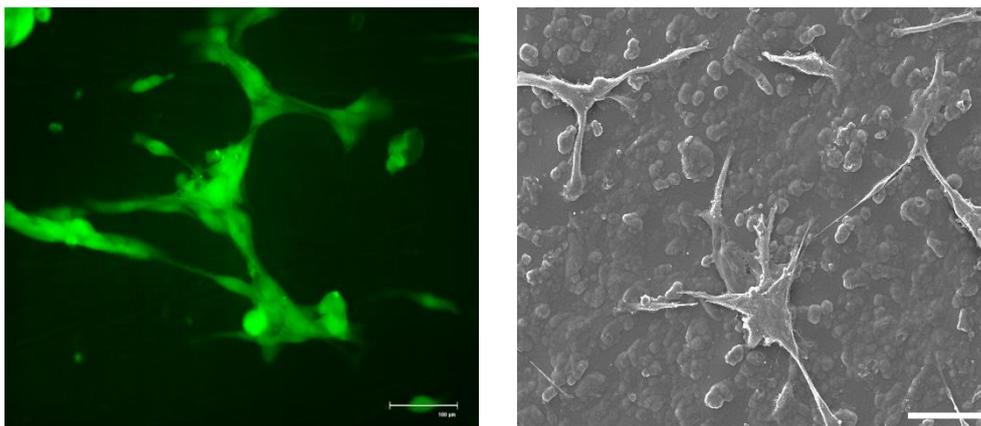


Figura 4.10a: Live/Dead staining a fluorescenza e SEM per i campioni AESO 70:30 (48h)

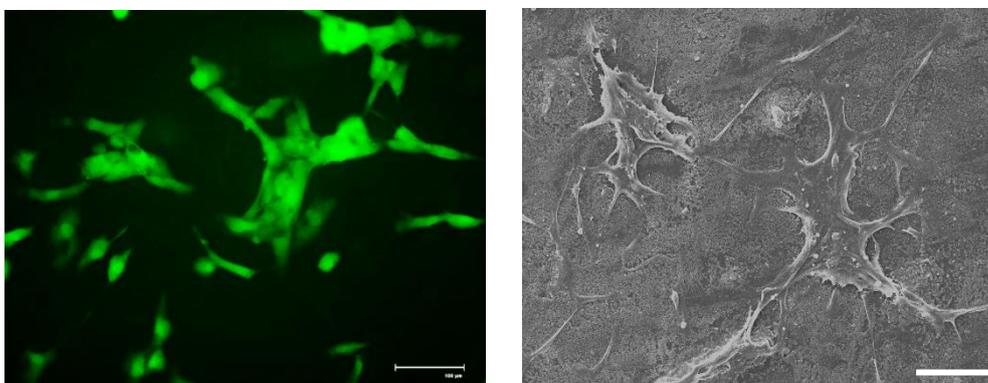


Figura 4.10b: Live/Dead staining a fluorescenza e SEM per i campioni AESO 70:30_30BGs (48h)

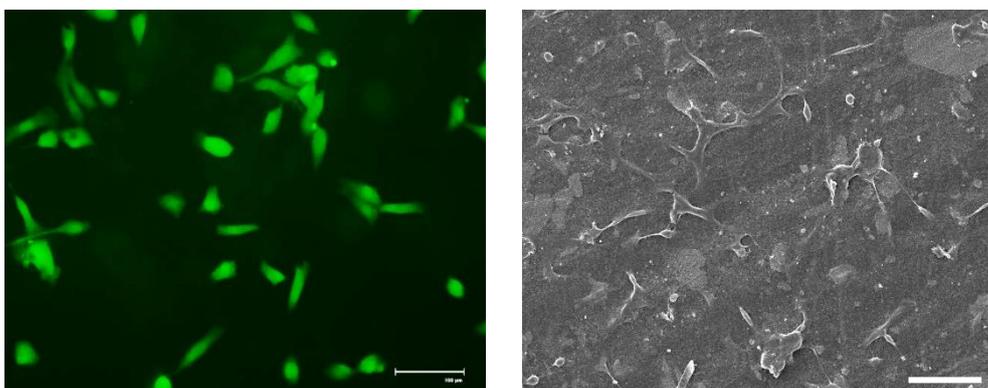


Figura 4.10c: Live/Dead staining a fluorescenza e SEM per i campioni AESO 70:30_30BGsCu (48h)

