UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI "FEDERICO II"

Facoltà di Ingegneria Dipartimento di Ingegneria dei Materiali e della Produzione



DOTTORATO DI RICERCA IN INGEGNERIA CHIMICA DEI MATERIALI E DELLA PRODUZIONE XVIIIº CICLO

MATERIALI E TECNOLOGIE PER LA REALIZZAZIONE DI SOSTITUTI OSSEI NELL'INGEGNERIA DEI TESSUTI

Coordinatore:

CH.^{мо} PROF. N.GRIZZUTI *Tutor:* CH.^{мо} PROF. L. Ambrosio CH.^{мо} PROF. P.A. NETTI Candidato: ING. VINCENZO GUARINO

TRIENNIO ACCADEMICO 2002/2005

INDICE

INDICE	3
INTRODUZIONE	7
1. L'OSSO NATURALE	13
1.1 PREMESSE	13
1.2 ASPETTI GENERALI	13
1.3 IL RIMODELLAMEN'TO OSSEO	14
1.4 RELAZIONI TRA STRUTTURA E PROPRIETA'	17
1.5 STATI DI SOLLECITAZIONE DELL'OSSO	
2. INGEGNERIA DEI TESSUTI	
2.1 DEFINIZIONE	
2.2 TAPPE EVOLUTIVE	
2.2 TISSUE REGENERATION	
2.3 LE CELLULE	
2.4 COLTURE IN VITRO: BIOREATTORI	
3. SCAFFOLDS TRIDIMENSIONALI	39
3.1 DEFINIZIONE	
3.2 PROGETTAZIONE DI SCAFFOLDS	
3.3 MATERIALI IMPIEGATI	41
3.4 REQUISITI STRUTTURALI: POROSITA'	45
3.5 TECNICHE DI PREPARAZIONE	
4. MATERIALI, METODI E STRUMENTAZIONE	57
4.1 MATERIALI IMPIEGATI	
4.1.1 Il POLICAPROLATTONE (PCL)	
4.1.2 DERIVATI DELL'ACIDO IALURONICO	
a) L'Acido Ialuronico	60
) Gli HYAFF	61
4.1.3 FOSFATI DI CALCIO: HA, α-TCP	64
a) Aspetti generali	64
b) Aspetti termodinamici	67
c) Reazione di hardening - Chimica della reazione	
d) Reazione di hardening - Cinetica della reazione	69
e) effetto della temperatura	70
f) effetto della porosità	71
g) effetto del magnetismo	71
4.2 PREPARAZIONE DEL SUBSTRATO	73
4.2.1 SCAFFOLD MACROPOROSI	73
4.2.2 SCAFFOLD MACROPOROSI FIBRORINFORZATI	79
4.2.3 SCAFFOLD MACROPOROSI PER SEPARAZIONE DI FASE	
4.2.4 MICROSFERE E SCAFFOLD SINTERIZZATI	

3

b) Doppia emulsione	
c) Pseudo-Sinterizzazione delle microsfere	
4.3 TIPOLOGIE DI CAMPIONI	91
4.4 ANALISI DEI CAMPIONI	96
4.4.1 ANALISI MORFOLOGICA	96
Microscopio a scansione elettronica (SEM)	96
4.4.2 CARATTERIZZAZIONE MECCANICA	
Macchina dinamometrica Instron 4204: Principio di funzionamento	
4.4.3 ANALISI TERMICA	
Calorimetro a scansione differenziale (DSC): principio di funzionamento	
4.4.4 ANALISI POROSIMETRICA	
a) Analisi qualitativa: metodo gravimetrico e liquid displacement	
b) Analisi quantitativa: porosimetria ad intrusione di mercurio	
c) Analisi qualitativa: analisi di immagini 2D	
4.4.5 ANALISI SPETTROSCOPICĂ E.D.S.	
4.4.6 COLTURA CELLULARE	
a) Bio-reattore di semina	112
b) Test di vitalità cellulare: Alamar Blue reduction	113
ć) Effetto della semina dinamica sulla distribuzione cellulare: analisi al microscopio d	confocale 114
	5
5. ANALISI SPERIMENTALE	117
5.1 SCAFFOLD MACROPOROSI – SALT LEACHING	117
5.1.1 ANALISI MORFOLOGICA E MICROSTRUTTURALE	117
5.1.2 ANALISI POROSIMETRICA	124
a) Metodo gravimetrico e liquid displacement	124
b) Analisi di immagini 2D	
c) Porosimetria ad intrusione di mercurio	135
5.1.3 ANALISI TERMICA	140
5.1.4 CARATTERIZZAZIONE MECCANICA	4.40
	142
5.1.5 MODELLO TEORICO E DATI SPERIMENTALI	142 147
5.1.5 MODELLO TEORICO E DATI SPERIMENTALI a) Porosità e rapporto Superficie/Volume	142 147 147
5.1.4 CARATTERIZZAZIONE MILCOANTON 5.1.5 MODELLO TEORICO E DATI SPERIMENTALI a) Porosità e rapporto Superficie/Volume b) Comportamento meccanico di uno scaffold: compressione e trazione	142 147 147 147
5.1.4 CHRITTERIZZAZIONE MILCOANTONICA 5.1.5 MODELLO TEORICO E DATI SPERIMENTALI a) Porosità e rapporto Superficie/Volume b) Comportamento meccanico di uno scaffold: compressione e trazione 5.1.6 SEMINA CELLULARE: STATICA E DINAMICA	142 147 147 147 149 152
 5.1.4 CHIATTERIZZAZIONE MILCOANTONI MILCOANTONI STATE 5.1.5 MODELLO TEORICO E DATI SPERIMENTALI	142 147 147 149 152 157
 5.1.4 CHARTTERIZZAZIONE MILCOANTORALIST 5.1.5 MODELLO TEORICO E DATI SPERIMENTALI	
 5.1.4 CHRITTERIZZAZIONE MILCOANTONI MILCOANTONI ALLANDING 5.1.5 MODELLO TEORICO E DATI SPERIMENTALI	
 5.1.4 CHARTTERIZZAZIONE MECCANTONALIA 5.1.5 MODELLO TEORICO E DATI SPERIMENTALI. a) Porosità e rapporto Superficie/ Volume	
 5.1.4 CHARTTERIZZAZIONE MECCANTONALIA 5.1.5 MODELLO TEORICO E DATI SPERIMENTALI. a) Porosità e rapporto Superficie/Volume b) Comportamento meccanico di uno scaffold: compressione e trazione 5.1.6 SEMINA CELLULARE: STATICA E DINAMICA 5.2 SCAFFOLD MACROPOROSI FIBRORINFORZATI. 5.2.1 ANALISI MORFOLOGICA E MICROSTRUTTURALE. 5.2.2 ANALISI POROSIMETRICA	
 5.1.4 CHARTTERIZZAZIONE MECCANTONALIA 5.1.5 MODELLO TEORICO E DATI SPERIMENTALI. a) Porosità e rapporto Superficie/Volume	
 5.1.4 CHARTTERIZZAZIONE MECCANTONALIA 5.1.5 MODELLO TEORICO E DATI SPERIMENTALI. a) Porosità e rapporto Superficie/ Volume b) Comportamento meccanico di uno scaffold: compressione e trazione 5.1.6 SEMINA CELLULARE: STATICA E DINAMICA 5.2 SCAFFOLD MACROPOROSI FIBRORINFORZATI. 5.2.1 ANALISI MORFOLOGICA E MICROSTRUTTURALE 5.2.2 ANALISI POROSIMETRICA 5.2.3 CARATTERIZZAZIONE MECCANICA 5.2.4 VALUTAZIONE DEL RAPPORTO FIBRA/MATRICE 5.3 SCAFFOLD MACROPOROSI – SEPARAZIONE TIPS 5.3.1 ANALISI TERMICA PRELIMINARE 	
 5.1.4 CHARTTERIZZAZIONE MECCANICATIONE MECCANICATION 5.1.5 MODELLO TEORICO E DATI SPERIMENTALI	
 5.1.4 CHARTTERIZZAZIONE MECCANTONALIA 5.1.5 MODELLO TEORICO E DATI SPERIMENTALI. a) Porosità e rapporto Superficie/Volume. b) Comportamento meccanico di uno scaffold: compressione e trazione. 5.1.6 SEMINA CELLULARE: STATICA E DINAMICA 5.2 SCAFFOLD MACROPOROSI FIBRORINFORZATI. 5.2.1 ANALISI MORFOLOGICA E MICROSTRUTTURALE. 5.2.2 ANALISI POROSIMETRICA 5.2.3 CARATTERIZZAZIONE MECCANICA. 5.2.4 VALUTAZIONE DEL RAPPORTO FIBRA/MATRICE. 5.3 SCAFFOLD MACROPOROSI – SEPARAZIONE TIPS 5.3.1 ANALISI TERMICA PRELIMINARE 5.3.2 ANALISI MORFOLOGICA E MICROSTRUTTURALE. 	
 5.1.4 CHARTTERREZIZED ALTI MERCONALIONE MERCONALIONE 5.1.5 MODELLO TEORICO E DATI SPERIMENTALI. a) Porosità e rapporto Superficie/ Volume b) Comportamento meccanico di uno scaffold: compressione e trazione 5.1.6 SEMINA CELLULARE: STATICA E DINAMICA 5.2 SCAFFOLD MACROPOROSI FIBRORINFORZATI. 5.2.1 ANALISI MORFOLOGICA E MICROSTRUTTURALE 5.2.2 ANALISI POROSIMETRICA 5.2.3 CARATTERIZZAZIONE MECCANICA 5.2.4 VALUTAZIONE DEL RAPPORTO FIBRA/MATRICE. 5.3 SCAFFOLD MACROPOROSI – SEPARAZIONE TIPS 5.3.1 ANALISI TERMICA PRELIMINARE 5.3.2 ANALISI MORFOLOGICA E MICROSTRUTTURALE. 5.3.2 ANALISI POROSIMETRICA 	142 147 147 149 152 157 157 161 162 164 166 166 168 173 173
 5.1.4 CHARTTERREZIZED ALTI MEDCONTROLATIONE MEDCONTROLATIONE 5.1.5 MODELLO TEORICO E DATI SPERIMENTALI	142 147 147 147 149 152 157 157 157 161 162 164 166 166 168 173 173
 5.1.4 CARATTERRIZZIONEL MEDCORINCA MEDCORINCA 5.1.5 MODELLO TEORICO E DATI SPERIMENTALI	142 147 147 147 149 152 157 157 157 161 162 164 166 166 166 168 173 173 175 183
 5.1.4 CHICHTERREZENCIAL MECCHINICAL 5.1.5 MODELLO TEORICO E DATI SPERIMENTALI	142 147 147 147 149 152 157 157 161 162 164 166 168 173 173 175 183
 5.1.4 CHIGHTHERIZZICIONE MEDGENINGALIANI ALLEANINGALIANI STRUCTURE STATICA E DATI SPERIMENTALI	142 147 147 149 152 157 157 157 161 162 164 166 166 173 173 175 183 187

b) Analisi calorimetrica	190
5.4.2 DOPPIA EMULSIONE	192
a) Analisi morfologica	192
b) Analisi porosimetrica ad intrusione di mercurio	195
c) Analisi al microscopio confocale	197
5.4.3 PSEUDO SINTERIZZAZIONE PER FUSIONE (MIMS)	198
a) Analisi morfologica	199
b) Analisi porosimetrica ad intrusione di mercurio	205
c) Caratterizzazione meccanica	206
6. DISCUSSIONE	208
7. SVILUPPI FUTURI	217
7.1 ELETTROSPINNING	217
7.2 BLENDS COCONTINUE BIODEGRADABILI	221
CONCLUSIONI	231
APPENDICI	235
I) SEPARAZIONE DI FASE	235
I.a) TECNICHE DI OTTENIMENTO DELLE STRUTTURE POROSE.	235
I.b) DIAGRAMMI DI FASE DI SISTEMI TERNARI	236
I.c) ASPETTI TERMODINAMICI	238
I.d) ASPETTI CINETICI	248
I.e) FATTORI DETERMINANTI SULLA STRUTTURA	250
II) DIFFUSIONE ATTRAVERSO MEMBRANE POROSE	251
II.a) TEORIA DEL TRASPORTO DI MATERIA	251
II.b) FENOMENI DI TRASPORTO IN MEMBRANE POROSE	251
II.c) TRASPORTO DI MATERIA A SEGUITO DI ΔΡ IMPOSTO	254
II.d) PERFUSIONE: MODELLO DI BOTCHWAY/LAURENCIN	255
III) ELABORAZIONE DI IMMAGINI 2D	257
RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI	263

INTRODUZIONE

La perdita o l'insufficienza funzionale di un tessuto rappresenta certamente uno dei problemi più invalidanti, frequenti e costosi nell'ambito della medicina internazionale [1].

Infatti, tale problema non si limita solamente ai casi in cui si prospetta la totale assenza di organi, ma coinvolge anche quei casi in cui la mancanza del tessuto, pur essendo localizzata in zone circoscritte dell'organismo, determina una riduzione significativa della qualità della vita del paziente.

L'approccio tradizionale nel recupero delle funzioni fisiologiche di organi e tessuti danneggiati si fonda sull'utilizzo di **protesi artificiali** le quali, malgrado i notevoli progressi compiuti negli ultimi anni circa la definizione di nuovi materiali e di nuove tecnologie, presentano alcuni limiti intrinseci dai quali, attualmente, ancora non si può prescindere. Il motivo principale di queste difficoltà nasce dalla volontà di voler sostituire una parte di un sistema vivente così complesso con un sistema artificiale inevitabilmente più semplificato. A ciò si aggiungono una miriade di problematiche connesse alla risposta dell'organismo in presenza di corpi estranei, di fatto, ancora non completamente risolvibili.

I progressi raggiunti nella ricerca di materiali innovativi negli ultimi anni permettono la realizzazione di nuovi sistemi protesici in grado di presentare risultati apprezzabili in termini di qualità della vita del paziente anche lungo un arco temporale relativamente breve [2].

Una diversa soluzione al problema della degenerazione dei tessuti risulta essere l'impiego del **trapianto** di organi naturali. Esso, se da un lato permette di recuperare integralmente le funzionalità dell'organo da sostituire presenta ancora due problemi di estrema rilevanza: in primo luogo il *rigetto*, ovvero una risposta immunitaria negativa dell'organismo nei confronti dell'organo trapiantato, a cui si affianca, con crescente allarme, la sempre più scarsa disponibilità di organi da impiantare. Basti pensare che, nel 1996 negli Stati Uniti, su 50.000 pazienti in attesa di trapianto di cuore solo 7.500 sono riusciti ad ottenerlo (circa il 15% del totale) ed il dato è in continua crescita [1].

Da un lato la richiesta crescente di organi artificiali e di supporti protesici dovuta principalmente all'incremento dell'età media degli individui ed ad una loro maggiore disponibilità economica, dall'altro i progressi raggiunti sia nelle metodologie di coltura cellulare che nella ricerca di nuovi biomateriali, hanno alimentato la possibilità di riparare i tessuti danneggiati attraverso la crescita localizzata di nuovo tessuto laddove si verifica la degenerazione in modo da ripristinare il tessuto originale [2].

In altri termini la soluzione innovativa al problema della degenerazione tessutale risiede nella moderna **ingegneria dei tessuti** la quale, attingendo da un lato dalla biologia e dalla medicina per quanto concerne le relazioni struttura-funzione dei tessuti naturali e dall'altro dall'ingegneria chimica, dei materiali e dalla bioingegneria in merito allo sviluppo di biomateriali innovativi, consente la progettazione di strutture tridimensionali (**scaffolds**) in cui le cellule viventi, introdotte mediante mirate procedure di coltura in vitro, sono in grado di differenziare, proliferare ed organizzarsi come nel tessuto nativo in modo da riprodurre fedelmente l'elemento naturale danneggiato da sostituire.

I biomateriali utilizzati nella rigenerazione tissutale sono molteplici e si possono distinguere in base alla loro natura chimica (ceramici, polimeri, compositi) nonché alle intrinseche proprietà fisiche e microstrutturali (biodegradabili o permanenti; naturali, sintetici o ibridi; permeabili, semipermeabili o non permeabili).

In ogni caso, essi devono mostrare un'elevata biocompatibilità intesa come la capacità del materiale di indurre una risposta biologica in grado di favorire il recupero funzionale del tessuto nella sede dell'impianto senza interferire con i meccanismi di rigenerazione tessutale o produrre reazioni infiammatorie o immunitarie avverse (*citotossicità*).

Inoltre la compatibilità biologica costituisce una condizione necessaria ma non sufficiente affinché un impianto non produca alterazioni nel tessuto ospite.

Come sottolineato dagli studiosi *Wintermantel e Mayer* non è possibile prescindere dalla compatibilità strutturale intesa come la capacità del materiale di adattarsi in maniera ottimale al tessuto ospite da un punto di vista meccanico ottimizzando la trasmissione dei carichi e minimizzando la deformazione dell'interfaccia tessuto/impianto [3].

Il policaprolattone (PCL), preso in esame in questo lavoro di tesi, risulta in questa direzione uno dei biomateriali di nuova concezione di maggiore diffusione nel settore dell'ingegneria tessutale. Usato inizialmente per la realizzazione di film degradabili e stampi, oggi, esso trova largo impiego in vari settori delle biotecnologie quali l'*organ substitution* nella realizzazione di suture riassorbibili, il *drug delivery* per sistemi a rilascio controllato di farmaci nonché, negli ultimi anni, nella *tissue regeneration* per la realizzazione di strutture temporanee (scaffolds) sostitutive del tessuto osseo naturale.

Un così ampio e diversificato insieme di impieghi è legittimato da caratteristiche chimiche e fisiche del polimero del tutto particolari soprattutto in relazione alla cinetica dei meccanismi di degradazione nonché ad acclarate doti di biocompatibilità ampiamente documentate in letteratura indispensabili per la riuscita della generica applicazione in campo biomedicale [4]. In questa sede si propone l'utilizzo del PCL per la realizzazione di scaffolds tridimensionali ottenuti mediante diverse metodologie e tecniche di realizzazione al fine di sostituire, in termini meccanici e microstrutturali, tessuti duri mineralizzati ed in particolare il tessuto osseo trabecolare.

L'obiettivo principale di questo studio è rivolto al raggiungimento di una porosità opportuna all'interno della struttura polimerica caratterizzata da un elevato grado di interconnessione dei pori ed una distribuzione spaziale omogenea in grado di favorire i meccanismi di adesione, differenziamento e proliferazione cellulare e di fornire lo spazio necessario per la neovascolarizzazione dei tessuti circostanti *in vivo* consentendo sia la circolazione di sostanze nutritive indispensabili al sostentamento cellulare che l'eliminazione di scorie e sostanze metaboliche di rifiuto.

Al contempo i tempi di degradazione del polimero, opportunamente lunghi, consentono alla struttura polimerica di mantenere gli spazi necessari all'interno dello scaffold affinché le cellule possano proliferare fino alla completa ricrescita del tessuto in formazione [5]. Inoltre non bisogna dimenticare che esiste un intimo legame, ancora non completamente spiegato in letteratura, tra la natura dell'architettura dei tessuti ed il microambiente ideale alla loro rigenerazione.

In altri termini per ogni tipologia di tessuto esiste una dimensione ottimale dei pori all'interno dello scaffold che consente alle cellule di attivarsi in modo da riprodurne la struttura. In quest'ottica, nel caso della rigenerazione del tessuto osseo, molti ricercatori indicano un range dimensionale ottimale dei pori compreso tra 150 e 400 μ m [6][7], anche se altri studiosi (*Yoshikawa ed altri*) ritengono preferibili pori di dimensioni più elevate (400-500 μ m) [8].

In questo lavoro di tesi si propone la realizzazione di scaffold macroporosi in policaprolattone mediante le seguenti tecniche:

- 1. Phase inversion/particulate leaching (PI/SL)
- 2. Separazione di fase indotta dalla temperatura (TIPS);
- 3. Pseudo-sinterizzazione per fusione di microsfere (MIMS);

La tecnica del phase inversion/salt leaching consente di realizzare scaffold a porosità controllata mediante l'impiego di agenti porogeni, generalmente cristalli di NaCl e/o saccarosio. La loro estrazione dal network polimerico permette di ottenere strutture macroporose (*L-macropori*) con grado di porosità superiore al 90% in volume ed elevato grado interconnessione dei pori. Attraverso un'attenta selezione della forma e delle dimensioni dei cristalli è possibile modulare la forma e la dimensione media dei pori all'interno del costrutto.

In aggiunta, la separazione termodinamica polimero/solvente indotta da un opportuno non solvente consente di realizzare una macroporosità di scala ridotta (*S-macropori*) in grado di favorire il trasporto delle sostanze nutritive e la rimozione delle sostanze di rifiuto nonché la vascolarizzazione del tessuto di neoformazione.

In questo lavoro di tesi si propone la realizzazione di scaffold polimerici e compositi a base di policaprolattone (PCL) mediante la tecnica suddetta in relazione alle specifiche esigenze dettate dall'applicazione di interesse.

Su di essi è stata effettuata una caratterizzazione morfologica e strutturale attraverso microscopia a scansione elettronica (S.E.M.) supportata da misure di porosità (metodo gravimetrico, analisi di immagini 2D, porosimetria ad intrusione di mercurio) finalizzate a qualificare ed a quantificare la porosità dello scaffold (grado di porosità percentuale, grado di interconnessione dei pori, diametro medio, rapporto superfice/volume).

Nei casi di maggiore interesse, è stata effettuata una caratterizzazione meccanica (trazione e/o compressione) al fine di valutare la compatibilità con la risposta meccanica dell'osso spongioso. In questa direzione, la matrice polimerica di PCL è stata affiancata da segnali bioattivi di diversa natura: a) **idrossiapatite** al fine di migliorare le proprietà di osteoinduzione migliorando la capacità di osteointegrazione con i tessuti circostanti; b) **fosfato tricalcico** al fine di migliorare le proprietà osteoinduttive innescando la formazione di nuovo tessuto osseo; c) estere benzilico dell'acido ialuronico (**HYAFF11**) al fine di migliorare la compatibilità della struttura favorendo i meccanismi di adesione, proliferazione e differenziamento cellulare [9].

In alternativa, la matrice polimerica in PCL è stata affiancata da sistemi di rinforzo fibroso (acido polilattico) e/o particellare (fosfato tricalcico α -TCP) in grado di migliorare la risposta meccanica complessiva del supporto in modo da favorirne la mimesi con il tessuto osseo trabecolare che si propone di sostituire.

Le tecniche di separazione di fase indotta dalla temperatura (**TIPS**) consente la realizzazione di strutture macroporose in virtù della transizione termodinamica solido/liquido di un sistema polimero/solvente.

Attraverso un'adeguata scelta dei parametri fisici del sistema (temperatura, pressione, etc) è possibile modulare la porosità all'interno dello scaffold in termini di dimensione e forma dei pori.

In questo lavoro di tesi si propone la realizzazione di scaffold macroporosi in PCL mediante tecnica TIPS utilizzando due diversi solventi, diossano e dimetilsolfossido, caratterizzati da un diverso potere solvente del polimero. Anche in questo caso si è proceduto ad un indagine morfologica mirata a valutare la porosità strutturale nonchè gli effetti su di essa indotti dai molteplici parametri

fisici associati alla tecnica di preparazione (temperatura e velocità di raffreddamento, modalità di estrazione del solvente).

Infine, l'ultima tecnologia impiegata prevede la realizzazione di strutture macroporose a seguito della pseudo-sinterizzazione per fusione (**MIMS**) di microsfere in PCL realizzate per emulsione singola e multipla: imponendo opportune condizioni di temperatura e pressione è possibile ottenere una parziale compenetrazione delle microsfere in virtù della incipiente fusione del polimero a partire dalla superficie delle particelle, dando vita ad una struttura compatta la cui porosità risulta determinata dagli interstizi venutisi a creare tra microsfere adiacenti.

L'ottimizzazione dei parametri di preparazione delle microsfere ottenute per singola emulsione (O/W) ha consentito di raggiungere una distribuzione dimensionale (200-500 μ m) compatibile con le dimensioni dei pori ottenute a seguito della sinterizzazione, secondo le indicazioni del modello teorico sviluppato. La loro combinazione con microsfere ottenute per doppia emulsione (W/O/W) in grado di incapsulare fattori di crescita e/o antibiotici consente la realizzazione di scaffold sinterizzati per il rilascio controllato di farmaci finalizzati alla cura di stati infiammatori localizzati nel sito di impianto.

In questa sede si propone la caratterizzazione morfologica delle microsfere nonché degli scaffold ottenuti dalla loro sinterizzazione mediante un'analisi microscopica S.E.M. ed un'analisi porosimetrica ad intrusione di mercurio affiancata da una caratterizzazione meccanica (test a compressione statica) mirata a valutarne la compatibilità strutturale con l'osso spongioso.

Una volta ottimizzate le proprietà morfofunzionali dello scaffold, è stato effettuato uno studio preliminare di semina e coltura cellulare in vitro finalizzato a verificare l'idoneità dell'impiego di tali strutture in campo biomedico.

In particolare l'attenzione è stata rivolta verso la realizzazione di un sistema di semina che in grado di riprodurre le condizioni fluidodinamiche caratteristiche dei fluidi biologici durante le fasi di coltura.

Infatti, è bene tener presente che la coltura in vitro di cellule, in particolare di osteoblasti, risponde ad un insieme di parametri legati quali le condizioni di flusso del mezzo di coltura, la pressione idrostatica, la deformazione del substrato dovuta ad una stimolazione meccanica delle strutture [10].

In quest'ottica si propone l'utilizzo di un semplice dispositivo per la semina in condizioni dinamiche di osteoblasti al fine di stimare l'efficienza della semina dinamica rispetto alla semina statica in termini di vitalità cellulare e di capacità di invasione cellulare. A questo scopo, sono stati ottimizzati i parametri di processo (portata di efflusso, numero di cicli) definendo un protocollo di semina impiegabile per altre tipologie di costrutti cellulari della stessa natura.

1. L'OSSO NATURALE

1.1 PREMESSE

Nella progettazione e nella realizzazione di materiali innovativi per applicazioni biomediche è necessario innanzitutto comprendere a fondo le problematiche che si dovranno affrontare nella ricerca; pertanto il primo passo di una progettazione efficace consiste nell'analizzare "*come progetta la natura*" ovvero valutare come l'evoluzione naturale abbia permesso la realizzazione di tessuti biologici con prestazioni così specifiche e così straordinarie consentendo di operare l'ottimizzazione della microstruttura di ciascun tessuto in base alla specifica funzione fisiologica richiesta.

Nella realizzazione di materiali sintetici non è possibile ripercorrere le stesse procedure evolutive del tessuto naturale, ma, valutando le proprietà meccaniche e fisiche dei tessuti biologici e studiando le correlazioni che esse presentano con le funzioni, è possibile comprendere ed ottimizzare la microstruttura in funzione delle proprietà richieste [3].

In quest'ottica si ritiene allora necessario introdurre alcune considerazioni sulla struttura e sulla composizione del tessuto osseo naturale sottolineando con particolare enfasi il principio di funzionamento in relazione alle proprietà meccaniche di interesse.

1.2 ASPETTI GENERALI

L'osso è un materiale composito naturale, caratterizzato da una matrice di fibre di collagene altamente orientate rinforzata da particelle di fosfato di calcio ed immersa in un fluido fisiologico (circa 10% in peso) che conferisce elevata plasticità al materiale [11].

Al suo interno la presenza di cellule (prevalentemente **osteociti** ed **osteoblasti**) che ricoprono circa il 15% del suo peso, consentono la continua ricostruzione dei tessuti, motivo per il quale l'osso viene definito un *tessuto vivente* [12].

Ma esso è innanzitutto un tessuto duro mineralizzato, in virtù del fatto che la matrice intercellulare è per la maggior parte impregnata di cristalli minerali, in prevalenza di fosfato di calcio, che le permettono di trasmettere e sorreggere gli sforzi. La presenza di minerali, così come la particolare distribuzione delle componenti organiche nella sostanza intercellulare, conferiscono al tessuto osseo spiccate proprietà meccaniche (durezza e resistenza alla compressione, alla trazione e alla torsione) ed al contempo una notevole leggerezza. In virtù di

queste proprietà il tessuto osseo risulta un materiale ideale per la formazione delle ossa dello scheletro che costituiscono nel loro insieme l'impalcatura di sostegno dell'organismo. Inoltre, a seguito del notevole contenuto in sali di calcio, il tessuto osseo rappresenta il principale deposito di ioni calcio per le necessità metaboliche dell'intero organismo [13].

1.3 IL RIMODELLAMENTO OSSEO

Il tessuto osseo è metabolicamente molto attivo nel senso che in esso coesistono continui processi di riassorbimento e di deposizione ossea, mirati ad adeguarne la struttura alle diverse e variabili sollecitazioni meccaniche a cui esso è sottoposto, contribuendo alla regolazione del quantitativo di calcio presente nell'organismo, in equilibrio con gli ioni calcio liberi presenti nel plasma [14].

Le modificazioni morfo-funzionali del tessuto osseo vengono indicate con il termine di **rimodellamento osseo**, inteso come il risultato di fenomeni di riassorbimento e di deposizione di osso, rivelabili microscopicamente, che non comportano cambiamenti macroscopici della forma del segmento osseo coinvolto [15]. In altri termini il rimodellamento osseo è un fenomeno per il quale l'osso è in grado di ottimizzare la sua forma in funzione del carico che deve sopportare. Ciò significa che sia la forma, sia le dimensioni delle sezioni resistenti hanno capacità "*adattative*" in risposta alle sollecitazioni meccaniche a cui l'osso è sottoposto [16].

Il rimodellamento osseo si realizza in virtù della presenza di una varietà di cellule nel tessuto che svolgono diverse funzioni; esso inizia con il reclutamento di **preosteoclasti**, che vengono trascinati nel sistema circolatorio e indotti a convertirsi in osteoclasti una volta giunti nelle sedi dove avrà luogo il riassorbimento del tessuto. Gli **osteoclasti** hanno la capacità di consumare lentamente il tessuto osseo grazie alla secrezione di acido lattico che scioglie i minerali di calcio e di magnesio depositati sull'osso e grazie ad uno speciale enzima proteolitico che scompone e digerisce la sostanza organica del tessuto osseo in cui i sali sono contenuti [17].

Parallelamente, altre cellule (*osteoprogenitrici*) danno vita a nuove cellule, gli **osteoblasti** che aderiscono alle pareti delle cavità formatesi a seguito del riassorbimento e depongono strati successivi di nuovo osso nella forma di lamelle concentriche dando vita a strutture cilindriche chiamate **osteoni**. I residui delle precedenti generazioni di osteoni, non completamente riassorbiti, andranno ad alimentare la **breccia ossea**.

Nell'essere umano, già a partire dal primo anno di vita, viene depositato soltanto

osso lamellare (cosiddetto *osso secondario*) che rimpiazza rapidamente i residui di osso fibroso (cosiddetto *osso primitivo*, o *primario*). Si può osservare che, col progredire dell'età dell'individuo, si assiste ad una perdita progressiva di tessuto osseo, con riduzione della massa ossea totale che causa la patologia, nota in medicina come osteoporosi, che determina un maggiore infragilimento delle ossa le quali divengono suscettibili a fratture spontanee o a traumi di modesta entità [18].



Figura 1: Schematizzazione dei meccanismi cellulari caratterizzanti il rimodellamento osseo

Molti studi sono stati compiuti nel tentativo rimodellamento osseo di definire l'origine di tale fenomenologia;

nel diciannovesimo secolo il chirurgo **Julius Wolff** ha affermato: "*la forma dell'osso segue la funzione*" intendendo che l'architettura dell'osso è influenzata dagli stress meccanici associati al suo normale funzionamento [19] e che l'attivazione dei meccanismi di formazione di osteoclasti e osteoblasti che determinano il rimodellamento dell'osso si realizza in presenza degli sforzi mentre laddove il carico non è applicato si verifica un fenomeno di riassorbimento osseo [20]. Successivamente egli ha mostrato che la formazione dell'osso incrementa nelle zone di compressione mentre diminuisce nelle zone soggette a tensione [21]. Da qui la definizione delle **leggi di Wolff** riassunta dalle seguenti tre leggi qualitative:

- il rimodellamento osseo è governato da sollecitazioni flessionali, non dagli sforzi principali;
- 2) il rimodellamento osseo è stimolato da carichi dinamici ciclici, non da carichi statici;
- 3) la flessione dinamica produce una crescita ossea nella zona in cui la flessione causa la concavità [16];

Esse esprimono il fatto che a seguito dell'applicazione di un carico ottimale, la formazione di nuovo osso prevale sul riassorbimento, mentre laddove le condizioni di carico non risultino adeguate, in quanto troppo modeste o eccessivamente elevate, il meccanismo di riassorbimento risulta dominare su quello di deposizione ossea [22]. E' evidente che la conoscenza di tali meccanismi non è del tutto ultimata come dimostrano tanti elementi di studio che non trovano ancora una chiara collocazione. Ad esempio ricerche compiute negli

anni 50, ad opera dello scienziato **Iwao Yasuda**, sottolineano il ruolo che possono avere, in tali meccanismi, le proprietà piezoelettriche dell'osso; esse sono attribuibili al fatto che, quando è applicato uno sforzo meccanico su una struttura fortemente anisotropa quale quella del tessuto osseo, esso genera un impulso elettrico che stimola gli osteociti a registrare, attraverso correnti piezoelettriche, le sollecitazioni sulla parte di lamella ossea interessata dal carico fino a costruire una struttura ossea adeguata alle funzioni meccaniche richieste [23].

1.4 RELAZIONI TRA STRUTTURA E PROPRIETA'

L'osso presenta una struttura piuttosto complessa organizzata secondo cinque livelli gerarchici differenti definiti in relazione alle unità di riferimento prescelte. In particolare si distinguono:



Figura 2: Organizzazione strutturale dell'osso[25]

- I) livello macrostrutturale (~ mm)
- II) livello microstrutturale (10 500µm)
- III) livello sub-microstrutturale (1-10µm)
- IV) livello nanostrutturale ($0.1 1 \,\mu m$)
- V) livello sub-nanostrutturale. ($10^{-3}\mu m$)

A livello macrostrutturale l'osso lamellare, che costituisce la quasi totalità dello scheletro umano, presenta due tipologie di strutture:

- a) **tessuto osseo spugnoso** quando i sistemi lamellari sono organizzati in trabecole che si intersecano disordinatamente.
- b) **tessuto osseo compatto** quando invece i sistemi di lamelle si compattano ordinatamente nello spazio[25].

La distribuzione di tali tipologie di tessuto varia in funzione del tipo di osso che si prende in esame. In generale nelle **ossa lunghe** si riconosce una parte centrale lunga e cilindrica percorsa da un canale e formata da tessuto osseo compatto (*diafisi*) e da due estremità più larghe (*epifisi*) costituite prevalentemente da osso spugnoso.

Nelle ossa piatte invece, in cui lo spessore è di un ordine di grandezza inferiore rispetto alle altre dimensioni, possiamo distinguere due lamine superficiali di osso compatto separate da uno strato di osso spugnoso. Infine nelle ossa corte si riscontra tessuto essenzialmente spugnoso ricoperto da sottile strato di osso compatto o di cartilagine [16].

L'osso compatto o corticale (fig.3) ha un comportamento anisotropo, presenta cioè maggiore resistenza alle forze applicate secondo il suo asse verticale e ha una densità di 1,8 g/cm³ [25].



Figura 4: Osso spongioso [24]



Figura 3: Osso corticale [24]

L'osso trabecolare o osso spongioso spugnoso (fig.4) è organizzato in trabecole, prevalentemente orientate in perpendicolare tra loro; le senso trabecole verticali sono più grosse e carico, le sopportano il trabecole orizzontali, invece, stabilizzano le verticali. Le trabecole, così disposte, formano le cavità in cui è collocato il midollo osseo. Ne deriva che la sua densità è inferiore a quella dell'osso corticale e può variare tra 0,1 ed 1 g/cm³ [26].

Si osserva che una simile architettura è tutt'altro che casuale in quanto le trabecole sono conformate secondo l'andamento delle linee isostatiche (quelle direzioni lungo cui sono dirette esclusivamente tensioni normali e pertanto l'osso risulterà semplicemente teso o compresso) corrispondenti alla sollecitazione prevalente a cui sono sottoposte [28].







Figura 5: a) Osso corticale[27]

b) Osso trabecolare [27]

Si riportano, a tal proposito delle tabelle che raccolgono i valori medi delle proprietà meccaniche principali dell'osso; in alcuni casi (tab.1) viene riportato sia il valore del carico longitudinale che trasversale per mettere in evidenza, anche numericamente, la forte anisotropia che caratterizza il tessuto:

Caratteristiche strutturali	Corticale	Spongioso
Fraz. volumetrica (mm ³ /mm ³)	0.90 (0.85 - 0.95)	0.20 (0.05 - 0.60)
Superficie / Volume (mm^2/mm^3)	2.5	20
Volume totale (mm^3)	$1.4 \ge 10^6$	$0.35 \ge 10^6$
Superficie interna (mm ²)	$3.5 \ge 10^6$	$7.0 \ge 10^6$

Tipo di osso	Direzione della prova	Modulo di elasticità [GPa]	Sforzo a rottura per Trazione [MPa]	Sforzo a rottura per compressione [MPa]
Ossa arto inferiore				
femore	Longitud.	17,2	121,0	167
tibia	"	18,1	140,0	159
Perone	"	18,6	146,0	123
Ossa arto superiore				
omero	"	17,2	130,0	132
radio	"	18,6	149,0	114
ulna	"	18,0	148,0	117
Vertebre				
cervicale	"	0,23	3,1	10
lombare	"	0,16	3,7	5
Cranio	tangenz.	-	25,0	-
	radiale	-	-	97

Tabella 1: Alcune caratteristiche strutturali dell' osso corticale e spongioso [26]

Tabella 2: Proprietà meccaniche dell'osso in funzione della propria collocazione nel corpo umano [16][29] Il suo comportamento può essere descritto in termini di proprietà strutturali attraverso la valutazione degli stress globali sul sistema costituito dalle trabecole più i pori, oppure in termini di proprietà materiali in riferimento alle proprietà intrinseche delle sole trabecole, in modo da valutare solo gli stress locali ed ottenere informazioni circa il riassorbimento dell'osso in prossimità di un impianto [30].

In generale la distinzione tra osso corticale ed osso spongioso è fatta in relazione alle variabili di porosità e di densità apparente (definita come il rapporto tra la massa ed il volume complessivo compresi i pori).



Figura 6: Andamento delle curve σ - ϵ nel caso di osso corticale e di osso trabecolare [31]

Infatti risulta evidente che l'osso trabecolare, meno denso e più poroso dell'osso corticale, nonché di più giovane formazione, mostra delle proprietà meccaniche, ed in particolare una rigidità, sensibilmente più basse dell'osso corticale [25]. E' necessario sottolineare che tali valutazioni si riferiscono per lo più a proprietà tensili per le quali si riesce ad ottenere una buona uniformità di risultati.

Le problematiche si complicano nello studio delle proprietà a compressione in quanto i test da effettuare possono evidenziare problemi di trasferimento del carico, specie per campioni molto piccoli, in virtù di fenomeni di frizione insorti tra il piatto della macchina e il materiale [33].

A livello microstrutturale l'osso presenta elementi strutturali piani, le **lamelle**, costituite da fibre di collagene mineralizzato parallele tra loro, riunite a formare le **fibrille**, che si sistemano in modo planare (dimensioni di 3-7 μ m) o stratificano (circa 7-8 lamelle) lungo un canale centrale, il **canale di Havers**, dando vita a strutture concentriche con dimensioni di 200-300 μ m (*osteoni*) [25].

La notevole anisotropia delle proprietà meccaniche è dovuta, in primo luogo, alla diversa orientazione che presentano gli osteoni all'interno della struttura rispetto alla direzione di applicazione del carico; inoltre esse variano anche da un osteone ad un altro in relazione al diverso contenuto minerale presente nelle lamelle [34].



Figura 7: Schema della struttura a livello micrometrico e nanometrico: fibrille di collagene intervallate da cristalli di apatite [25]

A livello nanostrutturale ($\cong 1-100 \mu m$) l'osso si presenta costituito essenzialmente da cristalli di apatite di dimensioni 2-3 μ m che vanno a collocarsi negli interstizi, formatisi tra le fibrille di collagene impacchettate, di dimensioni variabili tra 1-100 μ m. La loro forma per lo più appiattita deriva dal fatto che il loro accrescimento è vincolato ad avvenire lungo l'asse delle fibrille stesse [25]. Ad essi si aggiungono proteine non collageniche di varia natura come le **Sialoproteine** che regolano la dimensione e l'orientazione di tali cristalli in quanto adibiti a controllare le riserve di calcio dell'organismo.

Innanzitutto è evidente che al crescere del contenuto di cristalli, e quindi della sostanza minerale, aumenta la densità dell'osso e, di conseguenza, cresce il modulo elastico e la rigidità mentre diminuisce la tenacità e la resistenza a flessione dell'osso [16] come riassunto nella tabella seguente:

	Min anala	Domoità	Energia di	Resistenza a	Modulo
Tipo di osso		Defisita $(\alpha / \alpha m^3)$	rottura	flessione	elastico
	⁷ ⁶ in peso	(g/cm [*])	(J / m^2)	(Mpa)	(Gpa)
Corno di cervo	59.3	1.86	6190	179	7.4
Femore bovino	66.7	2.06	1710	247	13.5
Osso timpanico di balena	86.4	2.47	200	33	31.3

Tabella 3: Proprietà di differenti ossa animali in relazione al contenuto di minerale [16]

Un ruolo importante nelle proprietà meccaniche è svolto dalle fibre di collagene e in particolare dall'interazione delle fibre collagene di tipo I, che costituiscono la fase organica, con la fase inorganica costituita essenzialmente da cristalli di apatite [32].

A tal proposito sono stati introdotti alcuni modelli micromeccanici (*Katz 1971, Mammone, Hudson 1993*) per descrivere le proprietà micromeccaniche dell'osso in relazione alla composizione molecolare; l'idea è quella di immaginare l'osso come un composito molecolare costituito da collagene di tipo I e apatite come schematizzato nella figura seguente (fig.8):



Figura 8: Sezione longitudinale e trasversale di una fibrilla di collagene - Redrawn from Glimcher (1976) [33]

Inizialmente gli interstizi tra la molecole di collagene sono occupati da sostanza fisiologica, la quale lascia gradualmente il posto ai cristalli di apatite a seguito dell'attivazione del processo di mineralizzazione dell'osso. Tale processo prosegue trasformando il tessuto osseo soffice e flessibile in un materiale denso e rigido con proprietà prossime a quelle dei metalli leggeri.

Studiando il materiale composito, è possibile stimare il modulo elastico longitudinale attraverso:

$$E = E_m V_m + E_c V_c$$

dove E_m , E_c , V_m , V_c sono rispettivamente i moduli elastici e le frazioni volumetriche dell'idrossiapatite e del collagene; Tenendo conto che risulta:

$$\frac{V_m \cdot V_c}{E_m / E_c} < 100$$

si ricava che il massimo contributo del collagene alla rigidezza dell'osso è inferiore all'1% [32].

Molto importante risulta poi l'orientamento delle fibrille rispetto alla direzione di applicazione del carico. Le fibrille, ottenute da singole fibre di collagene (dalla caratteristica forma a triplice elica), sono tenute insieme da crosslinks e legami a ponte di idrogeno; esse sono costituite da aminoacidi, molecole fortemente non polari, e pertanto tendono ad interagire preferibilmente con se stesse piuttosto che con molecole di acqua favorendo così la formazione delle fibrille. Al diminuire della concentrazione di crosslinks diminuisce la rigidità e soprattutto la tenacità del materiale intesa come la sua capacità di assorbire energia prima della rottura mentre il modulo elastico resta all'incirca invariato.

Una forte variazione del modulo elastico è invece fortemente correlata alla presenza di molecole di acqua nel tessuto; infatti la presenza di gruppi idrofillici lungo la catena gioca un ruolo importante in quanto permette il raggiungimento della stabilità delle molecole e favorisce l'allineamento delle catene riducendo il modulo elastico dell'osso e migliorando invece la sua adattabilità ai carichi [31].

Proprietà del collagene	Wet	Dry
Upper Tensile Stress (Mpa)	2 - 40	20 - 360
Modulo Trazione E (Mpa)	10 - 570	2100 - 2700
Deformazione rottura (%)	6 - 48	11-17

Tabella 4: Proprietà meccaniche del collagene [34]

1.5 STATI DI SOLLECITAZIONE DELL'OSSO

Le ossa, durante la loro attività giornaliera, sono sottoposte a varie tipologie di sollecitazioni meccaniche (trazione, compressione, piegamento, taglio, torsione etc.).

In realtà, nell'organismo vivente, tutte le sollecitazioni possono intervenire contemporaneamente, il che rende piuttosto difficoltosa una modellazione teorica dello stato di sollecitazione in grado di riprodurre quantomeno fedelmente i comportamenti reali[31]. Si riportano i tipi di sollecitazione caratteristici delle ossa :

I. **trazione**: in tal caso due carichi uguali ed opposti sono applicati alle estremità del tessuto verso l'esterno, in modo tale che all'interno della struttura risulti una distribuzione uniforme di forze diretta lungo l'asse di applicazione dei carichi. In queste condizioni la struttura si allunga in direzione assiale e si assottiglia lungo le altre due direzioni.



II. compressione: carichi uguali e opposti sono applicati alle estremità dell'osso,

ma stavolta diretti verso l'interno: anche in questo caso si osserva, all'interno della struttura, una distribuzione uniforme di forze, su un piano perpendicolare alla direzione di applicazione del carico, che determina un accorciamento in direzione assiale ed un allargamento del corpo in direzione radiale. La valutazione delle



sollecitazioni a compressione è molto importante in quanto esse sono spesso la causa di fratture, ad esempio, nelle vertebre, in soggetti affetti da patologie

degenerative del tessuto osseo quali l'osteporosi.

III. Carichi in direzione di **taglio**: viene applicata una tensione parallelamente alla superficie della struttura. Ne risultano forze di taglio e tensioni all'interno della struttura. La forza di taglio può essere



pensata come una distribuzione di forze che agisce sulla superficie della

struttura su un piano parallelo a quello in cui è applicato il carico. Una struttura sottoposta a una sollecitazione di questo tipo si deforma internamente: immaginando di prendere due

fibre di materiale, la deformazione porta ad un cambiamento dell'angolo compreso tra queste. In particolare forze di taglio possono essere presenti nel caso in cui ci sia l'azione sia di sollecitazioni a trazione che a compressione. In

vivo, fratture dovute a forze di taglio si osservano principalmente nell'osso spugnoso.

IV. Flessione: In questo caso, i carichi sono applicati in modo che la struttura subisca una curvatura lungo il proprio asse. Il campione, in questo modo, è

sottoposto a sforzi sia di trazione che di compressione.

Dal momento che un osso non ha una struttura omogenea, le tensioni non sono distribuite in modo simmetrico. Un piegamento può essere ottenuto mediante l'applicazione di tre o quattro forze (in tal

senso possono essere realizzate prove di flessione a tre o a quattro punti). sollecitazioni flessionali sono tipiche di fratture in particolare nelle ossa lunghe (tibia, femore, ossa del braccio).

- V. **Torsione**: il carico è applicato in modo così da ottenere una rotazione attorno ad un asse, e all'interno della struttura si ottiene una coppia: in questo caso le forze di taglio sono presenti sull'intero sistema.
- VI. **carichi combinati**: Solo teoricamente è possibile pensare ad un osso sottoposto a un singolo tipo di sollecitazione come quelle viste in precedenza;

normalmente, anche nei movimenti che appaiono più semplici, le ossa, in un organismo vivente, subiscono sollecitazioni più complesse.

Tali sollecitazioni combinate a cui sono sottoposte le ossa dipendono anche da molteplici fattori di diversa natura [34]:

 l'azione dei muscoli, la quale può produrre tensioni di compressione che sono in grado di compensare (parzialmente o totalmente) forze di trazione cui è sottoposto l'osso; questa capacità di compensazione si riduce con l'aumentare dell'affaticamento del muscolo.





Prima del carico

- la velocità di applicazione del carico dal momento che l'osso è un materiale viscoelastico.

Nel seguente diagramma è mostrato il differente comportamento di una porzione di osso corticale sottoposto a carichi applicati con diversa velocità.

Questo fattore è importante poiché influenza il modo in cui un osso subisce una frattura, e, di conseguenza, condiziona il grado di danneggiamento dei tessuti molli circostanti. In particolare, se la velocità di carico è bassa, l'energia

immagazzinata nell'osso si può dissipare in un'unica rottura (e i circostanti tessuti rimangono intatti) in quanto la risposta del risente in materiale maniera proporzionale con la velocità di carico della presenza delle fibre di collagene che riducono la rigidezza (in quanto abbassano il modulo elastico complessivo) ma ne aumentano la tenacità.

Al contrario se la velocità di carico è alta, l'energia si dissipa in fratture multiple, provocando la formazione di numerosi frammenti in grado di rovinare anche i tessuti circostanti il segmento osseo.



Figura9: Differente risposta dell'osso in relazione alla velocità di carico: all' aumentare della frequenza di carico aumenta il modulo elastico [31] [34]

Tale comportamento è dovuto ad una risposta di natura fragile dovuta alla maggior incidenza della componente minerale di idrossiapatite nella risposta meccanica del tessuto osseo naturale.

- la ripetitività con cui un carico è applicato all'osso (carichi ciclici): le fratture, oltre ad essere provocate da un carico maggiore rispetto della massima tensione sopportata del tessuto, possono essere originate dall'applicazione ripetuta di carichi di minore intensità e comunque al di sopra di un certo valore di soglia legato alla natura del materiale ed alla sua resistenza a fatica. In particolare esperimenti compiuti su campioni di ossa in vitro, hanno permesso di osservare che l'applicazione ripetuta di piccoli carichi è sempre causa di microfratture che, mediamente, in un soggetto normale vengono riassorbite mediante processi di rimodellamento osseo.

Solo in caso di frequenze di carico troppo elevate tali microfratture possono essere degenerative in quanto i processi fisiologici di rimaneggiamento osseo non sono in grado di ripararle adeguatamente [34].

- La geometria dell'osso: la morfologia e le dimensioni delle ossa influenzano significativamente la risposta meccanica del tessuto; ad esempio il carico a rottura (nel caso di sforzi a compressione e a trazione) e la rigidità di un segmento osseo sono proporzionali alla sezione dell'osso stesso nel senso che ad una sezione maggiore corrisponde un osso più rigido e più resistente. Anche la lunghezza dell'osso influenza le proprietà meccaniche dell'osso soprattutto in risposta alle sollecitazioni flessionali e, in tono minore, in risposta agli sforzi a compressione a seguito dell'accentuarsi dei problemi di svergolamento.
- L'età del soggetto: infatti con l'aumentare degli anni si riduce la densità dell'osso. Ciò determina un progressivo assottigliamento nell'osso corticale, una riduzione generale della massa nell'osso trabecolare, a seguito dell'assottigliamento delle trabecole longitudinali e del riassorbimento di quelle trasversali.

Ad esempio nel 1990 Mosekilde studiando il corpo vertebrale ha riscontrato, in funzione all'incremento dell'età, una perdita nella continuità delle trabecole e, in particolare, una perdita delle trabecole ad orientamento orizzontale. Questo specifico mutamento nell'architettura trabecolare lascia presagire una futura riduzione della rigidezza e della resistenza ossea con l'età.

Una perdita di continuità e di elementi strutturali può essere la causa di fratture locali associate alla formazione di microcalli. Mosekilde sulla base di sperimentazioni condotte su vertebre lombari ha osservato in soggetti con età nell'intervallo tra 18-85 anni una riduzione progressiva del modulo elastico E del 17%, per decade, in direzione assiale. In concomitanza è stata osservata una riduzione della resistenza alla rottura stimata del 6%, per decade, ed un notevole incremento dell'anisotropia dell'architettura trabecolare [31].

2. INGEGNERIA DEI TESSUTI

2.1 DEFINIZIONE

L'ingegneria dei tessuti è quella disciplina che indaga sulle relazioni tra funzioni e struttura nei tessuti sani o caratterizzati da patologie degenerative, nel tentativo di ripristinare il loro funzionamento originario (*Skalak e Fox, 1989*)[36].

Traendo le sue origini dagli studi pionieristici di elettrofisiologia avviati da Galvani e Volta nel XIX° secolo, la sua nascita ufficiale risale alla seconda metà del secolo scorso, alla fine degli anni 80, quando, presa piena coscienza delle nuove tecnologie di indagine medica (tomografie, risonanze magnetiche ed ultrasoniche, etc.) scoperte negli anni 70, alcuni gruppi di scienziati, afferenti da diversi campi della scienza, come la biologia, la medicina, la chimica, l'ingegneria, intuirono la necessità di fondere le proprie conoscenze al fine di realizzare sistemi che, imitando la natura, fossero in grado di sostituire in maniera permanente porzioni localizzate o interi tessuti all'interno dell'organismo [37].

Dunque l'ingegneria dei tessuti è un settore scientifico molto giovane ma in pieno sviluppo ed in costante e progressiva evoluzione, così vasto da fare riferimento a molteplici applicazioni che abbracciano svariati settori della bioingegneria e non solo.

Il termine **Tissue engineering** è stato introdotto per la prima volta dagli organizzatori del Ist congress **NSF** tenutosi sul lago di Tahoe nel 1988 per identificare "l'insieme dei principi e dei metodi delle scienze mediche ed ingegneristiche atti a stabilire le relazioni fondamentali tra struttura e funzioni di tessuti sani o patologici di mammiferi"[2].

Nel tempo il concetto di ingegneria dei tessuti ha subito molteplici modifiche che ne hanno arricchito e perfezionato continuamente la definizione.

In questo ottica sono riportate nel seguito le definizioni introdotte dagli scienziati Langer e Vacanti le quali racchiudono in maniera completa ed esaustiva i principi essenziali sui quali si fonda l'ingegneria dei tessuti:

"La tissue engineering è quel settore interdisciplinare che applica i principi dell'ingegneria e delle scienze che studiano la vita per lo sviluppo di sistemi in grado di restituire, conservare e migliorare le funzioni del tessuto" (*Vacanti 1995*); "Il suo obiettivo primario è quello di ripristinare le funzionalità dei tessuti mediante l'impianto di elementi "viventi" che siano in grado, in tempi clinicamente accettabili, di diventare parte integrante dell'organismo in cui vengono introdotti, con ridotti margini di insuccesso postimpianto" (*Langer 1999*) [2] [41].

2.2 TAPPE EVOLUTIVE

Negli ultimi decenni, a partire dalla seconda metà del secolo scorso, la cura di anomalie congenite e di traumi caratterizzanti tessuti dell'organismo umano è stata realizzata attraverso l'impiego di tessuti donatori i quali una volta impiantati fossero in grado di ripristinare la funzione del tessuto compromesso.

In particolare, nell'ambito delle tecniche di sostituzione ed integrazione di porzioni di tessuto osseo mancanti o danneggiate, sono state introdotte svariate metodologie alcune delle quali, pur essendo obsolete in relazione alle attuali conoscenze scientifiche, costituiscono, ancora oggi, una risorsa importante per la cura di difetti scheletrici derivanti da malformazioni o traumi in quanto regolate da procedure rigidamente standardizzate che ne assicurano la riuscita con piccoli margini di insuccesso [1].

A seconda dell'applicazione a cui si fa riferimento, delle motivazioni che inducono alla sostituzione del tessuto nonché in relazione all'entità dell'intervento possono essere adottate diverse soluzioni:

1. Innesto di protesi artificiali di materiale inorganico :

Tale tecnica si fonda essenzialmente sull'impiego di materiali metallici e ceramici,

di largo utilizzo nel settore della biomedica negli ultimi decenni del secolo scorso, per la realizzazione di sistemi protesici (es. protesi d'anca) che, una volta impiantati, siano in grado di sostituire in maniera completa e definitiva il tessuto naturale simulandone il comportamento meccanico senza però determinare alcuna alterazione dell'ambiente articolare in cui è introdotto. Tale soluzione presenta in realtà numerosi problemi:

> limitata durata e affidabilità di alcuni materiali una volta impiantati nel paziente;



Figura 10: Confronto tra la risposta meccanica a trazione dell'osso e quella di un metallo e di un vetro [16]

- ridotta biocompatibilità del materiale, quindi elevata probabilità di infezioni di varia natura e alto rischio di rigetto;
- differenze, in alcuni casi significative, della risposta meccanica dei metalli rispetto al tessuto sostituito (soprattutto nel confronto dei moduli elastici) come si può evincere dal diagramma puramente qualitativo a lato (Fig.10):

- necessità di rimozione e sostituzione della protesi, anche più di una volta dopo l'impianto, a seguito dell'accrescimento fisiologico che mostrano i tessuti circostanti (Tale aspetto è certamente di maggiore rilevanza nel caso di pazienti di giovane età);
- ricrescita impropria del tessuto osseo in corrispondenza della zona di giunzione con la protesi con conseguente la formazione di "calli ossei" intorno alle viti impiegate per il fissaggio della protesi all'interfaccia con i tessuti circostanti [16][38];

2. Tecniche di autoinnesto di materiali fisiologici (autografts).

Tale tecnica consiste nell'impianto di un tessuto o di un organo in una nuova locazione all'interno dello stesso individuo. Esempi comuni di auto trapianto sono l'uso della safena per eseguire il by-pass coronarico o l'utilizzo di pelle del paziente stesso in caso di ustioni. Questo sistema presenta numerosi vantaggi rispetto alla soluzione precedente pur non essendo ancora la soluzione ideale. I principali vantaggi sono:

- maggior stabilità e durata del materiale;
- elevata biocompatibilità e impossibilità di fenomeni di rigetto dal momento che il tessuto è autogeno;
- possibilità di un "*normale*" sviluppo del tessuto innestato seguendo la naturale crescita dei tessuti circostanti (possibilità di impianti anche per pazienti in età pediatrica senza necessità di ulteriori interventi).

Nonostante tali aspetti notevolmente significativi sono comunque molte le problematiche associate ad una tale tipologia di trapianto:

- un intervento di questo tipo può essere eseguito solo su un ridotto numero di ossa e, nel caso di parti da sostituire di piccole dimensioni in quanto la disponibilità di tessuto donato dal paziente è certamente di modesta entità;
- necessità di tecniche e strumentazione di microchirurgia complesse e costose;
- problemi estetici relativi alla regione da cui è stato prelevato l'osso;
- possibilità di infezioni sia nel sito di prelevamento che in quello di innesto con conseguente rischio di danneggiamento di entrambe le parti;
- problemi connessi alla modellazione ed all'adattamento del tessuto donato all'interno della sua nuova collocazione [16][38][39]

3. Tecniche di innesto di materiali fisiologici non autogeni.

La tecnica consiste nell'innesto di tessuti o organi non appartenenti all'individuo che subisce il trapianto; in particolare quando il trapianto avviene tra individui della stessa specie, ma non identici geneticamente si parla di **Allograft**, mentre nel caso in cui esso avvenga tra individui di specie differenti (ad es. suini, ovini etc.) si parla di **Xenograft** [16].

Questo sistema, in entrambe le sue varianti, permette di risolvere alcuni aspetti negativi connessi alle due tecniche precedenti.

Infatti non dovendo più operare un prelievo di tessuto osseo dal paziente che subisce il trapianto risultano totalmente estinti sia i rischi di infezione nelle zone di prelevamento del tessuto sia gli inestetismi legati all'assenza di tessuto in corrispondenza di essi. Ma soprattutto risultano quasi totalmente risolti i problemi legati alla reperibilità del materiale da innestare con la conseguente possibilità di sostituire, quindi, anche segmenti ossei di dimensioni maggiori.

A tali vantaggi vanno aggiunti anche una serie di aspetti notevolmente critici che impediscono la realizzazione del trapianto se non in particolari circostanze; In particolare si riscontrano:

- persistenti problemi di rigetto;
- possibilità di infezioni nel sito di innesto e rischio di trasmissione di patologie di varia natura al paziente (nonostante i rigorosi controlli previsti dalle leggi vigenti riguardo il tessuto da trapiantare).
- Elevati costi dovuti alle strumentazioni nonchè alle tecniche chirurgiche [16][38].

In quest'ottica risulta evidente la necessità di incentivare lo sviluppo di nuove e migliori tecniche che permettano di eliminare, o quantomeno ridurre al minimo, l'incidenza dei problemi connessi alle tecniche di innesto preesistenti.

Negli ultimi anni, a seguito di un intensa sinergia tra diversi settori della bioingegneria e della biomedicina, molte soluzioni sono state avanzate in alternativa all'utilizzo di tessuti donatori; in questo senso è stata introdotta una vera e propria classificazione che prevede all'interno del settore del tissue engineering la distinzione di due grosse aree [40]:

- 1. **Organ substitution** alla quale afferiscono tutte le tecniche di trapianto che sono state finora descritte;
- 2. **Tissue regeneration**: alla quale afferiscono le moderne ricerche mirate alla ricostruzione parziale o totale dei tessuti danneggiati mediante la realizzazione di strutture di supporto tridimensionali nelle quali possano aderire e proliferare le cellule.

2.2 TISSUE REGENERATION

La Tissue Regeneration è l'area dell'ingegneria dei tessuti orientata alla ricostruzione dei tessuti mediante l'impiego di strutture di supporto ingegnerizzate costituite da materiali di nuova concezione [41]. Le strategie da essa seguite sono caratterizzate dalle seguenti fasi di sperimentazione (*Langer*, 1999):

I.Scelta delle cellule da impiantare: esse devono essere identificate, isolate e moltiplicate in maniera sufficiente per la proliferazione in vivo.

II.**Realizzazione di substrati** (sistemi aperti, sistemi chiusi) su cui depositare le colonie cellulari: progettazione dei materiali, della struttura e della geometria.

- III.**Coltivazione in vitro**: le cellule sono uniformemente distribuite sul substrato e lasciate crescere in ambiente fisiologico simulato all'interno di un bioreattore.
- IV.Impianto in vivo: la struttura ingegnerizzata, caricata con le cellule, viene collocata nel sito di interesse al fine di ottenere un integrazione ottimale con i tessuti circostanti [42].



Figura 11: Schema rappresentativo delle fasi di sperimentazione che caratterizzano la tissue regeneration [43]

Nei paragrafi successivi verranno brevemente approfondite le diverse fasi della tissue regeneration sorvolando sulla fase relativa alla realizzazione dei substrati la quale verrà ampiamente discussa nel capitolo successivo.

2.3 LE CELLULE

Le cellule costituiscono, accanto ai materiali che costituiscono i substrati, la materia prima alla quale si attinge nella tissue regeneration. Al loro interno esse presentano una struttura ben definita caratterizzata da un nucleo centrale all'interno del quale è conservato il corredo cromosomico che definisce il patrimonio genetico (*genoma*) della cellula.

Esternamente essa è rivestita da una membrana cellulare costituita da molecole lipidiche rivolte con la loro estremità idrofillica verso la matrice extracellulare esterna [44].

All'interno del corpo umano sono presenti diverse tipologie di cellule, circa 200, tra loro differenti, aventi tutte lo stesso contenuto genetico, ma una differente programmazione della propria attività genetica. In altri termini le cellule sono "differenziate" in relazione alla presenza di proteine regolatrici presenti all'interno del loro corredo proteico in grado di



Figura 12: Rappresentazione di una cellula in sezione[44]

attivare solo alcune funzioni del patrimonio genetico. Il processo che porta alla definizione dei diversi tipi di cellule è noto come "differenziamento". Parallelamente ad esso sono attivi i processi di riproduzione cellulare necessari alla loro proliferazione: essi sono tanto più favoriti quanto le cellule sono meno differenziate (da qui il motivo per cui le cellule staminali, che sono le cellule *ab origine* dell'organismo di ciascun essere vivente, sono quelle più adatte alla coltivazione per la realizzazione di nuovi tessuti).

Sia i meccanismi di differenziamento che quelli di riproduzione cellulare sono alla base della prima fase della tissue regeneration; ovviamente, nel caso della rigenerazione dei tessuti, la problematica è resa più complessa dalla presenza del substrato solido: la proliferazione cellulare infatti risulta condizionata in maniera significativa dalla più o meno favorevole adesione delle cellule al substrato; in questo senso vanno scelti opportunamente i polimeri impiegati per la realizzazione della struttura di supporto; inoltre solitamente è utile somministrare delle proteine transmembrana in grado di riconoscere proteine extracellulari (fibronectina, etc.) agevolando in questo modo l'adesione cellula/substrato [43]. Nell'ambito della tissue regeneration possono essere impiegate tipologie diverse di cellule in relazione al tipo di tessuto che ci si propone di riprodurre.

Nel caso specifico dell'ingegneria del tessuto osseo al quale fa riferimento in questo lavoro di ricerca, si procede all'utilizzo di osteoblasti le quali sono cellule giovani e molto attive derivanti da cellule mesenchimali presenti nel tessuto connettivo [44].

2.4 COLTURE IN VITRO: BIOREATTORI

Nella tissue regeneration le colture cellulari risultano più difficili da realizzare rispetto alle monocolture cellulari tradizionali in quanto condizionate dalle interazioni con la struttura tridimensionale che le contiene. Infatti all'interno del substrato 3D le condizioni di accessibilità alle cellule da parte dei fluidi biologici risultano molto sfavorite rispetto al caso di cellule deposte lungo un substrato piano (film sottili e membrane 2D); in particolare alcuni studi hanno dimostrato che, nel caso di coltura statica in 3D l'indice di vitalità cellulare all'interno dello scaffold risulta essere molto inferiore a quello lungo le superfici.

Infatti, grazie al continuo ricambio del terreno di coltura, da un lato, si consente il mantenimento della concentrazione dei nutrienti intorno ad un valore costante e dall'altro si favorisce la liberazione del mezzo dai residui derivanti dal metabolismo cellulare [46]. Ne consegue che l'organizzazione 3D delle cellule ossee è cruciale per la formazione di tessuto in vivo e che il fenotipo di cellule seminate dipende dall'organizzazione strutturale della matrice [47][48]. Inoltre la coltura di cellule in vitro risponde ad un insieme di parametri legati alla stimolazione meccanica quali le condizioni di flusso del mezzo di coltura, la pressione idrostatica la deformazione del substrato [10].

In particolare, correnti studi hanno dimostrato che le condizioni in flusso incidono significativamente sul comportamento delle cellule dell'osso [49][50] in quanto intervengono su molteplici fattori biochimici quali il calcio intracellulare, l'ossido nitrico, la prosteoglandina E₂, sui fattori di trascrizione intracellulari nonché sull'espressione di alcuni geni.

La stimolazione meccanica indotta dalle condizioni di flusso sulle cellule ossee in vitro consente di mimare abbastanza fedelmente la risposta fisiologica del tessuto. Al contrario il gradiente di pressione relativo ai carichi fisiologici associati alla locomozione, produce principalmente una deformazione della matrice ossea mineralizzata. In particolare, spingendo la componente fluida della matrice extracellulare verso l'esterno della corteccia ossea attraverso i canalicoli lacunari, esso gioca un ruolo sostanziale nei meccanismi di formazione e di riassorbimento del tessuto osseo nonché interviene sui meccanismi di produzione delle proteine che regolano la fase minerale del tessuto.

Infine a ciò si aggiunge, come rilevato da alcuni studi, che l'azione di forze meccaniche dettate dalle condizioni di flusso presenti all'interno dell'ambiente extracellulare condizionano fortemente i diversi meccanismi alla base del funzionamento delle cellule inducendo modifiche sia sulla formazione del citoscheletro cellulare che nell'interazione tra citoscheletro e matrice extracellulare. Infatti, lo stress meccanico indotto dalle condizioni di flusso esterne si trasmette all'interno della cellula mediante il sistema fibroso che costituisce il citoplasma cellulare alterando la geometria dell'intera cellula la quale reagisce a tale perturbazione modificando i propri meccanismi di adesione, proliferazione e differenziazione a danno della crescita del tessuto.

In altri termini il microambiente delle cellule dell'osso è determinato dall'interazione dinamica tra le sollecitazioni meccaniche agenti sulle cellule attive e l'architettura della matrice in continuo mutamento [43].

Per tutti questi motivi le colture cellulari per la rigenerazione dei tessuti non possono essere realizzate mediante tecniche tradizionali di tipo statico ma è indispensabile l'impiego di nuove tecniche di coltura che consentono lo sviluppo cellulare in regime dinamico.

Le tecniche di coltura dinamica si fondano sull'utilizzo del **bioreattore**, definito come il dispositivo nel quale si realizzano processi chimici e/o biologici sotto stretto monitoraggio delle condizioni di prova (pH, temperatura, pressione, apporto di sostanze nutritive e rimozione delle scorie) in modo da riprodurre l'ambiente biologico presente all'interno dell'organismo [51][52][53].

Contrariamente a ciò che accade nelle colture in vitro di tipo statico dove il mezzo di coltura circola all'interno del substrato semplicemente per diffusione passiva, all'interno di un bioreattore, grazie all'utilizzo di adeguati sistemi di pompaggio, è possibile istaurare un regime convettivo in grado di favorire la perfusione del mezzo di coltura all'interno di tutte le cavità del substrato in maniera ottimale consentendo un'adesione ed una proliferazione cellulare uniformemente distribuita su tutta la sua superficie [44].

Il processo di coltura cellulare prevede tre diverse fasi successive:

Semina cellulare: le cellule, incontrando il substrato per la prima volta, hanno la necessità di aderire ad esso per poi moltiplicarsi; in questa fase, accanto ad una eccellente compatibilità cellula/substrato, è indispensabile ricreare le condizioni fluidodinamiche che favoriscano i meccanismi di adesione riducendo al minimo i fenomeni di mortalità cellulare.

Coltivazione in vitro: le cellule, una volta aderse alla superficie dello scaffold, proliferano all'interno della porosità interconnessa riempiendo gradualmente l'intera struttura.

Coltivazione in vivo: Il costrutto carico in parte di cellule ed in parte di tessuto in neoformazione, viene impiantato all'interno dell'organismo nella zona di interesse fino alla completa formazione del tessuto[53].

Nell'ambito del processo di semina cellulare, attualmente, esistono molteplici sistemi, propriamente detti bioreattori di semina, i quali consentono di ottimizzare il processo di adesione cellulare sulle superfici dello scaffold avvalendosi di differenti principi di funzionamento.

In particolare è possibile distinguere le seguenti cinque differenti tipologie di bioreattori di semina con particolare riferimento alle più comuni applicazioni per la tissue engineering [52]:

- I. Spinning flask:
- II. Rotating walls
- III. Hollow fiber bioreactors
- IV. Direct perfusion
- V. Stimolazione meccanica

I bioreattori **spinner flask** consentono l'invasione dello scaffold da parte delle cellule per convezione; in particolare il mezzo di coltura entrando all'interno di un contenitore sterile (fig.13) investe la struttura opportunamente vincolata; l'accesso del mezzo di coltura ed il riempimento efficace della struttura sono garantite da una miscelazione del mezzo mediante un agitatore posto all'interno del bioreattore al di sotto dei campioni. Un simile sistema garantisce un eccellente trasporto di massa ed una elevata efficienza della semina cellulare.



Figura 13; Spinner flask [52]

Il principale inconveniente di tale sistema risiede nella possibilità di fenomeni di turbolenza del flusso all'interno del mezzo di coltura che possono determinare problemi di dedifferenziazione cellulare e ridurre l'accessibilità del mezzo nelle zone dello scaffold meno raggiungibili.
Un'alternativa molto diffusa è offerta dal sistema **rotating-walls vessels** (fig 14 a,b,c) il quale consente di creare un microambiente di coltura dinamico riducendo gli sforzi tangenziali ed aumentando la velocità di trasferimento di massa mediante l'impiego di un dispositivo rotante.

In particolare il dispositivo risulta costituito da una camera rotante rispetto ad un asse all'interno della quale i campioni vengono lasciati liberi di muoversi: una volta introdotto il fluido di coltura, a seguito della rotazione, il campione risulterà sottoposto all'azione di tre forze, una forza di trascinamento \mathbf{F}_d tangenziale alla rotazione, una forza centrifuga \mathbf{F}_c diretta verso l'interno ed una forza gravitazione \mathbf{F}_g diretta verso il centro.

L'azione congiunta di queste tre forze determina la diffusione del mezzo di coltura all'interno della struttura tridimensionale contribuendo efficacemente alla semina degli scaffold e provvedendo, al contempo, efficacemente al giusto nutrimento delle cellule nonchè alla rimozione delle scorie prodotte[52].



Figura 14: Rotating-walls vessels [52]

La tecnica che attualmente trova maggiori consensi in questo ambito è quella della perfusione diretta: il dispositivo, costituito da due parti, consente il passaggio del mezzo di coltura, in condizioni di flusso laminare, attraverso il campione in direzione assiale; il campione non è libero di muoversi ma è opportunamente ancorato al sistema mediante una coppia di ganasce solidali alle due parti del dispositivo stesso.

Un sistema di questo tipo (fig.15), oltre a favorire l'adesione e la proliferazione cellulare, consente una diffusione cellulare più uniforme con un incremento del trasporto di massa soprattutto nelle regioni di bulk oltre che nelle zone periferiche della struttura.

Un sistema di questo tipo, pur avendo a proprio vantaggio anche una facilità di utilizzo ed un'economicità nella gestione, presenta delle caratteristiche fluidodinamiche al proprio interno lontane dalle condizioni fisiologiche naturali che alterano il normale processo di semina.



Figura 15: Reattore di semina a perfusione diretta (A) e circuito di perfusione (B) [54]

Il principale limite dei sistemi siffatti è legato al fatto che in essi la semina avviene in assenza di stimolazione meccanica delle cellule; nel microambiente naturale, invece, i meccanismi di ricrescita tissutale sono influenzate in maniera rilevante dalle sollecitazioni meccaniche che agiscono sui tessuti ed in particolare sul tessuto osseo.

In questa direzione negli ultimi anni sono stati realizzati bioreattori in grado di ricreare l'ambiente fisiologico sia dal punto di vista fluidodinamico che dal punto di vista meccanico. In particolare, tale dispositivo (fig.16), mediante un sistema vite/madrevite, consente di stimolare substrati cellulari a trazione o compressione e/o a torsione quando sono immersi nel mezzo di coltura durante il processo di semina e nelle prime fasi di coltura in vitro [52].

In tal modo esso consente, da un lato, di valutare l'incidenza delle sollecitazioni meccaniche sull'evoluzione dei meccanismi di adesione e di proliferazione cellulare, dall'altro di definire i carichi ottimali a cui sottoporre il substrato durante l'impianto al fine di stabilire i tempi di inattività del paziente durante la degenza post-operatoria.



Figura 16: Bioreattore di semina a stimolazione meccanica [52]

3. SCAFFOLDS TRIDIMENSIONALI

3.1 DEFINIZIONE

Gli scaffolds sono strutture tridimensionali ingegnerizzate aventi la capacità di sostituire temporaneamente il tessuto naturale favorendo i meccanismi di differenziamento, di adesione e di proliferazione cellulare[55].

Essi svolgono principalmente tre ruoli fondamentali:

- facilitano la localizzazione ed il rilascio di cellule in parti specifiche del corpo;
- definiscono e mantengono uno spazio tridimensionale per la formazione dei nuovi tessuti con un'appropriata struttura;
- guidano la crescita e lo sviluppo dei nuovi tessuti nonché il flusso delle sostanze nutritive necessario al loro sostentamento[55][56];

Tali strutture devono mostrare, in condizioni ideali, eccellenti doti di stabilità meccanica, conservando specifiche caratteristiche di compatibilità biologica e funzionale. In particolare la stabilità meccanica di uno scaffold dipende primariamente dalla scelta del materiale, dalla sua architettura e dall'interazione che i suoi materiali costitutivi presentano con le cellule.

La funzionalità biologica, invece, è regolata essenzialmente da segnali di tipo biologico (ad esempio fattori di crescita), dalla matrice extracellulare (ECM) e soprattutto dalle cellule circostanti che, da un lato, provvedono al supporto meccanico e, dall'altro, intervengono nella regolazione dell'attività cellulare [55][56][57].

3.2 PROGETTAZIONE DI SCAFFOLDS

Alla luce di quanto affermato, gli scaffolds sono assimilabili a matrici di varia natura, sia fisica che chimica, atte a sostituire temporaneamente segmenti ossei del tutto assenti o in condizioni talmente deteriorate da richiedere una completa ricostruzione del tessuto[5][39].

Durante le fasi di progettazione di uno scaffold, in primo luogo, risulta indispensabile analizzare le principali caratteristiche dei materiali impiegati e la loro adeguatezza in relazione alle finalità richieste dall'applicazione. In particolare tali requisiti possono essere tratti dal seguente schema di validità generale nella tissue regeneration (fig.17).



Figura 17: Schema riassuntivo dei paramentri che intervengono nella progettazione di scaffolds per tissue regeneration [24]

Da tale schema si evince la presenza di due insiemi distinti di parametri:

- parametri biologici, connessi alla interazione della matrice con le cellule con cui essa viene a contatto;
- parametri ingegneristici connessi alla funzionalità meccanica e microstrutturale del sistema nonché alla sua realizzazione pratica durante le fasi di impianto[24][58].

I principali parametri biologici di progetto di uno scaffold sono:

- Biocompatibilità dei materiali impiegati; infatti il materiale usato deve essere *inerte* ovvero non deve determinare alcun tipo di alterazione nei tessuti con cui viene a contatto e al contempo deve far fronte alla risposta immunitaria dell'organismo favorendo i meccanismi di crescita e sviluppo delle cellule tissutali; in questo senso si parla anche di materiali *bioattivi* [16][59][60].
- Osteoconduzione: intesa come la capacità di favorire una buona adesione delle cellule alla matrice stessa; i materiali impiegati devono infatti facilitare l'adesione cellulare sulla superficie dello scaffold[5][61].
- Osteoinduzione: intesa come la capacità dello scaffold di favorire, in un ambiente non osseo, la differenziazione di cellule staminali totipotenti in condrociti e osteoblasti per culminare nella formazione di tessuto osseo completo[39][62].
- Osteointegrazione: intesa come la capacità del materiale di fondersi perfettamente con le estremità dei segmenti ossei cui è collegato[39].

 Bioassorbibilità: il tempo di degradazione dei materiali che costituiscono l'impalcatura deve essere strettamente coordinato a quello della formazione del nuovo tessuto in quanto la degradazione troppo rapida della matrice non permette la formazione di un tessuto completo e robusto. Tempi troppo lunghi, al contrario, inducono la formazione di tessuto attorno allo scaffold in modo imperfetto o incompleto [5][41].

I principali parametri di tipo ingegneristico sono invece i seguenti:

- Compatibilità meccanica: i materiali impiegati devono mostrare caratteristiche meccaniche (moduli elastici, risposte a tensioni applicate) compatibili con quelle del tessuto sostituito garantendo il suo sostegno sia durante la formazione che durante l'innesto nel sito d'impianto in modo da arginare la presenza di tensioni residue indesiderate al suo interno[5][39][59][63].
- Lavorabilità: in fase di costruzione e di impianto i materiali impiegati devono essere facilmente modellabili in modo da permettere il loro completo adattamento in funzione del tipo di impiego[58].
- Indeformabilità postimpianto: il materiale, una volta impiantato, deve risultare indeformabile per guidare l'avanzamento del tessuto in crescita garantendone il corretto sviluppo all'interno della matrice tridimensionale [31].

3.3 MATERIALI IMPIEGATI

I materiali utilizzati per la realizzazione di strutture di supporto per la tissue regeneration sono afferenti alla classe dei polimeri: essi associano a buone doti di biocompatibilità ottimi requisiti di lavorabilità in relazione alla loro disponibilità in vari stati termo-fisici differenti (solidi, fibre, pellicole, gel) a danno di proprietà meccaniche non sempre molto elevate.

Nell'ambito dei biopolimeri per la realizzazione di scaffold è possibile distinguere:

- polimeri biologici
- polimeri sintetici

I **polimeri biologici** sono solitamente dotati di proprietà inferiori a quelle dei polimeri sintetici sia dal punto di vista meccanico che dal punto di vista chimico; sono pertanto più ostici da utilizzare soprattutto perché chimicamente instabili nonché più costosi dei materiali sintetici. Alcuni esempi di polimeri biologici sono il collagene, la fibrina e l'acido ialuronico[44].

Nell'ambito dei **polimeri sintetici**, i polimeri particolarmente impiegati nella tissue regeneration sono i bioerodibili.

Si definiscono **bioerodibili** quei materiali polimerici che sono in grado di essere riassorbiti in vivo dall'organismo mediante meccanismi di degradazione superficiale mediante la produzione di composti a basso peso molecolare che garantiscono l'eliminazione totale del materiale introdotto senza la manifestazione di fenomeni residui o collaterali (*Vert 1992*)[5].

Tra i più utilizzati si ricordano:

0	Acido polilattico (PLA)	PLA	$\mathbf{H} = \mathbf{O} - \mathbf{C} \mathbf{H}_{\mathbf{a}} = \mathbf{O} \mathbf{H}$
0	Acido poliglicolico (PGA)	PGA	$H = O - CH_2 - CH_2 - O - CH_2 - CH_2 - CH_2 - OH_1 - OH_2 - OH$
0	Policaprolattone (PCL)	PCL	$H = O \rightarrow CH_2 \rightarrow_5 c$

o Copolomeri ottenuti dalla combinazione di polimeri precedenti

Il **PLLA** è un polimero idrofobico caratterizzato da un processo di degradazione molto più lento, rispetto agli altri polimeri, dovuto all'azione di microrganismi, che si traduce in una maggiore durabilità postimpianto del materiale [65].

Il **PGA**, invece, è un polimero idrofillico caratterizzato da buone proprietà meccaniche e tempi di degradazione piuttosto ridotti (circa 4 settimane).

il **PCL**, infine, fortemente idrofobico, è dotato di proprietà meccaniche complessivamente inferiori, è caratterizzato da spiccate doti di permeabilità che lo rendono particolarmente adatto al rilascio di sostanze (fattori di crescita, etc.).

Un aspetto di indiscusso interesse nella scelta di un polimero è la valutazione del suo peso molecolare in quanto quest'ultimo condiziona in maniera significativa il modulo elastico e di conseguenza le proprietà meccaniche [66].

Alcune deduzioni possono essere compiute valutando le sue temperature caratteristiche; in particolare si prendono in esame la temperatura di transizione vetrosa T_g definita come la temperatura caratteristica del materiale al di sopra della quale è possibile lo scorrimento delle catene macromolecolari a corto raggio e la temperatura di fusione (T_m) definita come la temperatura alla quale sono permessi anche gli scorrimenti a lungo raggio delle catene macromolecolari.

	E (GPa)	σ (MPa)	ε (%)
PLA	0.35-3.5	21-60	2.5-6
PGA	6-7	60.99.7	1.5-20
PCL	0.21-0.44	20.7-42	300-1000

Tabella 5: Proprietà meccaniche a trazione [68]

	$\rho (g/cm^3)$	ΔT_{g} (°C)	ΔT_{m} (°C)
PLA	1.21 – 1.25	[45,60]	[150,162]
PGA	1.50 - 1.707	[35,45]	[220,233]
PCL	1.11 – 1.146	[-60,-65]	[58,65]

Tabella 6: Proprietà fisiche principali [68]

Dalle tabelle riportate si possono osservare notevoli differenze tra le proprietà del PCL e quelle degli altri due polimeri, PLA e PGA, tra loro piuttosto simili; Ciò spiega il motivo per il quale è più facile realizzare copolimeri a base di PLA/PGA tra loro molto simili piuttosto che combinazioni con il PCL [67][68].

L'aspetto di maggiore interesse nella definizione di materiali atti a realizzare substrati per la tissue regeneration è certamente l'analisi dei tempi di degradazione dei polimeri impiegati[69].

Da un punto di vista chimico tutti i biopolimeri citati appartengono alla classe dei **poliesteri alifatici.** All'interno della loro formulazione chimica, essi presentano atomi di ossigeno o di azoto lungo la catena principale i quali sono interessati generalmente da processi di idrolisi il che fa auspicare la possibile degradazione *in vivo* di tali polimeri.

A supporto di tali considerazioni alcuni studi hanno dimostrato che, a seguito del processo di degradazione *in vivo*, tali materiali secernono vari prodotti non tossici facilmente eliminati dall'organismo [67].

A fronte di tali caratteristiche di degradazione la realizzazione di scaffolds per la tissue regeneration si è affermata attraverso due strategie principali di produzione (fig.18).

La differenza sostanziale tra le due strategie risiede nel differente ruolo che lo scaffold riveste durante le fasi di formazione e crescita del nuovo tessuto.

Nel primo caso le proprietà meccaniche intrinseche dello scaffold modellano la proliferazione e la differenziazione cellulare solo nella fase di crescita *in vitro*. L'azione di sostegno offerta dallo scaffold viene impiegata fino alla maturazione drl tessuto; A questo punto il polimero degrada e lo spazio lasciato libero viene riempito dalla crescita del tessuto durante le fasi di ricrescita in vivo.

Nel secondo caso lo scaffold deve essere in grado di supportare il complesso polimero/cellule/tessuto dal momento dell'impianto delle cellule fino al rimodellamento del tessuto da parte dell'organismo in vivo senza degradare.

In particolare tali caratteristiche sono richieste nella rigenerazione di tutti quei tessuti soggetti a forze e tensioni molto intense (ad es. ossa e tessuto muscolare); in tal caso infatti è fondamentale che lo scaffold fornisca un supporto meccanico temporaneo sufficiente a sostenere i carichi applicati sul tessuto fino alla sua completa formazione *in vivo*. Pertanto i materiali impiegati in questa strategia devono presentare un tempo di degradazione abbastanza lungo da garantire adeguato supporto finché il nuovo tessuto non è in grado di autosostenersi [5][70][71].

In questo modo si realizzano polimeri compositi quali PLA/PGA, PLA/PCL, che presentano moduli elastici e forze di compressione adatti a sopportare i carichi tipici a cui sono sottoposte le ossa (Cap.1, Tab. 2-3).





a<u>) I° strategia</u>

A) Fabbricazione dello scaffold bioassorbibileB) Semina statica delle cellule (es. osteoblasti)in disco di Petri

C) Crescita di nuovo tessuto primario in sistema dinamico di coltura (es. spinner flask).

D) crescita di tessuto maturo in ambiente fisiologico riprodotto mediante l'utilizzo di bireattori.

E) Impianto chirurgico.

F) Assimilazione e rimodellamento del tessuto trapiantato.

b<u>) II° strategia</u>

A) Fabbricazione dello scaffold bioassorbibileB) Semina statica delle cellule (es. osteoblasti) in disco di Petri

C) Crescita di nuovo tessuto primario in sistema dinamico di coltura (es. spinner flask).

D) crescita di tessuto maturo in ambiente fisiologico riprodotto mediante l'utilizzo di bioreattori.

E) Impianto chirurgico.

F) Assimilazione e rimodellamento del tessuto trapiantato.



3.4 REQUISITI STRUTTURALI: POROSITA'

Dal paragrafo precedente risulta evidente che la scelta dei materiali risulta un aspetto di prioritaria importanza nella definizione delle **proprietà microscopiche** dello scaffold; infatti dalla loro natura chimica dipendono le proprietà superficiali dello scaffold che, intervenendo sui meccanismi di interazione proteica, regolano i fenomeni di adesione e di proliferazione cellulare nonché sono responsabili della risposta immunitaria dell'organismo[68].

Parallelamente un efficace sviluppo dei tessuti all'interno della matrice risulta profondamente condizionato dalle **proprietà macroscopiche** dello scaffold che sono in grado di influenzare sia la morfologia delle cellule che la loro espressione genica la quale è strettamente connessa all'evoluzione ed all'efficacia dei meccanismi di crescita cellulare [59]. In particolare ne fanno parte le proprietà microstrutturali, in senso stretto, da ricondursi alla presenza di una porosità, opportunamente definita sia in termini morfologici che dimensionali, nonché alle risposte meccaniche ad esse strettamente correlate (elasticità, resistenza alla compressione, capacità di trasmissione dei carichi) che devono mimare il comportamento del tessuto osseo naturale.[68]. In dettaglio si riportano alcuni aspetti fondamentali connessi alla caratterizzazione microstrutturale di uno scaffold polimerico idoneo alla ricrescita cellulare:

I. Porosità e grado di interconnessione:

Gli scaffolds devono presentare una elevata porosità, superiore al 90% del volume complessivo della struttura, con pori aperti ed un elevato grado di interconnessione, fondamentale per la distribuzione uniforme delle cellule nello spazio tridimensionale, nonché per il loro sostentamento durante la proliferazione nelle fasi di coltura *in vitro*. La presenza di un network di "*tubuli cavi*" altamente interconnessi all'interno della struttura se, da una parte, consente la crescita e la riorganizzazione cellulare, al contempo, fornisce lo spazio necessario ad una efficace neovascolarizzazione dei tessuti circostanti in ambiente fisiologico.

In altri termini l'interconnessione dei pori influisce direttamente sulla diffusione delle sostanze nutritive e sulla rimozione dei rifiuti metabolici prodotti dall'attività cellulare promuovendo la crescita di vasi sanguigni e la nuova innervazione dei tessuti attivi attraverso meccanismi equivalenti alla rivascolarizzazione [68]. In questa direzione la realizzazione di scaffolds per ingegneria dei tessuti prevede l'utilizzo di bioreattori i quali sono in grado di ricreare, attraverso opportuni vincoli sulle condizioni fluidodinamiche del mezzo di coltura, "microambienti a diffusione controllata" in grado di simulare in maniera ottimale l'ambiente fisiologico [59].

II. Dimensione e distribuzione dei pori:

La dimensione dei pori all'interno di uno scaffold gioca un ruolo primario nell'efficienza di uno scaffold.

In generale, nello studio della porosità strutturale si usa fare la seguente classificazione in relazione alla scala dimensionale dei pori:

Dimensione pori (nm)	
Micropori	0.1-2
Mesopori	2-50
Macropori	>50

Tabella 7: Classificazione della porosità in relazione alla dimensione dei pori.

Nel caso di scaffold per l'ingegneria dei tessuti si fa riferimento sempre ad una macroporosità all'interno della quale è possibile distingure dimensioni dei pori differenti in relazione all'applicazione d'interesse: macropori dell'ordine di pochi micron possono essere indicati per consentire il trasporto di sostanze nutritive e/o il rilascio di farmaci o fattori di crescita mentre macropori dell'ordine di centinaia di micron risultano invece rivolti ad ospitare le cellule per la formazione di nuovi tessuti.

Relativamente a questo secondo tipo di macroporosità una dimensione dei pori troppo piccola (poche decine di micron) non consente alle cellule, nel caso specifico osteoblasti aventi dimensioni di circa 20µm, di trovare uno spazio adeguato per la propria sistemazione, mentre una dimensione eccessiva dei pori non consente loro di percepire nelle prossimità la presenza di altre cellule con cui formare il tessuto. In quest'ottica è facilmente intuibile che esiste una corrispondenza tra la dimensione dei pori, la tipologia di cellule utilizzate e la natura del tessuto da realizzare la quale pur non essendo ancora totalmente spiegata dal punto di vista scientifico, trova pieno sostegno nei molteplici risultati sperimentali riportati dalla letteratura scientifica degli ultimi anni.

Ad esempio, nel caso di crescita di fibroblasti ed epatociti, la dimensione ottimale dei pori è di circa 20 μ m; nella ricostruzione dei tessuti soffici (es. pelle) essa varia tra 20 e 150 μ m [5]. In particolare nell'ambito della rigenerazione del tessuto osseo, alcuni ricercatori [6] hanno indicato un intervallo dimensionale ottimale dei pori compreso tra 200 e 400 μ m, anche se lavori documentati in letteratura (Yoshikawa e altri [59][72]) hanno utilizzato con successo una porosità di dimensioni di 500 μ m.

Infine nella realizzazione di uno scaffold è auspicabile che la distribuzione dimensionale dei pori ricada esclusivamente negli intervalli dimensionali richiesti dall'applicazione e che i pori siano distribuiti in maniera omogenea in tutto il volume così da consentire la crescita del tessuto di nuova formazione in maniera uniforme.

III. Rapporto superficie interna dei pori / volume

I requisiti della porosità, finora esposti (elevata porosità, elevato grado di interconnessione), sono tutti finalizzati al raggiungimento di un elevato rapporto tra la superficie interna dei pori ed il volume dello scaffold.

Infatti una maggiore superficie interna significa una maggiore disponibilità ad ospitare le cellule. Al contempo esiste un limite inferiore alla dimensione dei pori oltre il quale non sono più efficaci i meccanismi di adesione, proliferazione e crescita cellulare.

Ne consegue, quindi, che la porosità di uno scaffold deve essere definita dal giusto compromesso dei seguenti contributi: da un lato la massimizzazione della superficie complessiva interna dei pori, dall'altro l'ottimizzazione dimensionale dei pori; tali requisiti, congiuntamente alla funzionalità chimica delle superfici (proprietà microscopica intrinseca del materiale), influenzano in maniera significativa l'adesione, la migrazione, l'interazione intracellulare in vitro nonché l'integrazione all'interfaccia tessuto/scaffold in vivo.

IV. Porosità e proprietà strutturali:

Gli scaffolds devono avere una sufficiente resistenza meccanica durante le fasi di coltura in vitro ed in vivo per mantenere gli spazi richiesti per la crescita cellulare e la produzione della matrice.

In particolare, in vitro, lo scaffold deve mostrare una resistenza meccanica adeguata a sostenere la pressione idrostatica ed a preservare gli spazi richiesti dalle cellule durante le fasi di produzione di matrice extracellulare e di formazione di nuovo tessuto [5][58][59][63].

L'aspetto più significativo è legato alla natura dei materiali impiegati: la matrice dello scaffold, deve degradare in ambiente fisiologico in tempi opportuni, consentendo alla struttura di conservare, nelle prime fasi di crescita del tessuto in formazione, sufficiente resistenza meccanica in modo da tollerare gli stress ed i carichi fisiologici imposti [6][41].

Al contempo le caratteristiche strutturali del tessuto in neoformazione sono intimamente legate alla porosità della struttura. In particolare è facilmente intuibile che al crescere della porosità se, da un lato, si verifica un incremento dei meccanismi di proliferazione cellulare con conseguente aumento della densità cellulare, al contempo, risulta inevitabile una riduzione delle prestazioni meccaniche della struttura [58].

In questo senso, anche il grado di interconnessione tra i pori, influenzando i contatti relativi fra le cellule, incide significativamente sulle proprietà strutturali dello scaffold. In particolare nelle prime fasi di coltura la presenza di un grado di interconnessione elevato comporta un maggiore indebolimento della struttura a seguito di un minore sostegno offerto da un minor numero di zone di interfaccia tra pori adiacenti; nelle fasi successive, la presenza di una elevata interconnessione dei pori determina un incremento delle interazioni reciproche sia intracellulari che tra le cellule ed il tessuto circostante preesistente con un complessivo rinforzo della struttura a seguito di una maggiore efficacia dei meccanismi di proliferazione cellulare.

3.5 TECNICHE DI PREPARAZIONE

Sulla base dei prerequisiti strutturali elencati precedentemente, uno dei principali obiettivi della produzione degli scaffolds è quello di assicurare un controllo accurato delle proprietà microscopiche (es. chimica delle superfici di interfaccia, interazioni proteiche) e macroscopiche (es. porosità, proprietà meccaniche).

Sebbene siano disponibili una varietà di tecniche di fabbricazione convenzionali per la loro produzione, molte di esse non sono di applicazione generale ma sono realizzate su misura per creare scaffolds che soddisfino requisiti chiave in relazione alla specifica applicazione di interesse.

Inoltre, la scelta di una tecnica anziché di un'altra e la definizione di ogni sua singola fase sarà influenzata dalla natura chimica e fisica del polimero scelto in relazione ai requisiti di processo richiesti (es. viscosità, punto di transizione vetrosa, punto di fusione, solubilità nel solvente a cui esso viene affiancato) [57]. Tra le principali caratteristiche che le tecniche di fabbricazione degli scaffolds devono indispensabilmente possedere perché risultino efficaci, si ricordano:

i. Condizioni di processo:

Le procedure e le condizioni di lavorazione dei materiali non devono influire negativamente sulle proprietà del materiale e sulla loro successiva utilizzazione clinica. Ad esempio la tecnica impiegata non deve alterare le proprietà chimiche ledendo la biocompatibilità dello scaffold, né determinare alcuna degradazione con conseguenze negative sulle proprietà meccaniche del sistema [59].

ii. Controllo del processo e del prodotto realizzato:

La tecnica deve permettere la realizzazione di scaffolds tridimensionali di geometria opportuna in modo da consentire l'impianto nella zona di interesse anche nel caso di tessuti danneggiati caratterizzati da geometrie complesse difficilmente riproducibili [58].

Un controllo efficace della geometria dello scaffold consente la predizione del suo comportamento in vivo (verifiche di resistenza, degradazione in vivo mediante l'utilizzo di modellazioni attraverso metodi di ingegneria assistita dal calcolatore (CAE) [59].

iii. Ripetibilità e riproducibilità:

La tecnica impiegata deve consentire, a parità di parametri di processo e di modalità di esecuzione, di ottenere prodotti equivalenti con minime variazioni delle forme e delle proprietà fisiche [59].

Le tecniche di preparazione di scaffold più diffuse sono:

- a. Tecnologie tessili (membrane bidimensionali e tridimensionali);
- b. Phase separation e phase inversion;
- c. Solvent casting /particulate leaching;
- d. Gas foaming;
- e. Pseudo-sinterizzazione di microparticelle;
- f. Elettrospinning;
- g. Combinazioni di tecniche precedenti (es. gas foaming/salt leaching, etc.).

Ciascuna di tali tecniche, sebbene sia stata applicata con successo come testimoniano parecchi lavori riportati in letteratura negli ultimi anni, presenta limiti intrinseci che ne limitano il campo di applicazione ad alcune sole applicazioni specifiche (es. mancata rimozione di solventi tossici durante la preparazione può incidere negativamente sul ciclo di vita cellulare) [59].

Nel seguito si riporta una descrizione delle tecniche più diffuse con particolare riferimento alle tecniche impiegate per la realizzazione di scaffold in questo lavoro di tesi con particolare accento ai principi teorici sulle quali esse si basano.

a. Tecnologie tessili

Le prime tecnologie impiegate, storicamente, per la realizzazione di substrati tissutali risultano essere quelle tessili. Attraverso tali tecnologie è possibile creare dei sistemi di maglie altamente porose grazie all'intreccio di due o più filamenti (o fibre) polimerici secondo diverse modalità (maglia singola, a fili intrecciati, multiasse etc). In sistemi di questo tipo la porosità risulta costituita, in parte, dallo spazio interno a ciascun anello della maglia, in parte, dagli interstizi tra i singoli

filamenti. Ne consegue che tali strutture sono caratterizzate da una buona porosità che mostra uno sviluppo lungo due sole dimensioni spaziali mancando

totalmente di interconnessione tra i pori [5].

questo senso In sono stati realizzati sistemi di maglie tridimensionali dalla ottenute sovrapposizione di più strati intrecciati: Quest'ultime, da un lato, presentano una porosità interconnessa con sviluppo tridimensionale, dall'altro mostrano una elevata durezza meccanica a fronte di una ridotta



Figura 19: Andamento della durezza e della vestibilità della struttura al variare del tipo di tessuto.

vestibilità (intesa come la capacità di rivestimento di una superficie).

In relazione a caratteristiche così differenti, i substrati 2D sembrano essere orientati alla rigenerazione di tessuti molli (es. pelle) dove è richiesta un'elevata vestibilità, mentre i substrati 3D, dotati di proprietà meccaniche più significative, risultano essere idonei alla rigenerazione di tessuti di maggiore consistenza (cartilagine, osso etc.).

b. Phase separation e phase inversion

La tecnica della separazione di fase si basa su una smiscelazione termodinamica di una soluzione omogenea bicomponente in due fasi distinte, una più ricca di un componente e l'altra più ricca dell'altro. Tale miscelazione può essere indotta da una drawing force di natura termica (TIPS - thermally induced phase separation) a seguito di un raffreddamento del sistema al di sotto della curva di solubilità binodale oppure a seguito di una drawing force di natura chimico-fisica (CIPS - Chemical induced phase separation) grazie all'azione di un terzo componente che risulta molto affine ad uno dei componenti in gioco ed immiscibile all'altro.

Le procedure di preparazione sono molto semplici: il sistema polimero/solvente viene sottoraffreddato ad una certa temperatura T e con una certa velocità di raffreddamento v; una volta raggiunto l'equilibrio del sistema si procede alla rimozione del solvente per evaporazione o per sublimazione in base allo stato fisico del solvente (liquido o solido) in relazione alle modalità di raffreddamento imposte. Tale operazione viene realizzataforzando termodinamicamente il sistema imponendo una condizione di vuoto (**phase separation**) e utilizzando un non solvente (**phase inversion**).

Al termine il sistema sarà completamente miscelato e lo spazio occupato precedentemente dal solvente costituirà la porosità dello scaffold [74].

La morfologia dello scaffold (dimensione e forma dei pori) può essere finemente controllata regolando le diverse transizioni di fase (*liquido-liquido, solido-liquido*), innanzitutto attraverso le modalità di raffreddamento del sistema (velocità e temperatura di quenching); nel caso di phase separation definendo opportunamente le combinazioni temperatura/pressione alle quali far avvenire la sublimazione/evaporazione del solvente mentre nel caso della phase inversion scegliendo opportunamente il terzo componente non solvente, nonché la temperatura e i tempi di esposizione ad esso [88].

c. Solvent casting / particulate leaching

Le tecnologie tessili, precedentemente descritte, risultano particolarmente valide dal punto di vista della porosità ma producono risultati del tutto insufficienti in termini di proprietà meccaniche.

Al fine di migliorare le doti meccaniche sono state sviluppate nuove tecniche in grado di formare strutture spugnose a base di polimeri biodegradabili note, in letteratura, come **solidi cellulari** [71].

In particolare la realizzazione di solidi cellulari si articola nelle seguenti due fasi:

- 1. Utilizzo di un terzo componente, di solito un solvente che induca un irrigidimento della struttura (*solvent casting*) ed al contempo separi il solvente in cui è stato disciolto il polimero a seguito di una diversa affinità termodinamica tra i componenti in gioco secondo un processo di inversione di fase come quello precedentemente descritto;
- Inclusione di un agente porogeno all'interno del sistema polimero/solvente dalla cui eliminazione (*particulate leaching*) si origina una struttura macroporosa costituita da una matrice continua con pori di geometria controllata omogeneamente distribuiti all'interno dell'intero volume [58][73][85][89][92].

Tale tecnica consente di modulare facilmente la porosità dello scaffold direttamente variando l'ammontare di agente porogeno impiegato e permette di ottenere un elevato grado di interconnessione in relazione alle sue modalità di estrazione.

Il principale limite di tale tecnica, come sarà ampiamente riportato nella parte sperimentale, nel seguito di questo lavoro, è nella impossibilità di ottenere strutture ripetibili con distribuzione omogenea della porosità a seguito del deposito sul fondo dell'agente porogeno per gravità.

d. Gas foaming;

La tecnica del **gas foaming** prevede l'utilizzo di gas (es. CO₂) ad alta pressione per la realizzazione di spugne macroporose.

A seguito della realizzazione di una soluzione polimero/gas è possibile produrre un fenomeno di instabilità termodinamica a seguito di una depressione della fase gassosa la quale, separandosi dal polimero, lascia una struttura a porosità chiusa omogeneamente distribuita.

La porosità e la struttura dei pori dipendono dalla quantità di gas dissolto nel polimero, dalla tipologia di gas "nucleante" impiegato nonché dalla velocità di diffusione delle molecole di gas attraverso il polimero.

Il principale limite della tecnica del gas foaming si riconduce al fatto che la porosità ottenuta, prevalentemente chiusa, non consente la semina cellulare all'interno dello scaffold. In quest'ottica, per migliorare la morfologia dei pori, si propone l'utilizzo di tale tecnica congiuntamente alla tecnica di particulate leaching, vista in precedenza, in modo da consentire la formazione di una porosità aperta ad alto grado di interconnessione accanto alla porosità chiusa indotta dal *bubbling* del gas. Come già visto in precedenza la porosità dello scaffold ed il grado di interconnessione dei pori potranno essere regolati variando il rapporto ponderale tra polimero ed agente porogeno ed in funzione della dimensioni di tali particelle [57][72].

e. Pseudo-Sinterizzazione di microparticelle;

La tecnica della sinterizzazione di microparticelle polimeriche consente la realizzazione di strutture tridimensionali macroporose a seguito di una parziale compenetrazione di particelle adiacenti indotta dalle condizioni fisiche imposte al sistema.

In particolare opportune condizione di temperatura e/o di pressione possono avviare meccanismi di incipiente fusione del polimero a partire dalla superficie delle particelle favorendo la loro parziale compenetrazione e dando origine, al contempo, ad interstizi interparticellari che determinano la porosità macroscopica all'interno della struttura [74] [94].

Il concetto di sinterizzazione di microparticelle trae origine dal processo di densificazione di polveri alla base dei metodi di realizzazione di materiali ceramici e si fonda sul fatto che il sistema è in grado di ridistribuire la propria massa a seguito della formazione di gradienti di materia verso zone ad alta concentrazione di difetti cristallini innescati da opportune condizioni di temperatura determinando una densificazione del sistema.

Partendo dal caso più semplice di sinterizzazione che prevede il riscaldamento ad una certa temperatura T di un aggregato di particelle costituito da una singola fase, si osserva che, a seguito della coalescenza delle particelle, comincia a formarsi un *colletto* caratteristico determinato dalla loro iniziale compenetrazione; esso presenta un raggio di curvatura più piccolo rispetto alla curvatura delle superfici delle particelle il che determina una pressione negativa che causa un flusso viscoso di materiale lungo la regione interparticellare [93].



Figura 20: Schematizzazione di un colletto formatosi tra due microsfere a contatto

Da un punto di vista microscopico, la coalescenza è promossa attraverso due contributi al trasporto di materia tra loro competitivi: una **densificazione** propriamente detta determinata da una diffusione di tipo bulk dal core delle singole particelle verso il colletto con conseguente avvicinamento dei centri ed un fenomeno di **coarsening** dettato da una diffusione superficiale dalle particelle verso il colletto con conseguente riduzione della superficie complessiva del sistema e dell'energia superficiale ad esso associata. In particolare al fine di ottenere strutture porose altamente interconnesse, è necessario promuovere i meccanismi di coarsening a svantaggio dei fenomeni di densificazione attraverso un riscaldamento a basse temperature, prossime alla temperatura di fusione del polimero [93]. La porosità ottenuta utilizzando la tecnica della sinterizzazione di microparticelle si aggira approssimativamente intorno al 72% con una dimensione dei pori compresa tra 100 e 400µm ed è totalmente interconnessa [74].

Il principale limite di questa tecnica, come riportato in molti lavori in letteratura scientifica, risiede nell'elevato numero di variabili che, anche a seguito di piccole variazioni, incidono significativamente sulla microstruttura finale (es. dimensioni delle particelle, distribuzione dimensionale delle particelle, condizioni di processo) [74][94].

f. Elettrospinning;

L'elettrospinning è una delle tecnologie più impiegate nella realizzazione di fibre su scala micrometrica e nanometrica in molteplici settori di applicazione dell'ingegneria e non solo[95][99].

Contrariamente alle convenzionali tecniche di tessitura delle fibre (*melt spinning, wet spinning e dry spinning*) che sfruttano sollecitazioni di tipo meccanico derivanti dalla natura del processo (es. estrusione del polimero fuso, stiro delle fibre risultanti dopo la solidificazione di soluzioni polimeriche), l'elettrospinning sfrutta l'azione delle forze di natura elettrostatica. In particolare, il suo principio di funzionamento si basa sull'applicazione di una elevata differenza di potenziale (*kilovolt*) tra due elettrodi costituiti rispettivamente da un capillare metallico (*catodo*) contenente il polimero fuso da processare e da un piatto di rame o alluminio (*anodo*) sul quale avviene la raccolta di fibre [96][97].

Di seguito si riporta lo schema di funzionamento dell'elettrospinning (fig.21):





A seguito dell'applicazione di una differenza di potenziale elevata la soluzione polimerica contenuta nel capillare si polarizza e viene trascinata verso l'anodo in maniera più o meno significativa in relazione alla tensione applicata.

In particolare nel caso di tensioni troppo basse la polarizzazione risulta totalmente annullata dalla tensione superficiale all'imbocco del capillare con la formazione, in corrispondenza di esso, di una goccia. Al crescere della tensione applicata il contributo crescente offerto dalla polarizzazione produce una progressiva elongazione della goccia e la formazione di un caratteristico "cono di Taylor" da cui si origina, se la differenza di potenziale è sufficientemente elevata, la fibra polimerica di dimensioni micrometriche.

Durante il cammino della soluzione polimerica dall'elettrodo positivo all'elettrodo negativo si possono innescare fenomeni di instabilità in grado di incidere anche significativamente sulla dimensione finale del prodotto: in particolare, a seguito della progressiva evaporazione del solvente, si manifesta, all'interno del getto, un significativo incremento della concentrazione di carica la quale, quando le interazioni repulsive mutue tra di esse diventano troppo intense, determina la frammentazione del getto in fibre più piccole di dimensioni nanometriche. Ne consegue che, la dimensione finale delle fibre è fortemente dipendente dall'entità della tensione applicata che di solito varia tra 10kV e 30kV nonché dalla distanza alla quale sono posti gli elettrodi che deve essere abbastanza elevata da consentire l'evaporazione del solvente [96][97].

L'altro elemento essenziale per la riuscita del prodotto finale è la natura chimicofisica della soluzione utilizzata. In particolare, nel caso di polimeri a basso peso molecolare e di soluzioni caratterizzate da viscosità elongazionale ridotta, a seguito dell'evaporazione del solvente e del sopraggiungere di fenomeni di instabilità del flusso per eccesso di concentrazione di carica, il fluido tende a rompere il getto in tante piccole goccioline cariche (Fig 22: questa tecnica, nota come **elettrospraying**, è particolarmente diffusa in applicazioni agricole per la concimazione e nella stampa a getto di inchiostro)[97].