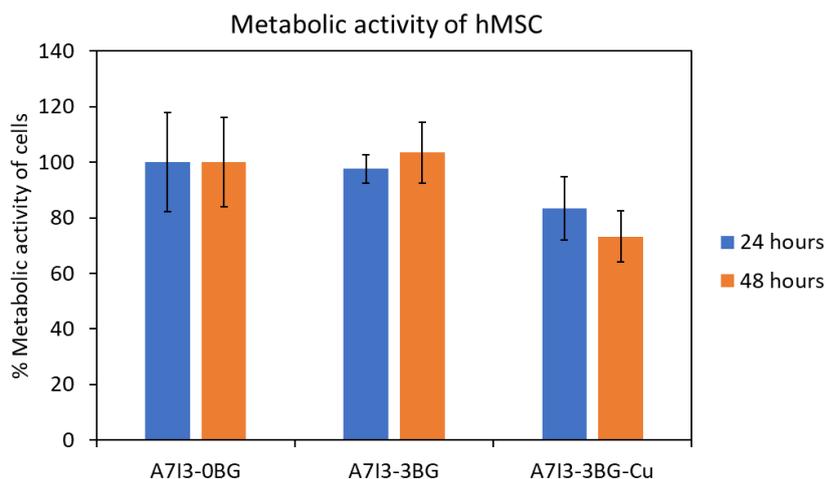


Figura 4.11: Attività metabolica delle cellule mesenchimali dopo 24 e 48 h

I risultati dell'attività metabolica delle cellule mesenchimali, riportati nella figura 4.11, sono stati rilevati dopo 24 e 48 ore di incubazione a 37 °C. L'attività metabolica delle cellule hMSC adese alle superfici dei campioni con formulazione AESO 70:30 e AESO 70:30_30BGs sono rimaste pressoché simili mentre quella delle formulazioni AESO 70:30_30BGsCu sono diminuite intorno al 70-80%. Questo è sicuramente spiegabile tenendo in considerazione la possibile citotossicità del rame contenuto nel vetro bioattivo S77Cu

L'elevata attività metabolica delle cellule presenti sulla superficie dei campioni AESO 70:30 e AESO 70:30_BGs indica invece che un alto numero di cellule vive adese a quelle superfici ha metabolizzato la resazurina blu e non-fluorescente in un altro composto rosa e fluorescente, detto resorufina, e la loro intensità è stata misurata ad una lunghezza d'onda di emissione di 590 nm.

Le immagini al SEM sono state rilevate 48 h dopo la semina e l'incubazione delle cellule, confermando i risultati dell'attività metabolica e indicando che i campioni con la formulazione AESO-IBOA 70:30 con il 30% di vetro bioattivo "base" danno vita a una superficie adatta per l'adesione e la proliferazione cellulare, mentre sulle superfici dei campioni contenenti vetro bioattivo dopato con rame hanno aderito un minor numero di cellule e sono state individuate delle cellule non adese, di forma globulare (vedi figura 4.10 c). La vitalità delle cellule adese alla superficie dei vari campioni è stata analizzata tramite la colorazione a fluorescenza live/dead, e i risultati sono riportati nelle figure 4.10 a, b e c, dove si può notare appunto una maggiore adesione e distribuzione cellulare, in verde, nel caso delle prime due formulazioni.

I risultati della valutazione della citocompatibilità hanno dimostrato che i campioni realizzati con la formulazione AESO-IBOA 70:30_30 BGs mostrano i risultati migliori per quanto riguarda la biocompatibilità con le cellule umane, ma anche i campioni contenenti vetro bioattivo dopato con rame hanno ottenuto valori accettabili di vitalità cellulare dopo 24 e 48 h, assestandosi intorno al 70-80%.

4.6.2 Valutazione dell'antibattericità

Oltre alla citocompatibilità, è stata effettuata sugli stessi campioni anche una valutazione dell'attività antibatterica, basandosi sulle indicazioni del protocollo standard ISO 22196 e andando quindi ad "infettare" i campioni con la corretta concentrazione batterica (1×10^5 cellule). Per farlo sono stati presi in considerazione principalmente due parametri: l'attività metabolica dello *Staphylococcus aureus* e la conta delle colonie batteriche vitali (CFU – "Colony-Forming Units") dopo 24 ore di incubazione, necessarie per consentire la proliferazione delle colonie batteriche. Si è inoltre valutata la superficie dei campioni tramite analisi SEM dopo l'azione e lo sviluppo delle colonie batteriche.

Per determinare l'attività metabolica batterica è stato utilizzato il test dell'alar blue, mentre per stabilire la vitalità e la quantità di batteri (CFUs) presenti sono stati analizzati i batteri planctonici e il biofilm aderente, servendosi di un saggio a colorazione fluorescente Live/Dead e di un microscopio digitale a fluorescenza.

I risultati sono visibili nella figura 4.12 e mostrano un elevato potere antibatterico dei campioni contenenti rame, quindi con formulazione AESO 70:30_30BGsCu, che si sono rivelati capaci di limitare a circa il 50% l'attività metabolica dello *S. Aureus*. Anche il numero di unità formanti colonie (CFUs) sugli stessi campioni, inoltre, è diminuito di circa due ordini di grandezza passando da 10^6 a 10^4 colonie batteriche vitali. Tutto ciò dimostra che l'elevata antibattericità del rame è riscontrabile anche nelle formulazioni contenenti vetro bioattivo dopato con rame e questo risulta essere molto promettente anche per successive sperimentazioni in vivo.