Figura 22: Elettrospraying: Instabilità di Raylight [95][99]

Nel caso di soluzioni polimeriche ad alto peso molecolare e con viscosità elongazionale elevata (fig.23), invece, le forze viscoelastiche in gioco, rilevanti contrariamente al caso precedente, nella stabilizzazione del getto in filamenti carichi più piccoli, consentono la realizzazione di fibre polimeriche con diametri variabili di diversi ordini di grandezza (dal micron delle fibre convenzionali fino a decine di nanometri) [97][99].



Figura 23: Elettrospraying: Cono di taylor [99]

In altri termini, modulando le proprietà chimiche (peso molecolare, natura del polimero: newtoniano o non newtoniano) e/o fisiche (viscosità della soluzione) risulta possibile definire il diametro delle fibre da ottenere, consentendo, a priori, una previsione delle caratteristiche dimensionali e strutturali del prodotto finito e delle sue possibili applicazioni (fig.24).



Figura 24: Possibili campi di applicazione dell'elettrospinning [96]

Una possibile applicazione della tecnica dell'elettrospinning si riferisce al settore biomedico della tissue engineering per la preparazione di scaffold tridimensionali. In particolare, sottoponendo una soluzione polimero/solvente con opportuna concentrazione all'azione di una tensione di alcuni kV, è possibile realizzare fibre polimeriche con diametri dell'ordine dei nanometri dalla cui sovrapposizione è possibile ottenere sistemi 3D caratterizzati dalla caratteristica microstruttura **woven not woven;** in particolare la sovrapposizione del tutto casuale dei filamenti ottenuti consente la realizzazione di un *tessuto non tessuto* in cui le fibre non sono disposte in maniera random [96][98].

Il principale vantaggio di tali scaffold risiede nella possibilità di poter coltivare al loro interno, in corrispondenza degli interstizi formatisi tra fibre adiacenti che hanno la stessa funzione della porosità, forme cellulari (es. osteoblasti), diverse a seconda dell'applicazione, le quali a contatto con la matrice polimerica altamente biocompatibile hanno la possibilità di proliferare senza incorrere in fenomeni di apoptosi e morte cellulare[98].

4. MATERIALI, METODI E STRUMENTAZIONE

4.1 MATERIALI IMPIEGATI

4.1.1 II POLICAPROLATTONE (PCL)

Il policaprolattone (PCL) è uno dei biomateriali di nuova concezione di maggiore diffusione nel settore dell'ingegneria tissutale. Usato inizialmente per la realizzazione di film degradabili e stampi, oggi, esso trova largo impiego in vari settori delle biotecnologie quali l'*organ substitution* nella realizzazione di suture riassorbibili, il *drug delivery* per sistemi a rilascio controllato di farmaci nonché la *tissue regeneration* per la realizzazione di sistemi sostitutivi del tessuto osseo naturale [4]. Un così ampio e diversificato insieme di impieghi è legittimato da caratteristiche chimiche e fisiche del polimero del tutto particolari nonchè da acclarate doti di biocompatibilità indispensabili per la riuscita della generica applicazione in campo biomedico [4] [68].

Proprietà chimiche

Da un punto di vista chimico il policaprolattone (PCL) è un poliestere alifatico lineare caratterizzato dalla formula di struttura riportata a lato (fig.25).

 $H \neq O \rightarrow CH_2 \rightarrow CH_2 \rightarrow CH_2 \rightarrow O$

Figura 25: Formula di struttura

del Policaprolattone (PCL)[66]

Esso mostra una dissoluzione a temperatura ambiente a contatto con solventi di diversa natura chimica come dimetilacetammide (DMAc),

diclorometano (MC), tetraidrofurano (THF), cloroformio e dimetilsulfossido (DMSO) scelti in relazione alla specifica applicazione a cui far riferimento [101]. La caratteristica più importante del PCL, da un punto di vista chimico, è la sua capacità di degradazione in ambiente fisiologico.

In particolare esso è interessato da fenomeni di degradazione dovuti dalla facile interazione che il legame estere alifatico, presente lungo la catena principale, mostra con le molecole di acqua. Tale meccanismo attivato da idrolisi chimica consente al policaprolattone di essere classificato quale uno dei principali polimeri bioerodibili [69]. In particolare il processo di degradazione del PCL è caratterizzato da almeno due fasi discrete la prima delle quali prevede un'idrolisi non enzimatica di bulk del legame estere autocatalizzato dai gruppi carbossilici presenti lungo la catena principale (*fig.25*) [69].

Molti studi sono stati e sono tuttora mirati ad approfondire le modalità di

degradazione del PCL. Ad esempio alcuni di essi hanno mostrato che radicali liberi ottenuti dalla reazione del gruppo carbossilico con l'ossigeno risultano molto più reattivi che radicali prodotti dalla reazione con il gruppo OH⁻ [69].

Altri hanno valutato l'evoluzione delle proprietà fisico-chimiche durante il processo di degradazione.

Si riporta l'andamento del peso

(spuesnout) 20 0 10 20 30 Time (wk)

Figura 26: Andamento del peso molecolare ponderale in funzione del tempo dopo l'introduzione in acqua distillata[69].

molecolare ponderale del polimero M_w in acqua distillata (fig.26).

Risulta evidente che, a seguito dell'attivazione di meccanismi di idrolisi, si innesca

la rottura dei legami alifatici lungo le macromolecole le quali divengono via via più corte.

Ciò si traduce in una caduta del peso molecolare ponderale, in un primo momento più significativa poi più graduale, fino alla completa degradazione del polimero [69]. Analogamente, all'avanzare del meccanismo di degradazione, si



Figura 27: Andamento della perdita di peso del polimero in funzione del tempo dopo l'immersione in acqua distillata[3].

manifesta una riduzione percentuale della massa di polimero (fig.27) [4]. Come è possibile dedurre dal diagramma precedente, l'arco temporale lungo cui si realizza il processo di degradazione è piuttosto lungo: in acqua distillata è dell'ordine di circa 30 settimane, mentre in ambiente fisiologico, a contatto con soluzioni saline di varia natura può aumentare fino alla durata di 48 mesi.

Proprietà	U.M.	Condizioni	Valore
Conformazione Molecolare			Quasi planare
Peso Mol. (unità ripetitiva)	$g \text{ mol}^{-1}$		114
Peso Medio Numerico M _N	g mol ⁻¹	GPC	74000
Peso Medio Ponderale Mw	$g \text{ mol}^{-1}$	GPC	25000

Tabella 8: Proprietà chimiche salienti [100].

Questo è il motivo principale per cui viene preferito per la realizzazione di tessuti ossei nella tissue regeneration: poiché l'osso è sottoposto a stati di sollecitazione di vario genere e di una certa entità (*par.1.4*) è fondamentale che l'impalcatura offerta dal polimero, oltre a favorire la proliferazione delle cellule, fornisca anche un supporto strutturale adeguato fino all'avvenuta crescita del tessuto in neoformazione [102].

Proprietà fisiche :

Il policaprolattone è un polimero termoplastico, semicristallino il quale, a temperatura ambiente, presenta uno stato fisico che ricorda quello di una gomma [103][104]. Appartenendo alla classe dei termoplastici esso è caratterizzato da un'elevata lavorabilità che ne consente il rapido modellamento nella forma desiderata ai fini dell'applicazione.

Esso è un polimero molto versatile in quanto mostra una elevata propensione a formare miscele compatibili con una grande varietà di polimeri. Infatti esso viene copolimerizzato facilmente con monomeri quali l'ossido di etilene, il cloroprene e il metilmetacrilato al fine di realizzare compositi in grado di presentare oltre ai requisiti di biocompatibilità, ampiamente documentati in letteratura, proprietà meccaniche di una certa rilevanza.

Il principale limite del policaprolattone, infatti, risiede proprio nelle proprietà meccaniche piuttosto esigue (resistenza a compressione pari a 1.58Mpa [4] e resistenza a trazione pari a 20.7-42 MPa [68]) se confrontate con le principali caratteristiche meccaniche del tessuto osseo naturale.

Proprietà	U.M.	Condizioni	Valore
Viscosità intrinseca	$cm^3 g^{-1}$	Diluizione infinita	0.9
Entalpia di polimerizzazione	kJ mol ⁻¹	25°C, 1 atm	-28.8
Entropia di polimerizzazione	kJ mol ⁻¹	25°C, 1 atm	-53.9
Energia libera di Gibbs	kJ mol ⁻¹	25°C, 1 atm	-12.8
Grado di cristallinità	%	DSC	69
Cella unitaria		X ray diffraction	Ortorombica
Numero di coordinazione			4
Densità	g cm ⁻³	X ray diffraction	1.094 - 1.200
Elongazione	%		700
Transizione vetrosa T_g	°K	DSC	201
Temperatura di Fusione T_f	°K	DSC	331
Calore di fusione $ riangle H_f$	kJ mol ⁻¹	DSC	8.9

Tabella 9: Proprietà fisiche salienti [100].

4.1.2 DERIVATI DELL'ACIDO IALURONICO

a) L'Acido Ialuronico

L'acido Ialuronico, la cui molecola è illustrata in fig.28, un polisaccaride lineare costituito da sequenze ripetute di acido glucuronico e N-acetil-glucosamina.presente in molti tessuti naturali[105][106][107].



Figura 28: Formula chimica dell'acido ialuronico [123]

Isolato per la prima volta nel 1934 [114] dall'umor vitreo bovino, risulta presente in molti, nella matrice extracellulare di molti tessuti soffici connettivi, nella pelle, nella cartilagine, nel cordone ombelicale, nel fluido sinoviale e rappresenta il maggiore componente della matrice extracellulare nei tessuti embrionali.

Esso esercita importanti funzioni biologiche collegate alle sue proprietà chimicofisiche e può interagire con differenti tipi cellulari attraverso recettori di membrana [105].

In aggiunta, è stato dimostrato che l'acido ialuronico riveste un ruolo essenziale in molti processi biologici come l'idratazione dei tessuti, l'organizzazione dei protoglicani, lo sviluppo embrionale, il differenziamento e la migrazione l'angiogenesi [108].

Utilizzato con successo inizialmente nella chirurgia oftalmica [109] attualmente trova ampio utilizzo nella terapia di viscosupplementazione a livello sinoviale per l'attenuzaione del dolore nelle artropatie [110] nonché nella riparazione di lesioni della pelle [111][112], nella ricostruzione del tessuto cartilagineo e osseo[113].

L'acido Ialuronico è l'unico polisaccaride che viene sintetizzato nella membrana cellulare e poi trasportato nella membrana extracellulare, dove avviene la crescita delle catene [115], fino a raggiungere un peso molecolare compreso fra i 3 e i 5*10⁵ u.m.a. con una diminuzione significativa della massa e della concentrazione di polimero in caso di infiammazione dei tessuti.

Dal punto di vista reologico l'acido ialuronico, in condizioni idrate, presenta il comportamento di un fluido viscoelastico non newtoniano dipendente dal peso molecolare. Il suo impiego risulta negli ultimi anni largamente diffuso in molteplici settori di applicazione per la realizzazione di farmaci a rilascio controllato, in virtù della sua alta biocompatibilità. A seguito della enorme richiesta in campo medico, il polimero, inizialmente estratto solo naturalmente, è stato prodotto in forma sintetica mediante fermentazione di streptococchi con risultati del tutto equivalente [115].

Attualmente lo studio dell'acido ialuronico è finalizzato alla modifica delle sue proprietà chimico-fisiche attraverso due diversi tipi di reazioni chimiche: reazioni di reticolazione e reazioni di accoppiamento.

Le reazioni di reticolazione creano dei cross-links tra le catene polimeriche mediante la formazione di legami chimici oppure per condensazione di specifici gruppi funzionali, modificando le proprietà viscoelastiche e di gelificazione.

La reazione più diffusa consiste nell'inserire un ponte fra le molecole di acido Ialuronico, alterando in tal modo i tempi di degradazione.

Al variare del grado di reticolazione è possibile modulare le proprietà chimicofisiche dell'idrogelo [116].

Le reazione di accoppiamento quali l'esterificazione o la solfatazione, invece, modificano i gruppi funzionali dell'acido ialuronico variando le proprietà biologiche del materiale (capacità anticoagulanti, antitrombogeniche, etc.).

In particolare, attraverso la reazione di esterificazione, è possibile ottenere gli HYAFF: in questo caso è possibile modulare le proprietà degli esteri dell'acido ialuronico al variare del grado di esterificazione.

Per quanto concerne la biodegradabilità, l'acido ialuronico viene in un primo momento degradato localmente dalle ialuronidasi, enzimi specifici per la degradazione dell'acido ialuronico, oppure attraverso la produzione di radicali. Questa prima degradazione riduce la lunghezza della catena dell'acido ialuronico. Le catene più corte e gli oligomeri dell'acido ialuronico entrano nel circolo ematico [117][118] e vengono degradati a livello epatico in acqua ed anidride carbonica [119][120].

b) Gli HYAFF

L'acido ialuronico naturale, in virtù della sua elevata idrofillicità, si presenta come un gel viscoso le cui caratteristiche strutturali non ne permettono l'utilizzo, quale dispositivo medico chirurgico [121][122].

In quest'ottica è stato necessario modificare le caratteristiche chimico-fisiche dell'acido ialuronico conservando intatte le sue naturali proprietà biologiche

attraverso una reazione chimica di tipo conservativo che determina la sua trasformazione in un biopolimero chiamato HYAFF[®].



Figura 29: Struttura chimica dell'HYAFF[®] [123]

In particolare l'HYAFF[®] è un estere dell'acido ialuronico, ottenuto mediante un processo di esterificazione del gruppo carbossilico dell'acido glucuronico con alcol benzilico.

Il processo di esterificazione riduce l'idrofillicità della molecola e trasforma l'acido ialuronico in una molecola meno solubile in acqua consentendo di produrre dispositivi medici in forma "solida" costituiti da puro acido ialuronico esterificato senza l'aggiunta di altri polimeri.

In particolare, tra le diverse tipologie in commercio, lo HYAFF11, risulta ottenuto dalla parziale o completa esterificazione dell'acido ialuronico da parte di gruppi benzilici. In tal senso si definisce il grado di esterificazione che risulta un indicatore della solubilità in acqua del polimero: più è elevato e più bassa è la sua solubilità in acqua; ad esempio HYAFF 11 con grado di esterificazione al 100% risulta completamente insolubile in acqua [124].

Gli HYAFF sono appartenenti alla classe degli idrogeli, ovvero alla classe di materiali polimerici capaci, se posti in acqua, di rigonfiare, trattenendo una frazione volumetrica circa cento volte quella iniziale, senza però dissolversi in essa, grazie alla formazione di un network tra le catene polimeriche, tenuto insieme dalle interazioni forti tra i gruppi funzionali lungo le catene e le estremità polari delle molecole d'acqua [125].

Il grado di swelling o di rigonfiamento di un idrogelo dipende da diversi fattori quali la struttura chimica, la densità dei legami tra le catene (crosslinks) e la presenza di gruppi ionici, e può essere espresso mediante il rapporto R nel seguente modo:

$$R = \frac{W_r - W_s}{W_s}$$

dove: W_r è il peso del polimero rigonfio

W_s è il peso del polimero a secco

La quantità d'acqua assorbita dal gel in condizioni "swollen", è essenziale per la determinazione della biocompatibilità la quale sembra essere favorita da una maggiore presenza di acqua a fronte di un decadimento delle sue proprietà meccaniche.

Essendo un biomateriale destinato ad essere utilizzato per la produzione di medicazioni e di biomateriali per l'ingegneria tissutale, gli studi di biocompatibilità hanno avuto una particolare rilevanza nello sviluppo dello HYAFF[®].

In particolare, a questo scopo sono stati effettuati studi di biodegradazione in vitro ed in vivo, per confermare che i metaboliti provenienti dallo HYAFF[®] fossero assolutamente biocompatibili. In particolare, la via metabolica attraverso cui avviene la degradazione dello HYAFF[®] è stata studiata sia *in vitro* che *in vivo* [117].

In questi studi è stato dimostrato che la degradazione avviene attraverso un meccanismo in due tempi, con la seguente sequenza di eventi:

- liberazione di alcol benzilico;
- liberazione di acido ialuronico solubile;

Queste due molecole, una volta liberate nel tessuto, possono seguire due distinte vie di degradazione.

Ad esempio, l'alcol benzilico viene ossidato nel fegato a formare acido benzoico per poi coniugarsi con glicina al fine di produrre acido ippurico, successivamente eliminato nelle urine [117]. Parallelamente, l'acido ialuronico solubile va ad arricchire le riserve dell'organismo per la formazione di matrice extracellulare.

La biodegradazione dello HYAFF[®] *in vivo*, dopo impianto sottocutaneo, intraperitoneale e dorsolombare, è stata dimostrata in un modello animale [121]. Determinazioni quantitative dell'acido ialuronico e dell'alcol benzilico [117] hanno dimostrato che, dopo cinque giorni, più del 90% dell'acido ialuronico era ancora presente, mentre la quantità di alcol benzilico era inferiore al 30%.

Questi risultati sembrano indicare che il primo step del processo di degradazione di HYAFF[®] è il rilascio di alcol benzilico.

In realtà, l'ambiente biologico è caratterizzato da fluidi complessi, differenti dall'acqua, costituiti da una soluzione ricca di ioni (anioni, cationi), macromolecole (proteine, enzimi) ed altre specie chimicamente molto attive (perossidi, superossidi, e radicali liberi) che, entrando a contatto con il materiale, alterano i meccanismi di degradazione.

Ma la degradazione è condizionata in primo luogo dal grado di esterificazione dell'Hyaff11: un grado di esterificazione più elevato aumenta la resistenza del materiale rallentando i processi di degradazione [123][124].

Alla luce delle sue proprietà, HYAFF11 soddisfa entrambi i requisiti essenziali richiesti da un materiale sostitutivo dell'osso in campo ortopedico: da un lato, favorisce i meccanismi di adesione, proliferazione e differenziamento cellulare, dall'altro mostra una rapida degradadazione i cui prodotti non intervengono minimamente nel processo di ricrescita del nuovo tessuto [125].

4.1.3 FOSFATI DI CALCIO: HA, α-TCP

a) Aspetti generali

Nell' ambito dei biomateriali utilizzati in campo biomedico il fosfato di calcio è classificato come un "*ceramico bioattivo*" ovvero un materiale in grado di favorire reazioni positive nell'ambiente biologico in cui viene inserito (ad esempio favorendo la rigenerazione di nuovo tessuto osseo) ed in grado di attivare reazioni chimiche che modificano il materiale per un certo spessore sotto la superficie [126]. In particolare, nel fosfato di calcio la bioattività è riconducibile alla sua peculiare composizione chimica e, proprio in virtù di tali proprietà e della propria capacità di formare un legame forte e diretto con il tessuto circostante, esso ha suscitato notevole interesse nella realizzazione di compositi mirati ad applicazioni che coinvolgono i tessuti duri mineralizzati [127]. I meccanismi che portano alla formazione di un intimo legame all'interfaccia tra l'osso ed il materiale sono il risultato di una serie di reazioni multiple, in alcuni casi con decorso contemporaneo, che possono essere schematizzate nel modo seguente [126]:

- 1) Dissoluzione del materiale ceramico;
- 2) Precipitazione dalla soluzione sul ceramico;
- 3) Scambio ionico e riadattamento strutturale del tessuto all'interfaccia;
- 4) Interdiffusione dalla superficie verso l'interno del ceramico;
- 5) Effetti dovuti all'attività cellulare;
- 6) Deposizione di nuova fase minerale o di fase organica;
- 7) Integrazione della nuova fase nel ceramico;
- 8) Orientamento delle cellule sulla superficie del materiale ceramico (*Chemiotassi*);
- 9) Attaccamento e proliferazione cellulare;
- 10) Differenziazione cellulare;
- 11) Formazione della matrice extracellulare.



Figura 30: Meccanismi che intervengono all'intefaccia tra un ceramico bioattivo ed il tessuto biologico [126];

Il fosfato di calcio si può ottenere mediante precipitazione da soluzioni acquose sovrassature di ioni di calcio e fosforo. Ciò comporta, come per altri sali moderatamente solubili, la formazione di fasi metastabili le quali, con il procedere della reazione, spariscono [128].

La stabilità o l'instabilità del fosfato di calcio in soluzione è direttamente correlata con il meccanismo di formazione delle fasi. Infatti alcuni precipitati possono essere ottenuti dalla precipitazione in soluzioni sovrassature a temperatura ambiente, mentre altri possono formarsi da reazioni allo stato solido ad alte temperature [128] [129]. In tal senso è possibile fare la seguente classificazione:

- 1) **Processi ad alte temperature** ($T > 500^{\circ}C$):
 - **DCP** è ottenuto dalla precipitazione alle alte temperature ed è leggermente più stabile del DCPD ottenuto a temperatura ambiente;
 - β-TCP è stabile a 1180°C; in acqua è più stabile del DCP e del OCP ma meno stabile del CDHA in un intervallo di variazione del pH tra 6 e 8;
 - α-TCP ottenuto per riscaldamento sopra i 1180°C, conserva la propria struttura quando si porta a temperatura ambiente (*quenching*). In acqua è meno stabile del DCPD e dell'OCP;
 - **SHA** è ottenuta da riscaldamento tra i 700-1400°C ed è stabile come l'idrossiapatite povera di calcio;
 - **TTCP** è ottenuto da riscaldamento sopra i 1500°C e conserva la propria struttura quando viene raffreddato a temperatura ambiente; in acqua è meno stabile di SDHA,CDHA,DCPD e OCP;

Accanto ad essi si forma anche dell'ossido di calcio CaO ottenuto dal riscaldamento del carbonato di calcio CaCO₃ al di sopra di 450°C [130].

	Acronimo	Formulazione	Ca/P	Cristallo
Fosfato di calcico	DCP	CaHPO ₄	1.00	triclina
Whitlockite	β-ΤСΡ	$Ca_3(PO_4)_2$	1.5	Esagonale
Fosfato tricalcico	α-ΤСР	$Ca_3(PO_4)_2$	1.5	Ortorombica
Idrossiapatite sinterizzata	SHA	$Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_{2-2x}O_x$	1.67	
Fosfato tetracalcico	TTCP	Ca_2PO_4	2.00	

Tabella 10: Composti di fosfato di calcio stabili alle alte temperature [129][130]

2) Processi a temperatura ambiente:

- **MCPM** stabile per pH<2
- **DCPD** stabile per valori di pH compresi tra 2 e 4, nuclea e cresce rapidamente portandosi a valori di pH=6.5.
- **OCP** nuclea rapidamente e cresce per valori di pH compresi tra 6.5 e 8, risulta più stabile di DCPD e ACP in questo intervallo.
- ACP è la prima fase a precipitare per valori di pH compresi tra 4 e 8 e si trasforma rapidamente in DCPD,OCP,CDHA.
- CDHA è l'idrossiapatite povera di calcio la quale non precipita spontaneamente a queste temperature ma necessita dell'azione di DCPD e OCP che agiscono come precursori; può raggiungere l'equilibrio per tempi infiniti in soluzione acquosa.
- **PHA** sono i precipitati di idrossiapatite e sono i composti più stabili del sistema per pH>4, anche se la loro precipitazione avviene in maniera autonoma solo per pH>8 altrimenti è necessaria la presenza di fluoruro che agisce da iniziatore.

	Acronimo	Formulazione	Ca/P	Cristallo
Monofosfato di calcico	MCP	$Ca(H_2PO_4)_2 \cdot H_2O$	0.50	
Brusite	DCPD	$CaHPO_4 \cdot 2H_2O$	1.00	Monoclina
Fosfato Octocalcico	OCP	$Ca_8H_2(PO_4)_6\cdot 2H_2O$	1.33	Triclina
Fosfato di calcio amorfo	ACP	$Ca_3(PO_4)_2 \cdot xH_2O$	1.5	
Idrossiapatite povera di calcio	CDHA	$Ca_9(HPO_4)(PO_4)_5OH$	1.5	
Idrossiapatite	PHA	$Ca_{10}(PO_4)_6 \cdot (OH)_2$	1.67	Esagonale

Tabella 11:Composti di fosfato di calcio stabili a temperatura ambiente [129][130]

b) Aspetti termodinamici

Il meccanismo di dissoluzione e precipitazione del fosfato di calcio in soluzione e la stabilità delle singole fasi che si formano possono essere studiati considerando il sistema ternario Ca(OH)₂-H₃PO₄-H₂O e tracciando le isoterme di solubilità [127].

Tali curve descrivono la correlazione tra il logaritmo della concentrazione di uno ione presente in soluzione (ad es. [Ca]²⁺ e [P] ³⁺) ed il pH della soluzione stessa. Tale curva definisce, al variare del PH della soluzione, lo stato di equilibrio del soluto in soluzione e pertanto divide il piano in due regioni: una regione di **sottosaturazione** al di sotto della curva e una regione di **sovrassaturazione** al di sopra della curva.

Per ogni punto appartenente alla regione di sottosaturazione il soluto si dissolve nella soluzione per il valore del pH considerato; viceversa per ogni punto appartenente alla regione di sovrassaturazione il soluto precipita per il valore del pH considerato. A tal proposito sono riportate le isoterme relative alle fasi che possono formarsi in soluzione a T= 37° C e P=1atm.

Facendo riferimento al diagramma (fig 31), fissato un certo valore del pH della soluzione, è più stabile la fase che si riferisce alla isoterma che si trova più in basso. In quest' ottica si può ricavare che, per valori del pH compresi tra 6.5 e 9.5 analoghi a quelli che si registrano in condizioni fisiologiche, la fase più stabile è certamente l'idrossiapatite. Per valori di pH inferiori a 4.2 risulta più stabile il DCP mentre per pH> 8.5 è più stabile il TTCP.



Figura 31: Diagramma di solubilità del sistema ternario Ca(OH)₂-H₃PO₄-H₂O per T=37°C e P=1atm;

Da tale diagramma è possibile ricavare diverse informazioni. Ad esempio dalla pendenza negativa del primo tratto di isoterma è possibile valutare qualitativamente la basicità del precipitato. In particolare DCPD e DCP, che mostrano pendenza minore, sono essenzialmente più acidi di HA e TTCP che mostrano pendenze maggiori [129].

Si osserva inoltre che l'andamento delle isoterme e pertanto, in ultima analisi, la stabilità di una certa fase ad un certo valore del pH è condizionato anche dal rapporto Ca/P.

Definito il **punto singolare** come quel punto in corrispondenza del quale si realizza l'equilibrio tra due fasi in soluzione (individuato dall'intersezione di due isoterme di solubilità) si può riscontrare che tale punto si sposta verso il basso e per valori di pH leggermente più bassi al crescere del rapporto Ca/P a seguito dell'effetto dello ione comune [127].

Infine va considerato un effetto della temperatura sulla termodinamica dei processi di dissoluzione e precipitazione dei fosfati di calcio in acqua; in particolare si osserva un decremento della solubilità del fosfato di calcio in soluzione al crescere della temperatura, tanto più evidente quando si tende a valori di pH decrescenti [127].

c) Reazione di hardening - Chimica della reazione

In letteratura le formulazioni di cementi a base di fosfato di calcio che presentano cristalli di idrossiapatite, una volta subito il processo di indurimento, sono molteplici. Il primo studio è stato compiuto da **Brown** e **Chow** che prepararono una miscela di TTCP e DCP in acqua. In particolare è stato osservato che l'idrossiapatite povera di calcio CDHA presenta una composizione più vicina all'osso minerale e risulta essere più stabile per valori di PH non aggressivi, compatibili con il tessuto osseo umano [131], rispetto all'idrossiapatite stechiometrica. Inoltre, dopo un certo tempo trascorso dall'impianto, non è più distinguibile dall'osso naturale da un punto di vista cromatico (*Driessen, Verbeeck, 1991*). In quest'ottica è stato realizzato un composto mediante l'idrolisi di α -TCP con una piccola percentuale di precipitati di idrossiapatite HAp in una soluzione acquosa di Na₂HPO₄ per favorire la reazione di hardening del cemento dalla cui sintesi si ottiene una struttura costituita da cristalli di CDHA. Tale processo si realizza a livello chimico attraverso la seguente reazione endotermica:

 $3Ca_3(PO_4)_2+H_2O \rightarrow Ca_9(HPO_4)(PO_4)_5OH$

Il materiale così ottenuto presenta una resistenza a compressione di 25 Mpa dopo un riposo di 7 ore in soluzione di Ringer alla temperatura corporea [132].

d) Reazione di hardening - Cinetica della reazione

La cinetica dei processi di formazione dei cementi a base di fosfato di calcio dipende dalla variabilità di un ampio spettro di parametri, relativi sia alle metodologie teoriche utilizzate che alla realizzazione pratica dell'operatore in laboratorio che intervengono direttamente ed indirettamente su molte proprietà quali la solubilità, il tempo di setting, la porosità e la resistenza a compressione del materiale [129]. La reazione di setting è definita da alcuni tempi caratteristici attraverso i quali è possibile valutare alcune caratteristiche essenziali del cemento che si sta preparando.

Si definisce *tempo di coesione t_c* il più piccolo tempo che è necessario attendere perché il cemento, messo il soluzione liquida, non si sgretoli.

Si definisce *tempo di setting iniziale t_i* il tempo oltre il quale non è più possibile manipolare il composto altrimenti perde di consistenza e non è più in grado di indurire e **tempo di setting finale t**_f il tempo in corrispondenza del quale il materiale ha già avviato i meccanismi di indurimento (*self-hardening*) manifestando la capacità di sostenere carichi leggeri.

Si può osservare che il tempo di setting iniziale dipende dal rapporto liquido polvere in particolare cresce al crescere del rapporto L/P. Inoltre è molto influenzato dalle modalità di preparazione del cemento.

Si definisce poi il **tempo di dough t**_d come il tempo che è necessario attendere perché il cemento perda le caratteristiche di un sistema bifasico ed assuma la consistenza di una pasta omogenea. Tale parametro è molto indicativo per la valutazione dell'iniettabilità del cemento. Infatti una delle prerogative essenziali di un cemento osseo è che possa essere impiegato con facilità nel riempimento di cavità ossee. Esso può essere facilmente ricavabile facendo riferimento alla seguente relazione empirica:

$t_{d} = 0.5t_{i}$

parametro Si può osservare che tale è fortemente condizionato dall'invecchiamento della polvere nel senso che tanto maggiore è il lasso di tempo che intercorre tra la realizzazione del cemento in polvere per sinterizzazione e il processo di indurimento in soluzione, tanto minore è la reattività del materiale e ciò comporta tempi di setting più lunghi. Di solito il tempo di dough risulta essere maggiore del tempo di coesione, ma sono riportati in letteratura dei casi in cui questi due parametri sono molto simili; Ciò è chiaramente un evento indesiderato poiché è auspicabile che il cemento sia iniettabile quando non può più sgretolarsi.

In questo caso si è costretti ad intervenire sulla composizione delle fasi partecipanti e sulle procedure eseguite per ridurre il tempo di coesione non compromettendo le proprietà meccaniche del materiale[133][134].

Da un analisi alla macchina Instron 4507 su campioni cilindrici di altezza 10mm e diametro 5mm è stato possibile valutare l'evoluzione delle proprietà di resistenza a compressione del cemento all'evolversi della reazione di setting come mostrato dal diagramma [128]:



Figura 32: Andamento della resistenza a compressione durante la reazione di indurimento descritta analiticamente da una relazione esponenziale del tipo $\sigma_c(t) = \sigma_{\infty}(1 - e^{\frac{t}{\tau}})$

Si può notare che le proprietà crescono repentinamente nelle prime 8 ore raggiungendo circa i 20 Mpa, per poi aumentare più dolcemente nelle 48 ore successive; è evidente da questi risultati che dopo 10 giorni la resistenza a compressione non aumenta più, segno tangibile del fatto che la reazione di indurimento del cemento si ormai conclusa [128].

e) effetto della temperatura

La temperatura gioca un ruolo certamente rilevante nell'evoluzione cinetica del processo. Si riportano i tempi di setting ricavati per il cemento a base di α -TCP (98%) con piccola percentuale di idrossiapatite (2%) per una temperatura di 22°C (T ambiente) e di 37°C (T corporea) [127]:

98% a-TCP 2% HA in H_2O	t _i (min)	t _f (min)
22°C	9	19
37°C	6	15

Tabella 12: Effetto	della temperatura s	sul setting della	reazione [127]
---------------------	---------------------	-------------------	------------------

Dal confronto dei valori riportati è possibile riscontrare una riduzione dei tempi di setting e quindi un aumento della cinetica del processo di circa il 30% a temperature più elevate. Al contempo, attraverso un analisi SEM, è stato possibile osservare che la temperatura non produce grosse alterazioni della microstruttura causando solo un lieve decremento delle proprietà meccaniche del cemento [132].

f) effetto della porosità

I cementi a base di fosfato di calcio sono materiali naturalmente porosi a seguito delle metodologie di ottenimento che prevedono una reazione di setting a temperatura corporea. Il controllo della porosità del materiale è importante in quanto permette di controllare la resistenza a compressione entro i limiti desiderati [135].

D'altra parte una porosità è indispensabile per permettere il passaggio delle sostanze nutritive verso il nuovo osso che si sta formando. Qualitativamente è intuitivo che al crescere della porosità del materiale si riduce la resistenza a compressione [135].

Facendo riferimento ad un sistema costituito dal 98% di α -TCP ed il 2% di idrossiapatite in soluzione acquosa al 2.5% di Na₂HPO₄ lasciato reagire in soluzione di Ringer a 37°C per 10 giorni, è stato possibile valutare l'entità della porosità mediante l'ausilio di un porosimetro a mercurio e si è valutato l'effetto prodotto sulle proprietà meccaniche del cemento al variare del rapporto liquido/polvere attraverso un test compiuto con macchina dinamometrica [135]:

L/P	% Porosità	Diametro pori (µm)	σc (Mpa)
0.35	41.23	0.017	37.0
0.40	48.51	0.027	31.2
0.45	50.2	0.039	23.5
0.50	52.8	0.058	22.6
0.55	54.9	0.072	16.1

Tabella 13: Dipendenza della resistenza	a compressione e della poros	ità al variare di L/P [135];
1	1 1	L 1/

Dalla tabella è evidente un incremento della porosità e della dimensione dei pori al crescere della fase liquida e quindi un abbassamento della resistenza a compressione che, in accordo con i dati sperimentali precedenti, mostra un andamento descritto dall'**equazione di Ryskewitch**:

$$\sigma = \sigma_0 \exp(-bP)$$

dove σ è la resistenza

 σ_0 è la resistenza a porosità nulla,

P è la porosità

Mediamente la porosità si aggira intorno al 50% contro il 4% della porosità della sola idrossiapatite sinterizzata [135].

g) effetto del magnetismo

La precipitazione di cristalli di fosfato di calcio è influenzata anche dalla presenza di sorgenti magnetiche nell'ambiente di reazione. Confrontando i risultati di un esperimento compiuto su dei campioni di idrossiapatite ed OCP a 25°C in presenza ed in assenza di un campo magnetico di 0.27 Tesla è possibile osservare degli effetti sia sulla termodinamica che sulla cinetica della reazione. La presenza di un campo magnetico infatti incrementa la dissoluzione di fasi metastabili alimentando la nucleazione di un numero più elevato di fasi stabili; inoltre è evidente una forte riduzione della velocità di accrescimento dei cristalli mentre quasi trascurabili effetti sembrano caratterizzare la velocità di formazione delle fasi amorfe [136].
4.2 PREPARAZIONE DEL SUBSTRATO

4.2.1 SCAFFOLD MACROPOROSI

In questo lavoro si è proceduto alla realizzazione di substrati cellulari in materiale polimerico mediante la tecnica di phase inversion/salt leaching (*par 3.5*) e di phase separation (*par 3.3*) termicamente indotta (TIPS).

Nell'ambito dei polimeri idonei al tipo di applicazione di interesse (*par 3.3*) è stato scelto il policaprolattone (PCL) (*Aldrich Chemical Company 181609-500G*) in virtù delle sue eccellenti doti di biocompatibilità e le sue buone proprietà meccaniche.

Nell'ambito degli scaffold realizzati secondo la tecnica del phase inversion/salt leaching, il PCL è stato disciolto in dimetilacetammide (DMAc) (*J.T. Baker 06-2007*) (ϱ =0.938 g/cm³) nel quale risulta solubile a temperatura ambiente [74] nel rispetto dei requisiti di biocompatibilità richiesti dall'applicazione.

La procedura impiegata consente di ottenere una porosità aggiungendo alla soluzione polimerica un'agente porogeno in grado, una volta avvenuta la sua eliminazione, di lasciare all'interno della struttura rigida i pori delle dimensioni desiderate; nel caso specifico, l'agente porogeno utilizzato è il cloruro di sodio NaCl (*Carlo Erba Reagenti cd. N.479687*).

Diverse tipologie di costrutti sono stati realizzati variando, singolarmente, un ampio spettro di parametri quali ad esempio:

- Il peso molecolare del polimero;
- Il rapporto volumetrico polimero/solvente;
- La frazione volumetrica di agente porogeno utilizzato;
- la dimensione dei cristalli di agente porogeno;
- la temperatura di dissoluzione del sistema polimero/solvente;
- L'impiego di una precompressione antecedente all'estrazione del solvente per migliorare la distribuzione spaziale dei cristalli nella matrice;
- l'impiego di un letto di cristalli di cloruro di sodio sul fondo del contenitore per ridurre l'effetto skin all'interfaccia con lo stampo;
- L'aggiunta di segnali bioattivi per migliorarne le proprietà di osteoconduzione;

74 - CAPITOLO 4

La realizzazione dello scaffold prevede le seguenti fasi di preparazione:

- I. inizialmente la fase polimerica di policaprolattone viene disciolta in DMAc per agitazione magnetica alla temperatura di 25°C e 55°C in modo da consentire la completa dissoluzione del polimero.
 Il sistema omogeneo ottenuto viene addizionato con il cloruro di sodio e quindi lasciato ancora alcuni minuti in agitazione così da permettere la completa miscelazione delle diverse fasi all'interno della miscela (fig.33).
 L'impasto ottenuto mostrerà diversa consistenza in relazione all'ammontare delle tre componenti utilizzate (polimero, solvente, agente porogeno).
 Esso viene depositato all'interno di un disco di Petri del diametro di 100 mm aiutandosi con una piccola spatola nel caso di sistemi altamente viscosi per l'alto contenuto di NaCl (fig.33).
- II. A questo punto si procede all'estrazione del solvente la cui eliminazione totale è un requisito essenziale ai fini dell'applicazione richiesta in quanto possibile fattore di disturbo del PH neutro dell'ambiente fisiologico. L'estrazione della dimetilacetammide avviene per inversione di fase mediante abluzioni successive di etanolo (circa 9ml ogni 20 minuti per tre step successivi).
- III. Per alcune tipologie di campioni caratterizzate da elevate percentuali di NaCl, preventivamente all'estrazione di solvente è stata realizzata una precompressione (1kg) del substrato della durata di circa un'ora in modo da consentire una maggiore compattazione della struttura ed una migliore distribuzione dell'agente porogeno all'interno dell'intero volume.
- IV. Il substrato viene immerso in acqua bidistillata in modo da permettere l'eliminazione dei cristalli di cloruro di sodio presente nella struttura: l'NaCl si dissolve per dissociazione ionica lasciando all'interno della struttura, ormai rigida, dei vuoti al posto dei cristalli che costituiscono la porosità del substrato.

Al fine di evitare la saturazione della soluzione H₂O-NaCl in cui è immerso il substrato, ogni 24 ore, si procede alla sostituzione dell'acqua bidistillata in modo da velocizzare le operazioni di eliminazione del sale dalla struttura.



Figura 33: Phase inversion/Particulate Leaching per la realizzazione di scaffold macroporosi di PCL

Lo stesso schema di preparazione è stato seguito per la realizzazione di scaffold compositi ottenuti aggiungendo durante le fasi preliminari relative alla preparazione del sistema ternario polimero/solvente/cloruro di sodio un quarto componente costituito da idrossiapatite di dimensioni micrometriche (d_{HA} 3.16 g/cm³ - $d_{0.1}$ 0.42, $d_{0.5}$ 4.02 and $d_{0.9}$ 11.91 µm) (fig.34).



Figura 34: Phase inversion/Particulate Leaching per la realizzazione di scaffold macroporosi di PCL bioattivati con HA;

La stessa procedura è stata seguita per la realizzazione di scaffold compositi ottenuti caratterizzati da una matrice polimerica di PCL ed Hyaff 11. In questo caso le fasi di preparazione sono state modificate nel modo seguente:

- I. Inizialmente il PCL viene disciolto in una miscela binaria di solventi, rispettivamente tetraidrofluorano (THF - Aldrich Chemical Company – $\rho=0.889g/cm^3$) e dimetilsulfossido (DMSO - Aldrich Chemical Company – $\rho=1.101 g/cm^3$): per agitazione magnetica alla temperatura di 25°C. Il sistema monofasico ottenuto viene addizionato ad un sistema particellare costituito da cloruro di sodio e Hyaff 11, preventivamente mescolati, lasciato ancora in agitazione per alcuni minuti al fine di permettere la omogeneizzazione delle diverse fasi all'interno della miscela (fig.35). L'impasto ottenuto, più o meno viscoso in relazione all'ammontare delle componenti utilizzate, viene depositato all'interno di un disco di Petri del diametro di 100 mm aiutandosi con una piccola spatola nel caso di miscele altamente viscose per l' alto contenuto di NaCl.
- *II*. L'estrazione del solvente la cui eliminazione totale è essenziale ai fini di ottenere un PH neutro delle strutture, è stata realizzata per inversione di fase mediante etanolo per 1h (9ml ogni 20 min).
- III. Per alcune tipologie di campioni caratterizzate da elevate percentuali di NaCl, preventivamente all'estrazione di solvente è stata realizzata una precompressione (1kg) del substrato della durata di circa un'ora in modo da consentire una maggiore compattazione della struttura ed una migliore distribuzione dell'agente porogeno all'interno dell'intero volume.
- IV. Il substrato viene immerso in acqua bidistillata in modo da permettere l'eliminazione del cloruro di sodio presente nella struttura: l'NaCl si dissolve per dissociazione ionica lasciando all'interno della struttura, ormai rigida, dei vuoti che costituiscono la porosità del substrato.

A seguito della saturazione della soluzione H_2O -NaCl in cui è immerso il substrato ogni 24 ore risulta necessario procedere alla sostituzione dell'acqua bidistillata al fine di velocizzare le operazioni di eliminazione del sale dalla struttura.



Figura 35: Phase inversion/Particulate Leaching per la realizzazione di scaffold macroporosi di PCL bioattivati con Hyaff 11;

4.2.2 SCAFFOLD MACROPOROSI FIBRORINFORZATI

Gli scaffold macroporosi in PCL sono stati rinforzati con fibre di acido polilattico (*PLLA 75dtex – Sofradim –* ϱ =1.25g/cm³) sfruttando la tecnologia della filament winding.

L'avvolgimento filamentare consiste nel condurre una o più fibre attraverso un bagno di resina in modo da determinare il loro impregnamento di matrice, e, successivamente il loro avvolgimento su un mandrino rotante secondo un'opportuna tensione [137].

Nel caso specifico la soluzione ternaria (PCL, DMAc, NaCl), già utilizzata per la preparazione delle precedenti tipologie di substrati, viene introdotta nel bagno al fine di impregnare le fibre di PLLA.

Solitamente, nei compositi prodotti con tale tecnologia, per ottenere una determinata pressione interlaminare tra strati successivi di fibra e matrice, risultano necessarie una opportuna *tensione di avvolgimento* ed un'adeguata *impregnazione*. Nel caso specifico la fibra non è sottoposta ad alcuna tensione in quanto la minima sollecitazione a trazione determinerebbe un avvolgimento della fibra direttamente sul mandrino a seguito della non adeguata viscosità della matrice utilizzata.

Al contrario, l'efficiente impregnazione della fibra risulta un punto importante della progettazione del substrato in relazione alle modalità di rivestimento di ciascun filamento della fibra con un opportuno strato di soluzione (PCL/DMAc) ricco di cristalli di sale.

Infatti, una volta realizzato l'avvolgimento, a seguito delle successive fasi di evaporazione del solvente e di eliminazione dei cristalli di sale a cui il sistema è sottoposto, la struttura finale risulterà composta dalle fibre, integrate alla matrice di PCL tra le quali sarà presente una porosità ad elevato grado di interconnessione dovuto alla fuoriuscita dei cristalli di sale.

Dal punto di vista tecnologico, l'avvolgimento si realizza in virtù del moto relativo della testa di deposizione rispetto al mandrino rotante rispetto al quale presenta un moto rettilineo alternato, e attraverso il quale si decide la geometria dell'avvolgimento secondo un angolo compreso tra 0° e 90° (fig. 36).

Il metodo di avvolgimento può essere *circonferenziale, elicoidale o polare* (Fig.36): nel primo (a) il rinforzo, preimpregnato in un bagno di resina, è avvolto su un mandrino rotante secondo un angolo di 90°, mentre in quello elicoidale l'angolo di avvolgimento risulta compreso tra 10° e 85°.

La tecnica polare, infine, è soltanto un caso particolare di avvolgimento elicoidale, in cui il mandrino è fermo [137].



Figura 36 : Rappresentazione schematica di un dispositivo per la realizzazione di avvolgimento filamentare;



a) Circonferenziale;

Metodi di avvolgimento [138]: b) elicoidale

c) polare

Nel caso specifico il metodo di avvolgimento è di tipo elicoidale con un angolo di avvolgimento di 45°.

La macchina avvolgitrice utilizzata (*mod. AS LAB 101* – fig.37) di cui si riportano le principali caratteristiche tecniche (*tab.14*) è integrato ad un calcolatore elettronico con software dedicato (*T.EL.MEC.SRL in dotazione con la macchina avvolgitrice*) che consente di gestire tutte le operazioni durante le fasi di avvolgimento in maniera automatica, nonché consente il calcolo delle velocità degli organi mobili (testa di deposizione e mandrino).



Figura 37: Filament winding mod. ASLAB101

Tensione di alimentazione	380 V
Gradi di libertà	5
Potenza	4000W
Diametro massimo del mandrino	300 mm
Lunghezza max avvolgibile del mandrino	1000 mm
Massa max del mandrino	100 Kg
Corsa utile di penetrazione	± 75 mm
Corsa utile verticale	250 mm
Intervallo di rotazione	Illimitato in ambo i versi
Distanza max punta-contropunta	1500 mm
Velocità massima	200 giri/min
Pressione di esercizio pistone-contropunta.	1–4 bar

Tabella 14: Filament winding mod. AS LAB 101 : caratteristiche tecniche

In particolare, il software elabora i parametri che gli vengono assegnati (angolo di avvolgimento θ , velocità di rotazione del mandrino ω , velocità di traslazione della testa di alimentazione v) intimamente legati secondo la seguente relazione [137]:

$$tg\theta = \frac{\omega \pi R}{v}$$

dove R rappresenta una sorta di raggio equivalente del mandrino, che nel nostro caso risulta essere noto.

Bisogna osservare, a tal proposito, che durante il corso di un avvolgimento, il diametro del composito progressivamente aumenta (per cui R aumenta) e, di conseguenza, anche l'angolo θ , dal momento che il software non permette la regolazione di $v \in \omega$, che restano costanti.

Una volta realizzato l'avvolgimento filamentare, lo scaffold viene sottoposto alla procedura, già vista in precedenza per altre tipologie di scaffold, di phase inversion/salt leaching con l'estrazione del solvente in etanolo per 24 ore e l'eliminazione di NaCl in acqua bidistillata per 7 giorni (*fig.38*).



Figura 38: Schema di preparazione di scaffold macroporosi rinforzati con fibre polimeriche di PLLA

Parallelamente sono stati realizzati scaffold caratterizzati da un duplice sistema di rinforzo: un rinforzo fibrillare di PLLA ed un rinforzo particellare a base di fosfati di calcio nella forma cristallina di α -TCP (*Universitat de la Catalunya – Barcelona, Spain*). In tal caso, il fosfato tricalcico, in polvere, viene aggiunto nelle fasi preliminari di preparazione unitamente ai cristalli di cloruro di sodio mentre le fasi successive delle procedure di vista in precedenza restano inalterate (fig.39).



Figura 39: Schema di preparazione di scaffold macroporosi rinforzati con fibre polimeriche e fosfato tricalcico;

4.2.3 SCAFFOLD MACROPOROSI PER SEPARAZIONE DI FASE

Parallelamente sono stati realizzati scaffold in PCL mediante tecniche di separazione di fase termicamente indotta (fig.40).

In questo caso il polimero viene disciolto in diossano (Aldrich Chemical Company – ϱ =1.034g/cm³) o dimetilsulfossido (Aldrich Chemical Company – ϱ =1.101 g/cm³) i quali risultano preferibili rispetto ai solventi impiegati in precedenza a seguito della loro elevata volatilità (Tm-diox = 10.8°C; Tm-dmso=18°C). La soluzione ottenuta viene introdotta in uno stampo e sottoposta ad un sottoraffreddamento (4°C -18°C) per circa 18h in modo da indurre una separazione di fase tra polimero e solvente. Successivamente i campioni vengono posti in condizioni di vuoto (5*10-1 Torr) alla temperatura di 12°C (vacuum extraction) per consentire l'eliminazione del solvente senza determinare il collasso strutturale della matrice polimerica.



Figura 40: Separazione di fase termicamente indotta (TIPS): realizzazione di scaffold macroporosi di PCL;

Infine sono stati realizzati scaffold in PCL mediante tecniche di separazione di fase con estrazione del solvente indotta dalla presenza di un non solvente per il polimero (freeze dipping) (fig.41).

Anche in questo caso il polimero viene disciolto in diossano (Aldrich Chemical Company – ϱ =1.034g/cm³). La soluzione ottenuta viene introdotta in uno stampo e sottoposta ad un sottoraffreddamento (4°C -18°C) per circa 18h in modo da indurre una separazione di fase tra polimero e solvente. A questo punto i campioni vengono introdotti in un bagno di etanolo, precondizionalto alle stesse temperature a cui è sottoposto il sistema (4°C -18°C) per circa 48h.

L'etanolo, agendo da solvente per il diossano ma da non solvente per il polimero estrae il solvente svolgendo la stessa funzione del vuoto (5*10⁻¹ Torr) ma con minore spreco di risorse temporali ed economiche in quanto non fa uso di apparecchiature costose come il freeze dry. L'etanolo viene sostituito rispettivamente dopo 3h e 24h per impedire la sua saturazione da parte del diossano.



Figura 41: Separazione di fase TIPS con modalità di estrazione del solvente Freeze dipping: realizzazione di scaffold macroporosi di PCL

4.2.4 MICROSFERE E SCAFFOLD SINTERIZZATI

In questo lavoro, prima di procedere alla realizzazione degli scaffold sinterizzati, si è proceduto alla realizzazione ed all'ottimizzazione di microsfere di policaprolattone (PCL) (*Aldrich Chemical Company 181609-500G, M_n: 65000*). Per la realizzazione di tali particelle sono state utilizzate due metodologie: singola emulsione (O/W) e doppia emulsione (W/O/W).

<u>Singola emulsione</u>

Uno dei metodi più comuni per la realizzazione di microsfere polimeriche consiste nell'emulsione oil-in-water (O/W) in cui una soluzione polimerica organica viene dispersa in una fase acquosa continua. Nel caso specifico la fase dispersa è costituita da una soluzione di Policaprolattone e diclorometano (*Aldrich Chemical Company*, 99,9%) il quale risulta un ottimo solvente per il polimero scelto anche a temperatura ambiente.

La fase disperdente, invece, consiste in una soluzione di 500 ml di acqua bidistillata con una concentrazione dello 0,25% di polivinilalcool (PVA) (*Aldrich Chemical Company, 87-89% idrolizzato, M_w: 13000÷23000*). La presenza di un agente emulsionante nella fase acquosa è fondamentale per ridurre i fenomeni di coalescenza e di aggregazione delle microsfere, in quanto ha il compito di prevenirne la coagulazione durante l'evaporazione del solvente.

La procedura di realizzazione è la seguente:

- 1. Preparazione della soluzione acquosa di PVA in agitazione magnetica alla temperatura di circa 100°C per circa un'ora in modo da consentire la completa dissoluzione del polimero.
- 2. Preparazione della fase disperdente ottenuta dissolvendo il policaprolattone in diclorometano (20 ml) per agitazione magnetica a temperatura ambiente fino a formare un sistema omogeneo.
- 3. Le due soluzioni ottenute vengono miscelate per circa tre ore ad un'opportuna velocità, mediante un agitatore meccanico (FALC Instruments mod. AT, PW: 85 W), al fine di ottenere delle microparticelle disperse (Fig. 42).
- 4. Il sistema bifasico ottenuto viene lasciato in agitazione magnetica per circa dodici ore sotto cappa chimica, in modo da consentire la completa evaporazione del solvente organico, altamente volatile, i cui residui risulterebbero nocivi per l'applicazione in vivo.
- 5. Successivamente le microsfere solide vengono separate per filtraggio e sottoposte a tre successivi lavaggi in acqua bidistillata per favorire l'eliminazione dell'agente emulsionante.

- 6. Infine, le microsfere così ottenute vengono lasciate essiccare sotto cappa chimica.
- 7.



Figura 42: Preparazione emulsione singola O/W

Doppia emulsione.

L'emulsione multipla W/O/W consiste in un sistema trifase in cui le goccioline di olio, contenenti una fase acquosa interna, vengono disperse in una fase acquosa esterna. Il metodo di preparazione consiste in due stadi di emulsione che permettono di incapsulare efficientemente un farmaco. Nel caso specifico, il polimero (PCL) è stato dissolto in un solvente organico, il diclorometano (MC) (Aldrich Chemical Company, 99,9%), il quale è caratterizzato da un'elevata volatilità che ne facilita la rimozione mediante evaporazione

- La procedura seguita consta delle seguenti fasi:
 - La preparazione della fase acquosa interna (*fase dispersa*) ottenuta dalla dissoluzione di un'opportuna percentuale di polivinilalcool (PVA) (*Aldrich Chemical Company, 87-89% idrolizzato, M_w: 13000÷23000*) in una soluzione salina (PBS) (*OXOID ph 7,3*) di 1 ml, mediante agitazione magnetica alla temperatura di circa 100°C. Tale soluzione, raffreddata a temperatura ambiente, viene addizionata con lo 0,45% di BSA (**Bovine Serum Albumine**) (*Sigma Aldrich Chemical Company, M_w: 68000*).

La presenza di un agente emulsionante nella fase acquosa interna favorisce la stabilità dell'emulsione primaria e l'incapsulamento delle proteine.

- 2. La soluzione polimerica (*fase disperdente/fase dispersa*) è stata ottenuta dissolvendo il policaprolattone in diclorometano mediante agitazione magnetica a temperatura ambiente al fine di formare un sistema monodisperso.
- 3. La fase acquosa esterna (*fase disperdente*) è stata preparata dissolvendo diverse percentuali di PVA in 250 ml di PBS mediante agitazione magnetica alla temperatura di circa 100°C.
- 4. La fase acquosa interna viene emulsionata per un tempo opportuno con la soluzione polimerica utilizzando un sonificatore con potenza di 50 W (GRANT ULTRASONIC BATH XB3, 50-60Hz, 60W) (Fig.43) in modo d a consentire l'incapsulamento della BSA all'interno della fase polimerica.
- Il prodotto della prima emulsione (W/O) viene iniettato nella fase acquosa esterna utilizzando una siringa di vetro. Tale soluzione viene miscelata per trenta minuti utilizzando un agitatore magnetico (FALC Instruments mod. F60) a temperatura ambiente ed impostando un'opportuna velocità di agitazione (Fig. 43).
- 6. Al fine di rimuovere il diclorometano viene aggiunta una soluzione salina (PBS) di 640 ml contenente la stessa concentrazione di PVA della fase acquosa interna ad una velocità di 3 ml/min. In queste condizioni il solvente contenuto nelle microsfere polimeriche viene estratto dal mezzo acquoso (non solvente per il polimero), accelerandone la rimozione.
- 7. Successivamente le microsfere solide vengono filtrate e sottoposte a tre lavaggi successivi con acqua bidistillata per eliminare l'agente emulsionante.
- 8. Infine, le microsfere così ottenute vengono lasciate essiccare sotto cappa chimica.



Figura 43: Preparazione doppia emulsione W/O/W

In conclusione, la realizzazione delle microsfere è dipendente da un ampio spettro di parametri tra i quali:

- ✓ Velocità di agitazione magnetica;
- ✓ Tempo di bonificazione;
- ✓ Concentrazione di PCL in fase oil;
- ✓ Concentrazione di PVA in fase acquosa interna;
- ✓ Concentrazione di PVA in fase acquosa esterna;
- ✓ Volume della fase oil.

Pseudo-Sinterizzazione delle microsfere

Una volta ottimizzato il processo di preparazione delle microsfere in termini morfologici si è proceduto alla realizzazione dello scaffold mediante la loro compattazione al fine di ottenere una struttura tridimensionale porosa. Nel caso specifico, sono state utilizzate le microsfere di policaprolattone ottenute per singola emulsione caratterizzate da un diametro confrontabile con le dimensioni di porosità richieste per l'adesione e la proliferazione cellulare. Tali microsfere vengono preventivamente setacciate mediante setacciatore (*ASTM IG/3-EXP SAREL*) al fine di separare le particelle secondo i seguenti range dimensionali:]0,106], [106,150], [150,212], [212,300], [300,500], [0,106], [500,1000[.

Diverse tipologie di matrici sinterizzate sono state realizzate variando opportunamente quattro parametri fondamentali:

- ✓ Range dimensionale delle microsfere
- ✓ Temperatura
- ✓ Tempo
- ✓ Pressione

Per la creazione di tali matrici sinterizzate è stato utilizzato uno stampo in teflon del diametro di 10 mm ed altezza di 4 mm.

Una volta introdotte le microsfere, lo stampo viene collocato all'interno di una stufa (ABICASA) impostando le condizioni di temperatura, di pressione e di tempo desiderati (fig.44).



Figura 44: Scaffold sinterizzati via MIMS: schema della preparazione

4.3 TIPOLOGIE DI CAMPIONI

In questo lavoro di tesi sono analizzate diverse tipologie di campioni ottenute variando i principali parametri che intervengono nella caratterizzazione della morfologia dello scaffold: peso molecolare del polimero, rapporti ponderali tra le fasi, dimensione dei cristalli di sale, aggiunta di segnali bioattivi e/o di rinforzo strutturale (idrossiapatite, Hyaff11, fosfati di calcio, fibre polimeriche di PLA) al fine di ottimizzarne la morfologia (porosità e di interconnessione dei pori) e le proprietà meccaniche. Si riportano le tabelle riassuntive di scaffold realizzati mediante la tecnica del phase inversion/salt leaching:

	Peso	PCL/I	OMAc	PCL/	NaC1	NaCL	Compressione	Т
Тіро	Molecolare	(wt/wt)	(v/v)	(wt/wt)	(v/v)	size (µm)	(1kg-1h)	(°C)
\mathbf{A}_{1}	65	20/80	17/83	33/66	50/50	212/300	No	25
\mathbf{A}_2	65	20/80	17/83	25/75	33/66	212/300	No	25
\mathbf{A}_{3}	65	20/80	17/83	10/90	18/82	212/300	No	25
\mathbf{A}_4	65	20/80	17/83	5/95	09/91	212/300	Si	25
\mathbf{T}_1	65	20/80	17/83	10/90	18/82	212/300	No	55
T_2	65	20/80	17/83	5/95	09/91	212/300	Si	55
T ₃	65	20/80	17/83	25/75	33/66	212/300	No	55
T_4	65	20/80	17/83	33/66	50/50	212/300	No	55
L_1	65	20/80	17/83	10/90	18/82	150-212	No	55
L_3	65	20/80	17/83	25/75	33/66	150-212	No	55
\mathbf{L}_4	65	20/80	17/83	33/66	50/50	150-212	No	55
\mathbf{Q}_1	10	20/80	17/83	10/90	18/82	150-212	No	55
Q_3	10	20/80	17/83	25/75	33/66	150-212	No	55
\mathbf{Q}_4	10	20/80	17/83	33/66	50/50	150-212	No	55

Tabella 15: Scaffold macroporosi in PCL realizzati mediante phase inversion/salt leaching

Tipo	PCL/DMAc		PCL/NaCl		PCL/HA		Compressione	Т
Tipo	(wt/wt)	(v/v)	(wt/wt)	(v/v)	(wt/wt)	(v/v)	(1kg-1h)	(°C)
B40	20/80	17/83	100/0	100/0	71/29	87/13	No	55
B70	20/80	17/83	100/0	100/0	59/41	80/20	No	55
B100	20/80	17/83	100/0	100/0	50/50	74/26	No	55
HA40	20/80	17/83	5/95	09/91	71/29	87/13	Si	55
HA70	20/80	17/83	5/95	09/91	59/41	80/20	Si	55
HA100	20/80	17/83	5/95	09/91	50/50	74/26	Si	55

 Tabella 16: Scaffold macroporosi in PCL con HA realizzati mediante phase inversion e phase inversion/salt leaching

Tipo	PCL/(THF/DMSO)		PCL/NaCl		PCL/Hyaff11		THF/1	THF/DMSO	
Tipo	(wt/wt)	(v/v)	(wt/wt)	(v/v)	(wt/wt)	(v/v)	(wt/wt)	(v/v)	
PHS1	20/80	17/83	5/95	09/91	100/0	100/0	80/20	83/17	
PHS1	20/80	17/83	5/95	09/91	90/10	91/09	80/20	83/17	
PHS2	20/80	17/83	5/95	09/91	80/20	82/18	80/20	83/17	
PHS3	20/80	17/83	5/95	09/91	70/30	77/23	80/20	83/17	
PHS4	20/80	17/83	5/95	09/91	80/20	91/09	50/50	55/45	

Tabella 17: Scaffold macroporosi in PCL con Hyaff11[®] realizzati per phase inversion/salt leaching

Successivamente si riportano le tabelle relative alle diverse tipologie di scaffold macroporosi in PCL rinforzati con fibre di PLLA realizzati mediante tecnica di solvent casting/salt leaching al variare dei rapporti ponderali tra matrice e fibra, dell'ammontare di NaCl e della presenza di ulteriori sistemi di rinforzo di tipo particellare (α -TCP):

Tipo	PCL/DMAc		PCL/NaCl		PCL/PLLA		Т
Tipo	(wt/wt)	(v/v)	(wt/wt)	(v/v)	(wt/wt)	(v/v)	(°C)
TCP _{0A}	10/90	17/83	10/90	18/82	82/18	84/16	25
TCP _{0B}	15/85	17/83	10/90	18/82	82/18	84/16	25
TCP _{0C}	20/80	17/83	10/90	18/82	82/18	84/16	25

 Tabella 18: Scaffold macroporosi di PCL rinforzati con fibre di PLLA realizzati mediante phase inversion/ salt leaching;

Tino	PCL/DMAc		PCL/	PCL/NaCl		PCL/PLLA		x-TCP	Т
тро	wt/wt	v/v	wt/wt	v/v	wt/wt	v/v	wt/wt	v/v	(°C)
TCP _{0C}	20/80	17/83	10/90	18/82	82/18	84/16	100/0	100/0	55
TCP ₄₀	20/80	17/83	10/90	18/82	82/18	84/16	71/29	87/13	55
TCP ₇₀	20/80	17/83	10/90	18/82	82/18	84/16	59/41	80/20	55
TCP ₁₀₀	20/80	17/83	10/90	18/82	82/18	84/16	50/50	74/26	55

Tabella 19: Scaffold macroporosi di PCL rinforzati con fibre di PLLA ed α-TCP realizzati mediante salt leaching;

Parallelamente si riporta una tabella riassuntiva delle diverse tipologie di scaffold realizzati mediante la tecnica di separazione di fase termicamente indotta (TIPS) con estrazione del solvente sottovuoto.

Tino	Solvente	PCL/S	olvente	Freeze	Vacuum
Tipo	Solvenie	wt/wt	v/v	(°C)	(10 ⁻¹ torr) (h)
PS1C	diossano	5/95	5/95	-18	72
PS1H	diossano	5/95	5/95	4	72
PS2C	diossano	10/90	9/91	-18	72
PS2H	diossano	10/90	9/91	4	72
PS3C	diossano	15/85	14/84	-18	72
PS3H	diossano	15/85	14/84	4	72

Tabella 20: Scaffold macroporosi in PCL realizzati mediante separazione di fase con estrazione sottovuoto del solvente;

		PCL/S	olvente	Freeze	Vacuum
Tipo	Solvente	wt/wt	v/v	extraction (°C)	(10 ⁻¹ torr) (h)
PS4C	DMSO	5/95	5/95	-18	72
PS4H	DMSO	5/95	5/95	4	72
PS5C	DMSO	10/90	10/90	-18	72
PS5H	DMSO	10/90	10/90	4	72
PS6C	DMSO	15/85	15/85	-18	72
PS6H	DMSO	15/85	15/85	4	72

Tabella 21: Scaffold macroporosi in PCL realizzati mediante separazione di fase con estrazione sottovuoto del solvente

Infine, si riporta una tabella riassuntiva delle tipologie di scaffold realizzati mediante la tecnica di separazione indotta dall'azione di un non solvente.

Tipo	Solvente	PCL/Solvente		Freeze	Etanolo
		wt/wt	v/v	extraction (°C)	(h)
FD1C	diossano	5/95	5/95	-18	48
FD1H	diossano	5/95	5/95	4	48
FD2C	diossano	10/90	9/91	-18	48
FD2H	diossano	10/90	9/91	4	48
FD3C	diossano	15/85	14/84	-18	48
FD3H	diossano	15/85	14/84	4	48

 Tabella 22: Scaffold macroporosi in PCL realizzati per separazione di fase indotta dalla temperatura con estrazione del solvente mediante freeze dipping

Per quanto concerne invece le microsfere in PCL sono state realizzate le seguenti tipologie di campioni al variare della concentrazione della fase polimerica dispersa e della velocità di agitazione meccanica mediante singola e doppia emulsione:

Tipo	PCL/MC (wt/wt)	PVA/H ₂ O (wt/wt)	Vel. agitazione (rpm)	Tempo di miscelazione (h)
S ₁	8/92	0.05	200	3
S ₂	8/92	0.05	400	3
S ₃	8/92	0.05	800	3
S ₄	16/84	0.05	200	3
S ₅	16/84	0.05	400	3
S ₆	16/84	0.05	800	3
S ₇	24/76	0.05	200	3
S ₈	24/76	0.05	400	3
S ₉	24/76	0.05	800	3

Tabella 23: Microsfere in PCL ottenute mediante singola emulsione

Tipo	PCL in MC $(\alpha/m1)$	PVA in	PVA in	V_{OIL}/V_{wint}	Tempo di	Velocità di
	(g/ III 76)	w _{interna} (g/ml %)	w _{esterna} (g/ml %)	(V/V%)	(s)	(rpm)
D ₁	0.3	0.5	0.5	90/10	120	600
\mathbf{D}_2	0.3	0.5	0.5	90/10	30	600
D_3	1.1	0.5	0.5	90/10	30	600
\mathbf{D}_4	0.3	0.5	0.5	90/10	30	200
\mathbf{D}_5	1.7	0.5	0.5	90/10	30	200
\mathbf{D}_{6}	1.7	0.5	1	90/10	30	200
\mathbf{D}_7	0.3	1	0.5	90/10	30	200
\mathbf{D}_8	1.7	0.5	0.5	95/5	30	200
\mathbf{D}_9	0.3	0.5	0.5	90/10	20	200
\mathbf{D}_{10}	0.3	0.5	0.05	90/10	20	200

Tabella 24: Microsfere in PCL ottenute mediante doppia emulsione

Infine si riportano le diverse tipologie di campioni ottenuti dalla pseudosinterizzazione di microsfere scelte in un opportuno intervallo dimensionale:

Tipo	T (°C)	t (min)	P (kPa)	Range (µm)
MIMS ₁	51	1440	/	300÷500
MIMS ₂	53	120	/	300÷500
MIMS ₃	53	1440	/	300÷500
MIMS ₄	55	45	/	300÷500
MIMS ₅	55	60	/	300÷500
MIMS ₆	55	960	/	300÷500
MIMS ₇	58	20	/	300÷500
MIMS ₈	58	25	/	300÷500
MIMS ₉	58	30	/	300÷500
MIMS ₁₀	58	60	/	300÷500
MIMS ₁₁	58	90	/	300÷500
MIMS ₁₂	63	10	/	300÷500
MIMS ₁₃	63	20	/	300÷500
MIMS ₁₄	63	30	/	300÷500
MIMS ₁₅	51	900	/	>500
MIMS ₁₆	55	40	/	>500
MIMS ₁₇	55	45	/	>500
MIMS ₁₈	55	60	/	>500
MIMS ₁₉	58	45	/	>500
MIMS ₂₀	63	40	/	>500
$MIMS_{21}$	63	50	/	>500
MIMS ₂₂	58	80	12.5	>500
MIMS ₂₃	53	60	37.5	>500
MIMS ₂₄	53	150	37.5	>500
MIMS ₂₅	55	75	37.5	>500
MIMS ₂₆	58	4	37.5	>500
MIMS ₂₇	58	60	37.5	>500

Tabella 25: Scaffold sinterizzati – T	Fipologie di campioni
---------------------------------------	-----------------------

4.4 ANALISI DEI CAMPIONI

4.4.1 ANALISI MORFOLOGICA

L'analisi della microstruttura è stata eseguita mediante il microscopio a scansione elettronica (SEM) grazie al quale risulta possibile valutare la morfologia delle varie tipologie di campioni.

Preventivamente ciascun campione, totalmente disidratato sotto cappa chimica per quarantotto ore, è stato sottoposto ad un processo di metallizzazione indispensabile affinché possa essere acquisita un'immagine ottimale.

✤ Microscopio a scansione elettronica (SEM):

Il microscopio a scansione elettronica è un dispositivo che, sfruttando l'interazione degli elettroni con la materia, è in grado di acquisire l'immagine della superficie di un campione ingrandendola fino a milioni di volte.

L'architettura dello strumento prevede la presenza di due parti essenziali:

- Un blocco cilindrico in cui sono contenuti vari elementi quali un filamento di tungsteno, sistemi di bobine e lenti condensatrici.
- Una base sulla quale è collocato il portacampioni in cui è presente il provino nonché una serie di sensori in grado di rilevare gli elettroni che sono deviati secondo diverse modalità.

Infine lo strumento è corredato di un'unità di elaborazione che permette l'assegnazione delle informazioni necessarie all'esecuzione della prova e gli spostamenti lungo la superficie del campione. In particolare esso è corredato di un monitor CRT sul quale viene visualizzata in tempo reale l'immagine scannerizzata dallo strumento.

Il principio di funzionamento di un SEM è caratterizzato da molteplici fasi.

All'interno del blocco cilindrico è presente un filamento di tungsteno il quale, sottoposto a riscaldamento, è in grado di emettere un fascio di elettroni; esso viene opportunamente accelerato a seguito di una differenza di potenziale applicata ai capi del filamento, che funge da catodo, orientando gli elettroni verso una piastra forata, che funge da anodo.

E' evidente che è possibile regolare la velocità di emissione degli elettroni al variare della tensione applicata (il suo valore può oscillare tra 1KeV e 50KeV). Il fascio di elettroni, prima di giungere al campione, è preventivamente "messo a fuoco" attraverso un sistema di lenti condensatrici e indirizzato per effetto di

campi magnetici presenti all'interno di bobine (*scan coils*) percorse da correnti alimentate da un generatore (*scan generator*).

Il fascio di elettroni giunge alla superficie del campione dove si verificano dei fenomeni di interazione tra elettroni e materia che è possibile distinguere nel modo seguente:

- 1) **Back Scattering** : gli elettroni del fascio incidente sono deviati a seguito dell'interazione elettrostatica tra la propria carica negativa e la carica positiva dei nuclei atomici degli strati superficiali del provino. Si verifica una sorta di urto elastico che produce una deflessione dell'elettrone la cui entità dipende dalla composizione puntuale del campione.
- 2) Emissioni secondarie: gli elettroni del fascio incidente in alcuni casi possono interagire con gli elettroni appartenenti agli orbitali più esterni dei singoli atomi della superficie del provino. In tal caso le interazioni elettrostatiche tra cariche dello stesso segno producono un urto di natura anelastica producendo elettroni di tipo *secondario*.
- 3) Emissioni di raggi X: Quando un elettrone, a seguito del precedente meccanismo di interazione, viene rimosso dal proprio livello energetico, un elettrone, appartenente ad un livello energetico più esterno dello stesso atomo, prende il suo posto emettendo un fotone appartenente al campo dei raggi X.

Tali emissioni, così diverse, vengono rilevate da opportuni sensori che trasferiscono i segnali, debitamente convertiti, ad un monitor CRT.

L'immagine rilevata è costituita da tanti "**spot**" luminosi la cui intensità è legata all'intensità delle emissioni; in particolare la presenza di zone più chiare è dovuta alle emissioni relative ad elementi di numero atomico più elevato e quindi in grado di emettere più elettroni, mentre le zone più scure sono riferite ad emissioni relative ad elementi con numero atomico più basso. Un parametro fondamentale nella valutazione di una micrografia SEM è l'*ingrandimento* definito come rapporto di scala tra la dimensione dell'elemento di superficie scansionata \boldsymbol{b} e la dimensione \boldsymbol{L} del corrispondente tratto visualizzato sul monitor:

E' evidente che, al crescere dell'ingrandimento, e pertanto al diminuire del tratto b del provino lungo cui avviene la scansione, aumentano le interazioni tra il fascio di elettroni ed il campione in quanto gli elettroni interagiscono su porzioni di superficie sempre più ridotte, il che comporta una difficoltà crescente nella messa a fuoco dell'immagine.



Figura 45: Schema dell'architettura di un microscopio a scansione elettronica SEM

4.4.2 CARATTERIZZAZIONE MECCANICA

E' stata eseguita una caratterizzazione meccanica dei campioni mediante la macchina dinamometria Instron 4204, al fine di determinare la resistenza a trazione ed a compressione, il modulo elastico e la deformazione ultima delle strutture prese in esame nei diversi casi.

In particolare, sono state eseguite prove a trazione in riferimento alla norma **ASTM D638/02a** su scaffold macroporosi in assenza ed in presenza di idrossiapatite (*tipologie T e B*). In particolare sono state realizzati campioni rettangolari di 3,4 mm di spessore, 5 mm di larghezza e tratto utile di 15 mm, utilizzando una cella di carico di 1 kN e impostando una velocità della traversa mobile di 1,5 mm/min.

In aggiunta sono inoltre state compiute prove a compressione secondo la norma **ASTM 695/2a** su campioni di geometria cilindrica con diametro di 12 mm e altezza di 24 mm, con un rapporto altezza/diametro di 2:1; Preventivamente, su tali campioni è stata eseguita una precompressione di 5 N, utilizzando una cella di carico di 1 kN e impostando una velocità della traversa mobile di 1 mm/min.

Sugli scaffold macroporosi rinforzati con fibre sono state realizzate prove a compressione comparative adattando la norma **ASTM 695/2a** per campioni polimerici porosi alla specifica morfologia dei campioni caratterizzati dal foro centrale, conservando un rapporto altezza/diametro di 1:1.

Sugli scaffold sinterizzati, infine, sono state eseguite prove a compressione comparative, in riferimento alla norma **ASTM 695/2°** sulla compressione di strutture polimeriche porose, su campioni di geometria cilindrica con diametro di 10 mm e altezza di 5 mm; nel caso specifico è stata impiegata una cella di carico di 1 kN, impostando una velocità della traversa mobile di 1 mm/min.

* Macchina dinamometrica Instron 4204: Principio di funzionamento

Una macchina dinamometria è costituita da quattro parti essenziali:

- a. Un attrezzatura di applicazione del carico;
- b. Un sistema di controllo e di visualizzazione dei parametri meccanici visualizzabili durante la prova;
- c. Una consolle per l'acquisizione dei dati;
- d. Un computer per l'elaborazione dei dati ricevuti durante la prova.

La prima parte è costituita principalmente da un montante su cui viene collocata la traversa mobile in grado di scorrere con moto verticale ascendente e discendente. Su di essa viene montata la cella di carico il cui peso varia a seconda della prova che deve essere compiuta (assegnata dalle norme ASTM così come la velocità della traversa mobile).

La seconda parte della macchina è il sistema di controllo che provvede al monitoraggio dei valori di sforzo e di deformazione che subisce il campione durante la prova.

Per il suo corretto funzionamento è necessario compiere, prima della singola prova, delle operazioni che permettono la lettura della cella di carico, l'azzeramento del carico e della deformazione nonché l'assegnamento di un piccolo precarico indispensabile per il corretto avvio della prova.

Infine, la macchina è corredata di sistema automatico costituito da un computer, dotato di software idoneo alla codifica dei dati trasmessi dalla macchina.

In particolare l'elaboratore registra in ingresso i parametri della prova da compiere: caratteristiche geometriche del campione, cella di carico, velocità della traversa.

Al termine della prova esso fornirà in uscita i parametri richiesti, opportunamente codificati, in modo da poter essere successivamente elaborati mediante software (foglio elettronico).



Figura 46: Schema dell' architettura della macchina dinamometrica Instron 4204

4.4.3 ANALISI TERMICA

Le analisi calorimetriche sono state effettuate al fine di determinare gli effetti indotti sulle proprietà termiche del polimero dalla presenza di fattori bioattivi (HA), dalle tecniche di preparazione, nonchè dalle caratteristiche microstrutturali del sistema (porosità microstrutturale e macrostrutturale).

In aggiunta, nel caso di scaffold sinterizzati, tale indagine è stata condotta allo scopo di valutare l'effetto sulle proprietà termiche del polimero impiegato in relazione alla tecnica di preparazione utilizzata.

In tutti i casi presi in esame, l'analisi termica dei campioni è stata effettuata mediante lo strumento **mod. Q1000** della **TA Instruments**. Per l'operazione di pesatura sia delle capsule che dei campioni si è utilizzata una bilancia ad alta precisione, mentre l'operazione di chiusura delle capsuline è stata eseguita mediante pressa a chiusura ermetica. Tutti i campioni sono stati sottoposti ad una scansione di riscaldamento da -100°C a 100°C, con una velocità di 5°C/min.

Calorimetro a scansione differenziale (DSC): principio di funzionamento

L'analisi termica a scansione differenziale, generalmente nota come DSC, è un utile strumento nell'analisi delle proprietà dei polimeri. La determinazione delle temperature di fusione e di transizione vetrosa, del calore specifico e lo studio della cinetica di cristallizzazione di materiali a matrice polimerica, sono le più comuni applicazioni di questa tecnica.

Essa si basa sulla rilevazione e sulla registrazione in forma di termogramma dei fenomeni esotermici ed endotermici che avvengono nel provino posto nella cella del calorimetro durante i processi chimico-fisici indotti da variazioni della temperatura.

Ciò avviene misurando la differenza di calore assorbito o ceduto dal campione rispetto a quella di un materiale inerte di riferimento sottoposto allo stesso trattamento termico.

Il calorimetro a scansione differenziale consente di ottenere diagrammi in cui è riportato il calore scambiato (**heat flow**) in funzione della temperatura o del tempo (fig.47). Il segnale in ordinata, che rappresenta la velocità di assorbimento di calore, è proporzionale al calore specifico del campione (quantità di energia termica necessaria per ottenere un determinato aumento di temperatura).

Ogni transizione, accompagnata da un cambiamento nel calore specifico, produce una discontinuità nel segnale di alimentazione ed i cambiamenti esotermici o endotermici di entalpia determinano dei picchi, la cui area è proporzionale al cambiamento totale di entalpia e alla quantità di sostanza presente.



Figura 47: Curva caratteristica di un'analisi calorimetria DSC

Nella maggior parte degli strumenti DSC l'apparecchiatura è costituita da un'unica cella, da una fornace programmabile, da un registratore e da un sistema di raffreddamento e controllo, solitamente in azoto liquido.

I campioni, contenuti in opportune capsule, sono collocati su delle apposite piattaforme (dischi di cromo) poste simmetricamente all'interno della base della cella (disco di costantana) e munite di termocoppie per la misura della temperatura. La differenza di temperatura viene ricavata misurando la differenza di potenziale tra il filo di cromo e quello di alluminio connessi a ciascun disco di cromo.

Nel caso specifico, l'analisi sui campioni è stata effetuata mediante il calorimetro a scansione differenziale della TA INSTRUMENT mod.Q1000, rappresentato in fig.48, accoppiato con un sistema di raffreddamento ad azoto liquido.

Questo è un DSC di nuova generazione caratterizzato da una tecnologia avanzata rispetto ai DSC tradizionali principalmente per quanto riguarda le celle. Queste sono munite di una terza termocoppia in cromo e costantana posta in mezzo tra le piattaforme del riferimento e del campione, che a differenza dei DSC tradizionali, sono rialzate rispetto al disco di costantana. Tutto ciò consente una maggiore precisione e sensibilità dello strumento.

b)

a)



Figura 48: a) Q 1000; b) piattaforme rialzate del campione

4.4.4 ANALISI POROSIMETRICA

<u>a) Analisi qualitativa: metodo gravimetrico e liquid displacement</u>

Nell'ambito delle possibili stime di porosità due diversi metodi sono stati utilizzati: il metodo gravimetrico ed il metodo liquid displacement.

Il primo consente una stima della porosità dello scaffold mediante la valutazione del peso e delle dimensioni del campione; in particolare si definisce una densità dello scaffold come:

$$d = \frac{m}{V'}$$

dove m indica la massa del campione mentre V' rappresenta il volume del campione poroso calcolato approssimativamente valutando la sua geometria. Si definisce quindi un grado di porosità P come:

$$P = 1 - \frac{d}{d_p}$$

dove dp indica la densità del polimero che ne costituisce lo scheletro. Nel caso in cui il campione risulta caratterizzato da un sistema composito costituito da due o più fasi (es. idrossiapatite, fosfati di calcio) la densità del materiale va opportunamente calcolata tenendo in considerazione le densità delle singole fasi corrette attraverso le frazioni volumetriche nel modo seguente:

$$\rho = X_1 \rho_1 + X_2 \rho_2$$

dove X_1 e X_2 indicano rispettivamente le frazioni volumetriche delle singole fasi costituenti il sistema. Evidentemente il metodo esposto mostra per sua intrinseca natura molteplici approssimazioni determinate in primo luogo dalla stima approssimativa del volume dello scaffold. In quest'ottica una soluzione alternativa al metodo gravimetrico per la valutazione della densità e della porosità di uno scaffold risulta essere il metodo liquid displacement [139][140].

✤ Questo metodo si fonda sull'utilizzo di un fluido (l'etanolo) il quale è in grado di indurre una separazione termodinamica tra il solvente utilizzato ed il polimero per il quale risulta essere non solvente, al fine di sostituire il solvente all'interno della struttura in formazione senza produrre alcun fenomeno di rigonfiamento e/o ritiro volumetrico. La procedura adottata è la seguente:

Un campione del peso W viene immerso in un cilindro graduato contenente un volume noto V_1 di etanolo. Il campione viene lasciato in etanolo per circa 5 minuti durante i quali rimescolamenti successivi del sistema vengono effettuati al fine di forzare il fluido all'interno della porosità dello scaffold.

Il volume raggiunto dall'etanolo all'interno del cilindro graduato viene indicato con V₂. La differenza (V₂ - V₁) indica il volume dello scaffold. Successivamente

lo scaffold viene rimosso dal cilindro e il volume di etanolo restante nel cilindro viene indicato con V₃. La differenza $(V_1 - V_3)$ indica il volume dei soli pori all'interno dello scaffold. Ne consegue quindi che il volume del solo scaffold privo dei pori sarà ottenuto dalla seguente espressione:

$$V = (V_2 - V_1) + (V_1 - V_3) = V_2 - V_3$$

Quindi la densità d della schiuma sarà espresso come:

$$d = \frac{W}{V_2 - V_1}$$

mentre la porosità P dello scaffold può essere valutata tramite la seguente:

$$P = \frac{V_1 - V_3}{V_2 - V_1}$$

Si osserva che la condizione che rende significativa la misura di porosità mediante liquid displacement è che il tempo caratteristico di diffusione del liquido nel polimero sia maggiore del tempo di immersione. In questo caso, il tempo di diffusione è stato valutato approssimativamente mediante la seguente equazione:

$$l^2 = 2D \cdot t$$

Dove l indica la distanza media tra due pori adiacenti, D la diffusività di etanolo nella matrice polimerica e t il tempo caratteristico della diffusione.

Assumendo la diffusività D pari a 10^{-5} cm²/s ed l pari a 10-20 µm il tempo caratteristico della diffusione di etanolo nella matrice polimerica risulta di circa 10^{11} secondi molto maggiore del tempo di immersione (10^2 s).

b) Analisi quantitativa: porosimetria ad intrusione di mercurio

Tra le varie possibili tecniche di misura di porosità, quella ad intrusione di mercurio è la tecnica largamente più usata.

Tale tecnica, sviluppata nel 1945 da Ritter e Drake, permette di misurare il volume e le dimensioni dei macropori e dei mesopori presenti all'interno di sostanze solide porose.

Essa si fonda sulla peculiarità del mercurio di essere non bagnabile a contatto con una grandissima varietà di solidi. In virtù di questa proprietà, il mercurio penetra attraverso i pori aperti di un campione solido a seguito dell'azione di una pressione esercitata dall'esterno. In particolare, in questa sede è stato utilizzato il porosimetro a mercurio Pascal *ThermoFinnigan mod.140 e mod.240* al fine di determinare la distribuzione dimensionale dei pori, il diametro medio e la porosità totale degli scaffold analizzati.

Nel caso specifico, l'analisi della microporosità delle microsfere ottenute mediante doppia emulsione è stata realizzata con il Porosimetro Pascal 240, su campioni del peso di circa 50 mg, effettuando due successive pressurizzazioni mediante lo strumento Pascal 240.

La scelta di due pressurizzazioni successive è legittimata dal fatto che, dopo la prima, a bassa pressione, il mercurio penetra all'interno degli interstizi presenti tra le particelle (*porosità interparticellare*) slegate tra loro, mentre dopo la seconda, a pressione più elevata, una volta occlusa la porosità interparticellare, il mercurio è in grado di penetrare solo all'interno delle singole particelle (*porosità intraparticellare*).

L'analisi della microporosità, mediante lo strumento Pascal 240, è stata effettuata su set di microparticelle del peso di circa 200 mg, impostando una pressione di 200 MPa.

L'analisi della macroporosità mediante lo strumento Pascal 140 munito del kit Ultramacropori combinata all'analisi mediante Pascal 240, è stata effettuata su scaffold tridimensionali macroporosi, in presenza ed in assenza di idrossiapatite, nonché su scaffold sinterizzati (con un peso compreso tra 500 e 200 mg a seconda della tipologia dei campioni) impostando un volume di riempimento del dilatometro pari a 1800 mm³ ed una pressione massima di 400 kPa.



Principi di funzionamento del Porosimetro Pascal 140/240

Un liquido posto a contatto con un solido poroso risulta essere esso non bagnabile sulla sua superficie se le interfacce liquido/solido e solido/vapore formano un angolo maggiore di 90° (**angolo di contatto**).

In tali particolari circostanze, il liquido non riesce a penetrare spontaneamente all'interno dei pori presenti lungo il substrato solido a seguito dell'azione della tensione superficiale; tuttavia, questa resistenza alla penetrazione può essere vinta applicando una pressione esterna la quale risulta essere funzione della dimensione del poro attraverso la seguente relazione, comunemente nota come **equazione di Washburn**, nell'ipotesi di pori di geometria cilindrica:

$$pr = -2\gamma\cos\vartheta$$

dove **r** è il raggio del poro, γ è la tensione superficiale del mercurio, θ l'angolo di contatto e **p** la pressione assoluta esercitata.

Sebbene l'assunzione fatta sulla geometria dei pori sia piuttosto lontana dalla realtà, tale equazione generalmente permette di calcolare, piuttosto fedelmente, la distribuzione dimensionale e la dimensione media dei pori.

Tale equazione deriva principalmente dalle seguenti considerazioni:

In un capillare di sezione circolare, la tensione superficiale del liquido è esercitata lungo la circonferenza delimitante l'area di contatto del poro con l'esterno ed è espressa da una forza, perpendicolare al piano della superficie di contatto, pari a $2\pi r\gamma$. Ne deriva che la forza che spinge il liquido verso l'esterno del capillare è:

$-2\pi r\gamma\cos\vartheta$

In opposizione a tale forza agisce la pressione esterna esercitata sulla superficie del poro all'interno della circonferenza di contatto e sarà data dalla seguente espressione:

 $\pi r^2 p$

Dall'equilibrio di queste due forze si ricava l'equazione di Washburn dalla quale è possibile ricavare l'inversa proporzionalità tra il raggio del poro e la pressione esterna:

$$r = \frac{-2\gamma\cos\vartheta}{p}$$

In particolare, considerando una tensione superficiale di 480 mN/m ed un angolo di contatto di 141,3° e assumendo la geometria cilindrica dei pori, si ottiene la seguente relazione:

$$r = \frac{7500}{p}$$

dove r è il raggio del poro espresso in nanometri (nm) mentre p è la pressione assoluta applicata espressa in Kg /cm².

Nel caso di pori di forma irregolare, il rapporto tra la sezione del poro (considerata nel calcolo della pressione esercitata) e la circonferenza del poro (considerata nel calcolo della tensione superficiale) non è proporzionale al raggio ma dipende dalla forma del poro.

Anche l'angolo di contatto θ dipende dalla natura del campione considerato. In particolare, tale angolo θ , misurato rispetto ad un ampia gamma di substrati solidi, varia per valori compresi tra 125° e 152°, e pertanto lo strumento compie la sua misura su un valore di θ pari a 141,3° che ne è il valore medio.

Inoltre anche la tensione superficiale risulta essere variabile con la temperatura; in particolare, alla temperatura di 25°C essa misura 482,2 dynes/cm, mentre a 50°C

risulta di 472 dynes/cm. Nel caso specifico, lo strumento ipotizza durante la misura una tensione superficiale di 480 dynes/cm.

In aggiunta alle approssimazioni fatte, è necessario assumere che la natura delle sostanze porose e la forma del poro rimangano inalterate a seguito della pressione crescente esercitata durante l'intera analisi.

Il porosimetro Pascal 140, mostrato in fig.49 è uno strumento automatico per la preparazione dei campioni per l'analisi porosimetrica e per la misura della porosità nelle regioni nelle regioni comprese negli intervalli di $2\div100 \ \mu m$ (analisi macropori) e di $100\div300 \ \mu m$ (analisi ultramacropori).

Lo strumento è particolarmente indicato l'analisi dimensionale di polveri.

Il volume poroso viene misurato per mezzo di un sistema capacitivo. Lo strumento deve essere accoppiato ad un PC esterno per la gestione dei dati. Può essere fornito di un kit Ulramacropori P/N190 06046 per consentire la caratterizzazione di campioni solidi e polveri per raggio dei pori compreso tra 1900 e 300000 nanometri.

Il porosimetro Pascal 140 consiste, essenzialmente, di quattro parti:

1) dilatometro: contiene il campione da esaminare;

2) sistema di pressurizzazione: comprende la pompa peristaltica dell'aria;

3) **sistema di depressurizzazione**: comprende la pompa peristaltica dell'aria e la pompa da vuoto;

4) **sistema di misura di capacità e della pressione**: misura l'intrusione del mercurio nel campione e la pressione di intrusione.

Il porosimetro Pascal 240, mostrato in fig.49, è uno strumento automatico per la determinazione della dimensione e del volume dei pori, nel campo da 3.7 a 7500 nm di raggio, per mezzo dell'intrusione di mercurio ad alta pressione.

Nel porosimetro 240, così come nel Pascal 140, il volume di mercurio che penetra nei pori del campione è misurato tramite un sistema capacitivo mentre la pressione di penetrazione è misurata tramite un apposito trasduttore.



Figura 49: Porosimetro Pascal 140 e 240

Il porosimetro Pascal 240 consiste, essenzialmente, di tre parti:

1) dilatometro: contiene il campione da esaminare

2) sistema di pressurizzazione: comprende la pompa di ingranaggi, il moltiplicatore di pressione e l'autoclave

3) sistema di misura di capacità e della pressione: misura l'intrusione del mercurio nel campione e la pressione di intrusione.

Entrambi gli strumenti forniscono i seguenti risultati:

✓ **Densità di massa** (*bulk density*) (g/ml): la densità di un solido riferita al volume esterno del solido stesso. Il volume esterno è misurabile attraverso tale strumento grazie alla proprietà del mercurio di non bagnare le pareti di un campione solido e quindi necessita di una pressione per penetrare eventuali pori del campione stesso. E'possibile definire la bulk density come:

 $BD = HgD*Ws (W_1-W_2+Ws)$

dove:

W₁=peso dilatometro + mercurio all'altezza di riferimento (g)

W₂= peso dilatometro + mercurio all'altezza di rif. + peso campione (g)

W_s=peso del campione (g)

HgD=densità del mercurio alla temperatura d'analisi (g/cc)

✓ Densità apparente (g/ml) è la bulk density corretta del volume specifico dei pori espresso in cc/g oppure mm³/g. Tale densità è definita apparente per due motivi principali: in primo luogo se il campione presenta delle microporosità al di sotto del limite minimo di misura, esse non possono essere misurate e quindi non si può tenerne conto nel calcolo della densità. Inoltre, alcuni tipi di campione subiscono l'effetto della compressione durante la pressurizzazione e lo strumento interpreta tale compressione come una presenza di pori.

La densità apparente si può definire nel modo seguente:

Apparent Density = $1/[(1/Bulk Density)-P_V]$

dove P_V è il volume specifico totale dei pori espresso in cc/g.

- ✓ Porosità percentuale (%);
- ✓ Distribuzione del volume dei pori in funzione del raggio (solidi);
- ✓ Distribuzione percentuale delle dimensioni delle particelle (polveri);
- ✓ Volume specifico dei pori (ml/g);
- **Raggio medio dei pori** (Å, μm, nm);
- ✓ **Superficie specifica** (cumulativa e differenziale) (m²/g);
- ✓ Morfologia dei pori.
<u>C) Analisi qualitativa: analisi di immagini 2D</u>

Un altro metodo per la valutazione della porosità di un sistema poroso prevede lo studio bidimensionale e /o tridimensionale delle immagini. Attraverso l'utilizzo di un software dedicato (**ImageJ**), è possibile analizzate le immagini (ottenute al microscopio a scansione elettronica) per ricavare una stima delle principali caratteristiche morfologiche dello scaffold: dimensione dei pori, grado di porosità totale, e percentuale relativa di L- macroporosità ed S-microporosità, del grado di interconnessione dei pori.

A seconda della specifica indagine da compiere, è necessario elaborare l'immagine attraverso l'utilizzo di diverse funzioni del programma.

In particolare per la stima del raggio medio e l'ottenimento di una distribuzione dimensionale dei pori (L - macroporosity), in primo luogo, è stato attenuato il rumore dell'immagine effettuando uno **smoothing**, o filtraggio passa basso, finalizzato ad eliminare le componenti frequenziali elevate non corrispondenti a quelle dell'immagine.

Ciò assicura l'attenuazione di rumori molto diffusi e fastidiosi ai fii dell'elaborazione come il *pepper/salt noise* che consiste nella presenza di pixel isolati caratterizzati da valori di grigio totalmente differenti dai pixel vicini.

L'utilizzo della funzione di **sharpening** (filtraggio passa alto) ha permesso di ridurre lo sfocamento dell'immagine ed aumentare la definizione dei contorni, esaltando le frequenze medio alte dell'immagine. Si osserva che tale operazione deve essere necessariamente successiva all'operazione di smoothing altrimenti potrebbe determinare un'esaltazione del rumore alle alte frequenze.

Inoltre, esaltando le variazioni repentine dei valori di grigio dell'immagine ed eliminando le variazioni lente (corrispondenti a livelli di grigio è uniforme), permette di evidenziare efficacemente i contorni dei pori.

Infine, l'immagine viene elaborata attraverso una particolare tecnica di manipolazione della scala dei grigi: la tecnica di finestramento (**windowing technique**) la quale mostrando solo un range dei valori di grigio dell'immagine ma conservando lo stesso numero di livelli di quantizzazione ne migliora il contrasto.

Al fine di regolare in maniera ottimale i contrasti dell'immagine, caso per caso, può essere scelto il range opportuno (threshold) all'interno dell'intervallo 0 - 255 dei possibili valori della scala dei grigi.

Nel seguito si riporta uno schema a blocchi riassuntivo delle funzioni usate per l'analisi bidimensionale delle immagini.

Per semplicità si è riportato anche uno schema a blocchi riassuntivo di tutta l'elaborazione effettuate sulle immagini:



A questo punto, l'indagine si completa con l'analisi delle particelle (**Particles Analysis**), attraverso la quale il software riesce ad individuare ed enumerare i pori presenti.

In questa fase, in alcuni è stato utile l'impiego di uno specifico tool (**Find edges**), il quale è in grado di di individuare i contorni più probabili dei pori.

La stessa procedura è stata utilizzata sia per lo studio della L-macroporosità che della S-macroporosità laddove risulta essere presente una tale distinsione.

Nei casi di studio della S-macroporosità, i margini dei pori sono risultati sufficientemente evidenti per cui non è stato necessario l'impiego del tool Find edges.

Infine, per la stima della porosità totale, l'analisi è stata effettuata convertendo l'immagine in binario (threshold), e valutando l'istogramma corrispondente: dal numero dei pixel neri (corrispondenti ai pori) e dal numero complessivo dei pixel formanti l'immagine, si è ricavata la percentuale della porosità totale:

$$%P = \frac{pixel_neri}{pixel_totali} \times 100$$

Analogamente, sono state calcolate le frazione relative di L-macroporosity e di S-macroporosity rispetto alla porosità totale, definendo opportunamente i range dimensionali rispetto ai quali l'analisi delle particelle e quindi analizzare l'istogramma.

4.4.5 ANALISI SPETTROSCOPICA E.D.S.

La caratterizzazione chimica qualitativa dei campioni è stata effettata utilizzando il dispositivo per la microanalisi in dispersione di energia (EDS) connesso al microscopio a scansione elettronica (SEM).

Tale dispositivo è composto essenzialmente da una camera a vuoto e da un cannone elettronico che produce un fascio di elettroni il quale viene focalizzato mediante un condensatore sul campione. In risposta a questo bombardamento si verificano una serie di fenomeni tra cui l'emissione di elettroni secondari, con energia di pochi eV, e di elettroni retrodiffusi, di alta energia, generati dall'interazione del fascio incidente con gli atomi del campione.

Poiché l'intensità dell'emissione di elettroni retrodiffusi dipende, oltre che dall'angolo con cui il fascio colpisce la superficie del campione, anche dal numero atomico medio del campione, variazioni locali del numero atomico, dovute alla presenza di atomi pesanti, producono variazioni nel contrasto dell'immagine.

Oltre a questi fenomeni l'interazione del fascio di elettroni incidente con il campione ha come ulteriore effetto quello di produrre raggi X primari, con lunghezze d'onda ed energie caratteristiche degli elementi presenti nel campione.

Lo strumento SEM/EDAX raccoglie lo spettro della radiazione X emessa dal cristallo e lo utilizza per identificare gli atomi presenti.

Dalla lettura dello spettro, poiché l'ampiezza di ogni picco è direttamente proporzionale alla quantità di fotoni emessa da un particolare elemento, è possibile fare una valutazione delle quantità relative degli elementi presenti nel campione.

Per il riconoscimento delle diverse specie atomiche devono essere forniti degli appositi valori standard relativi a campioni contenenti quel dato elemento chimico.Purtuttavia le analisi chimiche SEM/EDS non sono estremamente accurate dal punto di vista quantitativo.

4.4.6 COLTURA CELLULARE

Lo studio proposto è mirato alla ottimizzazione dei parametri del processo di semina di osteoblasti (portata di efflusso, numero di cicli) in condizioni dinamiche al fine di definire un protocollo impiegabile per altre tipologie di costrutti cellulari della stessa natura. A seguito dell'ottimizzazione del processo di semina saranno compiuti ulteriori valutazioni mirate a quantificare l'efficienza dei meccanismi di interazione ed adesione cellula/substrato (es. vitalità cellulare) all'interno della struttura tridimensionale e definire, quindi, delle relazioni tra i meccanismi di formazione e crescita dei tessuti, la formazione di matrice extracellulare e la distribuzione spaziale all'interno del costrutto al variare della velocità di perfusione del mezzo di coltura nel caso di semina statica e di semina dinamica.

a) Bio-reattore di semina

La tecnica di semina dinamica si fonda sull'utilizzo di un dispositivo, il bioreattore di semina, capace di depositare all'interno dello scaffold sostanza cellulare, mediante l'efflusso ciclico di un mezzo di coltura.

All'interno del dispositivo, infatti, grazie all'utilizzo di sistemi di pompaggio, è possibile istaurare un regime convettivo in grado di favorire la perfusione del mezzo di coltura ricco di cellule attraverso le cavità del substrato consentendo un caricamento cellulare distribuito su tutto il volume interessato al flusso.

Il bioreattore di semina, messo a punto per questo lavoro di tesi, è costituito da due parti simmetriche.

La struttura assemblata prevede un alloggiamento centrale in cui è posto lo scaffold. le estremità a contatto con lo scaffold sono costituite da filtri metallici con maglie multistrato dalla dimensione caratteristica di circa $100 \,\mu$ m.

Il dispositivo è collegato ad un sistema di pompaggio costituito da una siringe pump, che permette la perfusione del mezzo di coltura in condizioni di flusso (*inflow*) e riflusso (*withdraw-flow*) (fig. 50-51).



Figura 50: Rappresentazione schematica del bioreattore di semina

Il controllo di un insieme di parametri quali la fluidodinamica del mezzo di coltura che scorre all'interno del sistema, il numero di efflussi e la prevalenza utilizzati nonché la densità cellulare del mezzo risulta critico per un efficace processo di semina.



Figura 51: Sistema di semina dinamica

b) Test di vitalità cellulare: Alamar Blue reduction

L'AB reduction è un nuovo metodo che consente di misurare la vitalità cellulare attraverso un indicatore di vitalità cellulare, l'Alamar Blue.

Esso è un colorante (tetrazolium salt) che è in grado di essere ridotto da composti presenti nella matrice extracellulare a formare un prodotto che fuoriesce dalla membrana cellulare e può essere quantificato mediante un'analisi allo spettrofotometro a fluorescenza.

E' evidente che tanto maggiore sarà la percentuale di prodotto ridotto tanto maggiore sarà il numero di cellule che l'hanno determinato.

In altri termini il metodo AB reduction fornisce una misura indiretta della vitalità e della proliferazione cellulare attraverso la percentuale di riduzione dei prodotti della reazione di riduzione dell'Alamar Blue con composti della matrice extracellulare.

In particolare la percentuale di riduzione può essere calcolata dallo spettrofotometro attraverso una misura di assorbenza dell'Alamar Blue a due diverse lunghezze d'onda (λ_1 =570nm e λ_2 =600nm) secondo la seguente relazione:

$$\text{%} reduced = \frac{(\varepsilon_{ox600}) \cdot A_{570_{PCL}} - (\varepsilon_{ox570}) \cdot A_{600_{PCL}}}{(\varepsilon_{red570}) \cdot A_{600_{CRT}} - (\varepsilon_{red600}) \cdot A_{570_{CRT}}}$$

dove:

 ε_{red570} indica il coefficiente di estinzione molare dell'Alamar Blue ridotto a 570nm ε_{red600} indica il coefficiente di estinzione molare dell'Alamar Blue ridotto a 600nm ε_{ox570} indica il coefficiente di estinzione molare dell'Alamar Blue ossidato a 570nm ε_{ox600} indica il coefficiente di estinzione molare dell'Alamar Blue ossidato a 600nm A_{570PCL} indica l'assorbanza del supporto a 570nm

A600PCL indica l'assorbanza del supporto a 600nm

A_{570CRT} indica l'assorbanza del controllo negativo a 570nm

A_{600CRT} indica l'assorbanza del controllo negativo a 600nm.

In particolare è possibile valutare il numero di cellule presenti in un substrato dopo la semina o la coltura in vitro costruendo preventivamente una curva di taratura per numero di cellule note. Quindi per un numero di cellule assegnato calcolare sperimentalmente la % di riduzione ed entrare nella curva di taratura per valutare il numero di cellule vitali all'interno del costrutto.

c) Effetto della semina dinamica sulla distribuzione cellulare: analisi al microscopio confocale

La distribuzione cellulare all'interno delle strutture tridimensionali analizzate è stata valutata attraverso un'analisi al microscopio confocale (*Zeiss LSM 510*) che fornisce una misura qualitativa della vitalità cellulare a 0h, 24h e 48h dalla semina. La localizzazione delle cellule è stata effettuata attraverso un opportuno probe fluorescente in grado di "contrassegnare" le cellule vitali ed un altro probe in grado di evidenziare le cellule morte.

In particolare, i probe molecolari utilizzati sono la calceina, di colore verde, e l'etidio bromuro, di colore rosso.

Il campione è stato immerso in una soluzione di calcina ed etidio bromuro in rapporto 1:1 diluita in terreno di coltura ed incubato per circa 1 ora a 37°C.

Lo scaffold viene quindi lavato con PBS ed analizzato al microscopio confocale.

Il microscopio confocale permette la visualizzazione e l'analisi dei probe fluorescenti determinando una stima della vitalità delle cellule nello scaffold.

Si osserva che, diversamente da quanto avviene in un microscopio tradizionale, in un microscopio a fluorescenza la sorgente luminosa è laser.

Ne segue che la risoluzione è molto alta e le caratteristiche della luce risultante (estrema coerenza, alta intensità e lunghezza d'onda unica) consentono di evitare i fenomeni di aberrazione e diffrazione tipiche della luce prodotta dalle lampade a incandescenza [143].

Principio di funzionamento del Microscopio confocale

In un microscopio confocale la luce di un laser viene fatta convergere dalle lenti dell'obiettivo in un punto estremamente piccolo del campione osservato. Il punto stesso, attraverso un sistema di specchi oscillanti, viene spostato attraverso tutto il campo visivo dell'obiettivo così da effettuare una scansione completa di tutto il piano focale.

I campioni utilizzati per l'analisi con la CLSM devono essere marcati con un *probe* (dye) fluorescente. Nella scelta del probe da utilizzare è necessario considerare le lunghezza d'onda di eccitazione ed emissione, le linee di laser disponibili, i filtri da utilizzare e la possibilità che, una volta legata al probe, la molecola possa presentare caratteristiche differenti.

Il laser eccita i soli fluorocromi appartenenti al piano focale, corrispondenti al punto di massima concentrazione del raggio; in questo modo le sezioni non appartenenti al tale piano non vengono eccitate e il risultato complessivo è una riduzione degli aloni e del rumore di fondo.

Il principio di funzionamento di un microscopio confocale può essere schematizzato come segue:



Figura 52: Principio di funzionamento di un microscopio confocale

- 1. La luce, emessa dal laser, è deviata dallo specchio dicroico
- 2. Dopo, la luce investe il campione, eccitandolo. I suoi fluorocromi emettono una radiazione luminosa la quale, catturata dalle lenti dell'obiettivo, colpisce lo specchio dicroico. Attraverso questo la luce riflessa è deviata mentre la luce fluorescente passa attraverso il pinhole e un filtro, giungendo al fotomoltiplicatore.
- 3. Il pinhole funge da diaframma e impedisce che la luce proveniente dalle zone fuori fuoco raggiunga il fotomoltiplicatore. In questo modo solo il segnale luminoso relativo al piano focale contribuisce alla formazione dell'immagine finale.
- 4. Il fotomoltiplicatore trasforma l'intensità luminosa rilevata in un segnale elettrico proporzionale all'intensità stessa.
- 5. Il segnale elettrico uscente dal fotomoltiplicatore è poi elaborato via software, ed è registrata l'intensità luminosa in ogni punto. Tali valori di intensità sono utilizzati per ricostruire l'immagine video: ogni punto del campione corrisponde ad un pixel, e l'intensità luminosa di ogni punto è rappresentata da un tono di grigio.

Variando la messa a fuoco è possibile effettuare scansioni a piani focali variabili.

Queste sono dette sezioni ottiche e la loro unione, consente di ricostruire un'immagine complessiva dell'intero volume.



Figura 53: Sezioni ottiche e ricostruzione 3D di un'immagine al confocale [144]

5. ANALISI SPERIMENTALE

5.1 SCAFFOLD MACROPOROSI – SALT LEACHING

5.1.1 ANALISI MORFOLOGICA E MICROSTRUTTURALE

L'analisi della microstruttura è stata compiuta avvalendosi del microscopio a scansione elettronica (SEM), grazie al quale è stato possibile valutare qualitativamente la porosità presente all'interno dei campioni in termini di distribuzione spaziale, dimensione, forma e grado di interconnessione dei pori.

Si riportano le micrografie ottenute per le diverse tipologie di campioni ponendo in evidenza, attraverso la scelta di ingrandimenti opportuni, le variazioni strutturali indotte dalla modifiche dei parametri legati alle tecniche di preparazione dei substrati.

Al fine di ottimizzare la procedura di preparazione, le prime indagini effettuate sono state volte ad evidenziare le modifiche strutturali indotte dalla diversa dimensione dei cristalli di NaCl (150-212 e 212-300µm) nonché frazione volumetrica relativa dell'agente porogeno (fig.54):



Rapporto volumetrico PCL/NaCI

Figura 54: Analisi S.E.M.: valutazione della morfologia (S-macroporosità, L-macroporosità) al variare dei rapporti in volume PCL/NaCl e della dimensione dei cristalli di NaCl.

In corrispondenza delle superfici (non a contatto con lo stampo) è possibile riscontrare la presenza di una duplice porosità per le diverse tipologie di scaffold realizzate: una **S-macroporosità** dell'ordine di pochi micron associata alla formazione di caratteristiche "sacche" che il solvente produce all'interno della struttura di policaprolattone a seguito della inversione di fase solvente dovuta all'azione di estrazione del solvente esercitata dall'etanolo, non solvente per il polimero, ed una **L-macroporosità** dell'ordine di alcune centinaia di micron determinato, invece, all'estrazione dell'agente porogeno dalla matrice polimerica, per dissociazione ionica e successiva precipitazione dei cristalli di NaCl in acqua bidistillata.

E' possibile osservare un aumento della porosità complessiva al crescere della frazione volumetrica di NaCl nonchè l'esistenza di una correlazione tra la dimensione dei pori e la dimensione dei cristalli impiegati: cristalli di cloruro di sodio di dimensioni maggiori (212-300µm) producono pori di dimensioni maggiori a fronte di una minore disomogeneità della distribuzione spaziale dei pori.