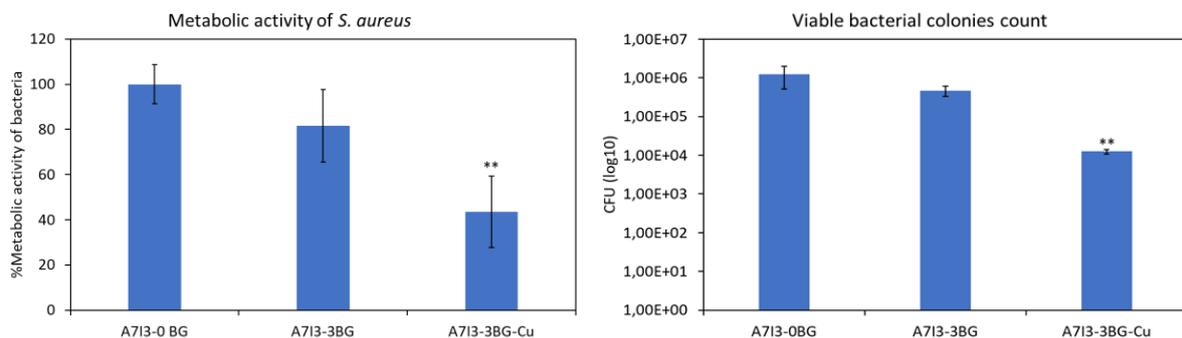


Figura 4.12: Attività metabolica e conta delle colonie batteriche vitali (CFU) di *S. aureus* dopo 24 h

Anche analizzando le immagini catturate al SEM (figura 4.13 a-c), si può osservare visivamente la riduzione dei batteri planctonici presenti sulla superficie dei campioni in AESO 70:30_30BGsCu e ciò corrisponde infatti alla riduzione della conta di unità formanti colonie riscontrata nell'istogramma della figura 4.12.

Per quanto riguarda i campioni realizzati con la formulazione AESO 70:30_30BGs, invece, si osserva una lieve riduzione dell'attività metabolica dei batteri, non significativa.

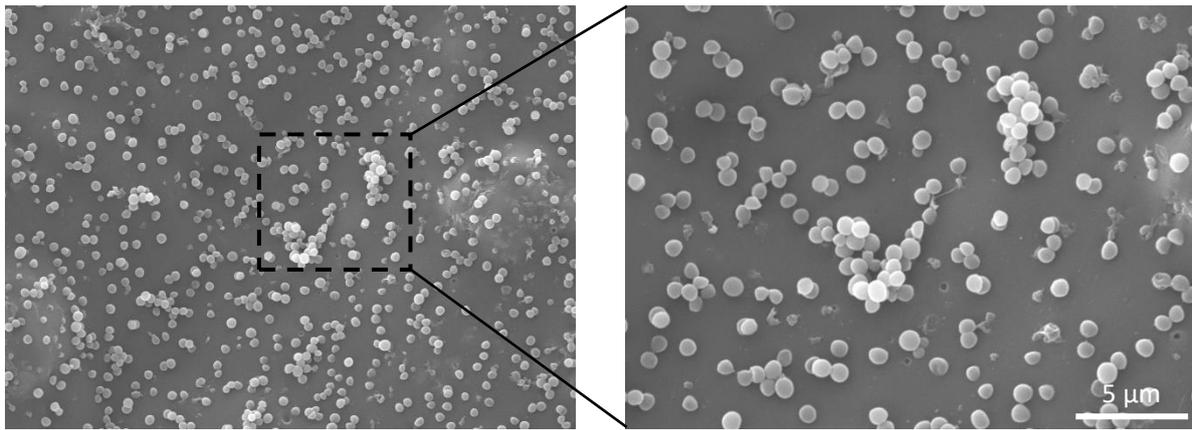


Figura 4.13a: SEM dei campioni AESO 70:30_0BGs colonizzati da *S. Aureus* dopo 24 h

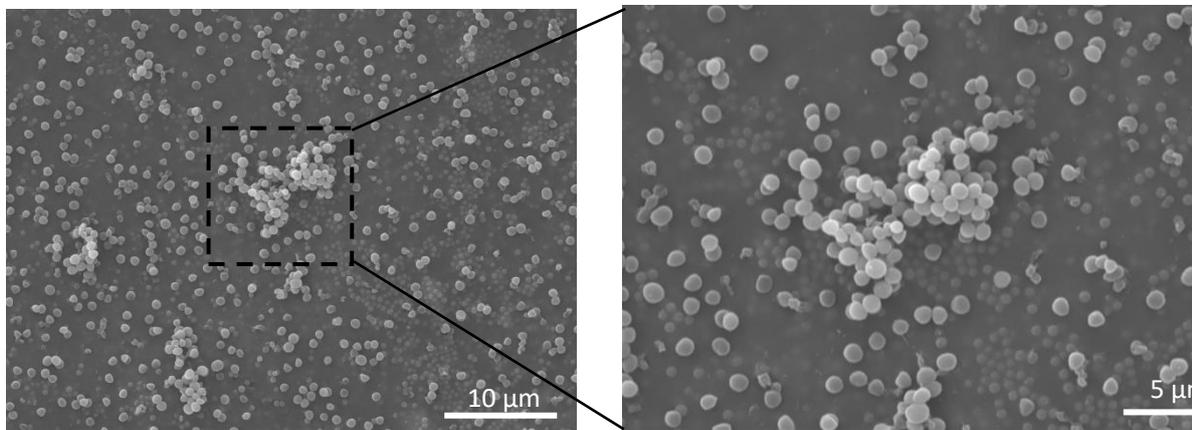


Figura 4.13b: SEM dei campioni AESO 70:30_30BGs colonizzati da *S. Aureus* dopo 24 h

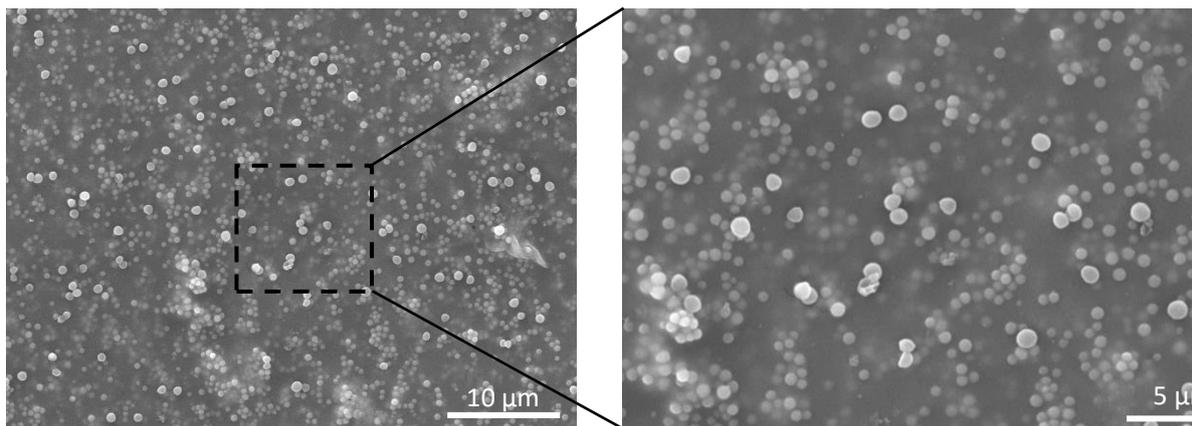


Figura 4.13b: SEM dei campioni AESO 70:30_30BGsCu colonizzati da *S. Aureus* dopo 24 h

5. Conclusioni

In questo lavoro di tesi è stata utilizzata una resina bio derivata dall'olio di soia epossidato acrilato (AESO) combinata con un diluente reattivo, l'isobornil acrilato (IBOA), per realizzare uno scaffold per rigenerazione del tessuto osseo, rinforzato con un vetro bioattivo dopato con rame (S77Cu).

È stata adoperata una formulazione composta da quattro componenti: l'olio di soia epossidato acrilato (AESO), l'isobornil acrilato (IBOA), il foto-iniziatore Irgacure 819 e il vetro bioattivo a base di silicio dopato con ioni rame (S77Cu). Il diluente reattivo è stato utilizzato principalmente come "fluidificante" per migliorare la densità e la viscosità della composizione in vista del processo di stampa 3D, senza però andare ad intaccarne la biocompatibilità. Alla formulazione polimerica "pura", cioè priva di vetro bioattivo, è stata addizionata una componente di vetro bioattivo dopato con rame con una concentrazione del 10 e del 30%, sia per quanto riguarda la formulazione AESO-IBOA 70:30 sia per quella 80:20.

La composizione così ottenuta ha dimostrato ottime proprietà di fotopolimerizzazione, con un decremento minimo rilevato nel processo di fotoreticolazione, dovuto probabilmente all'interferenza delle particelle di vetro bioattivo.

Sono poi state studiate le proprietà termo-meccaniche e visco-elastiche del materiale rinforzato con le particelle di vetro bioattivo, servendosi delle analisi con DMTA e dei test a compressione.

Le prove reologiche hanno dimostrato che la formulazione ottimale per il processo di stampa 3D è risultata essere quella con un rapporto AESO-IBOA 70:30 e il 30% di vetro bioattivo S77Cu. I test a compressione hanno invece evidenziato una diminuzione del modulo a compressione dei campioni realizzati con la formulazione AESO 70:30_30BGsCu rispetto a quelli con il vetro bioattivo "base", cioè AESO 70:30_30BGs, senza che questa possa però andare a compromettere le performance meccaniche dello scaffold.