Con riferimento alle immagini precedenti (fig.54), l'impiego di cristalli di dimensione più elevata (212-300µm) risulta preferibile ai fini dell'applicazione richiesta.

Infatti, la scelta di cristalli di dimensioni tra i 212-300 μ m sembra essere la più indicata per ottenere una porosità ottimale (circa 200 μ m) per la ricrescita del tessuto osseo naturale: durante le fasi di preparazione possono verificarsi alcuni fenomeni, non totalmente controllabili, quali il ritiro volumetrico del polimero (*shrinkage*) o la frammentazione dei cristalli di NaCl durante la le fasi di formatura dello scaffold che mediamente determinano una riduzione della dimensione dei pori rispetto alle dimensioni iniziali dei cristalli.

Ulteriori indagini sono state effettuate al fine di verificare le modifiche microstrutturali indotte dal pre-trattamento della soluzione polimero/solvente.

In questo caso, la soluzione polimerica di policaprolattone e dimetilacetamide viene preparata a temperatura ambiente (25°C) con tempi di dissoluzione del sistema significativamente più lunghi (circa 24/48 h) (Fig.55):



Figura 55: Analisi S.E.M. : Effetto della temperatura di dissoluzione del sistema PCL/DMAC sulla morfologia dei pori – Valutazione di una duplice porosità (S-Macropori e L-Macropori) mediante diversi ingrandimenti (M = 50x – 150x, WD=20)

Si osserva un aumento del grado di porosità al crescere della frazione volumetrica di NaCl. Ancora una volta, risulta evidente la presenza di una duplice porosità di dimensioni rispettivamente dell'ordine di decine di micron e di alcune centinaia di micron. Complessivamente le strutture ottenute dalla dissoluzione del sistema polimero/solvente a temperatura ambiente mostrano un ordine strutturale minore ed un ridotto grado di interconnessione dei pori rispetto al caso precedente.

Una possibile giustificazione di tale fenomeno potrebbe essere l'incremento della viscosità della soluzione dettata dal transitorio termico che il sistema subisce tra i 55°C ed i 25°C che consente di effettuare la precompressione della struttura prima delle fasi di estrazione dell'etanolo e dell'NaCl indispensabile al fine di ottenere una distribuzione spaziale omogenea dei cristalli nonché di favorire il contatto tra cristalli adiacenti da cui dipende il grado di interconnessione dei pori cui essi daranno origine.

In questa direzione, ulteriori indagini sono state condotte al fine di verificare l'effetto benefico sull'ordine microstrutturale indotto dalla precompressione dello scaffold preliminarmente alle fasi di estrazione del cloruro di sodio, quando la struttura, meccanicamente non completamente rigida, è ancora in grado di subire piccole deformazioni.

Tale indagine è stata condotta solo nel caso di sistemi caratterizzati da frazioni volumetriche di NaCl molto elevate (18/82, 09/91) per le quali la viscosità risulta essere tanto elevata da non consentire, a seguito del carico applicato, la fuoriuscita laterale della soluzione dallo stampo.



Figura 56: Analisi S.E.M. – Effetto della precompressione sulla morfologia

La precompressione determina un miglioramento abbastanza significativo della porosità del sistema in termini di distribuzione spaziale e di interconnessione dei pori (fig.56).

Parallelamente sono state realizzate indagini microscopiche su scaffold bioattivati con HA al fine di valutare la distribuzione di idrossiapatite all'interno della matrice polimerica e l'effetto indotto dal filler al variare della sua percentuale ponderale sulle principali caratteristiche morfologiche dei pori.



Figura 57: Analisi S.E.M. – Effetto della bioattivazione con HA sulla morfologia dei pori

Tale indagine è stata condotta prendendo in esame le superfici esposte e le sezioni trasversali delle diverse tipologie di scaffold realizzati (fig.57).

Al variare della percentuale ponderale si evince che l'idrossiapatite non determina sostanziali effetti sulla dimensione e sulla distribuzione dei pori mentre sembra incidere negativamente sull'interconnessione dei pori e sul grado di porosità totale.

A coronamento dell'indagine morfologica, è stata realizzata un analisi spettroscopica EDS mirata a valutare la presenza di idrossiapatite all'interno della struttura ed a verificare l'assenza di sue possibili trasformazioni in altre forme cristalline a seguito di fenomeni di precipitazione e dissoluzione in acqua durante la fase di estrazione dei cristalli di NaCl.

%HA	29%		41%		50%	
Elementi	Weight%	Atomic %	Weight%	Atomic %	Weight %	Atomic %
С	66.24	76.21	60.12	70.32	60.20	70.77
Ο	23.90	20.45	29.07	25.53	27.98	24.69
Р	2.76	1.23	3.48	1.58	3.60	1.64
Ca	7.10	2.01	7.33	2.57	8.22	2.89
Ca/P		1.63		1.62		1.76

Tabella 26: Spettroscopia a raggi X per dispersione di energia: valutazione delle percentuali atomiche e ponderali degli elementi chimici presenti per scaffold in PCL e compositi in PCL/HA realizzati per phase inversion/salt leaching.



Figura 58: Spettroscopia a dispersione di energia E.D.S. : Diagramma spettroscopico

I rapporti Ca/P variabili tra 1.62 e 1.76 (tab.26) confermano la presenza di idrossiapatite (Ca/P=1.66) distribuita uniformemente nello scaffold escludendo l'ipotesi della formazione di altre forme cristalline dovute a reazioni chimiche con i solventi utilizzati durante la preparazione.

Si riportano, infine, le micrografie relative a scaffold in PCL biocompatibilizzati con Hyaff11 realizzati per phase inversion/salt leaching al fine di valutare gli effetti indotti dalla presenza della carica sulla morfologia dei sistemi preparati:



Superficie

Sezione Trasversale

Figura 59: Analisi S.E.M - scaffold in PCL bioattivati con Hyaff11 via phase inversion/salt leaching – della porosità (L-macroporosità e S-macroporosità) lungo superficie e sezione trasversale.

Complessivamente, gli scaffold mostrano un ridotto ordine strutturale con una porosità delle dimensioni di circa 200 µm con pori dalla forma poco definita.

Tale disordine morfologico è certamente da attribuire alla presenza dell'Hyaff11 il quale, assorbendo elevate quantità di acqua durante le fasi di estrazione del cloruro di sodio in virtù del suo comportamento *hydrogel-like*, interviene sui meccanismi di diffusione delle molecole d'acqua all'interno della struttura modificando le modalità di estrazione dei cristalli di NaCl e riducendo l'interconnessione dei pori. Inoltre, la perdita di acqua da parte del polimero durante la fase di essiccamento comporta un ritiro della fase idrogelica presente lungo le trabecole dello scaffold determinando un alterazione della forma dei pori. Infine, é possibile distinguere, anche in questo caso, una S-macroporosità distribuita lungo lo scheletro dello scaffold delle dimensioni di 1-10 μ m determinata dall'estrazione violenta dei solventi (THF/DMSO) impiegati per la dissoluzione del polimero.

5.1.2 ANALISI POROSIMETRICA

a) Metodo gravimetrico e liquid displacement

Preliminarmente, è stata condotta una stima quantitativa della porosità delle diverse tipologie di scaffold attraverso due diverse metodologie: il metodo gravimetrico e il liquid displacement.

Nella tabella seguente (Tab.27-28-29) si riportano i risultati relativi alle misure di porosità effettuate per gli scaffold che hanno mostrato le migliori caratteristiche morfologiche alla luce delle indagini morfologiche precedenti.

PCL/HA (v/v)	PCL/NaCl (v/v)	Porosità GM (%)	Porosità LD (%)
100/0	50/50	88.9	73
100/0	33/66	91.7	75
100/0	18/82	93.9	79
100/0	09/91	95.1	83

Tabella 27: Stima della porosità strutturale: Metodo gravimetrico e Liquid displacement - Scaffold in PCL realizzati per phase inversion/salt leaching;

PCL/HA	PCL/NaCl	Porosità GM	Porosità LD
(v/v)	(v/v)	(%)	(%)
100/0	09/91	95.1	83
87/13	09/91	91.6	82
80/20	09/91	91.5	83
74/26	09/91	90.6	84

Tabella 28: Stima della porosità strutturale: Metodo gravimetrico e Liquid displacement - Scaffold in PCL, bioattivati con HA, realizzati per phase inversion/salt leaching;



Figura 60: Stima della porosità strutturale: Metodo gravimetrico e Liquid displacement: scaffold in PCL realizzati mediante phase inversion/ salt leaching: a) frazione volumetrica di NaCl b) bioattivazione con HA,

Hy11/PCL (wt/wt)	THF/DMSO (wt/wt)	PCL/NaCl (v/v)	Densità di bulk (g/cm ³)	Densità Apparente (g/cm ³)	Porosità GM (%)
0/100	20/80	09/91	0.080	1.13	92.9
10/90	20/80	09/91	0.088	1.14	92.3
20/80	20/80	09/91	0.088	1.16	92.3
30/70	20/80	09/91	0.091	1.17	92.2

Tabella 29: Analisi porosimetrica qualitativa: Metodo gravimetrico e Liquid displacement Scaffold in PCL, bioattivati con Hyaff11[®] realizzati per phase inversion/salt leaching;

Le misure gravimetriche confermano, nel caso di scaffold in PCL (tab.27), un elevato grado di porosità, compreso tra 88.9% e 95.1%, in relazione alla frazione volumetrica di NaCl impiegata.

Parimenti, le misure effettuate su scaffold in PCL bioattivati con HA (tab.28) mostrano una leggera riduzione del grado di porosità (da 95.1% a 90.6%) al crescere dell'ammontare del filler bioattivo.

Le misure realizzate su scaffold bioattivati Hyaff11, (tab.29) la presenza dell'estere dell'acido ialuronico determina una riduzione del 3% del grado di porosità che si attesta intorno al 92% indipendentemente dall'ammontare di Hyaff11 utilizzato.

Infine, le misure di liquid displacement realizzate soltanto per le prime due tipologie di scaffold, mostrano risultati di porosità decisamente al di sotto dei risultati teorici ottenuti attraverso il metodo gravimetrico; ciò è imputabile ad un maggior numero di errori intrinsechi significativi connaturati alla tecnica di misura.

b) Analisi di immagini 2D

Partendo dalle immagini al microscopio a scansione elettronica è stata ottenuta una stima delle principali caratteristiche morfologiche dello scaffold (raggio medio dei pori, distribuzione spaziale, grado di porosità totale, percentuale relativa di L-macroporosità ed S-macroporosità e grado di interconnessione dei pori) mediante l'utilizzo di un software dedicato all'elaborazione delle immagini (*ImageJ*).

L'elaborazione condotta risulta ovviamente diversa a seconda degli aspetti morfologici da indagare.

In particolare, la valutazione del raggio medio e della distribuzione dei pori (L-macroporosità), è stata realizzata modificando opportunamente il contrasto dell'immagine (*enhance contrast/ threshold*) e modulando lo sfocamento attraverso la funzione di smoothing.

Successivamente è stata effettuata una ridefinizione dei contorni più probabili dei pori, quindi l'analisi delle dimensioni dei pori (*particles analysis*) che ha consentito l'estrapolazione di tutti i pori la cui superficie risulta costituita da un numero di pixel contenuti in un opportuno intervallo (pari al numero di pixel rappresentativo di superfici circolari di raggio compreso tra 25 e 130 µm).

I dati finali ottenuti da tale analisi, forniscono il numero dei pori contati, la somma totale delle loro aree, la percentuale di porosità calcolata rispetto all'area dell'immagine, la superficie media dei pori (e quindi il raggio medio dei pori) e la loro distribuzione dimensionale.

Nel seguito (Fig.61) si riportano le immagini ottenute, step by step, mediante l'elaborazione di immagini ottenute al microscopio elettronico;

In particolare, nella prima colonna si riportano le immagini ricavate a seguito dell'applicazione di tutte le funzioni necessarie a modulare il contrasto e lo sfocamento dell'immagine nonché a ripulire l'immagine dal rumore presente.

La seconda colonna, invece, evidenzia i pori individuati, enumerati ed approssimati alle loro superfici equivalenti mediante l'analisi delle particelle.

Successivamente (Fig.62, Tab.30-31) sono riportati i risultati ottenuti relativi al grado di porosità complessivo, alle frazioni volumetriche relative di L-macropori ed S-macropori nonché alle distribuzioni dei raggi di L-macropori per le diverse tipologie di campioni analizzate (fig.63).



Figura 61: Analisi di immagini 2D - valutazione della L-macroporosità in scaffold macroporosi PCL e PCL/HA mediante ottimizzazione dei contrasti e della scala dei grigi (threshold), definizione dei contorni dei pori più probabili ed analisi delle particelle.

PCL/HA (wt/wt)	PCL/NaCl (v/v)	Porosità totale (%)	L-macropori (%)	S-macropori (%)
100/0	18/82	84	94.6	5.4
100/0	09/91	82	98.2	1.8
71/29	09/91	87	98.1	1.9
59/41	09/91	80	97.6	2.4
50/50	09/91	81	98.8	1.2

Tabella 30: Analisi di immagini 2D - Porosità totale, frazione volumetrica di L-macropori e S-macropori in scaffold macroporosi PCL e PCL/HA.



Figura 62: Analisi di immagini 2D - valutazione della L-macroporosità e della S-macroporosità in scaffold macroporosi PCL e PCL/HA.

PCL/HA (wt/wt)	PCL/NaCl (v/v)	Raggio medio L-macro(µm)	Raggio medio S-macro(µm)
100/0	18/82	95.6	3.06
100/0	09/91	117.6	2.76
71/29	09/91	113.2	2.28
59/41	09/91	114.1	3.04
50/50	09/91	110.9	2.01

Tabella 31 Analisi di immagini 2D - valutazione delle dimensioni medie della S-macroporosità e della L-macroporosità in scaffold macroporosi PCL e PCL/HA

Dall'analisi condotta è stato possibile ricavare le principali caratteristiche della porosità delle strutture analizzate: L-macropori presentano un raggio medio di circa 110-120 µm coerentemente con le dimensioni dei cristalli di cloruro di sodio utilizzati in fase di preparazione. Gli S-macropori presentano un raggio medio compreso tra 2 e 3 µm in relazione a stessi tempi di immersione in etanolo.



La stessa indagine è stata realizzata per gli scaffold compositi macroporosi PCL/Hyaff11.



Figura 64: Analisi di immagini 2D - valutazione della L-macroporosità in scaffold compositi PCL/Hyaff11 mediante ottimizzazione dei contrasti e della scala dei grigi (threshold), definizione dei contorni più probabili dei pori ed analisi delle particelle.

Si riportano i risultati ottenuti dall'elaborazione delle immagini relativamente al grado di porosità complessivo ed alle frazioni volumetriche relative di Lmacropori ed S-macropori (fig.65) nonché alle distribuzioni (fig.66) dei raggi di Lmacropori per le diverse tipologie di campioni analizzate.

PCL/Hy11 (wt/wt)	PCL/NaCl (v/v)	Porosità Totale (%)	L-macropori (%)	S-macropori (%)
100/0	09/91	79 %	98,1 %	1.9 %
90/10	09/91	77 %	98,4 %	1,6 %
80/20	09/91	77 %	98,3 %	1,7 %
70/30	09/91	75 %	97,9 %	2,1 %

Tabella 32: Analisi di immagini 2D - Porosità totale, frazione volumetrica di L-macropori e S-macropori in scaffold macroporosi PCL/Hyaff11.



Figura 65: Analisi di immagini 2D - valutazione della L-macroporosità e della S-macroporosità in scaffold macroporosi PCL/Hyaff11

PCL/Hy11 (wt/wt)	PCL/NaCl (v/v)	Raggio medio L-macro (µm)	Raggio medio S-macro (µm)
100/0	09/91	92	3.4
90/10	09/91	80	2.8
80/20	09/91	82	3.0
70/30	09/91	89	3.0

Tabella 33: Analisi di immagini 2D - valutazione delle dimensioni medie della S-macroporosità e della L-macroporosità in scaffold macroporosi PCL/Hyaff11.

In questo caso, dall'analisi condotta gli L-macropori presentano un raggio medio inferiore rispetto ai casi precedenti, circa $80-90 \ \mu m$ ancora in linea con le dimensioni dei cristalli di cloruro di sodio utilizzati in fase di preparazione.



Figura 66: Analisi di immagini 2D - valutazione della distribuzione della L-macroporosità (10-300µm) in scaffold compositi PCL/Hyaff11.

Non si riscontrano poi effetti significativi dettati dalla presenza dell'Hyaff11 sulla dimesione dei pori.

Gli S-macropori presentano un raggio medio compreso tra 2.5 e 3.5 μ m in relazione a tempi di estrazione del solvente equivalenti.

Per tale tipologia di campioni è stata effettuata anche una valutazione della distribuzione dimensionale degli S-macropori secondo le procedure utilizzate precedentemente per gli L-macropori su immagini ad ingrandimento più elevato in modo da ottenere una maggiore definizione dei contorni dei pori (Figg.67-68).



Figura 67: Analisi di immagini 2D - valutazione della S-macroporosità in scaffold compositi PCL/Hyaff11 mediante ottimizzazione dei contrasti e della scala dei grigi (threshold), definizione dei contorni dei pori più probabili ed analisi delle particelle.



Figura 68: Analisi di immagini 2D - valutazione della distribuzione della L-macroporosità (10-300µm) in scaffold compositi PCL/Hyaff11.

Le distribuzioni dimensionali dei pori confermano le dimensioni medie ricavate precedentemente mediante l'analisi di immagini ad ingrandimento ridotto.

c) Porosimetria ad intrusione di mercurio

Al fine di valutare in maniera quantitativa il grado di porosità dei campioni ed ottenere ulteriori informazioni circa le caratteristiche della morfologia dei pori, è stata effettuata un'analisi porosimetrica mediante porosimetro ad intrusione di mercurio.

Tale tecnologia permette di valutare la distribuzione del volume dei pori in funzione del raggio, il raggio medio dei pori, la porosità percentuale, la densità dello scaffold (*bulk density*) e del suo scheletro (*apparent density*).

Nel seguito si riportano i risultati ottenuti dalle prove effettuate sulle diverse tipologie di campioni nonché le distribuzioni del volume dei pori in funzione del raggio (in ascissa logaritmica) ottenute a seguito della valutazione del volume di mercurio che intrude nella porosità aperta presente nel campione.

PCL/NaCl (wt/wt)	PCL/NaCl (v/v)	Porosità Totale	Raggio medio dei	Bulk Density	Superficie specifica totale (m^2/α)
		(70)	porı (µm)	(g/cm)	(m /g)
10/90	18/82	81.06	65.08	0.18	0.249
05/95	09/91	95.43	65.85	0.09	0.649

Tabella 34: Analisi porosimetrica ad intrusione di mercurio – Scaffold in PCL realizzati mediante salt leaching – Valutazione del grado di porosità percentuale, del raggio medio dei pori, della densità di bulk e della superficie specifica dei pori;



Figura 69: Analisi porosimetrica ad intrusione di mercurio – Scaffold in PCL realizzati mediante salt leaching – a) Grado di porosità e bulk density b) Raggio medio dei pori e superficie specifica totale dei pori

L'analisi porosimetrica mostra che gli scaffold in PCL realizzati mediante phase inversion/salt leaching presentano un elevato grado di porosità compreso tra l'81% ed il 95%. In particolare, il grado di porosità cresce al crescere della frazione volumetrica di NaCl utilizzato mentre il raggio medio dei pori risulta costante e pari a circa 65µm. Si evidenzia una riduzione della densità di bulk ed

Pore Radius Range (µm)	10/90	05/95
100-300	13.9	12.9
10-100	73.5	71.4
1-10	12.6	15.7

un aumento della superficie specifica totale dei pori al crescere del grado di porosità, coerentemente con gli andamenti riportati in precedenza.

Tabella 35: Analisi porosimetrica ad intrusione di mercurio – Scaffold in PCL realizzati mediante salt leaching – distribuzione del volume dei pori in funzione del raggio;



Figura 70: Analisi porosimetrica ad intrusione di mercurio – Scaffold in PCL realizzati mediante salt leaching del tipo 82/18 e 09/91 – distribuzione del volume dei pori in funzione del raggio.

Infine, la porosità ottenuta, totalmente interconnessa in relazione al principio di funzionamento dello strumento, mostra un'ampia distribuzione del volume dei pori che contempla sia una S-macroporosità dell'ordine dei micron frutto dell'inversione di fase sia una L-macroporosità dell'ordine di centinaia di micron determinata dall'estrazione dell'agente porogeno.

Parimenti, si riportano i grafici relativi all'analisi porosimetrica su scaffold in PCL bioattivati con HA, al crescere dell'ammontare del filler.

PCL/HA (wt/wt)	Porosità Totale (%)	Raggio medio dei pori (µm)	Bulk Density (g/cm ³)
100/0	95.43	65.85	0.091
71/29	92.12	64.65	0.134
59/41	90.83	49.43	0.157
50/50	90.19	48.63	0.185

Tabella 36: Analisi porosimetrica ad intrusione di mercurio – Scaffold in PCL/HA – Valutazione del grado di porosità percentuale, del raggio medio dei pori, della densità di bulk.



Figura 71: Analisi porosimetrica ad intrusione di mercurio – Scaffold in PCL bioattivati con HA, mediante phase inversion/salt leaching a) Grado di porosità e bulk density b) Raggio medio dei pori;

Dall'analisi effettuata si riscontra che la presenza del filler non altera in maniera rilevante il grado di porosità ed il grado di interconnessione dei pori.

In particolare, a fronte di valori di porosità elevati (tab.37) compresi tra il 90% ed il 95%, si evince un graduale incremento della bulk density ed una riduzione del raggio medio dei pori al crescere dell'ammontare relativo di idrossiapatite all'interno della matrice polimerica (fig.71).

Range dimensionale dei pori (µm)	100/0	71/29	59/41	50/50
100-300	12.9	13.8	14.1	10.3
10-100	71.4	71.8	72.5	78.0
1-10	15.7	14.4	13.4	11.7

Tabella 37: Analisi porosimetrica ad intrusione di mercurio – Scaffold in PCL bioattivati con HA realizzati mediante salt leaching – Valutazione della distribuzione dimensionale dei pori;







Anche in questo caso, la porosità calcolata è totalmente interconnessa in relazione al principio di funzionamento dello strumento utilizzato il quale, calcola la porosità mediante una stima del volume di mercurio intruso all'interno dei pori a seguito di un gradiente di pressione imposto, non contemplando la presenza di eventuali cavità chiuse all'interno della struttura.

Mediante l'analisi porosimetrica ad intrusione di mercurio è stata valutata superficie specifica totale dei pori. Essa dando un indicazione sul rapporto superficie/volume dello scaffold, consente di ottenere alcune informazioni significative sulle potenzialità del sistema in termini di adesione cellulare nonché sulle proprietà di degradazione.

PCL/HA (wt/wt)	Porosità totale (%)	Raggio medio dei pori (µm)	Superficie Specifica Totale (m2/g)	Surface/Volume ratio (1/m)*10 ⁶
100/0	95.43	65.85	0.649	0.0584
71/29	92.12	64.65	0.464	0.0622
59/41	90.83	49.43	0.530	0.0831
50/50	90.19	48.63	0.501	0.0927

Figura 73: Analisi porosimetrica ad intrusione di mercurio – Scaffold in PCL bioattivati con HA realizzati mediante salt leaching – Valutazione dell'area superficiale specifica in relazione al grado di porosità ed alla dimensione dei pori.

Dalla tabella riportata si osserva che la presenza di idrossiapatite riduce mediamente la superficie complessiva dei pori: cio' è strettamente legato al fatto che l'idrossiapatite determina una riduzione della dimensione media dei pori.

In realtà dalla tabella riportata è possibile osservare che per diverse quantità di Ha utilizzate risulta un massimo della SST per la composizione 59/41. Ciò è giustificato dal fatto che il rapporto S/V oltre a dipendere dal grado di porosità e quindi dalla frazione volumetrica dei pori è anche funzione della dimensione media dei pori (*vedi modello par 5.1.5*).

5.1.3 ANALISI TERMICA

L'analisi calorimetrica è stata effettuata mediante calorimetro a scansione differenziale (*TA mod. Q1000*) al fine di determinare le variazioni delle principali proprietà fisiche della matrice polimerica indotte dalle caratteristiche microstrutturali del sistema (S- e L- macroporosità) nonché dall'ammontare di fattori bioattivi (HA) all'interno della struttura.

In primo luogo si riportano i risultati ottenuti dal confronto del polimero bulk con i campioni porosi di tipo T.

Gli effetti indotti dalla porosità sulle temperature caratteristiche del materiale, quali temperatura di transizione vetrosa (T_g) e temperatura di fusione (T_m), non sono particolarmente rilevanti.

Ciò nonostante, il lieve incremento della temperatura di transizione vetrosa nonché del calore latente di fusione, si ipotizza possano essere correlati alla presenza di residui di NaCl, i quali, fungendo da siti di nucleazione dei cristalli polimerici, determinano una variazione del grado di cristallinità del sistema.



Figura 74: Analisi DSC eseguita su scaffold in PCL bulk ed in PCL poroso realizzati mediante la tecnica phase inversion/salt leaching.

Successivamente si riportano i risultati dell'analisi calorimetrica condotta su scaffold in PCL bioattivati con HA al fine di valutare l'effetto indotto sulle proprietà termiche dall'interazione della matrice polimerica con l'idrossiapatite.



Figura 75: Analisi DSC eseguita su scaffold in PCL bulk ed in PCL bioattivati con HA realizzati mediante la tecnica del phase inversion/salt leaching.

La presenza del *filler* di idrossiapatite determina un lieve incremento della temperatura di transizione vetrosa determinato probabilmente dall'ostacolo offerto dalle particelle ceramiche allo scorrimento delle catene polimeriche.

Inoltre, non è stata riscontrata alcuna differenza sostanziale nella temperatura di transizione vetrosa dei campioni ottenuti al variare dell'ammontare di idrossiapatite, mentre, si osserva una graduale riduzione del calore latente di fusione al crescere dell'ammontare di HA, associato ad una quantità di polimero progressivamente decrescente.

5.1.4 CARATTERIZZAZIONE MECCANICA

La caratterizzazione meccanica dei campioni è stata eseguita mediante la macchina dinamometrica Instron 4204, al fine di determinare la resistenza a trazione ed a compressione, il modulo elastico e la deformazione ultima del materiale.

Si riportano i risultati delle prove a compressione condotte su scaffold in PCL mediante salt leaching con riferimento alla norma ASTM 695/2a.

PCL/NaCl (v/v)	Modulo elastico <i>Toe region</i> (Mpa)	Modulo elastico (Mpa)	Deformazione <i>Toe intercept</i> (mm/mm)	Sforzo <i>Toe intercept</i> (Mpa)
18/82	0.110 ± 0.012	2.83 ± 0.93	0.420 ± 0.012	0.13 ± 0.01
09/91	0.065 ± 0.001	4.34 ± 1.32	0.467 ± 0.012	0.14 ± 0.05

Tabella 38: Test a compressione – Scaffold in PCL realizzati mediante phase inversion/salt leaching – Tabella riassuntiva



Figura 76: Test a compressione – Scaffold in PCL realizzati mediante phase inversion/salt leaching a) Curva sforzo vs. deformazione b) moduli elastici di Toe Region;

Con riferimento alla tabella precedentemente riportata (Tab.38), i valori del modulo elastico nella regione di *toe region* risultano essere di particolare interesse ai fini dell'applicazione richiesta. Infatti, essi, indicando la resistenza a compressione offerta dalla struttura quando conserva ancora intatta la propria porosità, riproducono un comportamento che "mima" abbastanza fedelmente la risposta offerta dalla struttura trabecolare dell'osso spongioso. In particolare, si può osservare che, al crescere dell'ammontare della percentuale di NaCl impiegato, il modulo elastico nella *toe region* si riduce a seguito del grado di porosità crescente della struttura. In entrambi i casi, i valori meccanici ottenuti sono inferiori ai valori auspicati dall'applicazione variando tra 65 e 110 kPa a fronte di un modulo dell'osso trabecolare compreso tra 50MPa e 2GPa.

Successivamente, in riferimento alla stessa norma ASTM, sono stati testati scaffold in PCL bioattivati con idrossiapatite di granulometria nota la quale, oltre a fornire un modesto rinforzo meccanico della struttura, sicuramente consente una migliore integrazione con i tessuti circostanti a seguito delle sue proprietà osteointegrative.

PCL/HA	Modulo elastico	Modulo	Deformazione	Sforzo
(wt/wt)	Toe region	elastico	Toe intercept	Toe intercept
	(Mpa)	(Mpa)	(mm/mm)	(Mpa)
100/0	0.065 ± 0.001	4.34 ± 1.32	0.467 ± 0.012	0.14 ± 0.05
79/21	0.082 ± 0.004	9.43 ± 0.18	0.431 ± 0.005	0.11 ± 0.01
59/41	0.079 ± 0.007	8.58 ± 0.25	0.416 ± 0.006	0.08 ± 0.01
50/50	0.081 ± 0.005	9.67 ± 3.98	0.475 ± 0.008	0.24 ± 0.06

Tabella 39: Test a compressione – Scaffold in PCL bioattivati con HA realizzati mediante phase inversion/salt leaching – Tabella riassuntiva;



Figura 77: Test a compressione – Scaffold in PCL bioattivati con HA realizzati mediante phase inversion/salt leaching – a) Curva sforzo vs. deformazione b) moduli elastici di Toe Region;

Dal confronto dei risultati ottenuti dall'analisi a compressione, risulta chiaro che la presenza del filler ceramico a base di idrossiapatite non induce effetti significativi sul comportamento meccanico della struttura.

In ogni caso, la presenza di idrossiapatite determina un lieve incremento del modulo elastico di *toe region* (circa del 30%) rispetto al solo PCL, a fronte di un grado di porosità costante.

Ciò è apparentemente in contrasto con la teoria dei materiali compositi per la quale la presenza di un filler particellare influenza la risposta meccanica in funzione del proprio ammontare.

L'indipendenza del modulo elastico dall'ammontare di idrossiapatite può essere giustificato se si tiene conto del fatto che il rinforzo particellare è determinato sia dal numero che dalla dimensione delle particelle. Infatti, la formazione di cluster particellari riduce il numero di elementi di rinforzo all'interno della struttura anche se ne aumenta le dimensioni determinando due contributi concorrenti che complessivamente si annullano determinando un modulo elastico circa costante. A titolo di confronto, si riportano i risultati ottenuti nel caso di scaffold in PCL bioattivati con Hyaff11 seguendo la stessa norma ASTM.

PCL/Hyaff11 [®]	THF/DMSO	Modulo elastico	Modulo elastico
wt/wt	wt/wt	Toe region (Mpa)	Bulk (Mpa)
100/0	80/20	0.104 ± 0.003	386 ± 19
90/10	80/20	0.093 ± 0.014	378 ± 20
80/20	80/20	0.076 ± 0.027	383 ± 06
70/30	80/20	0.063 ± 0.012	365 ± 18
80/20	50/50	0.131 ± 0.034	316 ± 13

Tabella 40: Test a compressione – Scaffold in PCL bioattivati con Hyaff11 realizzati mediante phase inversion/salt leaching – Tabella riassuntiva;



Figura 78: Test a compressione – Scaffold in PCL bioattivati con Hyaff11 realizzati mediante salt leaching – a) Curva sforzo vs. deformazione b) moduli elastici di Toe Region;

Le prove effettuate confermano due aspetti già sottolineati dall'intuizione fisica. Innanzitutto si osserva che la scelta di un altro solvente per la dissoluzione del polimero determina una diversa risposta meccanica dello scaffold.

Ciò è motivato dalle diversa affinità tra il polimero ed il solvente e la diversa capacità che presenta il non solvente nell'estrarli dalla struttura. In particolare, il THF, più volatile della DMAC, viene più facilmente estratto dalla struttura con la formazione di una morfologia diversa prodotta dal processo termodinamico dell'inversione di fase che condiziona negativamente la capacità di supporto meccanico offerta dalle strutture.
In secondo luogo si riscontra un'influenza dell'ammontare di Hyaff11 sulle proprietà meccaniche dello scaffold.

Iin particolare al crescere del contenuto di Hyaff11 si riduce la rigidezza meccanica nella toe region: ciò dipende dalle proprietà meccaniche dell'Hyaff11 significativamente più basse di quelle del PCL.

Inoltre l'incremento relativo di DMSO rispetto al THF all'interno del mix di solventi impiegato per la dissoluzione del polimero determina un deciso aumento della rigidezza elastica: ciò dipende dal minore potere solvente del DMSO rispetto al THF che causa significative modifiche morfologiche della microstruttura (dimensione dei pori, omogeneità di distribuzione) con inevitabili ricadute sulla risposta meccanica dello scaffold.

Infine si sottolinea che non è stato possibile aumentare il rapporto tra Hyaff11 e PCL (es.50/50) per la realizzazione di scaffold strutturalmente utilizzabili ai fini dell'applicazione: l'idrofobicità del PCL, da un lato, e l'idrofillicità del Hyaff11, dall'altro, ostacolano la dissoluzione, anche parziale delle due fasi, a scapito della realizzazione di strutture totalmente integre.

Parallelamente, al fine di definire una caratterizzazione meccanica completa dei materiali analizzati, sono state condotte delle prove a trazione secondo la norma ASTM D638/02a.

Si riportano i risultati ottenuti per scaffold in PCL e PCL/HA realizzati mediante phase inversion/salt leaching (figg.79-80).

0.79	0.164 ± 0.033 0.160 ± 0.080	0.20 ± 0.027 0.06 ± 0.028
	0.79 0.31	$\begin{array}{cccc} 0.79 & 0.164 \pm 0.033 \\ 0.31 & 0.160 \pm 0.080 \end{array}$

Tabella 41: Test a trazione – Scaffold in PCL realizzati mediante phase inversion/salt leaching: Tabella riassuntiva;

PCL/HA (wt/wt)	Modulo elastico (Mpa)	Deformazione (mm/mm)	Sforzo (Mpa)
100/0	1.10 ± 0.31	0.160 ± 0.080	0.06 ± 0.028
79/21	1.31 ± 0.28	0.164 ± 0.060	0.076 ± 0.015
59/41	1.13 ± 0.19	0.111 ± 0.012	0.071 ± 0.0097
50/50	1.01 ± 0.17	0.172 ± 0.029	0.067 ± 0.0048

 Tabella 42: Test a trazione – Scaffold in PCL bioattivati von HA realizzati mediante phase inversion/salt leaching – Tabella riassuntiva;



Figura 79: Test a trazione – Scaffold in PCL realizzati mediante phase inversion/salt leaching – Tabella riassuntiva – a) curve sforzo vs. deformazione b) moduli elastici di toe region;



Figura 80: Test a trazione – Scaffold in PCL bioattivati con HA realizzati mediante phase inversion/salt leaching – Tabella riassuntiva: a) curve sforzo vs. deformazione b) moduli elastici di toe region;

La struttura risulta caratterizzata anche a trazione da proprietà meccaniche decrescenti al crescere del grado di porosità.. A fronte di una deformazione ultima equivalente, si riscontra un incremento del modulo elastico e della resistenza a trazione in funzione del grado di porosità decrescente.

La presenza di idrossiapatite integrata alla matrice di policaprolattone induce una complessiva riduzione della tenacità del materiale a fronte di una resistenza a trazione circa equivalente e di una riduzione della deformazione ultima.

5.1.5 MODELLO TEORICO E DATI SPERIMENTALI

a) Porosità e rapporto Superficie/Volume

Il rapporto S/V dei pori è funzione di due parametri tra loro non correlati: il grado di porosità e quindi la frazione volumetrica dei pori e la dimensione media dei pori. In quest'ottica, si propone di individuare un modello teorico in grado di validare i trend sperimentali trovati attraverso le misure di porosimetria ad intrusione di mercurio.

Il modello esemplificativo considerato assume lo scaffold come un solido all'interno del quale la porosità è assimilabile a sferette rigide impacchettate secondo una configurazione cubica semplice (CC).



Il volume e la superficie del poro sono ricondotti rispettivamente al volume ed alla superficie di una sfera:

$$V_s = \frac{4}{3}\pi r^3; \qquad A_s = 4\pi r^2$$

Esprimendo il volume complessivo dei pori come il prodotto del numero di pori per unità di volume N_s per la frazione volumetrica di pori ν pari al grado di porosità si ottiene:

$$N_s = \frac{3\nu}{4\pi r^3}$$

Combinando questa equazione con l'equazione della superficie della sfera si ottiene:

$$A = \frac{3\nu}{r}$$

Pertanto risulta che l'area specifica per unità di volume cresce con il grado di porosità e diminuisce con il raggio dei pori.

Tenendo presente l'elevato grado di interconnessione dei pori, un altro modello teorico potrebbe assumere il poro di forma cilindrica aventi rispettivamente volume e superficie:

$$V_C = \pi r^2 L; \quad A_C = 2\pi r L$$

Ragionando in modo analogo al caso precedente, si ottiene si ottiene una nuova correlazione tra il rapporto S/V, il raggio medio dei pori e la frazione volumetrica:

$$A = \frac{2\nu}{r}$$

Inoltre tenendo presente che la porosità è originata da cristalli di sale di forma cubica, si assume il poro di forma cubica di lato 0.965 r. In tal caso risulta:

$$V_{CB} = 0.956r^3$$
; $A_{CB} = 5.48r^2$

E quindi:

$$A = \frac{5.73 \cdot v}{r}$$

Si riportano le curve ottenute dal fit dei dati sperimentali a confronto con le curve ottenute secondo i tre modelli teorici ora introdotti.

Si osserva che i dati sperimentali mostrano, qualitativamente, lo stesso andamento e gli stessi ordini di gradezza dei rapporti S/V in funzione del contenuto di Ha espressi dai modelli teorici considerati.



Figura 81: Rapporto superficie/volume in funzione del contenuto di HA: confronto tra dati sperimentali e modello teorico (pori sferici, cilindrici e cubici);

b) Comportamento meccanico di uno scaffold: compressione e trazione

Negli ultimi decenni, molti studi sono stati compiuti per spiegare i meccanismi che regolano il comportamento meccanico di uno scaffold (*Sun/Shockdopole 1980, Sun/Webb 1985, Wendle 1976, Hillard 1982*) ma attualmente, ancora difficile risulta la definizione di modelli meccanici che spieghino esaustivamente il comportamento sperimentale.

Le proprietà di una struttura altamente porosa sono correlate alla sua morfologia ed alle proprietà del materiale che lo costituisce. Il parametro principale che definisce le proprietà di una schiuma è la densità relativa ϱ^*/ϱ_s dove ϱ_s indica la densità del materiale impiegato mentre ϱ^* si riferisce alla struttura comprensiva dei pori.

Ad essa vanno aggiunti altri parametri relativi alle pareti di cella come il Modulo di Young E_s del materiale, il modulo E^* relativo alla struttura comprensiva dei pori, la resistenza a frattura σ_{fs} .

Dall'analisi della curva sforzo/deformazione relativa ad una prova a compressione di una schiuma polimerica, si osserva che, successivamente ad un tratto iniziale, a basse deformazioni, in regime di elasticità lineare, la struttura presenta un plateau relativo alla deformazione plastica della schiuma associata al collasso dei pori in essa contenuti. Per valori di deformazione molto elevati (50-60%) i pori della struttura risultano oramai quasi totalmente collassati a seguito delle condizioni di carico e pertanto la curva mostra una rapida risalita, relativa alla risposta offerta dal materiale polimerico bulk.

Lo studio teorico di una schiuma risulta essere piuttosto complesso a seguito dei molteplici parametri che ne caratterizzano il comportamento in condizioni di carico.

Un approccio teorico semplificativo che consente di verificare la validità dei dati sperimentali prevede la definizione del comportamento elastico lineare della struttura attraverso tre distinti moduli: Il modulo di Young E^{*}, il modulo di shear G^* ed il modulo di Poisson v^{*} riferiti alla parete della generica cella che costituisce la schiuma. Nel caso particolare di struttura isotropa la definizione di due soli di essi consente di definirla univocamente. Nel caso di struttura anisotropa il numero di parametri da ricavare è più elevato.

In aggiunta un altro elemento di valutazione nella definizione del modello è legato alla distinsione tra strutture a celle aperte e strutture a celle chiuse.

Nel primo caso, di interesse in questa sede, le cose sono più facili in quanto il sistema può essere identificato con un array di elementi cubici di spigolo l e spessore t.

In particolare è possibile definire una relazione tra la densità relativa dello scaffold e la geometria della cella secondo la seguente relazione:

$$\frac{\rho^*}{\rho_s} \propto \left(\frac{t}{l}\right)^2$$

Il modulo elastico di Young può essere ottenuto studiando il sistema come una trave sottoposta a sollecitazione flessionale a seguito dell'applicazione di due carichi in campo elastico lineare (ovvero nel caso di piccole deformazioni) come mostrato in figura: in particolare si ricava che la deflessione δ subita dalla struttura risulta legata al modulo elastico E_s attraverso la seguente relazione ottenuta attraverso un bilancio di forze:



 $\delta = \frac{FI^3}{E_s I}$

Figura 82: Flessione di una cella di una schiuma ideale [141] [142];

Tenendo conto delle espressioni della forza applicata
$$F = \sigma l^2$$
 e della deformazione in funzione della deflessione: $\varepsilon = \delta / l$ ed operando le opportune sostituzioni è possibile ricavare la seguente relazione per il modulo elastico della cella che definisce l'equazione costitutiva del modello considerato:

$$E^* = \frac{\sigma}{\varepsilon} = \frac{C_1 E_s I}{l^4}$$

dove C_1 definisce una costante di proporzionalità relativa alla geometria del sistema analizzato e, nel caso particolare di struttura equiassiale, assume valore $C_1=1$. Sostituendo nella precedente equazione sarà possibile ottenere:

$$\frac{\overline{E}^*}{\overline{E}_s} = C_1 \left(\frac{\overline{\rho}^*}{\overline{\rho}_s}\right)^2$$

Tali relazioni hanno validità solamente nell'ipotesi di piccole deformazioni.

Infatti quando la sollecitazione applicata allo spigolo della cella supera il valore critico, tipico della struttura considerata, ($P>P_{crit}$) la struttura collassa.

In corrispondenza di questa condizione si manifesta un momento addizionale che determina un abbassamento del modulo elastico a compressione ed un incremento del modulo elastico a trazione.

Ne deriva che nel tratto elastico la curva sforzo deformazione non risulta perfettamente lineare ma mostra una concavità verso il basso che spiega il fatto che il modulo a compressione sia più basso del modulo a trazione, concordemente con i dati sperimentali trovati. In modo del tutto equivalente, è possibile stimare il modulo di shear G ottenuto applicando una sollecitazione di taglio τ alla cella.

Anche in questo caso, la deflessione subita dalla struttura risulta proporzionale al modulo di shear secondo una relazione del tutto analoga alla precedente:

$$G^* = \frac{\tau}{\gamma} = \frac{C_2 E_s I}{l^4} \qquad \Leftrightarrow \qquad \frac{G^*}{E_s} = C_2 \left(\frac{\rho^*}{\rho_s}\right)^2$$

dove C_2 viene assunta pari a 3/4 nell'ipotesi di struttura equiassiale.

Nel caso di struttura isotropa, il sistema è determinato essendo possibile ricavare la terza costante elastica attraverso la relazione seguente che lega il modulo di Poisson, al modulo tangenziale, per materiali isotropi in campo elastico lineare:

$$G = \frac{E}{2(1+\upsilon)}$$

Da cui si ottiene:

$$v^* = \frac{C_1}{2C_2} - 1 = C_3$$

dove $C_3 = 0.33$ nel caso di materiali isotropi in campo elastico lineare.

Il modello introdotto è stato applicato agli scaffold in PCL realizzati mediante phase inversion/salt leaching proposti in questo lavoro.

In particolare la densità dello scaffold ϱ^* (*bulk density*) pari a 0.09 g/cm³ è stata calcolata attraverso misure di porosità ad intrusione di mercurio mentre la densità dello scheletro ϱ_s (*apparent density*) pari 1.13 g/cm³ è stata ottenuta da dati ripotati in letteratura [68]. Di conseguenza, è stato calcolato il rapporto tra le densità ϱ^*/ϱ_s pari a 0.08.

Una volta calcolato il modulo elastico Es pari a 15 MPa attraverso test a compressione del polimero bulk, è stata applicata l'equazione costitutiva del modello nel caso di sollecitazione a compressione, assumendo la costante $C_1=1$. E' stata ottenuto un modulo E* pari a circa 0.095MPa dello stesso ordine di grandezza del dato sperimentale (E=0.065MPa).

Analogamente, nel caso di sollecitazione a trazione, assumendo il modulo elastico del PCL bulk compreso tra 210 and 440 MPa [68], ed ponendo la costante $C_1=1$, il modulo E* risulta compreso tra 1.33 e 2.79MPa.

5.1.6 SEMINA CELLULARE: STATICA E DINAMICA

Una volta ottimizzate le proprietà morfofunzionali attraverso un'approfondita caratterizzazione morfologica e meccanica dello scaffold, lo studio è stato rivolto a verificare le potenzialità in termini di compatibilità biologica delle strutture ad elevato grado di porosità realizzate.

In particolare è stato definito un protocollo per la semina di osteoblasti che prevede l'utilizzo del bioreattore di semina descritto nel capitolo 4 utilizzando un numero di cellule compreso tra 5 10^4 e 5 10^5 , una portata del mezzo di coltura compresa tra 0.1 e 10ml/min ed un numero di cicli di pompaggio compreso tra 1 e 10.

Avvalendosi in prima approssimazione della conta cellulare è stato scelto il seguente protocollo: Portata Q=1ml/min e 5 cicli (A/R).

Nel seguito si riporta schematicamente il protocollo adottato per la semina dinamica di osteoblasti in scaffold macroporosi:

PROTOCOLLO SEMINA DINAMICA			
Campione svincolato	n. cellule: $[5\ 10^4, 5\ 10^5]$		
L _{camera} : 16mm (8spire)	Q:1ml/min		
L _{max} : 30mm	n. cicli 5		
Diametro Campione: 10 mm	Mezzo di coltura:50ml		
Spessore: 3-4 mm	V _{camera} : 25ml		

Tabella 43: Protocollo di semina dinamica

Per definire il numero ottimale di cellule sono stati sugli scaffold macroporosi in solo PCL sono stati effettuati test di varia natura mirati a valutare:

- a) la vitalità cellulare di osteoblasti U2OS attraverso l'impiego di markers opportuni (Test Alamar Blue).
- b) l'incidenza delle condizioni di semina (*statica e dinamica*) sui meccanismi di adesione cellulare mediante l'ausilio di un semplice bioreattore di semina a perfusione progettato ad hoc.

In particolare è stata valutata l'efficienza dell'invasione cellulare all'interno dei costrutti al variare delle condizioni di semina (statica e dinamica) e del tempo di coltura.

c) la collocazione delle cellule all'interno dello scaffold attraverso esami istologici.

a) Test Alamar Blue

Sono state effettuate prove biologiche sui scaffold macroporosi in PCL, i quali, in virtù dell'elevata porosità e dell'alto grado di interconnessione, risultano essere particolarmente idonei all'adesione ed alla proliferazione cellulare.

In particolare è stata compiuta un'indagine sulla vitalità delle cellule sul substrato mediante un test Alamar Blue che consente di effettuare una valutazione quantitativa della vitalità cellulare nel tempo (nel caso specifico dopo 24h dalla semina). Per diverse popolazioni cellulari (aventi diverso numero di osteoblasti) è stato valutato il valore dell'assorbanza (in triplicato) in corrispondenza di due lunghezze d'onda tipiche ($\lambda = 570 \text{ e } 600 \text{ nm}$).

Tali informazioni sono state inserite nell'espressione già discussa nel cap.4:

$$\text{%red} = \frac{\varepsilon_{ox} \cdot A_{\lambda 1} - \varepsilon_{red} \cdot A_{\lambda 2}}{\varepsilon_{ox} \cdot C_{\lambda 1} - \varepsilon_{red} \cdot C_{\lambda 2}}$$

In tal modo è stata costruita una curva di taratura che consente di correlare la percentuale di riduzione rispetto al numero di cellule. Si osserva che la curva di taratura ha validità soltanto nel dominio $[10^5 - 3 \ 10^5]$ dove sussiste la linearità della curva (fig.83):

- per n<10⁵ ovvero per numero di cellule troppo ridotto, la non linearità è imputabile alla risoluzione dello spettrofotometro che sottostima la percentuale di riduzione;
- per n>10⁵ ovvero per numero di cellule molto elevato, la non linearità è probabilmente dovuta alla saturazione del sistema che causa anche in questo caso una sottostima della percentuale di riduzione misurata.

Si riporta la curva di taratura ottenuta dal test AB reduction e la legge lineare che "fitta" meglio i dati sperimentali nel dominio di validità $[10^5 - 3 \ 10^5]$.



Figura 83: Test di vitalità cellulare: Curva di calibratura Range di linearità [10⁵ - 3 10⁵]

$$\%$$
red = $a \cdot n + b$

$$a = 0.0001128$$

 $b = 24.16$
 $R = 0.9996$

E' stata effettuata, quindi, una misura indiretta della vitalità cellulare.

Dalla valutazione dell'assorbanza del campione a 570 e 600nm allo spettrofotometro si può risalire alla percentuale di riduzione dell'Alamar Blue attraverso la precedente relazione.

Entrando con il valore calcolato di %red nella curva di taratura è possibile individuare il numero di cellule corrispondenti presenti nello scaffold. Normalizzando rispetto al numero di cellule inizialmente introdotto nello scaffold (ottenuto attraverso una conta cellulare) è stato possibile ottenere una stima dell'efficienza della semina all'interno dello scaffold.

In particolare è stata realizzata una semina di osteoblasti utilizzando un numero di cellule peri a 2.5 10⁵ compreso nel dominio di linearità della curva di taratura.

I risultati del test di semina effettuato in triplicato sono stati confrontati con quelli di un test statico.

Si osserva che la percentuale di riduzione nel caso dinamico è più che doppia con un grado di efficienza della semina pari al 67%.

	Statica	Dinamica
% red	20.8	43.1
n. cellule	-	$1.7 \ 10^5$
Efficienza	-	67%

Tabella 44: Test AB reduction – Confronto tra semina statica e semina dinamica - Stima del grado di efficienza della semina

b) analisi al microscopio confocale

Al fine di valutare l'effetto indotto dalla diversa procedura di semina sulla vitalità ed sulla distribuzione cellulare le cellule sono state colorate con calceina ed etidio bromuro (C/EtBr).

A seguito della colorazione, l'analisi al microscopio confocale mostra cellule vitali con un citoplasma di colore verde. Al contempo, cellule morte con citoplasma rosso indicano l'interazione dell'etidio bromuro con il DNA della cellula dovuto alla penetrazione del probe attraverso la membrana cellulare non più integra.

L'analisi è stata effettuata utilizzando



Figura 84: Analisi al microscopio confocale: valutazione della profondità di semina attraverso modalità Z-stack

la funzione Z-stack del programma LSM-5 dedicato che consente di effettuare una scansione del campione lungo il piano yz.

In particolare, al fine di valutare la penetrazione cellulare, è stato realizzato uno zstack per tre differenti punti lungo la generica sezione del campione (fig.84).

Si riportano i risultati ottenuti nel caso di semina statica e dinamica rispettivamente dopo 24, 48 e 168 ore:





La profondità di penetrazione cellulare non sembra cambiare significativamente passando da una semina statica ad una semina dinamica.

In corrispondenza dei primi 300µm di profondità è possibile valutare una migliore penetrazione cellulare ed una prevalenza di cellule vive (*colore verde*) rispetto alle morte (*colore rosso*) nel caso di semina dinamica rispetto al caso di semina statica.

c) Analisi istologica

Anche l'analisi istologica conferma che all'interno dei pori dello scaffold seminato dinamicamente sono presenti un cospicuo numero di cellule che sono anche in grado di produrre naturalmente la matrice extracellulare (ECM), rispetto al caso statico dove le cellule, meno presenti, hanno avuto maggiore difficoltà a penetrare.



Figura 86: Analisi istologica di scaffold Figura 87: Analisi istologica macroporosi in PCL realizzati mediante tecnica del phase inversion/salt leaching semina statica

di scaffold macroporosi in PCL realizzati mediante tecnica del phase inversion/salt leaching - semina dinamica

Inoltre, sempre dall'osservazione istologica, si nota che le cellule riescono anche ad assumere una morfologia corretta con una forma allungata con la tendenza a realizzare strati cellulari bidimensionali.

5.2 SCAFFOLD MACROPOROSI FIBRORINFORZATI

5.2.1 ANALISI MORFOLOGICA E MICROSTRUTTURALE

Si riportano i risultati dell'analisi micrografica effettuata su scaffold macroporosi compositi in PCL rinforzati con fibre polimeriche di acido polilattico mirata a valutare qualitativamente le principali caratteristiche della porosità e confrontare le differenze morfologiche dipendenti dalla preparazione.



Figura 88: Analisi S.E.M. – Schematizzazione della porosità di scaffold cilindrici in PCL rinforzati con fibre di PLLA realizzati mediante salt leaching: superficie esterna, superficie interna, sezione trasversale, sezione longitudinale.

Dalla schematizzazione riportata (fig.88) si riscontra una porosità omogeneamente distribuita all'interno dell'intero volume. In particolare la porosità ottenuta risulta essere mediamente di dimensioni maggiori rispetto ai casi precedentemente analizzati in relazione all'utilizzo di cristalli di sale di dimensioni maggiori, comprese tra 300 e 500 µm.

La porosità ottenuta mostra caratteristiche ancora pienamente compatibili con quelle richieste per la proliferazione di osteoblasti e per la ricrescita del tessuto osseo.

Inoltre, risulta evidente una distribuzione omogenea dei pori sia lungo la sezione longitudinale che lungo la sezione trasversale e la superficie esterna; I pori risultano del tutto assenti, al contrario, lungo la superficie interna corrispondente alla superficie di contatto con il mandrino in quanto, durante le fasi di leaching, l'uscita dei cristalli di sale risulta impedita dalla presenza del mandrino stesso. Inoltre in corrispondenza della superficie interna è possibile osservare un elevata concentrazione di fibre in relazione al fatto che esse, leggermente tese, tendono ad affondare nella matrice polimerica ancora piuttosto fluida durante le prime fasi di avvolgimento restando quindi ancorate al mandrino sottostante.

Ciò nonostante le fibre risultano distribuite abbastanza omogeneamente all'interno di tutto il campione come si evince dalle micrografie relative alle sezioni trasversali.

Ulteriori indagini sono state effettuate per valutare l'incidenza dell'ammontare di fosfato di calcio sulla morfologia dello scaffold (fig.89).



Figura 89: Analisi S.E.M. di scaffold cilindrici in PCL rinforzati con fibre di PLLA ed α-TCP in forma cristallina realizzati mediante salt leaching: sezione longitudinale e sezione trasversale al crescere dell'ammontare di α-TCP;

Dalle micrografie riportate, si osserva che la porosità risulta essere altamente interconnessa con una doppia porosità rispettivamente, di dimensioni comprese tra 1 e 10 μ m e tra 200 e 300 μ m. Inoltre non si riscontra nessuna alterazione significativa della morfologia connessa alle diverse frazioni ponderali di filler ceramico introdotte.