Sono poi state condotte importanti prove di citocompatibilità e antibattericità in vitro per i campioni realizzati con la formulazione AESO 70:30_30BGsCu, AESO 70:30_30BGs e AESO 70:30_0BGs. Queste hanno dimostrato una buona biocompatibilità della formulazione contenente vetro bioattivo dopato con rame, seppur inferiore a quella della formulazione contenente il vetro bioattivo "base". Dal punto di vista dell'effetto antibatterico, invece, il rame contenuto nella formulazione AESO 70:30_30BGsCu ha dato gli esiti sperati conferendo un elevato potere antibatterico ai campioni, sia per quanto riguarda la riduzione dell'attività metabolica delle colonie batteriche sia per ciò che concerne il loro numero e quindi la conta delle unità formanti colonie (CFUs).

Tutto ciò pone delle ottime basi e lascia ben sperare per eventuali sperimentazioni e applicazioni future anche in vivo di questa composizione, di cui si potrebbe sfruttare l'ottima antibattericità oltre che le buone proprietà meccaniche, cercando però di limitarne quanto più possibile la tossicità in ambiente biologico.

6. Bibliografia

- [1] M. Bergoglio, Z. Najmi, A. Cochis, M. Miola, E. Vernè, M. Sangermano, “UV-Cured Bio-Based Acrylated Soybean Oil Scaffold Reinforced with Bioactive Glasses”, *Polymers* 15 (20), 4089.
- [2] B. Clarke, “Normal bone anatomy and physiology.,” *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.*, vol. 3 Suppl 3, no. Suppl 3, pp. S131-9, Nov. 2008, doi: 10.2215/CJN.04151206.
- [3] D. W. 2nd Buck and G. A. Dumanian, “Bone biology and physiology: Part I. The fundamentals.,” *Plast. Reconstr. Surg.*, vol. 129, no. 6, pp. 1314–1320, Jun. 2012, doi: 10.1097/PRS.0b013e31824eca94.
- [4] L. Bayliss, D. J. Mahoney, and P. Monk, “Normal bone physiology, remodelling and its hormonal regulation,” *Surg.*, vol. 30, no. 2, pp. 47–53, 2012, doi: <https://doi.org/10.1016/j.mpsur.2011.12.009>.
- [5] Ž. Perić Kačarević et al., «An introduction to bone tissue engineering», *Int. J. Artif. Organs*, vol. 43, n. 2, pagg. 69–86, feb. 2020, doi: 10.1177/0391398819876286.
- [6] A. P. Moreno Madrid, S. M. Vrech, M. A. Sanchez, e A. P. Rodriguez, «Advances in additive manufacturing for bone tissue engineering scaffolds», *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 100, pagg. 631–644, lug. 2019, doi: 10.1016/j.msec.2019.03.037
- [7] P. Chocholata, V. Kulda, e V. Babuska, «Fabrication of Scaffolds for Bone-Tissue Regeneration», *Materials*, vol. 12, n. 4, pag. 568, feb. 2019, doi: 10.3390/ma12040568.
- [8] «0003-3219%281994%29064%3C0175%3AWLABSA%3E2.0.CO%3B2.pdf». <https://meridian.allenpress.com/angle-orthodontist/article/64/3/175/57155/Wolff-s-Lawand-bone-s-structural-adaptations-t>
- [9] «Malattia dell’osso | ICS Maugeri». <https://www.icsmaugeri.it/patologie/malattia-delloso> (consultato 12 luglio 2022)
- [10] «science.8493529.pdf». R. Langer, J.P. Vacanti, «Tissue engineering», *Articles, SCIENCE*, vol.260
- [11] D. M. K. Junjie Zhao, Michelle Griffin, Jun Cai, Shaoxue Li, Peter E.M Bulter, “Bioreactors for tissue engineering: An update,” 2016
- [12] F. J. O’Brien, «Biomaterials & scaffolds for tissue engineering», *Mater. Today*, vol. 14, n. 3, pagg. 88–95, mar. 2011, doi: 10.1016/S1369-7021(11)70058-X
- [13] E. Fiume, J. Barberi, E. Vernè, and F. Baino, “Bioactive Glasses: From Parent 45S5 Composition to Scaffold-Assisted Tissue-Healing Therapies,” 2018.
- [14] M. J. Miller and C. W. Patrick, “Tissue engineering.,” *Clin Plast Surg*, vol. 30, no. 1, p. 91–103, vii, 2003.
- [15] A. J. Salgado, O. P. Coutinho, e R. L. Reis, «Bone Tissue Engineering: State of the Art and Future Trends», *Macromol. Biosci.*, vol. 4, n. 8, pagg. 743–765, ago. 2004, doi: 10.1002/mabi.200400026
- [16] C. M. Agrawal and R. B. Ray, “Biodegradable polymeric scaffolds for musculoskeletal tissue engineering,” *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 55, no. 2, pp. 141–150, May 2001, doi: [https://doi.org/10.1002/1097-4636\(200105\)55:23.0.CO;2-J](https://doi.org/10.1002/1097-4636(200105)55:23.0.CO;2-J).

- [17] T. Ghassemi, A. Shahroodi, M. H. Ebrahimzadeh, A. Mousavian, J. Movaffagh, e A. Moradi, «Current Concepts in Scaffolding for Bone Tissue Engineering», NUMBER, vol. 6, n. 2, pag. 10, 2018.
- [18] Y.-Z. Huang, H.-Q. Xie, e X. Li, «Scaffolds in Bone Tissue Engineering: Research Progress and Current Applications», in *Encyclopedia of Bone Biology*, Elsevier, 2020, pagg. 204–215. doi: 10.1016/B978-0-12-801238-3.11205-X.
- [19] J. Henkel et al., “Bone Regeneration Based on Tissue Engineering Conceptions - A 21st Century Perspective.,” *Bone Res.*, vol. 1, no. 3, pp. 216–248, Sep. 2013, doi: 10.4248/BR201303002.
- [20] A. Wubneh, E. K. Tsekoura, C. Ayranci, and H. Uludağ, “Current state of fabrication technologies and materials for bone tissue engineering,” *Acta Biomater.*, vol. 80, pp. 1–30, 2018.
- [21] S. Bose, M. Roy, and A. Bandyopadhyay, “Recent advances in bone tissue engineering scaffolds,” *Trends Biotechnol.*, vol. 30, no. 10, pp. 546–554, 2012.
- [22] K. Jahan and M. Tabrizian, “Composite biopolymers for bone regeneration enhancement in bony defects,” *Biomater. Sci.*, vol. 4, no. 1, pp. 25–39, 2016, doi: 10.1039/C5BM00163C.
- [23] “A Manual for Biomaterials/Scaffold Fabrication Technology,” *Manuals in Biomedical Research*, vol. Volume 4. WORLD SCIENTIFIC, p. 288, Jul. 01, 2007, doi: 10.1142/6408.
- [24] M. A. Fernandez-Yague, S. A. Abbah, L. McNamara, D. I. Zeugolis, A. Pandit, and M. J. Biggs, “Biomimetic approaches in bone tissue engineering: Integrating biological and physicochemical strategies,” *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 84, pp. 1–29, 2015.
- [25] E. Gentleman et al., “The effects of strontium-substituted bioactive glasses on osteoblasts and osteoclasts in vitro,” *Biomaterials*, vol. 31, no. 14, pp. 3949–3956, 2010.
- [26] Rezwan, K.; Chen, Q.Z.; Blaker, J.J.; Boccaccini, A.R., “Biodegradable and Bioactive Porous Polymer/Inorganic Composite Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Biomaterials*” 2006, 27, 3413–3431.
- [27] Lebedevaite, M.; Ostrauskaite, J.; Skliutas, E.; Malinauskas, M. “Photoinitiator Free Resins Composed of Plant-Derived Monomers for the Optical μ -3D Printing of Thermosets”. *Polymers* 2019, 11, 116.
- [28] Lebedevaite, M.; Ostrauskaite, J.; Skliutas, E.; Malinauskas, M. “Photocross-linked Polymers Based on Plant-derived Monomers for Potential Application in Optical 3D Printing”. *J. Appl. Polym. Sci.* 2020, 137, 48708.
- [29] Behera, D.; Banthia, A.K. “Synthesis, Characterization, and Kinetics Study of Thermal Decomposition of Epoxidized Soybean Oil Acrylate”. *J. Appl. Polym. Sci.* 2008, 109, 2583–2590.
- [30] Miao, S.; Zhu, W.; Castro, N.J.; Nowicki, M.; Zhou, X.; Cui, H.; Fisher, J.P.; Zhang, L.G. “4D Printing Smart Biomedical Scaffolds with Novel Soybean Oil Epoxidized Acrylate”. *Sci. Rep.* 2016, 6, 27226.
- [31] Mondal, D.; Srinivasan, A.; Comeau, P.; Toh, Y.-C.; Willett, T.L. “Acrylated Epoxidized Soybean Oil/Hydroxyapatite-Based Nanocomposite Scaffolds Prepared by Additive Manufacturing for Bone Tissue Engineering”. *Mater. Sci. Eng. C* 2021, 118, 111400
- [32] Pezzana, L.; Melilli, G.; Delliere, P.; Moraru, D.; Guigo, N.; Sbirrazzuoli, N.; Sangermano, M. “Thiol-Ene Biobased Networks: Furan Allyl Derivatives for Green Coating Applications”. *Prog. Org. Coat.* 2022, 173, 107203.