Inoltre risulta evidente, da micrografie a maggiore ingrandimento (fig.90), la presenza di piccoli cristalli di dimensioni micrometriche (1-3µm) collocati all'interno della L-macroporosità.



Figura 90: Analisi S.E.M. di scaffold cilindrici in PCL rinforzati con fibre di PLLA ed α-TCP in forma cristallina realizzati mediante salt leaching: particolare dell'interno di un macroporo;

Al fine di indagare sulla natura cristallina del fosfato di calcio è stata realizzata un indagine E.D.S. mirata a valutare i rapporti Ca/P per le diverse tipologie di campioni realizzate. Nel seguito si riportano i risultati ottenuti:

α-TCP % wt	29	0%	42	1%	50	%
Element	Weight%	Atomic %	Weight%	Atomic %	Weight %	Atomic %
С	65.54	72.33	62.70	70.36	59.50	68.50
Ο	32.41	26.87	33.53	28.25	33.33	28.70
Р	0.77	0.33	1.31	0.57	2.24	1.10
Ca	1.27	0.47	2.46	0.83	4.93	1.70
Ca/P	1.65	1.42	1.88	1.46	2.21	1.54

Tabella 45: Analisi Spettroscopica a dispersione di energia E.D.S. : valutazione dei rapporti Ca/P al crescere dell'ammontare di fosfato tricalcico nella forma α.

Dalla tabella si osserva che, indipendentemente dall'ammontare di filler ceramico utilizzato, i rapporti Ca/P si attestano intorno a 1.5 (a meno di piccole fluttuazioni) che indica il rapporto Ca/P caratteristico della forma cristallina di idrossiapatite povera di calcio (CDHA).

Tale risultato spinge a fare delle considerazioni sui meccanismi che si attivano durante le fasi di preparazione dello scaffold.

In particolare, durante l'estrazione dei cristalli di NaCl, si ipotizza l'attivazione di una reazione di idrolisi tra fosfato tricalcico ed acqua che porta alla dissoluzione dell'α-TCP ed alla successiva precipitazione di cristalli di idrossiapatite povera di calcio.



Figura 91: Spettroscopia a dispersione di energia E.D.S. : Diagramma spettroscopico

5.2.2 ANALISI POROSIMETRICA

Si riportano, infine, i grafici relativi all'analisi porosimetrica su scaffold fibrorinzorzati ottenuti mediante salt leaching; in questo caso la prova è stata condotta solo su campioni privi di fosfato tricalcico avendo ritenuto che la sua presenza fosse ininfluente sulla morfologia ed in particolar modo sulla porosità dello scaffold.

Scaffold compositi macroporosi	rinforzati con fibre di PLA
Porosità Totale %	79.72
Raggio medio S-macropori (µm)	1.12
Raggio medio B-macropori (µm)	88.41
Densità di Bulk (g/ cm3)	0.255
Densità apparente (g/ cm3)	1.259

Tabella 46: Analisi porosimetrica di scaffold compositi macroporosi rinforzati con fibre di PLA: grado di porosità totale, raggio medio L-macropori e S-macropori, densità di bulk e densità apparente.

L'analisi porosimetrica condotta mostra un grado di porosità totalmente interconnessa pari a circa l'80% del volume dello scaffold in virtù del principio di funzionamento dello strumento utilizzato. Dai grafici riportati (fig.92) si riscontra doppia porosità caratterizzata da due dimensioni caratteristiche:

- S-macropori aventi raggio medio 1.12 μm (fig 92.a), che ricoprono circa il 46% in volume della porosità totale e risulta determinata dall'estrazione del solvente;
- L-macropori aventi raggio medio 88.41 μm (fig 92.b), che ricoprono circa il 54% in volume della porosità totale dovuta all'estrazione dei cristalli di sale durante le fasi di leaching.



Figura 92: Analisi porosimetrica di scaffold compositi macroporosi rinforzati con fibre di PLA: distribuzione dimensionale di S-mscropori e di L-macropori.

5.2.3 CARATTERIZZAZIONE MECCANICA

In fase preliminare sono state realizzate prove a compressione su scaffold macroporosi in PCL integrati con fibre polimeriche di PLA al fine di valutare l'incremento delle proprietà meccaniche indotto dal sistema di rinforzo fibrillare In particolare, non potendo disporre di una norma internazionale ASTM che consenta di effettuare test su campioni di questa natura, sono state condotte prove comparative, riadattando la norma ASTM 695/2a al caso specifico, al solo scopo di confrontare le proprietà meccaniche al variare dei rapporti matrice/fibra (tab.47).

Tipologia	Modulo elastico	Modulo	Deformazione	Sforzo
	Toe (Mpa)	elastico (Mpa)	(mm/mm)	(Mpa)
TCP _{0A}	$0,136 \pm 0,065$	87 ± 2	$0,684 \pm 0,098$	$1,95 \pm 0,09$
TCP _{0B}	$0,375 \pm 0,012$	82 ± 1	$0,823 \pm 0,124$	$1,84 \pm 0,11$
TCP _{0C}	$0,495 \pm 0,157$	80 ± 2	$0,651 \pm 0,02$	$1,98 \pm 0,13$

Tabella 47: Test a compressione: scaffold macroporosi in PCL rinforzati con fibre di acido polilattico realizzati mediante phase inversion/salt leaching

Dalle curve a compressione ottenute è possibile osservare la presenza di una toe region relativa alla risposta offerta dalla porosità della struttura.

Focalizzando l'attenzione sulla toe region, di maggiore interesse ai fini dell'applicazione e sui valori riportati in tabella (tab.48), si osserva che al crescere del rapporto matrice/fibra risulta un incremento deciso del modulo elastico a fronte di nessuna variazione determinata dagli altri parametri meccanici in gioco.



Figura 93: Prove a compressione scaffold macroporosi in PCL rinforzati con fibre di acido polilattico realizzati mediante salt leaching a) curva sforzo/deformazione b) risposta a compressione nella toe region

In particolare la presenza delle fibre produce un incremento significativo della resistenza dello scaffold rispetto al caso di scaffold macroporosi in PCL in

assenza e in presenza di bioattivazione con idrossiapatite fino ad un ordine di grandezza.

I valori meccanici si mantengono sempre al di sotto dei requisiti richiesti per sostituire efficacemente, in maniera temporanea, l'osso trabecolare.

Parallelamente sono stati effettuati test a compressione su scaffold macroporosi in PCL caratterizzati da un rinforzo fibroso a base di fibre di acido polilattico ed un rinforzo particellare a base di fosfato tricalcico che ha anche il compito di bioattivare la struttura in virtù del suo elevato potere osteoinduttivo.

Si riportano i risultati ottenuti per diverse frazioni ponderali di fosfato tricalcico e nel caso del solo rinforzo fibroso in qualità di controllo.

PCL/α-TCP weight ratio	Elastic Modulus Toe region (MPa)
100/0	0.385 ± 0.041
71/29	1.279 ± 0.380
59/41	1.891 ± 0.140
50/50	2.211 ± 0.242

Tabella 48: Prove a compressione - scaffold macroporosi in PCL rinforzati con fibre di acido polilattico e bioattivati con fosfato tricalcico realizzati mediante phase inversion/salt leaching.



a)

Figura 94: Prove a compressione - scaffold macroporosi in PCL rinforzati con fibre di acido polilattico e bioattivati con fosfato tricalcico realizzati mediante phase inversion/salt leaching a) curva sforzo/deformazione b) risposta a compressione nella toe region.

Dalle curve riportate, risulta evidente che al crescere dell'ammontare di fosfato tricalcico aumenta il modulo a compressione di toe region fino ad un ordine di grandezza rispetto al caso fibrorinforzato.

In particolare ciò sembra dettato dalla presenza, all'interno dello scaffold, di isole di idrossiapatite, come di cristalli aghiformi confermato dall'analisi S.E.M./E.D.S., che forniscono un significativo rinforzo della struttura finale.

5.2.4 VALUTAZIONE DEL RAPPORTO FIBRA/MATRICE

Al fine di una completa comprensione delle proprietà fisiche e meccaniche del composito realizzato è di primaria importanza valutare l'incidenza che le proprietà dei singoli componenti del composito rivestono sul suo comportamento complessivo.

In quest'ottica il rapporto fibra/matrice è importante per fare delle valutazioni ulteriori relativamente al comportamento meccanico del composito realizzato.

Si consideri la fibra di PLA integrata alla matrice di PCL mediante tecnica di avvolgimento filamentare come descritto nel capito precedente (Cap. 4).



Figura 95: Molla ad elica cilindrica: schematizzazione

Dal punto di vista strettamente geometrico essa è assimilabile ad una molla ad elica cilindrica costituita da un filo di sezione circolare **S**, il cui asse si avvolge su un cilindro di diametro **D**' e di passo **p** definito come la distanza tra due spire successive, costante o variabile, ed un numero **n** di spire.

Noto il passo p, l'inclinazione α della tangente all'elica e le lunghezze l ed l_n, rispettivamente di una ed n spire, risulta che:

$$Tan\alpha = \frac{p}{\pi D}$$
; $l = \frac{\pi D}{\cos \alpha} = \sqrt{p^2 + \pi^2 D^2}$; $l_n = nl = n\sqrt{p^2 + \pi^2 D^2}$

Nel caso specifico, il generico campione considerato ha geometria nota: lunghezza H=105mm mentre si assume quale diametro del campione, il diametro medio dello scaffold cilindrico D=5mm (D_{int}=3mm e D_{ext}=7mm) equivalente al diametro della singola spira. In aggiunta è noto il diametro della fibra pari a d=2.5 μ m e l'inclinazione della tangente all'elica è pari all'angolo di avvolgimento α =45°. Alla luce di tali parametri risulta:

$$l = \frac{\pi D}{\cos \alpha} = 22.2mm; \qquad p = l \cdot sen\alpha = 15.7mm$$
$$n = \frac{H}{n} = 6.68; \qquad l_n = n \cdot l = 148.3mm$$

Ricordando che tutti gli scaffold realizzati sono stati ottenuti dall'avvolgimento di 5 cicli fibra (5 + 5 avvolgimenti lungo la lunghezza H dell'intero campione) è

possibile calcolare la lunghezza complessiva della fibra per il singolo scaffold come segue:

$$L = 10 \cdot l_n = 1483mm$$

La fibra di PLA utilizzata risulta classificata come *75dtex* ovvero ha una massa di 75g per km lineare.

Ne deriva che il peso della fibra all'interno del campione di geometria nota (H=105mm e D=5mm) risulta:

$$m_{fibra} = 0.075 \frac{g}{m} \cdot 1.483m = 0.111g$$

Tenendo presente il peso del campione valutato mediante bilancia di precisione (*Mettler Toledo: min 10mg, max 50g, e=1mg, d=0.1mg*) risulta pari a 0.74g si ottiene rapidamente il seguente rapporto fibra matrice:

$$\frac{F}{M} = \frac{m_{fibra}}{m_{camp}} = \frac{0.111}{0.740 - 0.111} = 0.18$$

5.3 SCAFFOLD MACROPOROSI – SEPARAZIONE TIPS

5.3.1 ANALISI TERMICA PRELIMINARE

Prima di procedere alla realizzazione dei substrati, è stata realizzata un indagine preliminare finalizzata a valutare le principali proprietà termiche dei solventi utilizzati, in particolare la temperatura di fusione e di cristallizzazione del diossano e del dimetilsulfossido in modo da tenerne conto nella definizione delle temperature di raffreddamento del sistema polimero/solvente.



Figura 96: Analisi DSC: Temperatura e calore di fusione;

	T _f (°C)	$\Delta H_{f} (J/g)$
Diossano	22.43	62.96
DMSO	12.79	104.10

Tabella 49: Analisi DSC: Temperatura e calore di fusione



Figura 97: Analisi DSC - Temperatura di cristallizzazione

	Τ _c (°C)	$\Delta H_{c} (J/g)$
Diossano	-6.63	44.21
DMSO	5.16	106.10

 Tabella 50:
 Analisi DSC - Temperatura di cristallizzazione

5.3.2 ANALISI MORFOLOGICA E MICROSTRUTTURALE

Si riportano le immagini al microscopio a scansione elettronica effettuate sulle diverse tipologie di campioni realizzate in corrispondenza della superficie e della sezione trasversale.

Le micrografie riportate sono state realizzate a differenti ingrandimenti al fine di evidenziare le principali caratteristiche morfologiche dei campioni realizzati:



Figura 98: Analisi S.E.M: scaffold ottenuti da sistema binario PCL/Diossano mediante tecniche di separazione di fase termicamente indotta (TIPS);

Gli scaffold realizzati per separazione di fase termodinamicamente indotta mostrano una porosità omogeneamente distribuita nello spazio per tutte le composizioni del sistema polimero/solvente e per tutte le modalità di raffreddamento del sistema (4°C e -18°C).

Le dimensioni dei pori risultano essere comprese tra 10 e 150 µm in funzione dei rapporti ponderali tra le fasi ed delle temperature di processo.

In particolare, dalle micrografie riportate è possibile osservare una riduzione della dimensione media dei pori al crescere della concentrazione polimerica; infatti una maggiore quantità di polimero determina una minore efficacia dei meccanismi di accrescimento della fase dispersa da cui trae origine la porosità.

Analogamente, un maggiore sottoraffreddamento che, nel caso specifico vuol dire anche una maggiore velocità di raffreddamento del sistema, induce una separazione di fase termodinamicamente più incisiva con la formazione di fasi disperse ricche di solvente di dimensioni più piccole fautrici di pori di dimensioni ridotte.



Figura 99: Analisi S.E.M: scaffold ottenuti da sistema binario PCL/Diossano mediante tecniche di separazione di fase termicamente indotta- Effetti della cristallizzazione del solvente.

La separazione di fase del sistema PCL/diossano è stata realizzata sottoraffreddando il sistema al di sotto della temperatura di fusione del solvente: ciò vuol dire che la separazione è del tipo solido/liquido.

In tal caso all' interno delle strutture possono manifestarsi pori dalla caratteristica morfologia a scala a pioli (**ladder-like**) aventi uno sviluppo nello spazio lungo una direzione preferenziale.

Tale morfologia è determinata dalla formazione di cristalli aghiformi indotta della transizione termodinamica al di sotto del punto di fusione del solvente.

In particolare, modulando opportunamente le condizioni di raffreddamento del sistema è possibile controllare la dimensione ed, entro certi limiti l'orientazione dei cristalli consentendo la realizzazione di strutture a porosità orientata. Si riportano le micrografie relative a costrutti ottenuti a partire dal sistema binario PCL/DMSO:



Figura 100: Analisi S.E.M: scaffold ottenuti da sistema binario PCL/DMSO mediante tecniche di separazione di fase termicamente indotta;

Cambiando la natura chimica del solvente si possono osservare alcune differenze significative sulla morfologia dei sistemi realizzati.

In particolare, la porosità mostra dimensioni decisamente più piccole in relazione ad una maggiore densità del dimetilsulfossido rispetto al diossano il quale, essendo più volatile, presenta una separazione di fase termodinamicamente più favorita e cineticamente più veloce.

Inoltre, nel caso di scaffold ottenuti da sistema binario/DMSO (fig.100) i pori mostrano una forma essenzialmente sferica; essi sono il frutto dei caratteristici meccanismi di nucleazione e crescita del solvente all'interno della matrice polimerica mentre sono del tutto assenti, invece, pori di geometria aghiforme. Ciò è spiegabile in relazione alle caratteristiche fisiche del solvente, il quale mostra una cinetica dei fenomeni di cristallizzazione caratterizzata da tempi più lunghi rispetto alla cinetica di raffreddamento imposta durante la preparazione dei substrati. In altri termini i cristalli di DMSO non hanno il tempo di formarsi. Si riportano le micrografie realizzate per scaffold ottenuti da PCL/diossano mediante estrazione del solvente mediante freeze dipping (immersione in non solvente per il polimero).



Figura 101: Analisi S.E.M: scaffold ottenuti da sistema binario PCL/Diossano – T=-18°C mediante tecniche di separazione termicamente indotta (freeze dipping).

Anche in questo caso è evidente un'elevato grado di porosità per tutte le composizioni analizzate ed una omogenea distribuzione spaziale dei pori.

Inoltre, i pori mostrano una dimensione compresa tra 20 e 100 μ m variabili in relazione alle specifiche condizioni di processo. In particolare, rispetto ai sistemi ottenuti per separazione TIPS con estrazione del solvente sottovuoto, è immediato evidenziare un legame tra la dimensione dei pori e la composizione del sistema polimero/solvente.

In riferimento ai sistemi con separazione difase ottenuta alla temperatura di -18°C (Fig.101) si può osservare una significativa diminuzione del diametro dei pori al crescere della concentrazione polimerica. E' poi possibile osservare lungo le trabecole polimeriche la presenza di solchi di forma esagonale probabilmente lasciati dai cristalli di solvente prima della propria eliminazione.



Figura 102: Analisi S.E.M: scaffold ottenuti da sistema binario PCL/Diossano – T=4°C mediante tecniche di separazione di termicamente indotta (freeze dipping)

Inoltre è possibile evidenziare alcune differenze morfologiche in funzione della temperatura e della velocità di raffreddamento a parità di concentrazione del sistema (fig.101-102).

Innanzitutto al crescere della temperatura la porosità mostra una minore omogeneità di distribuzione spaziale all'interno dello scaffold: ciò è determinato dal fatto che la spinta termodinamica alla separazione di fase è tanto maggiore quanto maggiore è il sottoraffreddamento e la velocità di raffreddamento imposti. Inoltre, per temperature più elevate (4°C) si riscontra la prevalenza di pori aghiformi con morfologia ladder-like imputabile alla cristallizzazione del solvente. Tale evidenza sperimentale è ascrivibile al fatto che per sottoraffreddamenti più piccoli, in relazione alle modalità del processo di preparazione la velocità di raffreddamento del sistema risulta significativamente più bassa; ciò implica una maggiore facilità di crescita dei cristalli all'interno della struttura a 4°C che a -18°C.

5.3.2 ANALISI POROSIMETRICA

a) Metodo gravimetrico

In una prima fase è stata effettuata un'analisi porosimetrica qualitativa mirata a valutare una porosità teorica in relazione a parametri geometrici (volume) ed a caratteristiche intrinseche del materiale (densità) mediante metodo gravimetrico.

Si riportano nelle tabelle successive (tab.50-52-53-54) i risultati ottenuti nel caso del sistema PCL/diossano, PCL/DMSO ottenuti per separazione di fase e del sistema PCL/diossano ottenuto per freeze inversion.

Tipo	PCL/Dioxane	Bulk	%Porosità
	(v/v)	density	
PS1C	5/95	0.068	94.1
PS1H	5/95	0.076	93.3
PS2C	9/91	0.097	91.4
PS2H	9/91	0.107	90.5
PS3C	14/84	0.126	88.8
PS3H	14/84	0.143	87.3

Tabella 51: Analisi qualitativa della Porosità – Metodo Gravimetrico: PCL/Diossano

Tipo	PCL/DMSO	Bulk	%Porosità
	(v/v)	density	
PS4C	5/95	0.10	91.2
PS4H	5/95	0.11	90.2
PS5C	10/90	0.13	88.5
PS5H	10/90	0.17	84.9
PS6C	15/85	0.17	84.9
PS6H	15/85	0.25	77.8

Tabella 52: Analisi qualitativa della porosità - Metodo Gravimetrico: PCL/DMSO



Figura 103: Analisi qualitativa della porosità – Metodo Gravimetrico: PCL/DMSO – Grado di porosità percentuale e bulk density in funzione dell'ammontare crescente di PCL

Tipo	PCL/Dioxane	Bulk density	Porosità Totale
	(v/v)	(g/cm^3)	(%)
FD1C	5/95	0.082	92.7
FD2C	9/91	0.117	88.9
FD3C	14/84	0.151	86.7

Tabella 53: Analisi qualitativa della porosità – Metodo Gravimetrico: PCL/Diossano – Temperatura di raffreddamento -18°C;

Tipo	PCL/Dioxane	Bulk density	Porosità Totale
	(v/v)	(g/cm^3)	(%)
FD1H	5/95	0.088	92.2
FD2H	9/91	0.124	88.4
FD 3 H	14/84	0.167	85.2

Tabella 54: Analisi qualitativa della porosità – Metodo Gravimetrico: PCL/Diossano – Temperatura di raffreddamento 4°C;



Figura 104: Analisi qualitativa della Porosità – Metodo Gravimetrico: PCL/Diossano - freeze dipping - Grado di porosità percentuale e bulk density in funzione dell'ammontare crescente di PCL

Il metodo gravimetrico sembra confermare le indicazioni già ricavate dall'analisi morfologica. In particolare, il grado di porosità diminuisce al crescere dell'ammontare di polimero rispetto al solvente in un range compreso tra il 77.8% ed il 94.1% per ciascun sistema polimero/solvente analizzato.

In aggiunta, parità di concentrazione del sistema, il grado di porosità sembra essere lievemente influenzato dalle condizioni di processo con una riduzione del grado di porosità al crescere della temperatura da -18°C a 4°C nel caso di separazione di fase termicamente indotta (TIPS). Al contrario si riscontra un trend opposto nel caso di sistemi realizzati mediante freeze inversion.

b) Analisi 2D di immagini

Secondo le stesse procedure adottate in precedenza è stata ottenuta una stima delle principali caratteristiche morfologiche dello scaffold in termini di raggio medio dei pori, distribuzione spaziale, grado di porosità totale mediante l'elaborazione delle immagini ottenute al microscopio a scansione elettronica con un software dedicato.



Figura 105: Analisi di immagini 2D - valutazione della macroporosità in scaffold macroporosi ottenuti per separazione di fase del sistema binario PCL/diossano (PSC) mediante ottimizzazione dei contrasti e della scala dei grigi (threshold), definizione dei contorni dei pori più probabili ed analisi delle particelle.



Figura 106: Analisi di immagini 2D - valutazione della macroporosità in scaffold macroporosi ottenuti per separazione di fase del sistema binario PCL/diossano (PSH) mediante ottimizzazione dei contrasti e della scala dei grigi (threshold), definizione dei contorni dei pori più probabili ed analisi delle particelle.

Si riportano i valori ottenuti per il grado di porosità totale e del raggio medio dei pori per le diverse tipologie di campioni realizzati:

Tipo	Porosità Totale	Raggio medio dei pori
	(%)	(µm)
PSC1	90.1	36.9
PSC2	87.8	25.3
PSC3	80.3	24.9

Tabella 55: Analisi di immagini 2D – scaffold macroporosi ottenuti per separazione di fase del sistema binario PCL/diossano a seguito di un raffreddamentoa -18°C. Tabella riassuntiva del grado di porosità totale e del raggio medio dei pori.

Tipo	Porosità Totale (%)	Raggio medio dei pori (µm)
PSH1	90.4	63.8
PSH2	85.5	43.8
PSH3	82.4	33.1

Tabella 56: Analisi di immagini 2D – scaffold macroporosi ottenuti per separazione di fase del sistema binario PCL/diossano a seguito di un raffreddamentoa 4°C. Tabella riassuntiva del grado di porosità totale e del raggio medio dei pori.



Figura 107: Analisi di immagini 2D – scaffold macroporosi ottenuti per separazione di fase del sistema binario PCL/diossano – Grado di porosità totale in funzione della percentuale di diossano utilizzata.

Figura 108: Analisi di immagini 2D – scaffold macroporosi ottenuti per separazione di fase del sistema binario PCL/diossano – Raggio medio dei pori in funzione della percentuale di diossano utilizzata.

L'elaborazione delle immagini via software mostra complessivamente una sottostima del grado di porosità rispetto al metodo gravimetrico.

In particolare, si osserva una riduzione del grado di porosità totale al crescere della concentrazione polimerica del sistema PCL/diossano a conferma del risultato ottenuto attraverso il metodo gravimetrico mentre meno netta risulta, invece, la correlazione tra temperatura di raffreddamento e grado di porosità.

Infine l'analisi delle immagini ha consentito di ottenere importanti informazioni circa l'effetto della cinetica di raffreddamento sulla dimensione dei pori: in particolare; si osserva che il raggio medio diminuisce per temperature di raffreddamento più basse e quindi velocità di raffreddamento più elevate.

Inoltre è possibile notare una significativa influenza della concentrazione del sistema sulla dimensione dei pori. In particolare, al crescere della concentrazione di PCL si può notare una rapida riduzione della dimensione dei pori fino ad un valore di plateau al di sopra del 10% come confermato anche dalla distribuzione dei raggi medi dei pori di seguito riportata.



Figura 109: Analisi di immagini 2D – scaffold macroporosi ottenuti per separazione di fase del sistema binario PCL/diossano. Distribuzione dei raggio dei macropori

La stessa analisi è stata portata a termine nel caso di scaffold realizzati mediante separazione di fase con l'estrazione del solvente via freeze dipping al fine di valutare gli effetti della diversa modalità di estrazione del solvente sulla morfologia dei pori.



Figura 110: Analisi di immagini 2D - valutazione della macroporosità in scaffold macroporosi ottenuti per separazione di fase del sistema binario PCL/diossano (PSC) mediante ottimizzazione dei contrasti e della scala dei grigi (threshold), definizione dei contorni dei pori più probabili ed analisi delle particelle.



Figura 111: Analisi di immagini 2D - valutazione della macroporosità in scaffold macroporosi ottenuti per separazione di fase del sistema binario PCL/diossano (PSC) mediante ottimizzazione dei contrasti e della scala dei grigi (threshold), definizione dei contorni dei pori più probabili ed analisi delle particelle.
Tipo	Porosità Totale (%)	Raggio medio dei pori (µm)
FDC1	84.2	36.9
FDC2	79.6.	29.5
FDC3	78.9	29.2

Tabella 57: Analisi di immagini 2D – scaffold macroporosi ottenuti per separazione di fase del sistema binario PCL/diossano a seguito di un raffreddamentoa -18°C. Tabella riassuntiva del grado di porosità totale e del raggio medio dei pori.

Tipo	Porosità Totale (%)	Raggio medio dei pori (μm)
FDH1	83.3	48.1
FDH2	82.6	42.4
FDH3	81.2	37.2

Tabella 58: Analisi di immagini 2D – scaffold macroporosi ottenuti per separazione di fase del sistema binario PCL/diossano a seguito di un raffreddamentoa 4°C. Tabella riassuntiva del grado di porosità totale e del raggio medio dei pori.



Figura 112: Analisi di immagini 2D – scaffold macroporosi ottenuti per separazione di fase del sistema binario PCL/diossano – Grado di porosità totale in funzione della percentuale di diossano utilizzata.

Figura 113: Analisi di immagini 2D – scaffold macroporosi ottenuti per separazione di fase del sistema binario PCL/diossano – Raggio medio dei pori in funzione della percentuale di diossano utilizzata.

Anche in questo caso l'analisi delle immagini effettuata fornisce una sottostima del grado di porosità per tutte le tipologie analizzate rispetto ai valori teorici ottenuti mediante il metodo gravimetrico.

In aggiunta è possibile verificare gli stessi trends relativi al grado di porosità ed al raggio medio dei pori al variare della concentrazione del sistema binario e della temperatura di raffreddamento valutati nei casi precedenti come testimoniano le distribuzioni dei raggio dei pori riportate nel seguito. 182 - CAPITOLO 5



Figura 114: Analisi di immagini 2D – scaffold macroporosi ottenuti per separazione di fase del sistema binario PCL/diossano. Distribuzione dei raggi dei macropori

c) Porosimetria ad intrusione di mercurio

E' stata condotta un'indagine quantitativa mediante porosimetro ad intrusione di mercurio al fine di determinare alcune importanti informazioni sulla porosità delle diverse strutture scaffold realizzate (raggio medio dei pori, densità di bulk, densità apparente, superficie specifica dei pori) non ottenibili con i metodi precedentemente utilizzati. In quest'ottica si riportano, soltanto i risultati ottenuti nel caso del sistema binario PCL/diossano il quale alla luce delle precedenti valutazioni morfologiche ha mostrato requisiti di porosità maggiormente rispondenti all'applicazione di interesse.

Туре	% Tot. Porosità	Raggio Medio (µm)	Bulk Density (g/cm ³)	Apparent Density (g/cm ³)	Superficie specifica relativa (m ² /g)
PSC1	91.7	25.6	0.09	1.16	0.986
PSC2	84.7	16.9	0.17	1.11	0.891
PSC3	78.3	13.1	0.24	1.12	0.627

Tabella 59: Analisi quantitativa – Porosimetro ad intrusione di mercurio: sistema PCL/Diossano Temperatura di raffreddamento di -18°C.

Туре	% Tot. Porosità	Raggio Medio (μm)	Bulk Density (g/cm ³)	Apparent Density (g/cm ³)	Superficie specifica relativa (m ² /g)
PSH1	84.6	55.3	0.15	1.10	0.477
PSH2	79.7	47.2	0.20	1.09	0.254
PSH3	76.5	30.5	0.27	1.13	0.280

Tabella 60: Analisi quantitativa – Porosimetro ad intrusione di mercurio: sistema PCL/DiossanoTemperatura di raffreddamento di 4°C.





Figura 115: Valutazione del grado di porosità totale al variare della concentrazione di PCL e della cinetica di raffreddamento.

Figura 116: Valutazione della densità di bulk al variare della concentrazione di PCL e della cinetica di raffreddamento.



Figura 117: Valutazione del raggio medio dei pori al variare della concentrazione di PCL e della cinetica di raffreddamento.

Figura 118: Valutazione della superficie totale relativa dei pori al variare della concentrazione di PCL e della cinetica di raffreddamento.

A conferma delle indagini morfologiche precedenti, anche l'analisi di porosimetria ad intrusione di mercurio ha mostrato una riduzione del grado di porosità totale al crescere della concentrazione di polimero ed al diminuire della temperatura di raffreddamento (congiuntamente ad una riduzione della velocità di raffreddamento del sistema).

Inoltre si riscontra una diminuzione della dimensione dei pori al crescere della concentrazione di PCL ed al diminuire della temperatura di raffreddamento del sistema (congiuntamente ad un aumento della velocità di raffreddamento)

Queste ultime considerazioni sono il risultato dei meccanismi termodinamici che caratterizzano la separazione termodinamica di un sistema binario polimero/solvente.

In particolare, un aumento della componente maggiormente viscosa (in questo caso, il polimero) all'interno del sistema fornisce un ostacolo maggiore alla formazione di due fasi coesistenti all'equilibrio che pertanto risulteranno di dimensioni inferiori originando, a seguito dell'estrazione del solvente, pori di dimensioni più piccole.

Analogamente, una riduzione della temperatura e soprattutto un incremento della velocità di raffreddamento determina un amplificazione dei meccanismi di accrescimento rispetto a quelli di nucleazione delle singole fasi con la formazione di pori complessivamente più piccoli.

Tali valutazioni trovano ulteriore riscontro nelle distribuzioni dei raggi medi delle porosità presenti nelle diverse tipologie di scaffold realizzate per separazione di fase.



Figura 119: Distribuzione del raggio medio dei pori per scaffold ottenuti per separazione di fase di un sistema binario PCL/diossano mediante estrazione sottovuoto del solvente (vacuum extraction).

5.3.4 CARATTERIZZAZIONE MECCANICA

Si riportano i test a compressione effettuati sugli scaffold realizzati mediante separazione TIPS con estrazione secondo la modalità freeze dipping risultati dall'analisi morfologica di maggiore interesse ai fini dell'applicazione.

Tipo	Modulo Elastico Toe Region (MPa)	Grado di porosità (%)
FDC1	0.27 ± 0.016	92.7
FDC2	0.63 ± 0.12	87.9
FDC3	1.12 ± 0.09	86.7

Tabella 61: Prove a compressione scaffold macroporosi in PCL realizzati mediante separazione di fase TIPS con modalità freeze dipping.



Figura 120: Prove a compressione scaffold macroporosi in PCL realizzati mediante separazione di fase TIPS con modalità freeze dipping. a) curva sforzo/deformazione b) risposta a compressione nella toe region

Si osserva un incremento del modulo elastico di toe region al crescere della concentrazione polimerica coerentemente con la riduzione del grado di porosità della struttura.

5.4 MICROSFERE E PSEUDOSINTERIZZAZIONE

5.4.1 SINGOLA EMULSIONE

Sono state realizzate microsfere polimeriche mediante la tecnica della singola emulsione al fine di realizzare dei sistemi che possano aggregarsi a seguito di un processo di pseudo-sinterizzazione per fusione (MIMS) a formare scaffold polimerici biodegradabili idonei alla ricrescita del tessuto osseo naturale.

Il principio teorico dell'emulsione termodinamica sulla quale si fonda la preparazione delle microsfere è abbastanza semplice ed intuitivo: un emulsione è caratterizzata da una fase dispersa costituita da una soluzione polimerica, (nel caso specifico PCL disciolto in diclorometano), distribuita in una fase disperdente costituita da una soluzione acquosa.

Essa si realizza a seguito di un processo di nucleazione ed accrescimento di gocce di fase dispersa all'interno della fase disperdente che si arresta solo quando all'interfaccia tra le fasi la tensione superficiale della goccia eguaglia gli sforzi tangenziali indotti dalla agitazione meccanica.

Evidentemente il bilancio di forze all'interfaccia, ora descritto, che regola la formazione dell'emulsione ed in particolare la dimensione delle gocce, la loro distribuzione dimensionale, la rugosità superficiale, etc. risulta essere "*controllato*" attraverso molteplici parametri quali la viscosità della fase disperdente e della fase dispersa, la velocità di agitazione, il rapporto dei volumi tra le fasi che incidono in maniera più o meno significativa sul prodotto finale.

Inoltre per prevenire fenomeni indesiderati quali la coalescenza delle gocce, la fase disperdente viene solitamente caricata con agenti tensioattivi (nel caso specifico 0.5% wt di PVA) che, rivestendo con uno strato sottile la superficie delle gocce in formazione, ne abbassano l'energia superficiale impedendone l'aggregazione.

L'obiettivo, in questa prima fase è stato quello di ottimizzare la dimensione delle particelle in relazione ai parametri di processo ed alle proprietà reologiche delle singole fasi al fine di ottenere particelle di dimensioni opportune per la realizzazione di scaffold sinterizzati [300-400µm].

a) Analisi morfologica

L'analisi della microstruttura è stata eseguita mediante il microscopio a scansione elettronica (SEM) grazie al quale risulta possibile valutare la morfologia delle varie tipologie di campioni. Nel seguito si riportano le micrografie relative a nove tipologie di campioni ottenuti per singola emulsione; in particolare, per ogni tipologia si riportano due micrografie a diverso ingrandimento, al fine di evidenziare la distribuzione dimensionale e la morfologia superficiale delle singole microsfere.



PCL/MC (wt/wt) 08/92

Figura 121: Analisi S.E.M. di microsfere realizzate per singola emulsione – rapporto PCL/MC (wt/wt) 08/92 – valutazione delle dimensioni in relazione alla velocità di agitazione.



PCL/MC (wt/wt) 16/84

Figura 122: Analisi S.E.M. di microsfere realizzate per singola emulsione – rapporto PCL/MC (wt/wt) 14/84 – valutazione delle dimensioni in relazione alla velocità di agitazione.

Dalle micrografie riportate si riscontra che le microsfere, indipendentemente dalla tipologia, risultano di geometria sferica e prive di porosità superficiale.

Tali caratteristiche sono interessanti nell'ottica dell'applicazione di interesse in quanto la regolarità della forma e la uniformità dimensionale facilitano la realizzazione di strutture porose interconnesse.



PCL/MC (wt/wt) 24/76

Figura 123: Analisi S.E.M. di microsfere realizzate per singola emulsione – rapporto PCL/MC (wt/wt) 24/76 – valutazione delle dimensioni in relazione alla velocità di agitazione.

Al contrario si osserva, per ciascuna tipologia di campioni, una distribuzione dimensionale piuttosto ampia, il che impedisce un controllo accurato del processo di pseudosinterizzazione e consente una previsione verosimile della porosità che può originarsi al suo interno.

b) Analisi calorimetrica

L'analisi calorimetria è stata condotta allo scopo di valutare l'effetto sulle proprietà termiche del polimero dovuto alla tecnica di preparazione utilizzata al fine di stabilire la temperatura ottimale del processo di sinterizzazione.



L'analisi termica dei campioni è stata effettuata mediante lo strumento della TA Instrument mod. Q1000.

Figura 125: Termogramma PCL non trattato

Dalle curve riportate si evince che il processo di preparazione non induce sostanziali modifiche delle proprietà termiche del polimero rispetto al PCL non trattato. In aggiunta, attraverso l'analisi del picco endotermico di fusione, è stato possibile determinare il range ottimale di temperatura [55-60°C] in corrispondenza del quale effettuare la pseudosinterizzazione delle microsfere.

5.4.2 DOPPIA EMULSIONE

Al fine di raggiungere dimensioni delle particelle ottimali per la realizzazione di substrati realizzati mediante il processo di sinterizzazione sono state realizzate diverse tipologie di microsfere, mediante la tecnica della doppia emulsione; in tal caso, il processo prevede la realizzazione di un emulsione intermedia e pertanto oltre ai parametri già valutati in precedenza, è stato necessario valutare, congiuntamente, anche l'incidenza dei seguenti parametri:

- ✓ Tempo di sonificazione
- ✓ Concentrazione di PVA nella fase acquosa interna
- ✓ Volume della fase oil rispetto al volume della fase Winterna

La fase di sonificazione è necessaria per la realizzazione di una prima emulsione (tipo W/O) nella quale la fase disperdente costituita dalla soluzione polimerica formi al proprio interno gocce di soluzione acquosa a seguito di un fenomeno di cavitazione. Il tempo di sonificazione influisce significativamente sulla formazione delle cavità, sulla loro dimensione nonché sulla omogeneità della distribuzione; Infatti, tempi di sonificazione ridotti (10 sec) non sono sufficienti alla formazione delle cavità mentre tempi di cavitazione troppo lunghi (120 sec) sono causa di fenomeni di implosione legati alla prolungata esposizione del sistema a sollecitazioni vibrazionali indotte dall'esterno. In questa direzione, in questo studio è stato scelto un tempo di sonificazione di 30 sec quale tempo di sonificazione ottimale per la formazione delle cavità.

Ulteriori fattori in grado di influenzare considerevolmente la dimensione delle microsfere risultano essere, come già detto, la velocità di agitazione magnetica la quale consente il trasferimento di energia necessario alla formazione della dispersione della fase olio in acqua, e la concentrazione di polimero nella fase organica, in quanto, attraverso la differenza di viscosità tra fase dispersa e fase disperdente varia l'efficienza della miscelazione.

Infine l'aggiunta di PVA alla fase acquosa interna, in qualità di agente emulsionante, incrementa la stabilità dell'emulsione primaria e migliora l'efficienza di incapsulamento delle proteine consentendo quindi la realizzazione di sistemi a rilascio controllato di farmaco ad alta efficacia.

a) Analisi morfologica

Si riportano alcune micrografie relative ad alcune tipologie di microsfere realizzate per doppia emulsione:



Figura 126: Analisi S.E.M. di microsfere realizzate mediante emulsione multipla – V_{oil}/V_{water} 90/10 – valutazione delle dimensioni in relazione a due differenti velocità di agitazione.

Dalle micrografie riportate si evince che al diminuire della *velocità di agitazione magnetica* incrementano le dimensioni delle particelle.

Ciò è spiegato dal fatto che aumentando l'agitazione meccanica aumenta l'energia trasferita al sistema per disperdere la fase oil in acqua. In particolare, un incremento di energia corrisponde a shear stress più intensi all'interfaccia tra la fase dispersa e la fase disperdente; per bilanciare tali sforzi sarà necessaria una tensione interfacciale maggiore la quale risulta essere inversamente proporzionale alle dimensioni delle particelle in formazione. In altri termini, per velocità di agitazione crescente, aumentano gli sforzi tangenziali all'interfaccia tra le fasi, aumenta la tensione interfacciale nella volontà di annullarli, diminuisce la dimensione delle particelle fino al verificarsi della condizione di equilibrio.



Figura 127: Analisi S.E.M. di microsfere realizzate mediante emulsione multipla – velocità di agitazione 200rpm – valutazione delle dimensioni e della porosità in relazione alla concentrazione di PCL nella fase oil ed al rapporto volumetrico tra fase oil e fase water interna.

Dal confronto delle micrografie, è possibile riscontrare l'effetto indotto sulla dimensione delle particelle dalla concentrazione di polimero all'interno della fase oil; in particolare al crescere della concentrazione della soluzione polimerica, aumenta la viscosità della fase dispersa, o più propriamente, aumenta la differenza di viscosità tra fase disperdente e fase dispersa il che determina all'interfaccia un'aumento degli sforzi tangenziali ed in ultima analisi la riduzione della dimensione delle particelle fino alla condizione di equilibrio.

Dall'osservazione, invece, delle micrografie successive (fig.127) si può invece stabilire una correlazione tra la porosità delle particelle, in termini di dimensioni e distribuzione dei pori, ed il rapporto volumetrico tra la fase dispersa ($W_{interna}$) e la fase disperdente (O) della prima emulsione. In particolare, è evidente che, da un punto di vista termodinamico, il sistema formi l'emulsione tanto più facilmente quanto più piccolo è il volume della fase dispersa rispetto a quello della fase disperdente; al contempo, durante la fase di cavitazione la fase dispersa, circondata da fase disperdente, formerà gocce tanto più grandi quanto la fase disperdente è meno viscosa rispetto ad essa, e quindi quanto più elevato è il rapporto volumetrico V_{int}/V_{ext} . In altri termini, al diminuire del rapporto volumetrico V_{int}/V_{ext} , incrementano i meccanismi di nucleazione delle gocce ma diminuiscono i meccanismi di accrescimento per cui il sistema sistema tende a mostrare gocce sempre in maggior numero ma di dimensioni più piccole.

In riferimento alle microsfere ottenute dopo la seconda emulsione, esce presenteranno al posto delle gocce formatesi per cavitazione, delle cavità vuote dovute al processo di disidratazione della soluzione acquosa.

In quest'ottica, sulla superficie sarà possibile osservare una porosità che sarà espressione della distribuzione delle cavità interne; in particolare a rapporti volumetrici V_{int}/V_{ext} piccoli corrisponde una elevata porosità di dimensioni ridotte ed uniformemente distribuita mentre a rapporti volumetrici V_{int}/V_{ext} elevati corrisponde una porosità ridotta di dimensioni maggiori (fig.127).

b) Analisi porosimetrica ad intrusione di mercurio

Al fine di studiare ulteriormente gli aspetti morfologici e strutturali delle microsfere ottenute mediante doppia emulsione, è stata effettuata un'analisi porosimetrica sui campioni di tipo D₅.

Si riporta l'analisi di porosità effettuata su suddetta tipologia mediante porosimetro Pascal 240, al fine di valutarne la distribuzione percentuale relativa del volume dei pori in funzione del raggio, la porosità volumetrica percentuale complessiva e la *bulk density*.

Di seguito si riportano i risultati ottenuti dall'analisi delle microsfere di tipologia D_5 espressi mediante grafici con doppia ordinata, rispettivamente il volume cumulativo ed il volume relativo percentuale, e in ascissa il raggio dei pori in scala logaritmica.



Figura 128: Analisi porosimetrica ad intrusione di mercurio – Microsfere in PCL ottenute per doppia emulsione – Distribuzione dimensionale dei pori

Dall'analisi effettuata con lo strumento in dotazione nonché dalla successiva elaborazione dei dati mediante software di calcolo Kaleidagraph 3.5, risulta che la porosità totale presente nelle microsfere si aggira intorno al 4% in volume con diametro dei pori compreso tra 0.01 e 0.1 micron. Inoltre dai calcoli effettuati mediante software dedicato (Pascal Instruments), sono stati ottenuti i seguenti parametri:

- Porosità totale: 3.93 %
- Bulk Density: 0.546 g/cm3
- Densità Apparente: 0.565 g/cm3

Un valore di *bulk density* ben al di sotto della densità del PCL sembrerebbe indicare un grado di porosità significativamente più elevato rispetto al valore riportato dallo strumento; questa apparente incongruenza può essere giustificata dalla presenza di sacche vuote caricate con BSA all'interno delle microsfere. Tale risultato trova conferma nel fatto che il valore della densità apparente risulta poco superiore alla *bulk density* e molto inferiore alla densità del PCL.

In altri termini, considerando che la *bulk density* indica la densità del materiale comprensivo della porosità aperta ed interconnessa e che la densità apparente, invece, è relativa al solo materiale, risulta che:

- A seguito dello scarto ridotto tra i due valori di densità calcolati, la porosità aperta del sistema, ad esso correlata, è bassa come confermato dal valore calcolato dallo strumento;
- Poiché la densità apparente risulta significativamente inferiore alla densità del PCL che costituisce le microsfere, si può ipotizzare la presenza di cavità chiuse all'interno di esse come già osservato in precedenza.

c) Analisi al microscopio confocale

Al fine di caratterizzare la morfologia interna delle microsfere, è stata utilizzata la microscopia confocale, la quale, attraverso l'utilizzo di un probe fluorescente consente di determinare la distribuzione della macromolecola incapsulata.

Nel caso specifico, durante la preparazione delle microsfere mediante doppia emulsione, la BSA è stata marcata con fluoresceina (FITC). Si riportano le immagini ottenute dall'analisi:



Figura 129: Immagine in fluorescenza (a) e in contrasto (b) di una microsfera caricata con BSA fluorescente.

Dall'analisi in fluorescenza (fig. 129-a) si evidenzia la distribuzione spaziale della macromolecola in cavità micrometriche (*depot*), distribuite nel volume della microsfera. E' inoltre riportata un'immagine in contrasto (fig. 129-b) al fine di enfatizzare la geometria della microsfera rispetto alla distribuzione delle cavità interne.

5.4.3 PSEUDO SINTERIZZAZIONE PER FUSIONE (MIMS)

E' opinione diffusa nella letteratura scientifica che la rigenerazione dei tessuti sia strettamente correlata alla geometria del substrato destinato ad ospitare le cellule ed in particolare dimensione dei pori in esso contenuti.

In particolare alcuni ricercatori hanno indicato un range dimensionale da 200 a 400 μ m [153] quale range ottimale per la ricrescita del tessuto osseo, anche se altri (Yoshikawa e altri [6]) hanno utilizzato con successo scaffolds con dimensione dei pori di 500 μ m.

Partendo dai lavori presenti in letteratura [153], è stata definita ua tecnica di pseudo-sinterizzazione per fusione di microsfere (MIMS) per a realizzazione di strutture tridimensionali con pori di dimensioni comprese tra 200 µm e 500 µm.

Un modello teorico a quattro sfere è stato realizzato al fine di determinare il range dimensionale ottimale delle microsfere per la realizzazione di matrici sinterizzate, caratterizzate da una porosità in grado di stimolare l'adesione e la proliferazione cellulare.



Figura 130: Schematizzazione modello a 4 sfere

Tale modello è costituito da quattro sfere rigide, uguali e disposte simmetricamente lungo le diagonali del quadrato in cui sono inscritte (fig. 130). La dimensione caratteristica, **a**, della cavità presente tra le quattro sfere può essere approssimata dal valore del diametro della sfera rigida inscrivibile in essa:

$$\frac{D-2d}{2} = a$$

in cui: **D** è la diagonale del quadrato in cui sono inscritte le sfere, **d** è il diametro delle sfere rigide di partenza. Da considerazioni di natura geometrica è stato possibile definire un range dimensionale teorico delle sfere compreso tra 366 e 610 μ m ottimale per l'applicazione in relazione alle microsfere in dotazione.

In accordo con tale risultato, infatti, sono state utilizzate due tipologie di microsfere in due intervalli dimensionali compresi rispettivamente tra 300 e 500µm superiori a 500 µm. ottenute mediante setaccio a vibrazione.

a) Analisi morfologica

L'analisi della microstruttura è stata compiuta avvalendosi del microscopio a scansione elettronica (SEM), grazie al quale risulta possibile valutare qualitativamente la porosità presente all'interno dei campioni in termini di distribuzione, dimensione dei pori e grado di interconnessione.

Si riportano alcune micrografie ottenute per diverse tipologie di campioni:



Figura 131: Analisi S.E.M. di scaffold sinterizzati di microsfere ottenute per singola emulsione di dimensioni comprese tra 300 e 500 μm – Temperatura di sinterizzazione 53°C. Tempo di sinterizzazione 1440 min.

1440 min 30 µm ⊢⊣

Dalle micrografie riportate è possibile osservare che le microsfere, in condizione di incipiente fusione (53°C), cominciano a fondere a partire dalle zone più periferiche originando una struttura tridimensionale compatta, in cui, però, non

si riscontra alcuna formazione di colletti, indice di un'assenza di fenomeni di trasporto di massa indotta dalle condizioni termiche del sistema.

In quest'ottica, è stata impostata una temperatura di processo più elevata al fine di innescare, parallelamente alla fusione della fase polimerica, fenomeni di trasporto di massa.



Figura 132: Analisi S.E.M. di scaffold sinterizzati di microsfere ottenute per singola emulsione di dimensioni comprese tra 300 e 500 μ m – Temperatura di sinterizzazione 55°C. Tempo di sinterizzazione 45 min.

Dalle micrografie riportate è evidente la formazione di colletti tra le differenti microsfere caratterizzati da dimensioni tali da garantire da un lato un legame più forte tra le microsfere e conseguentemente una resistenza maggiore della struttura.

Ciò comunque non è prova del fatto che la formazione dei colletti sia raggiunta grazie all'avvento di fenomeni di trasporto di massa. Inoltre ciò non inficia significativamente sulla porosità della struttura che conserva un elevato grado di interconnessione dei pori facilitando l'impiego di tali strutture per la coltura cellulare al loro interno.





Un ulteriore incremento della temperatura incrementa ulteriormente i meccanismi di fusione tra le particelle con una parziale compenetrazione e un conseguente avvicinamento dei centri delle microsfere.

In altri termini, al crescere della temperatura, la cinetica dei processi di fusione prevale sulla cinetica dei fenomeni di trasporto di massa rendendo difficoltosa la formazione dei colletti, talaltro non completamente accertata.

Inoltre, la compenetrazione delle particelle indotta dalla fusione risulta non omogeneamente all'interno della struttura, probabilmente a causa di tempi di processo insufficienti e gradienti termici all'interno della struttura indotti dalla forma dello stampo utilizzato.

In quest'ottica è stato valutato l'effetto indotto sulla microstruttura dal tempo di processo a parità di temperatura di sinterizzazione:



Figura 134: Analisi S.E.M. di scaffold sinterizzati di microsfere ottenute per singola emulsione di dimensioni comprese tra 300 e 500 μ m – Temperatura di sinterizzazione 63°C. Tempo di sinterizzazione 20 e 30 min.

Dal confronto delle tipologie di campioni $MIMS_{13}$ e $MIMS_{14}$, ottenuti a parità di temperatura rispettivamente per 20 e 30 minuti di processo, si osserva in entrambi i casi, la formazione di colletti uniformemente distribuiti, ma nel secondo caso essi sono maggiormente consolidati ed in numero maggiore.

In particolare nei campioni MIMS₁₃, si nota la presenza di colletti tra microsfere sottoposti a *streaching* immediatamente a ridosso di gruppi di microsfere parzialmente fusi.

La formazione di suddetti filamenti allungati a ridosso di due microsfere adiacenti nasce probabilmente dal fatto che durante la loro parziale fusione si verifica un riaccomodamento strutturale delle particelle negli interstizi che le porta ad allontanarsi ma non a separarsi completamente a seguito delle condizioni di rammollimento in cui si trova il polimero a quella temperatura.

Successivamente si riportano le micrografie delle strutture ottenute mediante sinterizzazione di microsfere di dimensioni maggiori di 500 µm al fine di valutare le differenze strutturali indotte dalla scelta di particelle di dimensioni più elevate.

Probabilmente, per microsfere di dimensioni maggiori rispetto a quelle precedentemente osservate, sarà necessario, a parità di temperatura, un tempo di sinterizzazione più elevato a seguito di un minor rapporto superficie-volume della struttura.





Figura 135: Analisi S.E.M. di scaffold sinterizzati di microsfere ottenute per singola emulsione di dimensioni comprese maggiori di 500 µm al variare della temperatura di sinterizzazione, del tempo di sinterizzazione e, a seconda dei casi, applicando una precompressione.

Anche in tal caso si può osservare la presenza di colletti ben distribuiti all'interno della struttura e di dimensioni compatibili alla creazione di un'elevata porosità ad alto grado di interconnessione dei pori.



Figura 136: Analisi S.E.M. di scaffold sinterizzati di microsfere ottenute per singola emulsione di dimensioni comprese maggiori di 500 µm al variare della temperatura di sinterizzazione, del tempo di sinterizzazione e, a seconda dei casi, applicando una precompressione.

Dalle immagini precedenti, ottenuti a parità di tempo e temperatura ma sottoposti ad una pressione di 37.5 kPa, si riscontra la formazione di una struttura più regolare con colletti distribuiti in maniera pressoché uniforme.

L'azione della pressione sulla compattazione della struttura sinterizzata risulta mutuata dalla scelta di una opportuna temperatura nell'intervallo di temperature di rammollimento del polimero, così come previsto dalla analisi calorimetrica effettuata.

b) Analisi porosimetrica ad intrusione di mercurio

Al fine di valutare il grado di porosità degli scaffold sinterizzati realizzati si è proceduto ad un'analisi di porosità ad intrusione di mercurio per la tipologia di campioni MIMS₄.



Figura 137: Analisi porosimetrica ad intrusione di mercurio – Scaffold ottenuti per compattazione di microsfere in PCL ottenute per singola emulsione – Distribuzione dimensionale dei pori

Dall'analisi effettuata risulta che il campione presenta una porosità diffusa totalmente interconnessa, con un grado di porosità del 47% in volume ed un raggio medio dei pori di circa 90 micron pienamente compatibile con le dimensioni richieste dalla rigenerazione del tessuto osseo.

c) Caratterizzazione meccanica

Al fine di valutare la resistenza meccanica degli scaffold sinterizzati sono stati condotti test a compressione in riferimento alla norma ASTM 695-2a:



Figura 138: Curva sforzo/deformazione di uno scaffold sinterizzato via MIMS.

Dalla curva è possibile studiare il comportamento a compressione della struttura: in corrispondenza del primo tratto, caratterizzato da pendenza fortemente ridotta, si presume che, a seguito del carico applicato, si verifichi un accomodamento delle microsfere non saldate all'interno della struttura portante dello scaffold, in corrispondenza degli interstizi presenti in esso.

Il tratto successivo, di pendenza crescente, invece, esplica la risposta dei colletti formatisi nelle zone di contatto tra microsfere vicine a seguito dell'incipiente fusione degli strati polimerici superficiali.

Successivamente, al crescere della deformazione, si riscontra un nuovo plateau corrispondente alla rottura dei colletti tra le microsfere ed al loro conseguente riaccomodamento all'interno degli interstizi presenti nella struttura.

Infine, la curva mostra un nuovo tratto a pendenza crescente indicativo della risposta offerta dal materiale ormai compattato.

In relazione all'applicazione d'interesse, è evidente che il comportamento meccanico dello scaffold è esplicato dal tratto relativo alla risposta dei colletti tra le microsfere e dal tratto immediatamente seguente relativo alla loro rottura.

In particolare, è stato calcolato un modulo elastico di circa (10 ± 1.2) Mpa nel tratto indicato che è confrontabile con i valori meccanici relativi alla risposta dell'osso naturale.