- [33] Subramaniyan, S.; Bergoglio, M.; Sangermano, M.; Hakkarainen, M. “Vanillin-Derived Thermally Reprocessable and Chemically Recyclable Schiff-Base Epoxy Thermosets”. *Glob. Chall.* 2023, 7, 2200234.
- [34] Bergoglio, M.; Reisinger, D.; Schlögl, S.; Griesser, T.; Sangermano, M. “Sustainable Bio-Based UV-Cured Epoxy Vitrimer from Castor Oil”. *Polymers* 2023, 15, 1024.
- [35] Nason, C.; Pojman, J.A.; Hoyle, C. “The Effect of a Trithiol and Inorganic Fillers on the Photo-Induced Thermal Frontal Polymerization of a Triacrylate”. *J. Polym. Sci. A Polym. Chem.* 2008, 46, 8091–8096.
- [36] Noè, C.; Hakkarainen, M.; Sangermano, M. “Cationic Uv-Curing of Epoxidized Biobased Resins”. *Polymers* 2021, 13, 89.
- [37] Noè, C.; Hakkarainen, M.; Malburet, S.; Graillot, A.; Adekunle, K.; Skrifvars, M.; Sangermano, M. “Frontal-Photopolymerization of Fully Biobased Epoxy Composites”. *Macromol. Mater. Eng.* 2022, 307, 2100864.
- [38] Courtecuisse, F.; Belbakra, A.; Croutxé-Barghorn, C.; Allonas, X.; Dietlin, C. “Zirconium Complexes to Overcome Oxygen Inhibition in Free-Radical Photopolymerization of Acrylates: Kinetic, Mechanism, and Depth Profiling”. *J. Polym. Sci. A Polym. Chem.* 2011, 49, 5169–5175.
- [39] Steindl, J.; Koch, T.; Moszner, N.; Gorsche, C. “Silane–Acrylate Chemistry for Regulating Network Formation in Radical Photopolymerization”. *Macromolecules* 2017, 50, 7448–7457
- [40] G. Turnbull et al., “3D bioactive composite scaffolds for bone tissue engineering,” *Bioact. Mater.*, vol. 3, no. 3, pp. 278–314, 2018.
- [41] B. Sarker, J. Hum, S. N. Nazhat, and A. R. Boccaccini, “Combining Collagen and Bioactive Glasses for Bone Tissue Engineering: A Review,” *Adv. Healthc. Mater.*, vol. 4, no. 2, pp. 176–194, Jan. 2015, doi: <https://doi.org/10.1002/adhm.201400302>.
- [42] S. Fiorilli et al., “The Incorporation of Strontium to Improve Bone-Regeneration Ability of Mesoporous Bioactive Glasses,” *Materials (Basel)*, vol. 11, no. 5, 2018, doi: 10.3390/ma11050678.
- [43] T. Albrektsson and C. Johansson, “Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration,” *Eur. spine J. Off. Publ. Eur. Spine Soc. Eur. Spinal Deform. Soc. Eur. Sect. Cerv. Spine Res. Soc.*, vol. 10 Suppl 2, no. Suppl 2, pp. S96-101, Oct. 2001, doi: 10.1007/s005860100282.
- [44] C. Wu and J. Chang, “Mesoporous bioactive glasses: structure characteristics, drug/growth factor delivery and bone regeneration application.”
- [45] X. X. Yan et al., “Mesoporous bioactive glasses. I. Synthesis and structural characterization,” *J. Non. Cryst. Solids*, vol. 351, no. 40–42, pp. 3209–3217, 2005.
- [46] L. L. Hench, “Bioactive materials: The potential for tissue regeneration,” *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 41, no. 4, pp. 511–518, Sep. 1998, doi: [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4636\(19980915\)41:43.0.CO;2-F](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4636(19980915)41:43.0.CO;2-F).
- [47] T. Gong, J. Xie, J. Liao, T. Zhang, S. Lin, and Y. Lin, “Nanomaterials and bone regeneration,” *Bone Res.*, vol. 3, no. 1, p. 15029, 2015, doi: 10.1038/boneres.2015.29.
- [48] Pajares-Chamorro, N. & Chatzistavrou, X. “Bioactive Glass Nanoparticles for Tissue Regeneration”. *ACS Omega* 5, 12716–12726 (2020).