6. DISCUSSIONE

L'obiettivo di questo lavoro di tesi triennale è stato la definizione di materiali e tecnologie atte a consentire la realizzazione di costrutti tridimensionali (*scaffold*) caratterizzati da specifici requisiti morfologici e funzionali.

Il materiale utilizzato, in questa sede, per la realizzazione degli scaffold è il policaprolattone, un poliestere termoplastico che associa ad inprescindibili doti di biocompatibilità, specifici tempi di degradazione (*6 e 36 mesi*) confrontabili con i tempi di formazione e crescita di nuovo tessuto osseo e pertanto ideali per la realizzazione di sistemi in grado di sostituire temporaneamente il tessuto naturale. La sua integrazione con altri materiali (*idrossiapatite, hyaff11, fibre di acido polilattico, fosfato tricalcico*) permette di realizzare strutture composite in grado di offrire, almeno in parte, una risposta meccanica adeguata a sostenere i carichi tipici del tessuto osseo migliorando le proprietà di osteoconduzione ed osteoinduzione indispensabili per il buon esito dell'impianto.

Tre distinte metodologie di realizzazione dei substrati sono state sviluppate e confrontate in questa sede: il salt leaching in combinazione con un'inversione di fase (**PI/SL**), la separazione di fase termicamente indotta (**TIPS**) e la pseudo sinterizzazione per fusione di microsfere (**MIMS**) ottenute per emulsione. In primo luogo, una attenta caratterizzazione morfologica delle strutture ha permesso di verificare i requisiti di porosità (distribuzione spaziale, forma e dimensione dei pori) idonei alla rigenerazione del tessuto osseo. Infatti, come ampiamente documentato dalla letteratura scientifica [5][6] [58][60], un grado di porosità superiore all'80% ad elevato grado di interconnessione ed una dimensione media dei pori di circa 200-300 µm definiscono requisiti morfologici essenziali per l'attivazione dei meccanismi di formazione in vitro del tessuto osseo naturale.

In una prima fase dello studio, una indagine qualitativa della porosità mediante osservazioni al microscopio a scansione elettronica ha permesso l'ottimizzazione preliminare dei parametri di preparazione e di processo delle diverse strutture.



Figura 139: Aspetti morfologici analizzati al microscopio a scansione elettronica (S.E.M.)

Ad esempio, nel caso di scaffold realizzati mediante salt leaching, l'impiego di una frazione volumetrica del 91% di cristalli di cloruro di sodio aventi una dimensione media di 212 e 300 µm risulta essere la scelta ottimale per ottenere un elevato grado di porosità ed un grado di interconnessione adeguato all'applicazione cellulare. L'inversione di fase indotta dall'estrazione del solvente mediante un terzo componente, non solvente per il polimero, combinata alla

consolidata tecnica del salt leaching assicura la realizzazione di un ambiente morfologico ideale alla rigenerazione tissutale a seguito di una distribuzione bimodale della porosità strutturale caratterizzata da:

- pori di 150-300 μm (*L-macroporosità*) associati all'estrazione dei cristalli di NaCl in grado di incentivare i meccanismi di adesione e proliferazione di osteoblasti.

- pori di 1-10 μ m (*S-macroporosità*) associati all'estrazione del solvente particolarmente idonei a garantire il trasporto efficace di sostanze metaboliche indispensabili per il sostentamento cellulare nonché il rilascio controllato di molecole di piccole dimensioni (antibiotici, fattori di crescita) per la cura localizzata di patologie in prossimità delle zone di impianto.



S-macroporosità (1-10µm)

Figura 140: Doppia Porosità determinata dalla combinazione di inversine di fase e salt leaching.

Nel caso di substrati ottenuti per separazione di fase indotta dalla temperatura (TIPS), la distribuzione spaziale omogenea ed il controllo fine della dimensione dei pori in relazione ai parametri di processo (temperatura e velocità di raffreddamento) consentono un'ampia versatilità di applicazione in campo biomedico. La struttura altamente ordinata dei substrati realizzati a partire dal sistema binario PCL/diossano è caratterizzata da una porosità ben definita nella forma e nelle dimensioni con una morfologia dei pori, a tratti, fortemente allungata (*ladder-like*) determinata dai fenomeni di cristallizzazione del solvente (fig.141). Inoltre, la dimensione media dei pori variabile tra 20 e 150 µm, di gran lunga inferiore alla dimensione dei pori realizzati mediante PI/SL, non risulta indicata alla rigenerazione del tessuto osseo ma, con riferimento a molteplici studi del settore presenti nella letteratura scientifica internazionale [59][60], il suo impiego risulta potenzialmente proficuo per la rigenerazione di tessuti costituiti

da cellule di altra natura aventi dimensioni ridotte (es. fibroblasti, endoteliali) nonché per il differenziamento di cellule mesenchimali e staminali.



Figura 141: Morfologia ladder-like in scaffold realizzati per separazione TIPS

Infine, l'analisi morfologica di scaffold realizzati secondo la tecnica di compattazione MIMS, mostrano un minore grado di porosità ed una ridotta omogeneità di distribuzione spaziale dei pori rispetto alle altre tecniche realizzate con una dimensione media dei pori di circa 200 µm, frutto della parziale fusione alla temperatura prossima all'incipiente fusione del polimero (55°C) di microsfere delle dimensioni 300-500 µm. D'altra parte, i tempi, inevitabilmente lunghi, richiesti dalla messa a punto delle tecniche di realizzazione delle microsfere e soprattutto le difficoltà associate alla stabilizzazione della temperatura all'interno del sistema con la presenza di enormi discontinuità strutturali tra regioni prevalentemente fuse (collocate nelle zone periferiche) e regioni integre (collocate nelle regioni centrali dello scaffold) non hanno permesso ancora di stilare un protocollo definitivo di preparazione (temperatura, tempo di compattazione, pressione). L'analisi morfologica qualitativa è stata integrata da un attento studio della porosità strutturale che, mediante l'ausilio di diverse metodologie di indagine (metodo gravimetrico, analisi di immagini 2D, porosimetria ad intrusione di mercurio) ha permesso di valutare quantitativamente, con diverso grado di accuratezza, i



principali requisiti strutturali di tutte tipologie di substrato proposte.

Figura 142: Grado di porosità medio al variare della tecnica di preparazione.

In particolare, le tecniche di phase inversion/salt leaching (PI/SL) e di separazione di fase (TIPS) hanno evidenziato, complessivamente, un grado di porosità strutturale medio circa del 90% a fronte di una porosità del 47% nel caso di scaffold ottenuti per pseudosinterizzazione MIMS.

Nel caso di scaffold realizzati per salt leaching il grado di porosità riscontrato (95%) risulta coerente con la frazione volumetrica di NaCl utilizzata (91%). Lo scarto percentuale tra il valore sperimentale ed il valore teorico risulta imputabile alla presenza della S-macroporosità originata dall'estrazione del solvente per inversione di fase. Inoltre, la presenza di sistemi in grado di bioattivare la struttura come l'idrossiapatite o l'Hyaff11 non determina una significativa alterazione della porosità del sistema con una riduzione del grado di porosità circa del 2% nel caso di compositi PCL/Hyaff11 e circa del 3% nel caso di compositi PCL/HA. le fibre di acido polilattico determinano invece una riduzione più significativa del grado di porosità dell'ordine del 10% mentre la presenza di fosfato tricalcico non sembra incidere in maniera rilevante sulla porosità del sistema, complessivamente più bassa in relazione all'utilizzo di una frazione volumetrica di NaCl inferiore (82%).



Figura 143: Effetto della carica di segnali bioattivi e biocompatibilizzanti sul grado di porosità di scaffold realizzati mediante PI/SL

Figura 144: Effetto dei sistemi di rinforzo (fibroso e particellare) sul raggio medio dei pori di scaffold realizzati mediante PI/SL

Infine una superficie specifica dei pori di circa 0.5 m²/g, crescente in funzione dell'ammontare di segnale bioattivo impiegato (HA), incrementa la densità teorica di adesione degli osteoblasti. Assumendo, infatti, che la superficie ricoperta da un osteoblasta sia circa di 700 μ m² (diametro di circa 30 μ m [163]), lo scaffold presenta, da un punto di vista morfologico in relazione alla superficie specifica dei pori, una capacità di adesione di circa 2.5×10⁹ osteoblasti per cm³. (Per ipotesi, si è assunto che le superfici siano ricoperte da un solo strato cellulare mentre è stato trascurato l'ulteriore superficie derivante dalla formazione di

matrice extracellulare da parte delle cellule). Un valore di densità cellulare così elevato costituisce una indicazione promettente, anche se al momento solo teorica, per un'efficace rigenerazione tissutale.

Nel caso di separazione di fase TIPS, gli scaffold realizzati hanno mostrato un grado di porosità elevato (80-95%), fortemente variabile con la concentrazione del sistema polimero/solvente, la temperatura di raffreddamento nonché le modalità di estrazione del solvente (Fig.145).



Figura 145: Grado di porosità al variare della concentrazione, delle modalità di raffreddamento e di estrazione del solvente in scaffold realizzati mediante separazione TIPS.

La dimensione media dei pori, stimata mediante elaborazione via software delle immagini ottenute al microscopio a scansione elettronica, risulta essere fortemente influenzata dalla tecnica di preparazione: complessivamente si riscontra un raggio medio dei pori di 110 μ m nel caso di PI/SL, di 38 μ m nel caso di TIPS ed infine di circa 90 μ m nel caso di MIMS (Fig.146).



Temperatura di raffreddamento

Figura 146: Raggio medio dei pori al variare della tecnica di preparazione

Figura 147: Separazione TIPS Raggio medio dei pori al variare dei metodi di'estrazione del solvente

La dimensione media dei pori risulta ovviamente condizionata dai parametri termodinamici legati alla preparazione ed in particolar modo dalla cinetica del processo: il raggio medio dei pori varia da circa 60 µm a 35 µm al crescere del sottoraffreddamento imposto (da 4°C a -18°C) e della velocità di raffreddamento a parità di concentrazione del sistema PCL/diossano. Tali differenze nelle dimensioni dei pori determinate dalla cinetica di raffreddamento risultano essere più evidenti nel caso di substrati ottenuti mediante estrazione sottovuoto del solvente (fig.147). Ciò dipende dal fatto che l'estrazione sottovuoto avviene alla temperatura di 12°C prossima alla temperatura di fusione del solvente e non alla temperatura di raffreddamento: tale incremento di temperatura risulta determinante sulla morfologia del sistema in quanto provoca un parziale rimescolamento tra solvente e polimero alle zone d'interfaccia con un aumento complessivo delle dimensioni delle fasi disperse.

Infine, il confronto delle risposte meccaniche delle diverse tipologie di scaffold, realizzato mediante test a compressione statica, ha consentito di delineare una previsione del comportamento meccanico dei substrati durante le fasi di impianto e pertanto verificare la compatibilità funzionale delle strutture realizzate.

I costrutti porosi realizzati mediante tecniche PI/SL e TIPS presentano un andamento a compressione tipico delle schiume polimeriche (fig.148) caratterizzato da tre tratti caratteristici: un tratto lineare per piccolissime deformazioni relativo a un comportamento elastico lineare della struttura, un secondo tratto a pendenza circa costante in un ampio range di deformazione (*platean post-toe tegion*), relativo alla risposta offerta dalle trabecole tra pori adiacenti ed, infine, un ultimo tratto, nuovamente crescente, relativo alla risposta della struttura totalmente densificata a seguito del collasso strutturale della porosità [145].



Figura 148: Caratteristica curva a compressione di una schiuma polimerica [145].

In questa sede sono stati presi in esame i moduli elastici in prossimità della Toe region in quanto interessati alla risposta meccanica della struttura prima del collasso della porosità. Si osserva che, nel caso di strutture MIMS, invece, la curva risulta essere caratterizzata da due plateau distinti: per piccolissime deformazioni, un primo plateau relativo al riarrangiamento spaziale di microsfere non completamente fuse in superficie, mentre per deformazioni più elevate un ulteriore plateau relativo alla risposta dei colletti formatisi a seguito della parziale fusione superficiale delle microsfere.

Anche in relazione a tali differenze, la risposta meccanica delle strutture realizzate con tecnica MIMS risulta circa due ordini di grandezza superiore rispetto alle strutture realizzate con tecnica PI/SL e circa un ordine di grandezza maggiore rispetto alle strutture realizzate mediante TIPS (Fig.149). Tale comportamento è intimamente legato alla morfologia dei sistemi considerati caratterizzati, in primo luogo, da un grado di porosità significativamente più basso (circà la metà) rispetto agli scaffold realizzati mediante le altre due tecniche di preparazione discusse.



Figura 149: Modulo elastico al variare della tecnica di preparazione.

In questa sede, l'attenzione è stata focalizzata principalmente sugli scaffold realizzati mediante PI/SL in quanto caratterizzati dai requisiti morfologici più adeguati all'ingegneria dei tessuti. In tal senso, sono stati selezionati materiali biocompatibili in qualità di sistemi di rinforzo strutturale al fine di migliorare la risposta meccanica dei costrutti realizzati, altrimenti ben al di sotto delle aspettative richieste dall'applicazione.

L'aggiunta di segnali bioattivi (idrossiapatite) e biocompatibilizzanti (Hyaff11) alla matrice polimerica produce una contenuta riduzione della risposta meccanica ed in particolare del modulo elastico del 10-20% (fig.150).



Figura 150: Modulo elastico di scaffold PI/SL in presenza di segnali bioattivi o biocompatibilizzanti

Figura 151: Modulo elastico di scaffold PI/SL al variare del sistema di rinforzo utilizzato.

Inoltre, la presenza di un sistema di rinforzo fibroso a base fibre di acido polilattico ed ancor più di un sistema di rinforzo particellare a base di fosfato tricalcico fornisce un significativo incremento del modulo elastico fino a due ordini di grandezza rispetto al caso non rinforzato (fig.151).

Si osserva che i meccanismi di rinforzo offerti dai due sistemi sono sostanzialmente diversi. Nel primo caso il rinforzo offerto dalle fibre di acido polilattico risulta determinato principalmente dalla disposizione spaziale delle fibre oltre che dalle proprietà intrinseche dei materiali costituenti la fibra e la matrice. A seguito della sollecitazione a compressione, le fibre, disposte in maniera circonferenziale (a sviluppo elicoidale con asse il mandrino), sorreggono la matrice fino a quando la sollecitazione esercitata non supera la tensione della fibra, preventivamente imposta durante le fasi di processo, fino all'inevitabile sua rottura. Ne consegue che, in questo caso, sono del tutto assenti fenomeni di svergolamento o buckling delle fibre tipici di sistemi compositi caratterizzati da fibre di rinforzo distribuite nella matrice in direzione uniassiale.

Al contrario, il rinforzo offerto dai cristalli di fosfato tricalcico è principalmente di natura chimicofisica in quanto scaturisce dalla trasformazione chimica subita dalla forma cristallina globulare dell'α-TCP nella forma cristallina *needle-like* dell'idrossiapatite povera di calcio (CDHA). Durante le fasi di accrescimento, i cristalli aghiformi di CDHA interagiscono fisicamente tra loro, intrecciandosi all'interno della matrice irrobustendo complessivamente la struttura.

I risultati sperimentali ottenuti sono stati validati dal modello matematico proposto, ampiamente utilizzato per la simulazione del comportamento meccanico di schiume polimeriche che identifica ciascun poro dello scaffold in una cella cava assimilabile ad una trave sollecitata a flessione, descrivendo esaustivamente sia il comportamento a compressione che il comportamento a trazione dello scaffold (i valori del modulo elastico E_C ed E_T sono stati calcolati solo nel caso di scaffold in PCL realizzato mediante PI/SL privo di sistemi di rinforzo).

Riassumendo, dallo studio morfofunzionale è emerso che ad una elevata potenzialità dei substrati realizzati per phase inversion/salt leaching dal punto di vista morfologico corrisponde una risposta meccanica ancora insufficiente per l'applicazione nell'ingegneria del tessuto osseo. D'altra parte, non va dimenticato che il modulo elastico, considerato per analizzare il comportamento meccanico dello scaffold, descrive solo parzialmente la risposta meccanica dello scaffold in quanto non tiene conto del contributo, assolutamente non trascurabile, offerto dalla pressione idrostatica esercitata dai fluidi biologici che l'attraversano.

In altri termini, appare riduttivo lo studio dei costrutti senza considerare l'azione dei fluidi biologici in quanto è dimostrato che le condizioni fluidodinamiche imposte sono in grado di influenzare sia i principali meccanismi cellulari che la risposta alle sollecitazioni meccaniche.

In questa direzione, è stato approntato in collaborazione con i biologi un protocollo di semina e di coltura in vitro di osteoblasti avvalendosi di un dispositivo appositamente realizzato in grado di riprodurre le condizioni fluidodinamiche desiderate del mezzo di coltura (*semina dinamica*).

La curva di taratura per la semina cellulare, costruita mediante analisi allo spettrofluorimetro, ha consentito di identificare il numero ottimale di cellule (2.5 10⁵ cellule) per una semina efficiente mentre test di vitalità cellulare (*Alamar Blue*) hanno permesso di stimare la maggiore efficienza della semina dinamica rispetto alla semina statica con il 67% di cellule vive dopo 24 h dalla semina

Lo stato vitale delle cellule è stato confermato dall'analisi istologica che ha evidenziato una corretta forma cellulare ed una distribuzione omogenea all'interno degli spazi a loro disposizione soprattutto nel caso di semina dinamica e dall'osservazione al microscopio confocale ha consentito di verificare la migliore penetrazione cellulare nel caso di semina dinamica con una prevalenza di cellule vive sulla superficie anche dopo 7 giorni di coltura statica.
7. SVILUPPI FUTURI

7.1 ELETTROSPINNING

La realizzazione di strutture tridimensionali porose in grado di sostituire temporaneamente il tessuto naturale sia da un punto di vista strutturale che da un punto di vista biologico risulta essere alquanto complessa.

Come dimostrano le diverse metologie di realizzazione di scaffold finora riportate (phase inversion/salt leaching, termal induced phase separation o TIPS, melting induced microspheres sintering o MIMS), è molto difficile riuscire a combinare una porosità strutturale elevata, altamente interconnessa, con proprietà meccaniche compatibili con quelle del tessuto osseo naturale ed in particolare dell'osso trabecolare. Tenendo presenti queste finalità, attualmente si sta proponendo l'utilizzo della tecnica dell'elettrospinning per la realizzazione di substrati microporosi e nanoporosi per applicazioni biomediche.

In questa fase preliminare dello studio è stato progettato il dispositivo di prova tenendo presente le problematiche specifiche correlate da un lato, all'applicazione di interesse, e dall'altro, ai materiali impiegati. Successivamente è stata realizzata l'apparecchiatura come schematicamente riportato nel seguito:



Figura 152: Elettrospinning – Schema dell'apparecchiatura

Essa risulta essere costituita da tre parti essenziali:

- 1. una camera di prova
- 2. un generatore di ad alta tensione
- 3. un sistema siringe pump

La camera di prova è l'ambiente all'interno del quale si realizza lo scaffold per deposizione di fibre polimeriche di dimensioni micrometriche e nanometriche a seguito dell'azione di un campo elettrico ad alta tensione applicato tra due elettrodi. Essa contiene al proprio interno una siringa dotata di un ago in acciaio del diametro interno di 1mm collegato al polo positivo del generatore di tensione che costituisce l'elettrodo positivo (*catodo*).

La siringa può scorrere liberamente in direzione orizzontale grazie all'ausilio di un binario lungo una delle sue pareti che consente di regolare la sua distanza dall'elettrodo negativo (*anodo*) costituito da un piatto di rame dello spessore di circa 2mm posizionato sul fondo della camera.

L'insieme di questi elementi viene collocato all'interno di un contenitore in plexiglass avente pareti dello spessore di circa 5mm che assicurano da eventuali scariche dalle elevate tensioni di prova all'interno del dielettrico indotte, a seguito di valutazioni compiute sulla rigidità dielettrica dell'aria e del polimero impiegato.

La camera di prova presenta, poi, alcuni accorgimenti legati alla specifica applicazione. Ad esempio, il piatto di rame che agisce da anodo è stato dotato di un cestino di raccolta in materiale conduttore per favorire la deposizione e la raccolta delle fibre impedendo fenomeni di coesione e ridistribuzione della matrice all'interno della struttura indotti dal contatto diretto con il solvente.

Sul fondo della camera è stata inoltre collocata una vaschetta che permette la raccolta del solvente che, a seguito della formazione della fibra durante la prova, si separa dal polimero per l'azione di stiro esercitata su di essa dalla tensione applicata. Il sistema è poi corredato di un **generatore ad alta tensione** (*mod. ES30P*) avente una potenza di 5W ed un range di variabilità della tensione tra 1 e 30kV per una corrente di circa 180mA. Esso è costituito da un unico polo, positivo, collegato all'ago della siringa all'interno della camera di prova mentre l'elettrodo negativo viene collegato alla terra dello strumento.

Infine lo strumento è costituito da un **sistema di pompaggio a siringa** il quale consente di regolare la portata volumetrica con cui la soluzione polimerica viene sparata all'interno del catodo.

Il dispositivo, progettato in questa sede, richiede opportune misure di sicurezza per l'operatore che lo utilizza. Tali misure in parte si riferiscono sia alle tensioni elevate sia all'impiego di solventi tossici durante l'applicazione.

Infatti l'applicazione di tensioni dell'ordine dei kV richiede l'utilizzo di guanti in neoprene a norma per la manutenzione interna della camera e di tappetini salvascarica che tutelano l'operatore durante la prova da eventuali scariche del dielettrico. Tutte le operazioni di preparazione della soluzione e di prova devono essere compiute all'interno di una cappa chimica in virtù dell'utilizzo di solventi necessari per la dissoluzione del polimero (es. DMAC) classificati ad alto rischio di cancerogeneità.

A seguito dei molteplici dispositivi di sicurezza richiesti per l'utilizzo dell'apparecchiatura, in questa fase dello studio non sono ancora stati realizzati scaffold in maniera sistematica ma sono state compiute solo alcune prove "*pilota*" al fine di verificare il funzionamento del dispositivo in relazione ai parametri di prova e dei materiali impiegati partendo da studi equivalenti riportati in letteratura [96][97][98][99].

Si riportano, in questo senso, alcune foto relative alla prima prova effettuata al fine di mostrare l'apparecchiatura in tutte le sue parti ed "immortalare" il primo esperimento condotto con successo:



Figura 153: Elettrospinning – Dispositivo di prova: Sulla sinistra il generatore di tensione a cui segue il sistema di pompaggio a siringa ed infine la camera di prova in plexiglass.



Figura 154: Elettrospinning: particolare della camera di prova: sulla sinistra la siringa e l'ago collegato al generatore di tensionementre sulla destra il piatto di rame sul quale avviene la deposizione delle fibre; infine sul fondo la vaschetta di raccolta del solvente.



Figura 155: Particolare della fibra in uscita dall'ago durante la prova.

7.2 BLENDS COCONTINUE BIODEGRADABILI

Nel panorama delle tecniche impiegate per la realizzazione di strutture porose atte a sostituire temporaneamente i tessuti naturali, è possibile identificare alcune tecniche come l'estrusione da fuso polimerico che consente, in opportune condizioni termodinamiche del sistema polimerico scelto (*blend*), di ottenere la morfologia e la microstruttura più adatta al tipo di applicazione di interesse.

In particolare, una blend consiste in una miscela di due o più polimeri strutturalmente differenti, opportunamente mescolati tra loro.

Il sistema, così definito, presenta un comportamento chimico/fisico piuttosto complesso non banalmente riconducibile ai comportamenti delle singole fasi costituenti.

La complessità del sistema, poi, aumenta in relazione alle differenti forme microstrutturali (cristallino, semicristallino, amorfo) che possono manifestarsi all'interno di ciascuna fase, condizionando significativamente le principali proprietà fisico-chimiche del sistema.

In altri termini, la progettazione di una blend polimerica richiede lo studio completo dei singoli componenti e delle loro proprietà d'insieme nonché delle operazioni di processo alle quali il sistema viene sottoposto.

Infatti, a seguito del mescolamento dei due polimeri allo stato liquido, il sistema viene sottoposto a lavorazioni successive a seguito delle quali il sistema mostra una specifica struttura microscopica (*morfologia*) la quale risulta essere determinante nella definizione delle caratteristiche del materiale.

Pertanto, le proprietà fisiche della miscela (meccaniche, ottiche e reologiche) oltre ad essere funzioni della composizione e della natura dei singoli componenti, dipendono in maniera significativa dalla struttura morfologica e dalle relazioni che intercorrono tra di essi in relazione alle condizioni in flusso realizzate durante il processo [146][147].

Nel ampio e vario mondo delle blends polimeriche è possibile in primo luogo distinguere tra sistemi polimerici immiscibili e parzialmente miscibili.

In tal senso è possibile studiare la miscibilità di una blend da un punto di vista termodinamico in modo analogo al caso della separazione di fase di sistemi polimerici sottoraffreddati.

La miscelazione di due polimeri conduce prevalentemente alla definizione di un sistema eterogeneo a seguito di un entropia di miscelazione delle macromolecole estremamente ridotta ($\Delta S_m \rightarrow 0$) con la formazione di due fasi immiscibili le cui caratteristiche sono dipendenti dalla temperatura, dalla pressione e dalla composizione del sistema.

D'altra parte, le interazioni di natura solitamente repulsiva tra i gruppi lungo le catene polimeriche determinano un contributo entalpico di miscelazione ΔH_m positivo che addizionato al ridotto contributo entropico comporta un energia libera di miscelazione positiva che definisce una condizione di immiscibilità del sistema polimerico ($\Delta G_m > 0$).

Alla luce delle precedenti valutazioni termodinamiche le blends polimeriche vengono classificate come segue:

- a) <u>blends di polimeri omologhi</u> (solitamente lo stesso polimero con distribuzione molecolare molto stretta);
- b) <u>blends di polimeri miscibili</u> caratterizzati da interazioni dei gruppi di catena di natura attrattiva ($\Delta H_m < 0$);
- c) <u>blends di polimeri immiscibili</u> caratterizzati da contributi termodinamici tali da verificare la condizione di immiscibilità:

$$\Delta G_m \ge \Delta H_m - T \Delta S_m$$

La morfologia della miscela polimerica oltre ad essere influenzata dalle condizioni termodinamiche del sistema (*caso statico*), risulta fortemente dipendente dalle condizioni di flusso durante il processo di preparazione (*caso dinamico*). In particolare, la forma, le dimensioni e l'orientazione delle singole fasi sono regolate dalle velocità di scorrimento imposte in grado di incidere significativamente sulle proprietà meccaniche e reologiche del sistema.

In generale, la morfologia di una blend immiscibile <u>in condizioni statiche</u> (assenza di flusso) può essere di due tipi:

Morfologia globulare: per concentrazioni relativamente basse di una delle due fasi rispetto all'altra, per motivi termodinamici, il sistema formerà delle gocce di tale fase (*fase dispersa*) omogeneamente distribuite nell'altra (*fase disperdente*) in modo del tutto analogo ai meccanismi di separazione delle fasi indotte da un rapido sottoraffreddamento (*quenching*).

Morfologia cocontinua: per concentrazioni prossime al 50% delle due fasi non è più facilmente distinguibile una fase dispersa ed una fase disperdente. In altri termini la spinta termodinamica che determina la formazione di una fase dispersa in una fase disperdente è la stessa per entrambi i polimeri. Ne consegue che la struttura mostra una totale compenetrazione delle due fasi e la concentrazione delle fasi alla quale si raggiunge una morfologia cocontinua viene detta *punto di inversione* o *di cocontinuità* della blend.

<u>In condizioni dinamiche</u> invece, a seguito delle condizioni di flusso imposte, la morfologia della blend subisce modifiche significative secondo le seguenti modalità:

a) Le condizioni di flusso imposte possono essere tali da non indurre deformazioni delle gocce le quali conservano la loro morfologia sferoidale (morfologia globulare).

b) Variando delle condizioni di flusso, in particolare al crescere degli shear rate imposti, le gocce disperse all'interno della fase disperdente cominciano a deformarsi evolvendo verso strutture di tipo fibrillare o stratificato fino raggiungere la rottura formando gocce di dimensioni più piccole.

Un indicazione analitica per lo studio della morfologia di una blend polimerica in funzione delle proprietà intrinseche del sistema e delle condizioni in flusso del fuso polimero durante il processo di preparazione è ottenuto attraverso un parametro adimensionale detto numero capillare o **numero di Weber**:

$$Ca = \frac{R \, \gamma \eta_m}{\sigma}$$

dove R è il raggio medio della fase dispersa, γ è lo shear rate ed è legato alle proprietà del flusso, η è la viscosità della fase disperdente e σ indica la tensione superficiale all'interfaccia tra le fasi.

Riassumendo, la morfologia della blend risulta fortemente condizionata dal rapporto di viscosità dei due componenti: alti rapporti di viscosità spingono verso fasi disperse a viscosità molto più bassa (bolle di gas) o molto più alta (gocce solide) della viscosità della matrice che conserveranno in flusso la loro forma sferica mentre rapporti prossimi all'unità portano ad ottenere fasi disperse facilmente deformabili. E' possibile definire una condizione di cocontinuità della blends che stabilisce una relazione tra le frazioni volumetriche ed il rapporto di viscosità:

$$\frac{\eta_1(\gamma)}{\eta_2(\gamma)} \approx \frac{\phi_1}{\phi_2}$$

In particolare, in condizioni statiche le viscosità dei due componenti possono considerarsi indipendenti dallo shear rate γ e pertanto la condizione di continuità diviene semplicemente:

per bassi
$$\gamma = \frac{\eta_1}{\eta_2} \approx \frac{\phi_1}{\phi_2}$$

Il primo passo per poter studiare il comportamento di una blend è quello di valutare il comportamento di ciascun componente e di conseguenza trovare delle leggi teoriche o semiempiriche in grado di approssimare il comportamento sperimentale della blends. In questa direzione è stata condotta una caratterizzazione termica e reologica dei polimeri utilizzati.

i) Analisi Calorimetrica differenziale:

Al fine di valutare la compatibilità termica dei due polimeri è stata effettuata un'analisi calorimetrica differenziale mirata a valutare la temperatura di fusione dei due polimeri.

	PCL	PEO
$\Delta H_{f}(J/g)$	85.9	196.7
Т _f (°С)	58.5	59.3

Tabella 62: Temperatura e calore di Fusione di PCL e PEO

Si osserva che i due polimeri mostrano una temperatura di fusione intorno ai 60°C: tale temperatura può essere scelta come temperatura di processo per l'estrusione della blends senza incorrere in problemi di incompatibilità termica (es. shock termici) tra i due polimeri.

Inoltre, la presenza di due entalpie di fusione molto diverse, circa una doppia dell'altra, implica ridotte interazioni tra i gruppi molecolari dei due polimeri il che definisce una condizione favorevole alla separazione ed alla cocontinuità delle due fasi polimeriche.



Figura 156: Analisi DSC – temperatura di fusione e calore di fusione del PCL e del PEO

ii) Caratterizzazione reologica:

Al fine di ottimizzare le condizioni di processo è stata effettuata una caratterizzazione reologica dei materiali polimerici costituenti la blend in modo da valutare le differenze in termini di viscosità. In quest'ottica sono stati realizzati i seguenti test reologici per i due componenti:

Geometria del campione		Amplitude Strain Sweep Test		Dynamic Frequency Sweep Test	
diametro	25mm	Gap (mm)	0.95	strain	1.0
spessore	1mm	ω (hz)	1	T(°C)	100
16 hz	100 r/s	T(°C)	100	Modalità	Sweep
		Modalità	sweep	ω_{in} (hz)	0.1
		ε _{in}	0.1	ω_{fin} (hz)	10
		$\epsilon_{\rm fin}$	30	Punti decade	6
		Punti decade	6		





Figura 157: Amplitude Strain Sweep Test



STEADY RATE SWEEP TEST				
T(°c)	100	80	120	
Modalità	sweep log	Sweep log	sweep log	
V iniz	0.062	0.062	0.062	
V fin.:	100	100	100	
P. decade	6	6	6	
Raccolta dati	Tempo	Tempo	Tempo	
Attesa	10 sec	10 sec	10 sec	
Tempo	40 sec	40 sec	40 sec	
Direzione:	Oraria	Oraria	Oraria	
Direz.Mis	1	1	1	

Tabella 64: Parametri di prova

Per definizione un fluido è newtoniano se la viscosità η risulta costante con il γ , mentre è pseudoplastico se la viscosità η decresce con il γ .

Inoltre, valori non nulli dei parametri G' e G", rispettivamente componente elastica e viscosa della risposta del materiale, ricavate dallo sweep in frequenza, indicano che il materiale è viscoelastico.

Dalle prove fatte si evince una riduzione della viscosità del materiale al crescere della temperatura come intuitivamente era prevedibile.

In particolare, dall'analisi della viscosità in funzione dello shear rate a tre differenti temperature si osserva un fenomeno inconsueto maggiormente evidente a basse temperature (T=80°C): dopo un lungo tratto a viscosità costante per bassi γ (comportamento newtoniano), si osserva un andamento decrescente indicativo, apparentemente, di un comportamento pseudoplastico (*shear tinning*).



Figura 159: Curve di viscosità vs. shear rate del Figura 160: viscosità al variare della temperatura PCL:

L'analisi del momento torcente agente sui due piatti dello strumento di prova ha dimostrato in corrispondenza del cambio di pendenza della curva di viscosità, un massimo della torque seguito da tratto decrescente della curva (fig.161) e ciò non è possibile in quanto il momento torcente è funzione monotona strettamente crescente al crescere dello shear rate.

Cio' vuol dire allora che per γ troppo elevati il materiale scivola lungo i piatti determinando una riduzione del momento torcente che, di conseguenza, comporta la lettura di una caduta della viscosità del materiale.

A conferma di ciò l'analisi dinamica di G' e G" ottenuta mediante l'applicazione della Cox-Mertz ha dimostrato che, anche per elevati γ , la viscosità non diminuisce; ciò consente di affermare che il PCL analizzato risulta essere un fluido viscoelastico newtoniano.



Figura 161: Curva viscosità vs shear rate: interpretazione della curva in relazione all'andamento del momento torcente.

Figura 162: Curve di viscosità vs. shear rate del PCL: correzione della curva di viscosità.

La medesima caratterizzazione reologica è stata effettuata sul l'altro polimero scelto: il PEO.

Geometria del campione		Amplitude Strain Sween Test		Dynamic Frequency Sween Test	
diametro spessore 16 hz	25mm 1mm 100 r/s	$\begin{array}{c} \text{Gap (mm)} \\ \omega (hz) \\ \text{T(°C)} \\ \text{Modalità} \\ \varepsilon_{\text{in}} \\ \varepsilon_{\text{fin}} \\ \text{Punti decede} \end{array}$	0.39 1 80 sweep 0.1 30	strain T(°C) Modalità ω_{in} (hz) ω_{fin} (hz) Punti decade	5.0 100 sweep 0.1 10 6

Tabella 65: Parametri di prova



PEO - Mw: 100000



Figura 163: Amplitude Strain Sweep Test

Figura 164: Dynamic Frequency Sweep Test

Dall'analisi in frequenza, si osserva che il materiale risulta viscoelastico caratterizzato da una componente viscosa G" lievemente superiore a quella elastica G'.

Dalle prove di viscosità si riscontra che il materiale analizzato alle diverse temperature (80°C, 100°C, 120°C) non presenta alcun plateau indicativo di un comportamento da fluido newtoniano.

In particolare, da una prima valutazione, il comportamento sembra essere non newtoniano pseudoplastico in quanto la viscosità risulta essere decrescente con lo shear rate. Da un'analisi più attenta, il comportamento risulta più complesso in quanto, nella zona di shear thinning, la curva mostra un cambio di pendenza intorno ad 8 s⁻¹ che richiede indagini ulteriori.

STEADY RATE SWEEP TEST				
$T(^{\circ}c)$	100	80	120	
Modalità	sweep log	Sweep log	sweep log	
V iniz	0.062	0.062	0.062	
V fin.	100	100	100	
P. decade	6	6	6	
Raccolta dati	Tempo	Tempo	Tempo	
Attesa	10 sec	10 sec	10 sec	
Tempo	40 sec	40 sec	40 sec	
Direzione:	Oraria	Oraria	Oraria	
Direz.Mis	1	1	1	

Tabella 66: Parametri di prova



Figura 165: Curve di viscosità vs. shear rate del PEO

iii) Comportamento reologico della blends: Modello teorico

Nell'ottica di voler realizzare una blend costituita dai due polimeri attraverso un processo di estrusione mediante Minicompounder (*Haake minilab - Thermo Electron*) con i due polimeri precedentemente analizzati, la caratterizzazione reologica svolta ha lo scopo di fornire un'indicazione sui parametri di processo che, in linea teorica, possano ottimizzare la microstruttura al fine di ottenere una cocontinuità del sistema polimerico. In particolare, il PCL mostra una viscosità più elevata (almeno di un ordine di grandezza) rispetto al PEO per tutte le temperature considerate.

Pertanto, per soddisfare la condizione di cocontinuità sarà necessario realizzare una blend caratterizzata da una frazione volumetrica di PCL maggiore rispetto al volume di PEO.

Inoltre, supponendo con elevata probabilità la non linearità nel comportamento reologico della blend è molto importante impostare un opportuno shear rate che consenta di assumere lineare il comportamento del sistema.

In quest'ottica, dall'analisi dei comportamenti reologici dei singoli componenti (PCL e PEO) per shear rate intorno ai 5 s⁻¹ il policaprolattone mostra un comportamento newtoniano (viscosità costante) secondo una legge del tipo:

$$\eta_1 = K$$

Mentre il poliossietilene mostra una viscosità decrescente con pendenza circa costante tale da poter assimilare tale andamento a quello di una legge di potenza descritto dalla seguente relazione:



Figura 166: Comportamento PCL-like

Figura 167: Comportamento PEO-like

In prima approssimazione è possibile prevedere teoricamente il comportamento della blend attraverso una relazione viscosità/shear rate ottenuta dalla combinazione lineare dei due contributi relativi ai singoli materiali pesati con le relative frazioni volumetriche secondo la seguente legge:

$$\eta = \eta_1 \phi_1 + \eta_2 \phi_2 = k \phi_1 + \frac{c}{\left[\left(\frac{1}{b}\right) + a \cdot \gamma^b\right]} \phi_2 \qquad \qquad \begin{array}{l} \dot{\gamma}[s^{-1}] = [0.1,5] \\ K = 2182 \\ a = 0.884 \\ b = 0.653 \\ c = 13331 \end{array}$$

Il primo termine costante è riferito al PCL (*comportamento Newtoniano*) mentre il secondo termine è relativo al PEO (*comportamento pseusoplastico a legge di potenza*). Si ricorda che la legge trovata descrive approssimativamente il comportamento della blends, in quanto si fonda sull'ipotesi abbastanza forte, di aver assunto il comportamento della blend come combinazione lineare dei comportamenti dei singoli componenti (**ipotesi di linearità della blend**).

CONCLUSIONI

L'attività di ricerca sviluppata in questo lavoro di tesi è stato rivolta alla definizione ed all'ottimizzazione di tecniche innovative per la realizzazione di scaffold tridimensionali in grado di integrarsi in tempi brevi con l'ambiente fisiologico in cui vengono inseriti sostituendo sia da un punto di vista biologico che da un punto di vista biomeccanico il tessuto osseo naturale.

La prima fase del lavoro è stata dedicata principalmente alla progettazione dei substrati mediante differenti tecniche e metodiche di preparazione quali la tecnica del salt leaching in combinazione con un'inversione di fase determinata dalla presenza di un non solvente, la separazione di fase indotta dalla temperatura (*TIPS*) e la pseudo-sinterizzazione per fusione (MIMS) di microsfere ottenute per emulsione.

Nel caso dei substrati realizzati mediante salt leaching si è proceduto all'ottimizzazione dei molteplici parametri caratterizzanti i materiali e la loro preparazione. In particolare, con l'ausilio di strumentazioni per l'indagine morfologica (*microscopio a scansione elettronica, porosimetro ad intrusione di mercurio, etc*), sono stati valutati gli effetti indotti dai parametri legati alla preparazione del sistema (PCL/DMAC/NaCl) come l'ammontare relativo delle singole fasi costituenti il sistema (polimero/solvente/agente porogeno), la dimensione dei cristalli di NaCl impiegati (150-212, 212-300, 300-500), dal peso molecolare del polimero (10 o 65 kDa) nonchè dai parametri associati al processo di realizzazione (temperatura, precompressione, aggiunta di sale sul fondo) sulla morfologia del substrato.

Le strutture ottenute hanno mostrano un elevato grado di porosità (superiore al 90%), alta interconnessione dei pori con una dimensione media di circa 200-300µm ottimale per la semina e la coltura in vitro di osteoblasti [6][59]. Inoltre, l'elevato rapporto superficie/volume dei pori consente di accomodare un enorme numero di cellule indispensabile per il ripristino funzionale dei tessuti influenzando favorevolmente la migrazione cellulare ed il signaling intracellulare.

L'utilizzo combinato di un terzo componente, non solvente per il polimero, ha consentito la formazione, per inversione di fase, di una ulteriore porosità all'interno della struttura, delle dimensioni di circa 1-10 μ m in grado di garantire un efficace trasporto dei metaboliti necessari al sostentamento cellulare nonchè il rilascio controllato di molecole di piccole dimensioni (fattori di crescita, antibiotici, etc.).

La compatibilità biologica dei substrati, già garantita dall'impiego del policaprolattone caratterizzato da spiccate doti di biocompatibilità e da opportuni tempi di degradazione, è stata ottimizzata integrando alla matrice polimerica segnali bioattivi di natura ceramica (*idrossiapatite*) o polimerica (*Hyaff11*) i quali contribuiscono ad incrementare il potere osteoconduttivo e, complessivamente, la compatibilità biologica dei substrati favorendo i meccanismi di migrazione ed adesione cellulare nonchè accelerando i processi biomimetici del tessuto osseo naturale.

La risposta biologica dei substrati, realizzati in solo PCL mediante phase inversion/salt leaching, è stata verificata qualitativamente mediante procedure di semina statica e dinamica a 7 giorni per la valutazione dell'adesione e della proliferazione di osteoblasti attraverso un semplice dispositivo a perfusione del mezzo di coltura, costruito ad hoc.

La compatibilità strutturale con il tessuto osseo è stata realizzata parzialmente mediante sistemi di rinforzo fibroso a base di fibre polimeriche di acido polilattico integrate alla matrice mediante tecniche convenzionalmente impiegate per la realizzazione di materiali compositi (*filament winding*), e sistemi di rinforzo particellare a base di polveri ceramiche di fosfato di calcio nella forma di α -TCP. L'impiego congiunto dei due sistemi di rinforzo ha consentito un incremento della risposta meccanica della struttura porosa fino a due ordini di grandezza rispetto al caso non rinforzato meccanicamente anche se i valori meccanici raggiunti risultano ancora al di sotto di quelli richiesti per la sostituzione del tessuto osseo naturale.

Il principale limite delle strutture realizzate mediante la tecnica del salt leaching resta la ridotta omogeneità di distribuzione spaziale dei pori determinata dal controllo, solo parziale, della dispersione dei cristalli di cloruro di sodio all'interno della matrice.

In quest'ottica sono state ottimizzate altre due tecniche finalizzate ad ottenere un maggiore controllo della porosità strutturale in termini di dimensione e di distribuzione spaziale dei pori.

La tecnica di separazione di fase termicamente indotta (TIPS) ha consentito di ottenere strutture tridimensionali ad elevato grado di porosità mediante l'applicazione di un raffreddamento ΔT al di sotto della temperatura di intorbidimento (*cloud point*), caratteristica del sistema polimero/solvente considerato, e la successiva eliminazione del componente maggiormente volatile. La modulazione dei parametri connessi alla geometria del sistema (es. spessore), ed alle fasi di separazione (temperatura e velocità di raffreddamento) e di estrazione del solvente (vacuum extraction, freeze dipping) ha permesso un

controllo accurato della forma, della dimensione nonchè della distribuzione spaziale dei pori. In particolare l'eliminazione del solvente mediante l'immersione del sistema binario in un terzo componente non solvente per il polimero (*freeze dipping*) in grado di favorire la separazione del polimero dal solvente in maniera più controllata grazie ad un processo di inversione di fase "a freddo", garantisce un maggiore controllo della porosità all'interno della struttura rispetto alla tradizionale tecnica di estrazione sottovuoto del solvente (*vacuum extraction*).

La tecnica di pseudo sinterizzazione per fusione (MIMS) di microsfere in PCL ottenute per emulsione (singola e multipla), parimenti, ha consentito la realizzazione di strutture a porosità controllata. Infatti, la porosità che trae origine dagli interstizi formatisi della parziale compenetrazione di microsfere adiacenti dettata dalla incipiente fusione degli strati polimerici più esterni, risulta essere modulabile nella forma e nelle dimensioni in relazione alla dimensione delle particelle utilizzate nonché delle condizioni di processo imposte (*temperatura, tempo di pseudo-sinterizzazione*). In particolare, le strutture MIMS mostrano una ridotta porosità totalmente interconnessa ed omogeneamente distribuita che ricopre soltanto il 45% del volume complessivo del campione a fronte di una risposta meccanica significativamente più elevata, fino a due ordini di grandezza rispetto a scaffold ottenuti mediante le tecniche di phase inversion/salt leaching.

Infine, esse presentano l'ulteriore vantaggio di incapsulare molecole di piccole dimensioni (*antibiotici, fattori di crescita*) all'interno di sacche (*depot*) presenti nelle microsfere che costituiscono lo scaffold, ottenute mediante il processo di emulsione multipla, favorendo il rilascio controllato dei drugs per la cura mirata di patologie insorte localmente nel sito d'applicazione dello scaffold.

Le prospettive future del lavoro di ricerca sviluppato durante questo triennio sono molteplici e sono rivolte a diversi settori della ricerca sia di natura strettamente ingegneristica che di natura biologica:

In primo luogo, la valutazione della risposta biologica *in vitro* delle diverse strutture progettate risulta una priorità essenziale al fine di poter procedere ad una successiva fase di produzione e distribuzione dei prodotti su larga scala (*scale up*). Attualmente, uno studio delle procedure di semina e di coltura in vitro è in atto in collaborazione con alcuni biologi del gruppo IOR (*Istituti Ortopedici Rizzoli - Bologna*) dal quale sono emersi risultati preliminari incoraggianti circa la compatibilità in vitro di alcuni dei substrati realizzati. Fino a questo momento sono stati effettuati prevalentemente studi tradizionali (es. semina e coltura statica) ma si auspica, nel prossimo futuro, uno studio della risposta cellulare in presenza di una stimolazione meccanica dei substrati direttamente nel mezzo di coltura mediante l'utilizzo di un dispositivo di nuova concezione (*bioreattore*), in

dotazione presso i laboratori dell'IMCB *(Istituto dei materiali compositi e Biomedici),* in grado di produrre gli stati di sollecitazione tensionali e/o torsionali su strutture 3D in ambiente biologicamente controllato.

Parallelamente, presso i laboratori del nostro Dipartimento, è in atto uno studio mirato a valutare le differenze indotte sulla risposta cellulare dalle modalità di semina (*statica o dinamica*); in tal senso è stato realizzato un semplice dispositivo di semina il quale, opportunamente collegato ad un sistema di pompaggio a siringa (*siringe pump*), è in grado di ricreare le condizioni fluidodinamiche desiderate attraverso un rigido controllo della portata di efflusso del mezzo di coltura al suo interno ed il numero di cicli di semina.

Nell'ottica di ricercare ulteriori tecniche altamente innovative per la realizzazione di scaffold tridimensionali per l'ingegneria dei tessuti sono in corso alcuni studi in merito alla possibilità di impiegare la tecnologia dell'elettrospinning, ampiamente utilizzata nel campo delle nanotecnologie, anche in campo biomedico per la realizzazione di strutture porose in grado di ospitare osteoblasti favorendone i meccanismi di adesione e di proliferazione cellulare. Durante questo lavoro di tesi, è stata messa a punto l'apparecchiatura in tutte le sue parti e ne è stato testato il funzionamento attraverso uno studio pilota che ha mostrato le potenzialità della tecnica per la realizzazione di strutture tridimensionali (*woven not woven*) impiegabili proficuamente nell'ingegneria dei tessuti.

Infine, altri studi sono attualmente rivolti alla realizzazione di scaffold porosi per estrusione di blends polimeriche mediante minicompounder. Tale metodologia mostra essenzialmente due punti di forza rispetto a molte altre tecniche impiegate nell'ingegnerizzazione di scaffold tridimensionali: da un lato assicura la totale interconnessione dei pori all'interno della struttura garantita dalla condizione di cocontinuità imposta all'atto dell'accoppiamento dei due polimeri, dall'altro definisce condizioni operative ottimali per l'ottimizzazione della composizione della blend a seguito di ridotte quantità di materiale utilizzato (circa 30/50ml) durante le prove.

APPENDICI

I) SEPARAZIONE DI FASE

La realizzazione di dispositivi in grado di presentare specifici requisiti di porosità strutturale come membrane per emodialisi ed emofiltrazione, filtri per leucodeplezione di emocomponenti, sistemi di immobilizzazione enzimatica e proteica, sistemi a rilascio di farmaci e fattori di crescita, scaffolds per l'ingegneria dei tessuti, fibre cave risulta un aspetto molto importante ai fini dell'applicazione in campo biomedico.

Le tecniche di *separazione ed inversione di fase* consentono di convertire una soluzione polimerica omogenea in un sistema bifase in cui la fase ricca in polimero forma la matrice della membrana, mentre la fase povera in polimero da luogo ai pori. Il fenomeno può essere realizzato inducendo una certa instabilità termodinamica per mezzo di un cambiamento di composizione o di temperatura.

I.a) TECNICHE DI OTTENIMENTO DELLE STRUTTURE POROSE

È possibile distinguere diversi processi che sfruttano i meccanismi di inversione di fase:

1. **Precipitazione per immersione in un controsolvente** (NIPS): tale tecnica e consiste nell'immersione (*dipping*) della soluzione polimerica, preformata in uno stampo (es.disco di petri), in un bagno di coagulazione contenente un non solvente per il polimero (*controsolvente*) o una soluzione di esso. Il polimero precipita per effetto dell'ingresso del non solvente e della contemporanea uscita del solvente dalla matrice polimerica (*Loeb e Sourirajan*).

2. **Precipitazione in fase vapore**: il non solvente, stavolta in fase vapore, penetra nella soluzione polimerica. La soluzione viene saturata rapidamente per evitare l'evaporazione del solvente, altamente volatile, dalla soluzione in modo da evitare la formazione di struttura ad elevata densità.

3. **Precipitazione per evaporazione controllata**: il polimero viene disciolto in una miscela contenente un solvente ed un non solvente. Il primo ad evaporare sarà il solvente a seguito della minore volatilità del non solvente. Ne segue la precipitazione del polimero a seguito del cambiamento di composizione della soluzione.

4. Precipitazione per via termica: il polimero viene disciolto ad alta temperatura in una soluzione di solvente-non solvente e successivamente si

induce un'instabilità termodinamica del sistema attraverso un raffreddamento controllato della soluzione forzando, in tal modo, la precipitazione del polimero.

5. Precipitazione indotta termicamente (TIPS): il polimero viene disciolto ad alta temperatura nel solvente ed in seguito per effetto di un raffreddamento rapido (*quench*)

sfruttando la solubilità del polimero nel solvente con la temperatura si induce la separazione di fase. A questo punto il solvente potrà essere eliminato attraverso l'immersione (dipping) in un non solvente per il polimero.

I.b) DIAGRAMMI DI FASE DI SISTEMI TERNARI

Le metodiche di preparazione di scaffold porosi ottenuti per inversione di fase sono principalmente le seguenti

i) Evaporazione di un solvente volatile da una miscela di due o più componenti.

ii) Aggiunta di un non solvente ad una soluzione polimerica omogenea.

i) Evaporazione di un solvente volatile da una miscela di due o più componenti

Tale tecnica si fonda sull'impiego di una miscela ternaria polimero-solvente-non solvente. Il diagramma ternario (fig I.a), a temperatura costante mostra la completa miscibilità dei tre componenti per un certo intervallo di composizioni del sistema ed una lacuna di miscibilità in cui, invece, il sistema si separa in due fasi distinte.



Figura I-a: Formazione di scaffold per evaporazione del solvente da una miscela ternaria polimero/solvente/non solvente.

In questo caso, quando si verifica l'evaporazione del solvente, la composizione della soluzione si sposta dal punto A al punto B ed il sistema si separa in una fase ricca in polimero (B'), che costituisce la struttura rigida dello scaffold, e in una fase liquida (B'') che riempie i pori dello scaffold stesso.

Tra le due configurazioni del sistema è possibile individuare due configurazioni intermedie: il punto C individua la composizione per la quale il sistema, durante l'evaporazione del solvente già in atto, comincia a smiscelare.

Il punto D invece individua una generica configurazione del sistema nella quale a seguito dell'evaporazione del solvente il sistema separa nelle due due fasi istantanee individuate dalla lacuna di miscibilità per l'attuale concentrazione di solvente.

ii) Aggiunta di un non solvente ad una soluzione polimerica omogenea

In questo caso, la tecnica si fonda sullo studio di un sistema ternario polimero/solvente/non solvente soltanto che in questo caso il sistema binario polimero/solvente viene realizzato in un primo momento e solo successivamente viene aggiunto il non solvente.

Si riporta anche in questo caso il diagramma isotermo del sistema ternario polimero/solvente/non solvente (Fig. I.b).



Figura I-b: Formazione di scaffold per aggiunta di non-solvente ad una soluzione polimerica omogenea

In questo caso si parte da una configurazione del sistema in cui è presente solo polimero e solvente (punto A). L'aggiunta del non-solvente e la contemporanea rimozione del solvente determina una variazione della composizione del sistema lungo la linea A-B. In particolare, a partire dalla configurazione C il sistema incontra la lacuna di miscibilità e comincia a separare in due fasi distinte: una ricca in polimero, rappresentata dai punti sulla parte superiore della lacuna di miscibilità, ed una povera in polimero rappresentata dai punti appartenenti alla porzione inferiore della suddetta curva. Quando lo scambo solvente-non solvente all'interno del sistema sarà ultimato ed il solvente sarà completamente evaporato, il sistema perviene alla configurazione B dove coesistono all'equilibrio le fasi B' e B" rappresentive rispettivamente della fase solida ricca in polimero che costituisce lo scheletro dello scaffold e la fase liquida virtualmente priva di polimero che poi verrà successivamente eliminata per la creazione della porosità interna.

Si osserva che tutti i diagrammi riportati descrivono stati di equilibrio e forniscono informazioni relative alla temperatura e alla composizione alle quali avviene la separazione di fase nonchè al rapporto relativo delle due fasi nella miscela eterogenea.

Al contempo bisogna ricordare che la termodinamica di equilibrio non consente di ottenere alcuna informazione circa la dimensione dei pori in quanto non è in grado di predire le variazioni strutturali che intervengono lungo lo spessore dello scaffold.

Tali parametri sono infatti determinati da effetti cinetici, dipendenti da alcune proprietà del sistema quali la diffusività dei componenti nella miscela, la viscosità della soluzione e i gradienti di potenziale chimico che costituiscono la forza motrice del fenomeno diffusivo [149].