- [49] Varmette, E. A., Nowalk, J. R., Flick, L. M. & Hall, M. M. “Abrogation of the inflammatory response in LPS-stimulated RAW 264.7 murine macrophages by Zn- and Cu-doped bioactive sol-gel glasses”. *J. Biomed. Mater. Res. Part A* 90A, 317–325 (2009).
- [50] Erol, M., Özyv uran, A., Marasi, M. & Kügükbayrak, S. “In Vitro Evaluation of Sr and Cu Doped Bioactive Glasses”. *Adv. Sci. Lett.* 19, 3333–3337 (2013).
- [51] Palza, H. et al. “Designing antimicrobial bioactive glass materials with embedded metal ions synthesized by the sol-gel method”. *Mater. Sci. Eng. C* 33, 3795–3801 (2013)
- [52] A. A. Zadpoor and J. Malda, “Additive Manufacturing of Biomaterials, Tissues, and Organs,” *Ann. Biomed. Eng.*, vol. 45, no. 1, pp. 1–11, 2017.
- [53] M. Alizadeh-Osgouei, Y. Li, and C. Wen, “A comprehensive review of biodegradable synthetic polymer-ceramic composites and their manufacture for biomedical applications,” *Bioact. Mater.*, vol. 4, no. 1, pp. 22–36, Nov. 2018, doi: 10.1016/j.bioactmat.2018.11.003.
- [54] Pereira, T.; Kennedy, J.V.; Potgieter, J. “A Comparison of Traditional Manufacturing vs Additive Manufacturing, the Best Method for the Job”. *Procedia Manuf.* 2019, 30, 11–18.
- [55] McGregor, D.J.; Tawfick, S.; King, W.P. “Mechanical Properties of Hexagonal Lattice Structures Fabricated Using Continuous Liquid Interface Production Additive Manufacturing”. *Addit Manuf.* 2019, 25, 10–18.
- [56] B. Zhang, A. Goel, O. Ghalsasi, and S. Anand, “CAD-based design and pre-processing tools for additive manufacturing,” *J. Manuf. Syst.*, vol. 52, pp. 227–241, 2019, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jmsy.2019.03.005>.
- [57] Pagac, M.; Hajnys, J.; Ma, Q.-P.; Jancar, L.; Jansa, J.; Stefek, P.; Mesicek, J. “A Review of Vat Photopolymerization Technology: Materials, Applications, Challenges, and Future Trends of 3D Printing”. *Polymers* 2021, 13, 598.
- [58] Bagheri, A.; Jin, J. “Photopolymerization in 3D Printing”. *ACS Appl. Polym. Mater.* 2019, 1, 593–611.
- [59] Yao, J.; Morsali, M.; Moreno, A.; Sipponen, M.H.; Hakkarainen, M. “Lignin Nanoparticle-Enhanced Biobased Resins for Digital Light Processing 3D Printing: Towards High Resolution and Tunable Mechanical Properties”. *Eur. Polym. J.* 2023, 194, 112146.
- [60] Chaudhary, R.; Fabbri, P.; Leoni, E.; Mazzanti, F.; Akbari, R.; Antonini, C. “Additive Manufacturing by Digital Light Processing: A Review”. *Prog. Addit. Manuf.* 2023, 8, 331–351. *Polymers* 2023, 15, 4089 18 of 19
- [61] van Kampen, K.A.; Scheuring, R.G.; Terpstra, M.L.; Levato, R.; Groll, J.; Malda, J.; Mota, C.; Moroni, L. “Biofabrication: From Additive Manufacturing to Bioprinting”. In *Encyclopedia of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*; Reis, R.L., Ed.; Academic Press: Oxford, UK, 2019; pp. 41–55. ISBN 978-0-12-813700-0.
- [62] Luongo, A.; Falster, V.; Doest, M.B.; Ribo, M.M.; Eiriksson, E.R.; Pedersen, D.B.; Frisvad, J.R. “Microstructure Control in 3D Printing with Digital Light Processing”. *Comput. Graph. Forum* 2020, 39, 347–359.
- [63] Kokubo, T.; Takadama, H. How Useful Is SBF in Predicting in Vivo Bone Bioactivity? *Biomaterials* 2006, 27, 2907–2915. [CrossRef] [PubMed]

Ringraziamenti

Ringrazio il Prof. Marco Sangermano e la Prof. Marta Miola, relatori di tesi, per avermi supportato durante tutto il lavoro sperimentale e durante la stesura dell'elaborato. Li ringrazio inoltre per aver accresciuto in me l'interesse verso i temi trattati, così come per avermi permesso di svolgere la tesi nei laboratori e negli uffici del DISAT.

Ringrazio poi i dottorandi del gruppo di ricerca Photopolymer del Prof. Sangermano, in particolare Matteo, per avermi assistito e accompagnato durante tutto il lavoro di tesi.

Ringrazio la mia famiglia, mia madre, mio padre e mia sorella, per avermi sempre supportato durante tutto il percorso universitario, nonostante le difficoltà e gli ostacoli incontrati durante il cammino.

Ringrazio i miei amici e compagni di corso, Francesco, Luca ed Elisa, per il loro aiuto e la loro comprensione e per aver condiviso con me momenti difficili ma anche soddisfazioni e successi.

Ringrazio poi in modo particolare Elena, che mi ha sempre sostenuto e incoraggiato durante questi lunghi anni. La ringrazio per la pazienza e la comprensione che ha sempre avuto nei miei confronti, così come per tutti i momenti tristi che è sempre riuscita a migliorare con la sua dolcezza e tutto il suo affetto. Grazie di esserci sempre.