I.c) ASPETTI TERMODINAMICI

Dal punto di vista teorico, lo stato termodinamico di un sistema polimero/solvente/non solvente può essere descritto in termini di energia libera di miscelazione ΔG_m ; attraverso l'equazione di Flory-Huggins sulle soluzioni polimeriche:

$$\frac{\Delta G_m}{RT} = \frac{\varphi_1}{m_1} \ln(\varphi_1) + \frac{\varphi_2}{m_2} \ln(\varphi_2) + \frac{\varphi_2}{m_2} \ln(\varphi_2) + \chi_{1,2} \varphi_1 \varphi_2 + \chi_{1,3} \varphi_1 \varphi_3 + \chi_{2,3} \varphi_2 \varphi_3$$

dove φ_i rappresentano le frazioni volumetriche dei componenti in miscela, m_i sono ottenuti dal rapporto tra volume molare del componente i ed il volume molare del componente di riferimento $\chi_{i,j}$ sono i parametri di interazione tra i componenti in miscela, R è la costante universale dei gas e T è la temperatura.

Tale relazione è frutto della condizione di equilibrio per la separazione liquidoliquido ottenuta imponendo l'uguaglianza dei potenziali chimici delle specie presenti, rispettivamente, nella fase ricca in polimero e povera in solvente e nella fase povera in polimero e ricca in solvente:

$$\mu^l_{\alpha} = \mu^l_{\beta}$$

Pertanto, sostituendo in questa espressione l'espressione del potenziale chimico ricavato per ogni componente mediante l'equazione di Flory-Huggins, è possibile ottenere un sistema algebrico non lineare il quale consente la rappresentazione dell'energia libera in funzione della concentrazione dell'i-esimo componente, noti i parametri di interazione del sistema considerato.

Ricordando che risulta:

$$\left(\frac{\partial \Delta G_m}{\partial n_i}\right)_{T,P} = \mu_i - \mu_i^o$$

ed imponendo la condizione di equilibrio dei potenziali chimici per diverse temperature:

$$\mu^i_{\alpha} = \mu^i_{\beta} \qquad \forall T$$

è possibile ottenere un diagramma temperatura vs. composizione rappresentante la lacuna di miscibilità e le curve binodali e spinodali del sistema considerato.

Nel caso di un sistema a parziale miscibilità, fissate le condizioni di temperatura e pressione (T, P cost) è possibile distinguere tre diversi stati energetici del sistema : a) **Stato stabile**, costituito da una soluzione omogenea in un'unica fase ed espresso dalla diseguaglianza: $\Delta G_m < 0$;

b) **Stato instabile**, quando una soluzione omogenea si separa spontaneamente in due fasi in equilibrio ed è espresso dalla diseguaglianza: $\Delta G_m > 0$;

c) **Stato di equilibrio**, relativo alle composizioni appartenenti alla curva che separa la regione a miscibilità totale dalla lacuna di miscibilità, ed espresso dalla uguaglianza: $\Delta G_m=0$;

Al fine di comprendere meglio alcuni aspetti termodinamicidella separazione di fase di un sistema ternario polimero/solvente/non solvente, ora esposti, è necessario fare alcune considerazioni di carattere generale sulla termodinamica di sistemi parzialmente miscibili.

i) Parziale miscibilità di sistemi binari a basso peso molecolare.

I sistemi liquidi binari possono essere classificati sulla base della completa o parziale miscibilità dei componenti stessi. In particolare, due liquidi, A e B, che combinati in qualsiasi rapporto formino una singola fase, vengono definiti completamente (o omogeneamente) miscibili.

Si parla, invece, di parziale miscibilità quando A e B non sono miscibili in tutte le proporzioni. In questo caso, in un fissato intervallo di rapporti di A e B, la miscela è caratterizzata dalla presenza contemporanea di due fasi liquide non miscibili tra loro.

Ogni fase è costituita da una soluzione satura di uno dei due componenti nell.altro. La solubilità tra due liquidi è funzione della temperatura e, in generale,

aumenta all.aumentare della temperatura (assumendo costante la pressione durante il riscaldamento).

Anche nel caso di sistemi parzialmente miscibili si può verificare una condizione di completa miscibilità quando piccole quantità di A vengono aggiunte a B (o viceversa) fino a raggiungere il cosiddetto limite di solubilità di A in B (alla temperatura di operazione).

Da questo momento in poi, ulteriori aggiunte di A comporteranno la comparsa di due fasi liquide che sono soluzioni sature del componente A in B e del componente B in A. Infine, una sufficiente aggiunta di A riporterà nuovamente il sistema nelle condizioni di singola fase omogenea.

La variazione della composizione di tali soluzioni sature con la temperatura viene riportata graficamente nelle cosiddette **curve di miscibilità** anche dette curve di solubilità o di coesistenza.

Nella figura I.c è riportata la composizione delle due fasi liquide sature all equilibrio in funzione della temperatura.

L'area esterna alla curva, individua le configurazioni temperatura/composizione per le quali si forma una singola fase liquida, mentre quella al di sotto individua configurazioni temperatura/composizione che danno luogo a soluzioni liquide in coesistenza di fase.

Ad esempio, la configurazione composizione/temperatura individuata dal punto F darà luogo a soluzioni sature di composizione D ed E e la linea orizzontale DE che le unisce è chiamata *linea coniugata*.



Figura I.c: diagramma di fase di una sistema liquido/liquido binario.

La solubilità del componente A in B aumenta all.aumentare della temperatura, i punti D ed E si avvicinano l'uno verso l'altro, fino a coincidere nel punto C, dove

240

le due soluzioni coniugate diventano identiche e l'interfaccia che le separa scompare.

La minima temperatura in corrispondenza della quale si verifica l'omogeneità della miscela (punto C), è denominata **temperatura critica di soluzione** o **CST** (*Critical Solution Temperature*), mentre la corrispondente composizione prende il nome di **composizione critica di soluzione**.

Nel caso specifico (a), la temperatura legata al punto C è una temperatura critica superiore o UCST (*Upper Critical Solution Temperature*); non tutti i sistemi parzialmente miscibili si comportano come quello descritto in precedenza, ma ne esistono altri, ad esempio, la cui mutua solubilità dei componenti aumenta al diminuire della temperatura (b,c,d).

Nel caso (b), il punto in cui la composizione delle due fasi diventa identica, è un punto con temperatura critica inferiore di soluzione o LCST (*Lower Critical Solution Temperature*).

Inoltre, alcuni sistemi mostrano la tendenza a mostrare entrambi i comportamenti (c) oppure a formare una regione bifase chiusa (d).



Figura I.d: Esempi di diagramma di fase liquido/liquido di una sistema binario.

ii) Interpretazione microscopica della parziale miscibilità di sistemi binari

L'eenrgia libera di Gibbs può essere definita come somma di due contributi energetici antagonisti: un contributo entalpico associato alle interazioni molecolari, ed un contributo antropico determinato dal grado di disordine molecolare:

$$\Delta G_m = \Delta H - T \Delta S$$

La spiegazione fisica del fenomeno di miscibilità parziale è basata sulla presenza di forze intermolecolari (Domb e Green, 1972).

Infatti, assumendo che il legame molecolare A-B sia più debole delle interazioni individuali A-A e B-B risulta una riduzione dall'entalpia del sistema associata alle interazioni microscopiche al crescere della temperatura del sistema verso la UCST.

In particolare, ad alte temperature (al di sopra della UCST) il contributo entropico risulta essere preponderante per cui sulla variazione dell'energia libera di Gibbs risulta essere negativa ($\Delta G_m < 0$) e si verifica la condizione di completa miscibilità del sistema.

A basse temperature, invece, l'entalpia associata alle interazioni microscopiche è prevale sul contributo entalpico, per cui l'energia libera di Gibbs risulta positiva e si verifica la separazione di fase.

La spiegazione della esistenza di una temperatura critica inferiore LCST in alcuni sistemi termodinamici dipende, dalla elevata direzionalità delle interazioni a corto raggio delle entità A e B, (es. legame idrogeno).

Per basse temperature, un opportuno abbassamento di energia libera di miscelazione dovuto all'interazione specifica tra i componenti A e B determina la miscibilità.

Al crescere della temperatura, al di sopra della LCST gli effetti entropici in alcuni casi possono prevalere sul contributo entalpico favorendo un'orientazione random delle specie che, distruggendo i legami direzionali, danno luogo ad una variazione di energia libera di miscelazione negativa ($\Delta G_m > 0$) e conseguentemente alla separazione di fase.

Inoltre, si osserva che anche la variazione della pressione esterna applicata al sistema può comportare una variazione delle condizioni termodinamiche di separazione di fase ma solitamente essa può essere trascurata nella maggior parte dei casi (*Treybal, 1963*).

In ogni caso, l'effetto della pressione può essere previsto dal principio di Le Chatelier, secondo il quale un aumento della pressione legato ad un incremento di volume della soluzione bicomponente comporta una diminuzione della solubilità del sistema (la UCST aumenterà e la LCST diminuirà).

L'aggiunta di un terzo componente, anche in quantità ridotte, a un sistema liquido bicomponente può alterare notevolmente la sua temperatura critica di soluzione (CST).

In genere, quando il terzo componente è molto più solubile in uno dei componenti della miscela binaria (es. sistemi ternari polimero/solvente/non solvente), allora la sua aggiunta produce un aumento della UCST (*Hales et al., 1966*).

Quando, invece, il terzo componente si distribuisce praticamente nella stessa misura tra i due componenti, la sua aggiunta tende ad abbassare la UCST (*Snyder* e Eckert, 1973).

242

iii) Curve di coesistenza termodinamica

Lo stato di equilibrio di un sistema a una data temperatura, pressione e composizione è definito dalla condizione di minimizzazione dell'energia libera di Gibbs. Ciò significa che una miscela binaria si separa ogni volta che l'energia totale di Gibbs della soluzione eterogenea è minore di quella che corrisponde alla soluzione omogenea.

Considerando il diagramma di fase di un sistema binario, come quello riportato in fig.I.c, esso è caratterizzato da due curve di coesistenza termodinamica, rispettivamente, una curva più interna detta **curva spinodale** ed una curva più esterna è detta **curva binodale** [77][78].

Tali curve risultano ottenute dallo studio della funzione energia libera di Gibbs del sistema rispetto alla concentrazione di un componente a temperatura costante (fig.I.e).

In particolare si prende in esame l'andamento dell'energia libera molare in funzione della concentrazione espressa come frazione molare o frazione volumetrica in relazione al tipo di sistema considerato (componenti a basso peso molecolare oppure ad alto peso molecolare). A tal proposito si ricorda che l'energia libera di Gibbs è definita come:

$$G_m = \sum \mu_i n_i$$

in funzione del potenziale chimico o energia libera parziale molare:

$$\mu_i = \left(\frac{\partial G}{\partial n_i}\right)_{T,P,n_j}$$

mentre l'energia libera molare è definita sostituendo $n = \sum n_i$ ottenendo:



Figura I.e: Andamento dell'energia libera di Gibbs nel caso di un sistema binario.[76].

La curva ottenuta risulta costituita da una lacuna di miscibilità che definisce una regione di instabilità termodinamica del sistema in corrispondenza della quale la miscela mostra una separazione di fase secondo due composizione d'equilibrio caratterizzate dallo stesso potenziale chimico.

La curva risulta caratterizzata da alcuni punti caratteristici: due punti di minimo che identificano configurazioni termodinamicamente stabili del sistema in corrispondenza dei quali si verifica la condizione di minimizzazione dell'energia libera, ed un punto di massimo che invece definisce una configurazione instabile del sistema.

Ricordando la definizione del potenziale chimico, esso sarà geometricamente individuato dalla tangente alla curva minimi e massimo risultano caratterizzati dallo stesso potenziale chimico. pertanto sarà minimo in corrispondenza dei punti di stabilità dove si verifica la condizione di minimizzazione dell'energia.

Inoltre la lacuna di miscibilità risulta caratterizzata da due punti di flesso i quali definiscono configurazioni metastabili tale che risulti.

$$\frac{\partial^2 G}{\partial x^2} = 0$$

I punti di flesso, che verificano la condizione precedente, separano le regioni di instabilità da quelle di metastabilità sono chiamati **punti spinodali**. Il luogo dei punti spinodali al variare della temperatura del sistema definisce la **curva spinodale**.

Invece, i punti che delimitano la lacuna di miscibilità, separano le regioni di stabilità dalle regioni di metastabilità e sono detti punti binodali. Il luogo dei **punti binodali** al variare della temperatura del sistema definisce la **curva** binodale.



Figura I.f: Curve di coesistenza termodinamica: curve binodale e spinodale.

Analogamente tutti i punti compresi tra le curve binodali e spinodali identificano configurazioni metastabili per il sistema in quanto, per piccole fluttuazioni di concentrazione (ovvero in un intorno opportunamente piccolo) tali poter assumere potenziale chimico costante, la curva presenta un minimo dell'energia in quel punto avendo scelto come riferimento la tangente nel punto stesso.

Al contrario tutti i punti compresi tra le curve spinodali identificano configurazioni instabili per il sistema in quanto, per piccole fluttuazioni di concentrazione (ovvero in un intorno opportunamente piccolo) tali poter assumere potenziale chimico costante, la curva presenta un massimo dell'energia in quel punto avendo scelto come riferimento la tangente nel punto stesso.

Quando le relazioni tra composizione, temperatura ed energia libera di Gibbs della miscela sono note, ovvero sono note le curve di coesistenza termodinamica del sistema, le considerazioni appena fatte possono essere usate per valutare la CST mediante la condizione di flesso a tangente orizzontale appena espressa e le composizioni all'equilibrio delle singole fasi applicando il principio di uguaglianza dei potenziali chimici.

iv) Interpretazione macroscopica della parziale miscibilità di sistemi binari

I meccanismi di separazione di fase in un sistema binario liquido/liquido possono distinguersi in **nucleazione e crescita** e **decomposizione spinodale**.

I punti compresi tra le curve binodali e spinodali definiscono configurazioni metastabili del sistema termodinamico per le quali il sistema evolve secondo meccanismi di nucleazione e crescità.

I punti all'interno della curva spinodale definiscono, invece, configurazioni fortemente instabili del sistema in quanto piccole fluttuazioni della concentrazione provocano smiiscelazioni istantanee del sistema con la formazione di regioni a bassa e ad alta concentrazione di polimero tra loro interconnesse (*cocontinue*) formatesi secondo meccanismi di decomposizione spinodale instabili del sistema [76].

La rappresentazione delle curve di coesistenza di un sistema termodinamico può essere arricchita dalla presenza di un'ulteriore terza curva (fig.I.g) rappresentativa dei fenomeni di cristallizzazione del solvente.

Essa delinea il cambiamento di stato di uno dei componenti del sistema (solitamente il più volatile) a seguito del passaggio da una transizione termodinamica liquido/liquido ad una transizione solido/liquido [76][77][78].

Essa dipende in maniera significativa dai parametri di processo dei sistemi realizzati (temperatura e velocità di raffreddamento, concentrazione) e risulta,

come dimostrano alcuni studi, costante all'interno della lacuna di miscibilità del sistema [76].



Figura I.g: Tipico diagramma di fase di una soluzione polimero solvente. [76]

In particolare, variando la concentrazione iniziale del sistema polimero/solvente (vedi frecce in fig.I.g) per una stessa riduzione di temperatura ed una stessa velocità di raffreddamento possono determinarsi morfologie differenti delle fasi disperse: strutture dense senza pori esternamente alla curva binodale, globulari (GMP) o cell-tunnel (CTMP) in corrispondenza delle regioni metastabili, e strutture cocontinue o a porosità fibrillare (FPM) nelle zone termodinamicamente più instabili.



Figura I.d: Tipologie di morfologia all'interno di un sistema binario interessato da meccanismi di separazione di fase[151].

Infine, la trattazione ora discussa è caratteristica di un sistema binario dove le due specie chimiche mostrano peso molecolare e viscosità confrontabili.

Nel caso di soluzioni polimeriche, o di miscele polimeriche che presentano una differenza elevata tra i pesi molecolari dei componenti (es. soluzioni polimero/solvente), i diagrammi di fase, invece, possono risultare asimmetrici a seguito delle diverse dimensioni molecolari [150] ed in alcune miscele è possibile riconoscere anche una *lower critical solution temperature* (LCST).

In fig.I.h, è riportato un diagramma di fase tipico di una miscela polimero/solvente, dove lungo l'asse delle ordinate è riportata la quantità χ_{θ} - χ detta *temperatura ridotta*, e data dalla differenza tra il *parametro di Flory* χ alla generica temperatura T ed il parametro di Flory χ_{θ} =1/2 calcolato alla *temperatura critica* θ mentre lungo l'asse delle ascisse è riportata la frazione volumetrica φ : tenendo presente che il parametro di Flory è inversamente proporzionale alla temperatura, in questo caso la curva presenta necessariamente un LCST. **C**_P indica il punto critico, **SSL** e **KSL** indicano rispettivamente la curva di simmetria statica e quella cinetica mentre **B**_L rappresenta la curva binodale [150].

In un sistema di questo tipo, quando la temperatura si porta ad un valore finale T_f al di sotto della temperatura critica Tc, la miscela di concentrazione Φ , prossima alla concentrazione critica Φ c, si separa in due fasi, una ricca di un componente ed una ricca dell'altro ottenute dall'intersezione dell'isoterma con la curva binodale.



Figura I.h: Diagramma di fase di una miscela polimero solvente con un LCST [150][151]

In questo caso, la cinetica del processo di separazione della singola fase in due fasi distinte è controllata dalla temperatura di raffreddamento T_f , dalla composizione iniziale Φ , dalla velocità di raffreddamento dT/dt, dalla viscosità delle fasi formate nonché dalla tensione interfacciale Γ tra di esse [150].

Anche in questo caso è possibile distinguere due possibili fenomeni a seguito del sottoraffreddamento: una *decomposizione spinodale* (SD) ed una *nucleazione e crescita o decomposizione binodale* (NG) secondo le modalità precedentemente esposte.

I.d) ASPETTI CINETICI

L'interpretazione cinetica di un sistema parzialmente miscibile può essere compiuta attraverso lo studio dei coefficiente di diffusione D che rappresenta il fattore di proporzionalità tra il flusso diffusivo di materia ed il gradiente di forza motrice.

Infatti, da un punto di vista cinetico, i fenomeni di decomposizione spinodale e binodale sono regolati da una legge di potenza (*Saggia E.D. - 1979*) che correla la crescita dei domini miscelati al tempo come segue:

$$D_{cell} = kt^{\prime}$$

dove D_{cell} indica la dimensione del dominio miscelato, t il tempo mentre K ed α sono delle costanti legate alla velocità di crescita dei domini stessi [151].

In particolare, alcuni studiosi hanno individuato tre differenti regimi di crescita: subito dopo la formazione dei nuclei, i domini della fase dispersa cominciano ad accrescersi a svantaggio dei domini più piccoli a seguito di fenomeni di coarsening regolati da meccanismi di tipo diffusivo con velocità $\alpha=1/3$.

Successivamente, a seguito delle tensioni all'interfaccia tra le fasi miscelate, la crescita dei domini progressivamente diviene più rapida (α =1) a seguito dell'istaurarsi di un regime di flusso idrodinamico.

Infine, per lunghi tempi di osservazione, comincia una sedimentazione ed una stratificazione delle fasi miscelate che altera la cinetica di crescita dei domini che non segue più l'andamento a legge di potenza sopraindicato [152].

i) Formazione dello Skin

Quando la soluzione polimerica preformata viene immersa in un non solvente, il solvente fuoriesce dalla soluzione lasciando il posto al non solvente.

In superficie, il profilo di concentrazione del non solvente nel polimero è molto ripido, e la precipitazione del polimero è molto facilitata.

Al contrario, nella zona interna, la concentrazione di non solvente è ancora lontana dal valore limite per la precipitazione del polimero.

Ne consegue che la separazione di fase, inizialmente, ha luogo solo sulla superficie, dove, a causa dell'elevato gradiente di potenziale chimico, si sviluppa un moto del polimero in direzione ortogonale alla superficie.

Ciò comporta un incremento della concentrazione locale del polimero, con formazione di uno skin che costituisce un ostacolo all'ulteriore interscambio solvente-non solvente, inducendo un appiattimento nei profili di concentrazione.

ii) Formazione di fingers

Al di sotto dello skin possono manifestarsi due differenti morfologie strutturali:

- strutture a spugna
- strutture fingers-like

Ciò è determinato dalla resistenza alla diffusione offerta dallo skin che rallente la precipitazione del polimero nelle regioni immediatamente sottostanti con conseguente formazione di una struttura omogenea porosa.

A livello microscopico si formano delle aree a concentrazione molto variabile che definiscono siti di nucleazione e di precipitazione.

La distribuzione totalmente random di tali microdomini determina una struttura fortemente irregolare mentre la formazione di microdomini di forma allungata che si sviluppano prevalentemente lungo lo spessore dello scaffold (*fingers*), tipici della precipitazione per immersione, risulta più complessa e di dubbia interpretazione.

A tal proposito, diverse teorie che cercano di interpretare questo fenomeno si basano su un'analisi delle caratteristiche dello skin in quanto in assenza di quest'ultimo non è mai stata riscontrata la presenza dei fingers [154].

Una teoria sostiene che la formazione dei fingers sia generata dalla penetrazione di non solvente nel film attraverso microcricche superficiali.

Lo skin è sottoposto a sollecitazioni tensionali dovute alla sua contrazione che, non potendo essere riassorbite da fenomeni di creep, provocano la formazione di microfratture; è proprio in quest'ultime che si innesca la crescita delle cavità.

La loro propagazione è attribuibile alla precipitazione del polimero lungo le pareti della cricca a diretto contatto con il non solvente.



Figura I.f: Propagazione dei fingers all'interno dello skin [150]

Altri sostengono invece che la formazione possa essere attribuibile alla diffusione di solvente e non solvente in corrispondenza di irregolarità dello skin (ad esempio parti più sottili di altre creano percorsi favorevoli al trasferimento) e che la propagazione delle cricche si realizzi secondo meccanismi equivalenti a quelli precedentemente descritti.

I.e) FATTORI DETERMINANTI SULLA STRUTTURA

In questo paragrafo vengono analizzati i fattori che influiscono in maniera maggiormente significativa sulla struttura finale di scaffold ottenuti mediante inversione di fase:

i) Concentrazione della soluzione polimerica

Più elevata è la concentrazione del polimero, maggiore sarà la compattezza dello skin e quindi minore la suscettibilità di quest'ultimo a fratturarsi o a presentare irregolarità. Di conseguenza, in soluzioni altamente concentrate o viscose la formazione dei fingers risulta inibita ed il substrato presenta una struttura spugnosa. In altri termini la formazione di fingers risulta essere favorita per concentrazioni polimeriche ridotte.

ii) natura del solvente

All'aumentare dell'affinità tra il polimero ed il solvente aumentano i tempi di rimozione del solvente con una diminuzione della velocità di precipitazione del polimero. A parità di polimero, quindi, la struttura dello scaffold risulta tanto più porosa quanto migliore è il solvente [155].

L'interazione tra solvente e non solvente, espressa dall'entalpia di miscelazione ΔH_m incide sulla morfologia del sistema: sistemi ad elevato ΔH_m presentano elevate velocità di precipitazione.

Inoltre, al diminuire della miscibilità tra solvente e non solvente e quindi all'aumentare del ΔH_m , si manifesta una maggiore formazione di fingers, mentre nel nel caso quasi totale immiscibilità del sistema si ottiene una struttura spugnosa con skin denso priva di fingers [154].

iii) Natura del non solvente

La scelta del non solvente ha un notevole effetto sulla velocità di precipitazione. In particolare, un non solvente debole (scarsa affinità con il solvente) provoca una parziale dissoluzione del polimero sfavorendo la formazione dello skin.

In aggiunta, il processo di estrazione del solvente è molto lento e porta alla formazione di una struttura spugnosa. All'aumentare dell'affinità solvente/non solvente aumenta la velocità di precipitazione con la formazione un substrato spugnoso con un skin denso di spessori crescenti con aumento del numero di fingers.

La velocità di precipitazione dipende quindi dall'affinità tra solvente/non solvente che è funzione della differenza di potenziale chimico dei due componenti [154].

II) DIFFUSIONE ATTRAVERSO MEMBRANE POROSE

II.a) TEORIA DEL TRASPORTO DI MATERIA

Il *trasporto di materia* indica il trasferimento di un componente di una miscela da una regione verso un'altra sotto l'azione di una forza motrice, quali, ad esempio, una variazione di concentrazione, di pressione, di temperatura, di potenziale chimico.

Questo processo può verificarsi in un gas, in un vapore o in un liquido e deriva dal movimento delle molecole. In base al tipo di movimento si distingue una diffusione di tipo molecolare e una di tipo turbolento. La prima deriva dalla direzione casuale delle velocità molecolari, la seconda deriva invece dal fatto che le velocità possono avere delle direzioni definite da correnti e vortici che si formano all'interno del fluido.

Le procedure di semina e coltura dinamica prevedono dei meccanismi il cui evolversi è guidato dalle leggi fondamentali del trasporto di materia, sia di tipo diffusivo (matrice densa) nel caso di scaffold non porosi dove si auspica una adesione superficiale delle cellule, sia di tipo convettivo nel caso di sistemi porosi dove l'adesione delle cellule è intimamente legato al passaggio per permeazione e quindi al trasporto di una fase liquida (ad esempio, mezzo di coltura e cellule) all'interno del sistema tridimensionale.

II.b) FENOMENI DI TRASPORTO IN MEMBRANE POROSE

Un mezzo poroso è composto da una fase solida, continua, in cui sono intervallate delle sacche o *pori*, occupate da un fluido[156][157].

Nel caso in cui i pori siano collegati tra loro (*interconnessione*), tale che la fase fluida al suo interno risulti continua, la struttura del mezzo poroso si dice bicontinua e il fluido può attraversare il mezzo poroso sotto l'azione di una differenza di pressione.

Ovviamente, invece, quando la fase fluida non è continua ovvero i pori non sono interconnessi, il mezzo poroso non è permeabile.

Per quantificare la porosità di una struttura porosa è possibile definire una grandezza specifica detta *grado di vuoto* definita come:

$$\varepsilon = \frac{V - V_s}{V} = 1 - \frac{V_s}{V}$$

dove V è il volume totale, mentre Vs è il volume occupato dalla fase solida.

Supponendo l'uniformità del mezzo poroso e l'assenza di fenomeni di "channeling" (ovvero di canali preferenziali attraverso i quali il fluido fluisce), il modello più semplice è quello che assume il mezzo poroso equivalente a un solido attraversato da tantissimi tubicini aventi il raggio, definito raggio idraulico, espresso dalla seguente relazione:

$$R_H = \frac{2(V - V_S)}{S_W}$$

dove (V-Vs) è il volume disponibile al flusso, mentre Sw è la superficie esposta al flusso. Ora, supponiamo che il mezzo poroso sia composto da Np particelle di volume Vp e superficie Sp. Risulta che:

$$Sw = Np Sp;$$
 $V_S = N_P V_P = (1 - \varepsilon)V;$

e sostituendo nell'espressione del raggio idraulico si ottiene:

$$R_{H} = \frac{2(V - V_{S})}{S_{W}} = \frac{2V_{\varepsilon}}{N_{P}S_{P}} = \frac{2V_{P}\varepsilon}{(1 - \varepsilon)S_{P}} = \frac{D_{P}\varepsilon}{3(1 - \varepsilon)}$$

Dove $D_P=6V_P/S_P$ indica il diametro equivalente delle particelle che compongono il mezzo poroso.

Nell'ipotesi di flusso laminare, la velocità media all'interno dei tubicino o velocità interstiziale è data dalla relazione:

$$v_t = \frac{(\Delta P)R_H^2}{8\mu L}$$

Tenendo presente che la velocità superficiale Vs definita come il rapporto tra portata volumetrica e densità attraverso la seguente:

$$v_s = \varepsilon v_t$$

Sostituendo nella precedente si ottiene l'equazione:

$$v_s = \frac{(\Delta P)}{L} \frac{D_P^2}{150\mu} \frac{\varepsilon^3}{(1-\varepsilon)^2}$$

Essa è nota come equazione di **Blake Kozeny o Carmen Kozeny** in relazione all'utilizzo della costante numerica 150 o 180.

Introdotto il coefficiente di attito *f* tenendo presente che:

$$\Delta P = \frac{2fL}{D_P}\rho v_s^2$$

e mediante l'equazione di Blake Kozeny si ottiene:
$$f = \frac{(1-\varepsilon)75}{\varepsilon^3} \frac{75}{\operatorname{Re}_P}; \qquad \operatorname{Re}_P = \frac{v_S D_P}{v(1-\varepsilon)};$$

dove ReP è il numero di Reynolds calcolato in funzione della velocità superficiale opportunamente corretta con il fattore (1-ɛ) e del diametro medio delle particelle. Nell'ipotesi di flusso laminare, la caduta di pressione risulta proporzionale alla velocità superficiale, e può essere utilizzata la legge di Darcy:

$$v_{S} = \frac{K}{\mu} \frac{\Delta P}{L}$$

dove μ indica la viscosità del fluido mentre K indica la **permeabilità idraulica** la quale indica con quale facilità penetri il fluido viscoso nel mezzo poroso (N.B. dimensionalmente per quasto motivo è un'area).

Sostituendo, nel caso di moto laminare, con la correlazione di Blake-Konezy:

$$\frac{\Delta P}{L} = \frac{150\,\mu v_s}{D_P^2} \frac{(1-\varepsilon)^2}{\varepsilon^3}$$

si ottiene la seguente espressione della permeabilità idraulica:

$$K = \frac{D_P^2 \varepsilon^3}{150(1-\varepsilon)^2}$$

Nel caso di flusso turbolento si utilizza la correlazione di Burke Plummer:

$$\frac{\Delta P}{L} = 3.5 \frac{1}{D_P} \left(\frac{1}{2} \rho v_s^2\right) \frac{1 - \varepsilon}{\varepsilon^3}$$

che risulta valida per numeri di Reynolds per $\text{Re}_{P} > 1000(1-\epsilon)$.

Combinando entrambe le correlazioni precedenti si ottiene la correlazione di Ergun:

$$\frac{\Delta P}{L} = \frac{150\,\mu v_s}{D_p^2} \frac{(1-\varepsilon)^2}{\varepsilon^3} + \frac{1.75\,\rho v_s^2}{D_p} \frac{1-\varepsilon}{\varepsilon^3}$$

che può essere scritta anche in forma adimensionale:

$$\left(\frac{\rho\Delta P}{V^2}\right)\left(\frac{D_P}{L}\right)\frac{\varepsilon^3}{1-\varepsilon} = \frac{150(1-\varepsilon)}{\operatorname{Re}_P} + 1.75$$

Si osserva che la correlazione di Ergun, per bassi numeri di Reynolds si riconduce alla correlazione di Blake-Kozeny mentre per alti numeri di Reynolds si riduce alla correlazione di Burke-Plummer [156][157].

254

II.c) TRASPORTO DI MATERIA A SEGUITO DI ΔΡ IMPOSTO

Supponiamo di immergere lo scaffold in un solvente, ad esempio, acqua oppure un fluido biologico. Applichando un differenza di pressione ΔP transmembrana, si osserva un flusso volumetrico di solvente di velocità J descritto dalla seguente relazione:

$$J_{v,w} = L_{P,w} \Delta P$$

Dove L_P indica la permeabilità idraulica dello scaffold a quel solvente, ed è un indice quantitativo della natura convettiva del trasporto del solvente stesso dello scaffold considerato



Figura II.a Andamento della velocità di flusso di solvente in funzione della pressione di transmembrana

La permeabilità idraulica è funzione di vari parametri: in particolare, la pressione di trasmembrana può provocare la compattazione dei pori (fenomeno normalmente reversibile) con conseguente scostamento negativo di J_v in funzione di ΔP .

Altri parametri che influenzano la permeabilità idraulica sono lo stato di tensione a cui è sottoposta lo scaffold, la temperatura e il tipo di solvente impiegato nella prova.

Ricordando che la permeabilità k presenta un'espressione ottenutà nell'ipotesi di validità dell'equazione di Darcy tenendo presente che J_v coincide con v_s , si ha che:

$$L_P = \frac{K}{\mu L}$$

II.d) PERFUSIONE: MODELLO DI BOTCHWAY/LAURENCIN

Botchway e Laurencin hanno definito un modello analitico in grado di descrivere il problema della per fusione in uno scaffold tridimensionale facendo le seguenti sei assunzioni [158][159]:

lo scaffold, di forma cilindrica, è rappresentato da un network di canali cilindrici interconnessi con tortuosità τ . La costante di permeabilità di Darcy K dello scaffold è definita dalla seguente relazione (*Scheiddegger 1960*)[160]:

$$K = \frac{\varepsilon \sigma^2}{96\eta \tau^2}$$

dove ε è la frazione volumetrica dei pori, σ è il diametro dei pori ed η è la viscosità del fluido. Si assume poi che durante l'esperimento di per fusione la geometria del sistema non cambi a seguito dell'azione del gradiente di pressione imposto sulla struttura anche se l'ipotesi è accettabile solo nel breve periodo in quanto lo scaffold dopo un certo tempo è soggetto a degradazione.

Profilo omogeneo di velocità v_{∞} a lunga distanza dallo scaffold che è autore di un gradiente di pressione ΔP lungo lo spessore dello scaffold stesso.

Il vettore ortonormale alla superficie dello scaffold è parallelo alla velocità a lunga distanza dallo scaffold stesso.

la velocità del fluido all'interno dello scaffold molto inferiore di v∞ assumendo molto piccolo lo spessore della struttura ed elevata la permeabilità al fluido.

Il gradiente di pressione per unità di lunghezza $\Delta P/L$ è data dalla forza di trascinamento (*drag force*) sullo scaffold per unità di volume (*Happel e Brenner* 1983). In particolare, la forza di trascinamento esercitata su uno scaffold cilindrico è pari a:

$$F = \frac{4\pi\eta v_{\infty}R}{\ln(2R/L) - 0.72}$$

dove R ed L sono rispettivamente il raggio e la lunghezza dello scaffold[161].

6) La velocità di per fusione del fluido è data dalla relazione ottenuta attraverso l'equazione di Darcy:

$$v = -\left(\frac{K}{\eta}\right)\frac{\Delta P}{L}$$

dove v indica la velocità del fluido attraverso lo scaffold poroso mentre K è la costante di permeabilità di Darcy.[162]



Figura II.b Rappresentazione riassuntiva delle diverse metodologie di coltura dinamica di strutture porose 3D: Spinner flask, Rotating vessels e direct perfusion. In ogni caso il flusso è realizzato da un gradiente di pressione all'interno del costrutto e la velocità v di per fusione può essere espressa attraverso la legge di Darcy in funzione della permeabilità della struttura e della viscosità del fluido [158]

III) ELABORAZIONE DI IMMAGINI 2D

Lo studio della morfologia di scaffold altamente porosi, può essere realizzato attraverso tecniche di elaborazione software di immagini ottenute al microscopio a scansione elettronica o di microtomografia computerizzata.

Una generica immagine in scala di grigi può essere rappresentata come una funzione di due variabili f(x,y) rappresentativa dell'intensità luminosa o del livello di grigio associato alle coordinate x e y. L'insieme di definizione di questa funzione è il dominio spaziale dell'immagine.

In analogia ai segnali temporali, un'immagine digitale viene ottenuta da un'operazione di campionamento e quantizzazione del segnale in modo da permettere la sua elaborazione numerica e la codifica in binario. La quantizzazione consiste nell'associare ai singoli campioni spaziali un numero appartenente ad un intervallo finito di valori corrispondenti ai diversi livelli di grigio mentre la codifica binaria associa a tale intervallo una stringa binaria.

La qualità di un'immagine dipende dal grado di chiarezza con cui una specifica informazione può essere percepita dall'osservatore.

E' sempre necessario definire criteri oggettivi per poter quantificare la qualità di un'immagine. Per definire quantitativamente la qualità di un'immagine si introducono tre parametri: la nitidezza (sharpness), il contrasto ed il rumone;.

La **nitidezza** consiste principalmente nella capacità di un sistema di presentare (e dunque permettere di distinguere) i dettagli più fini di un'immagine. Il deterioramento dei dettagli è principalmente dovuto alla risposta impulsiva dell'intero sistema di acquisizione, la cosiddetta *Point Spread Function* (PSF).

La figura seguente dà il significato della funzione PSF :



Figura III.a : Point Spread Function

La nitidezza è valutata a partire dalla risoluzione spaziale dell'immagine. Quest'ultima è definita come la capacità di distinguere chiaramente due piccoli punti ad alto contrasto vicini tra loro. In altri termini, la risoluzione spaziale è determinata dalla più piccola distanza tra due punti distinguibili ad alto contrasto.

Il **contrasto** è la possibilità di distinguere dettagli dell'immagine con ridotta differenza di luminosità rispetto al campo di fondo. In altre parole, si tratta della capacità o meglio sensibilità di distinguere piccole variazioni dell'intensità del livello di grigio.

Una causa della degradazione del contrasto è la presenza di rumore. Per la valutazione del contrasto di una immagine è usato il termine "*risoluzione di contrasto*" che è definito come la più piccola differenza di intensità distinguibile tra una piccola area dell'immagine e lo sfondo. Un parametro generale che stima la qualità di un'immagine può essere definito come segue:

 $\frac{(nitidezza)^2 \cdot (contrasto)^2}{spettro \ di \ potenza \ del \ rumore}$

L'obiettivo che le tecniche di elaborazione delle immagini si propongono è quello di manipolare appropriatamente la matrice rappresentativa dell'immagine in modo che l'immagine ottenuta sia di qualità superiore.

Ci sono diverse tecniche di elaborazione il cui impiego dipende dallo specifico problema da risolvere nonché dall'osservatore. Ad esempio, l'utilizzo di particolari filtri esalta il contenuto frequenziale medio/alto dell'immagine determinando una maggiore evidenziazione dei contorni ed in generale delle ripide variazioni del segnale, con un conseguente miglioramento di alcuni dettagli dell'immagine.

Ci sono tre principali categorie di tecniche per il miglioramento della qualità dell'immagine: l'image smoothing per la riduzione del rumore; l'image sharpening per la diminuzione dello sfocamento dell'immagine; la manipolazione della scala dei grigi per l'aumento del contrasto.

Tutte le tecniche ed i filtraggi usati possono a loro volta essere distinti in lineari e non lineari.

2.5.1 Image smoothimg

L'image smoothing è una tecnica di elaborazione delle immagini che consente di ottenere una soppressione del rumore, che può risiedere nelle immagini per diversi motivi. Normalmente il rumore è di carattere statistico ed occupa principalmente la banda di alta frequenza delle immagini ed in genere presenta componenti frequenziali maggiori di quelle contenute nell'immagine stessa. In questo senso, le tecniche di image smoothing sono tecniche di soppressione delle

alte frequenze in quanto agiscono come un filtro passa/basso. A seguito dell'utilizzo di tali tecniche ne consegue inevitabilmente una perdita di informazioni utili per la valutazione dell'immagine presenti a frequenze più elevate. In particolare si manifesta uno smussamentodei contorni (*sfocamento*) ed una degradazione del dettaglio dell'immagine. Bisogna dunque essere cauti nell'utilizzo della funzione di smoothing.

Tenendo presente poi che il rumore è a media nulla e che quindi il suo valore medio tenda a zero, è possibile filtrare l'immagine attenuando lo stesso rumore; utilizzando ad esempio un filtro che effettui la media locale: ogni punto

dell'immagine viene sostituito la media aritmetica con effettuata su enne punti vicini. Un tale filtraggio può essere pensato come una matrice (la cosiddetta maschera) N x N che muove sull'intera si immagine (che a sua volta è una matrice), sostituendo al valore del generico pixel la media aritmetica calcolata sul pixel originario e gli altri (N x N) – 1 pixel adiacenti.

In generale esistono vari filtri



Fig. III.b : Image smooting

che combinano in modi diversi i valori dei grigi dei punti adiacenti assegnando ad essi, a seconda dei casi, differenti coefficienti (*pesi*) agendo come un filtro passa/basso.

Un'altra tipologia di filtraggio passa/basso fa uso di filtri a mediana. Si ricorda che la mediana di n campioni si ottiene ordinando i valori dei campioni in ordine crescente o decrescente di grandezza e prelevando il termine che bipartisce la sequenza ordinata dei valori in due successioni di uguale numero di termini, gli uni di valore inferiore alla mediana stessa, gli altri di valore superiore. L'idea che sta dietro questa tecnica di image smoothing è quella di sostituire il valore di ogni pixel dell'immagine con la mediana dei valori dei pixel che lo circondano. Tale tecnica risulta particolarmente efficace in presenza di particolari tipi di rumore, nel caso ad esempio di pixel isolati aventi valori di grigio totalmente differenti dai vicini (salt and pepper noise). Tali punti, se isolati, grazie al filtro a mediana non verranno mai valutati nell'immagine risultante in quanto verranno sostituiti con pixels aventi i valori dei pixel vicini.

2.5.2 Image sharpening

L'image sharpening è una tecnica impiegata per ridurre lo sfocamento di una immagine dovuto alla Point Spread Function del processo di formazione dell'immagine. Si ricorda che lo sfocamento dell'immagine consiste nella perdita di dettagli dell'immagine stessa nonchè della chiarezza dei contorni, dovuta ad una soppressione delle frequenze medio alte dell'immagine.

E'ovvio che tecniche di image sharpening compiano l'operazione di esaltare le alte frequenze agendo come un filtro passa alto.

Si osserva che va definita con attenzione l'intensità del filtro passa/alto da applicare poiché il rumore dell'immagine risiede particolarmente nelle alte frequenze dello spettro. In questa zona l'ampiezza dello spettro di potenza del rumore può essere comparabile a quello del segnale,



Fig. III.c : Image sharpening

dunque un filtraggio passa alto potrebbe avere l'effetto negativo di incrementare notevolmente il rumore. Per qesti motivi solitamente l'image sharpening risulta essere applicato solo dopo che viene effettuata una riduzione del rumore nonché nel caso di immagini dove il rapporto segnale – rumore sia alto.

Altri tipi di filtri sono i **derivatori** il cui effetto è quello di tagliare quasi completamente il contenuto fraquenziale prossimo allo zero. Ciò provoca una perdita del contenuto informativo a bassa frequenza come, dovute ad aree uniformi o poco contrastate del segnale dando invece ampio risalto alle zone di discontinuità quali bordi e confini di regioni.

Nella volontà di migliorare la qualità di un'immagine può essere molto importante conservare le informazioni contenute nelle basse frequenze dell'immagine e contemporaneamente aumentare la nitidezza ed il dettaglio globale rendendo più nitidi i contorni.

E' possibile realizzare ciò con l'uso dei cosiddetti filtri *High Emphasis*. Esso consente di preservare il contenuto informativo alle basse frequenze e contemporaneamente esaltare i bordi ed i contorni.

2.5.3 Manipolazione della scala dei grigi

Le tecniche di manipolazione della scala dei grigi consentono un miglioramento della qualità dell'immagine fornendo eccellenti risultati sebbene risultino di semplice implementazione.

Esse cercano di superare il fatto che in molte immagini i valori della scala dei grigi effettivamente usati sono ben al di sotto di tutti i valori della scala dei grigi disponibili. A seguito di tale aspetto, l'immagine finale potrebbe mostrare un contrasto visibile inferiore al suo potenziale.

Ci sono, fondamentalmente, due tipi di tecniche di manipolazione della scala dei grigi: le tecniche di finestramento (**windowing technique**) e le tecniche di modifica dell'istogramma (**histogram modification**).

Le tecniche di finestramento consistono nel mostrare solo una parte del range dei valori di grigio dell'immagine. Il termine finestra (*window*) si riferisce alla sezione del range dei valori di grigio dell'immagine che viene mostrata volta per volta.

Un modo di mostrare l'immagine sul video può essere quello di assegnare l'intero range dei valori dell'immagine agli n livelli disponibili. Se ad esempio i livelli di

quantizzazione della scala di grigio dell'immagine sono 256, con questo metodo ognuno dei 256/n livelli di grigio consecutivi facenti parte di 1/ndell'intero range, sarà rappresentato da un unico livello di grigio sul video. Questo procedimento comporterà una perdita di informazioni ed una riduzione del contrasto dell'immagine.

Un altro modo consiste nell'individuazione di un intervallo di



Fig. III.d : Tecniche di finestramento

valori, costituito da m
 valori (m < 256), e presentare su video solo i valori di tale interval
lo secondo gli n livelli disponibili.

In questo ultimo caso ci saranno solo m/n (invece di 256/n) valori consecutivi assegnati ad un unico valore di grigio disponibile su video. Il risultato sarà che la parte di immagine presa in considerazione, risulterà visualizzata con un contrasto più alto di quello ottenuto precedentemente.

Con la tecnica di modifica dell'istogramma è possibile ottenere una espansione del contrasto. Si ricorda che l'istogramma è il grafico che evidenzia il numero dei pixel di un immagine che assumono un determinato livello di grigio in funzione dei livelli di grigio disponibili. Di ogni immagine si può generare l'istogramma che riporta in ascissa i livelli di grigio disponibili ed in ordinata il numero dei pixel dell'immagine che assumono un determinato livello di grigio.

Le tecniche di modificazione dell'istogramma cercano di aumentare il contrasto dell'immagine alterandone l'istogramma.



Fig. III.e : Modifica dell'istogramma

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI:

- B. S. Kim, D. J. Mooney Development of biocompatible synthetic extracellular matrices for tissue engineering - TibTech (vol.16) May 1998.
- [2]. M.S. Chapekar Tissue engineering: challenger and opportunities Chemistry and life science – June 2000.
- [3]. L. Ambrosio, G. Peluso Progettazione, caratterizzazione chimico-fisica e biologica dei Biomateriali - VII Congresso Nazionale di Chirurgia Maxillo-facciale, Monduzzi Editore, Ischia 28-31 Maggio 1991, 3, 957-951.
- [4]. H.Y.Kweon, M.K.Yoo, I.K.Park, T.H.Kim, H.C.Lee, H.S. Lee, J.S.Oh, T.Akaike, C.S. Cho A novel degradable polycaprolactone networks for tissue engineering – Biomaterials 24 (2003) 801-808.
- [5]. D. W. Hutmacher Scaffold in tissue engineering bone and cartilage Biomaterial 21 (2000) p.2529-2543.
- [6]. S.Yang, K.Leong, Z. Du, C.K. Chua The design of Scaffolds for Use in Tissue Engineering. Part I. Traditional Factors. – Tissue Engineering, Vol.7 n.6 2001;
- [7]. F.J. Hua, T.G.Park, D.S.Lee A facile preparation of highly interconnected macroporous poly(D,L,-lactid acid-co-glycolic acid) scaffolds by liquid-liquid phase separation of a PLGA-dioxane-water ternary system – Polymer 44 – 2003.
- [8]. Wake, M.C., Patrick, C.W., and Mikos, A.G. Pore morphology effects in the fibrovascular tissue growth in porous polymer substrates. Cell Transplant. 3, 339, 1994.
- [9]. S.Cristino, F.Grassi, S.Toneguzzi, A.Piacentini, B.Grigolo, S.Santi, M.Riccio, E.Tognana, A.Facchini, G.Lisignoli - Analysis of mesenchymal stem cells grown on a threedimensional HYAFF 11based prototype ligament scaffold - J Biomed Mater Res 73A: 275–283, 2005
- [10]. Klein-Nulend, J., van der Plas, A., Semeins, C. M., Ajubi, N. E., Frangos, J. A., Nijweide, P. J. & Burger, E. H. - (1995) FASEB 9, 441–445;
- [11]. H. Lodish Molecular Cell Biology Scientific American Books, New York, 1995.
- [12]. A. Boskey Noncollagenous matrix proteins and their role in mineralization Bone Min 6, 1989 p.111.
- [13]. J.P. Bilezikian, L.G. Raisz, G.A. Rodan. Principles of bone biology Academic Press, San Diego, USA, 1996.
- [14]. N.M. Hancock. Biology of bone University Press, Cambridge, UK, 1972
- [15]. G.Marotti The structure of bone tissues and the cellular control of their deposition
- [16]. R. Pietrabissa Biomateriali per protesi e organi artificiali.
- [17]. A. Guyton, Textbook of Medical Physiology Saunders, Philadelphia, 1991.
- [18]. A.Teti, A. Zambonin Zallone Basi cellulari del rimodellamento osseo Università degli Studi di Bari.
- [19]. A. Einhorn, Thomas, R. Marcus et al The bone organ system. Form and function. Osteoporosis. Academic Press, San Diego.
- [20]. R.B. Salter, Textbook of disorders and injuries of the musculoskeletal system (1st ed.). (1970).
- [21]. J. A. Albright, B. A. Richard The Scientific Basis of Orthophaedics 2nd ed. Appleton & Lange, Norwalk, CT, 1987.
- [22]. Arthur J. Orthopaedic and Sports Mosby, Physical Therapy, 3rd ed.- 1997 p. 21.
- [23]. I. Yasuda, On the piezoelectric activity of bone. J. Jap. Orthop. Surg. Soc. 28 p.267 (1954).

- [24]. B.L. Seal, T.C. Otero, A. Panitch Polymeric biomaterials for tissue and organ regeneration Material Science and engineering R 34 (2001) 147-230.
- [25]. J.-Y. Rho, L. Kuhn-Spearing, P. Zioupos Mechanical properties and the hierarchical structure of bone – Medical Engineering and Physics 20 (1998) – 92-102.
- [26]. P.H.F. Nicholson, X. Cheng, G, Lowet Structural and material mechanical properties of human vertebral cancellous bone – Med. Eng. Phys. 1997, Vol 19, 729-737.
- [27]. M.A.K. Liebschner and M. A. Wettergreen Optimization of Bone Scaffold Engineering for Load Bearing Applications - Topics in Tissue Engineering 2003. Eds. N. Ashammakhi & P. Ferretti.
- [28]. R.B. Ashman, J.Y. Rho. Elastic modulus of trabecular bone material. J Biomech 1988; 21:177-81.
- [29]. J.D. Currey Mechanical properties of vertebrate hard tissue Proc instn mech engineering -Vol 212 part-H.
- [30]. J.K. Nulend Mechanotrasduction in bone role of the lacuno canalicula networks Faseb Journal (1999) 13 – p.101-121.
- [31]. F.C Bruni, D. Curone, S. Marini, D. Prè Ingegneria del tessuto osseo Dispense corso di Biomeccanica- Università di Pavia.
- [32]. X. Wang, R. Bank, J. TeKoppele, C. Agrawal The role of collagene in determining bone mechanical properties — Journal of orthopaedic research 19 (2001) 1021 – 1026.
- [33]. D. Zhang Modelling compact bone as a molecular composite Vol. 50, 2001 Bioengineering Conference ASME 2001.
- [34]. A.C. Lawson, J.T. Czernuszka Collagen-calcium Phosphate composities Department of Materials, University of Oxford – Vol. 212 part H p. 413-425 (1998).
- [35]. P.X. Ma, R. Langer Fabrication of biodegradable polymer foams for cells transplantation and tissue engineering Methods in Molecular Medicine vol.18.
- [36]. Schmidt Introduction of Tissue Engineering BME 379-385 (2003).
- [37]. L.G. Griffith, A.J. Grodzinsky Advances in biomedical engineering Opportunities for medical research - JAMA 2001; 285:556-561.
- [38]. T.C. Grikscheit, J.P. Vacanti The History and Current Status of Tissue Engineering: The Future of Pediatric Surgery - J Pediatr Surg 37:277-288. Copyright © 2002.
- [39]. K.J.L.Burg, S.Porter, J.F.Kellam Biomaterial development for bone tissue engineering Biomaterials 2000.
- [40]. Y. Tabata Recent progress in tissue engineering Drug Discovery Today, Vol. 6, No. 1 January 2001.
- [41]. R.Langer, J. P Vacanti. Tissue engineering (1993) Science 260, 920-926.
- [42]. R. Langer Tissue engineering Rewiew Molecular therapy Vol. 1, No. 1, January 2000.
- [43]. F.Mussi, G.Bertolini, L.Portella Ingegneria Tissutale: metodologie ed applicazioni.
- [44]. *P.Labrini, A.Fredianelli* **Ingegneria Tissutale** Dispense del corso di Organi artificiali e Protesi Università degli Studi di Pisa;
- [45]. A.C. Jean, S.J. Peter, A.G. Mikos Preparation and use of Porous Poly(α-Hydroxyester) scaffold for bone tissue engineering – Methods in molecular medicine vol.18 (3.1).
- [46]. R.Langer Selected advances in drug delivery and tissue engineering Journal of Controlled Release 62 (1999) 7–11.
- [47]. Jacobs, C. R., Yellowley, C. E., Davis, B. R., Zhou, Z., Cimbala, J. M. & Donahue, H. J. (1998) J. Biomech. 31, 969–976.
- [48]. Cukierman E., Yamada K.M. (2001) Science 294, 1708-1712.

- [49]. Owan, I., Burr, D. B., Turner, C. H., Qiu, J., Tu, Y., Onyia, J. E. & Duncan, R. L. (1997) Am. J.Phys. 273, C810–C815.
- [50]. Smalt, R., Mitchell, F. T., Howard, R. L. & Chambers, T. J. (1997) Am. J. Phys. 273, E751-E758. 22.
- [51]. V. Barron, E. Lyons, C. Stenson-Cox, P.E. McHugh, A.Pandit Bioreactors for Cardiovascular Cell and Tissue Growth: A Review - Annals of Biomedical Engineering, Vol. 31, pp. 1017–1030, 2003.
- [52]. Ivan Martin, David Wendt and Michael Heberer The role of bioreactors in tissue engineering -Biotechnology Vol.22 No.2 February 2004;
- [53]. X. Yu, C.T. Laurencin Bioreactor-based bone tissue engineering PNAS August 2004 vol. 101 no. 31, 11203–11208
- [54]. G.N. Bancroft, A.G. Mikos Fluid flow increases mineralized matrix deposition in 3D perfusion culture of marrow stromal osteoblasts in a dose-dependent manner - PNAS October 2002 vol. 99 no. 20, 12600–12605.
- 5]. X.P. Ma Scaffolds for Tissue engineering Materials Today May 2004 p.30-40
- [56]. M.A.K. Liebschner and M. A. Wettergreen Optimization of Bone Scaffold Engineering for Load Bearing Applications - Topics in Tissue Engineering 2003. Eds. N. Ashammakhi & P. Ferretti
- [57]. E.Rabkin, F.J. Schoen Cardiovascular tissue engineering Cardiovascular Pathology 11 (2002) 305–317
- [58]. A. J. Salgado, O. P. Continho, R. L. Reis Bone Tissue Engineering: State of the Art and Future Trends - Macromol. Biosci. 2004, 4, 743–765;
- [59]. Leong K. F., Cheah C. M., Chua C. K. Solid freeform fabrication of three-dimensional scaffolds for engineering replacement tissues and organs - Biomaterials 24 (2003): 2363-2378;.
- [60]. S.Yang, K. F. Leong, Z. Du, C. K. Chua Tissue Eng. 2001,7, 679.
- [61]. J. E. Davies Int. J. Prosthodont. 1998, 11, 391.
- [62]. T. Albrektsson, C. Johansson, Eur. Spine J. 2001, 10.
- [63]. C. M. Agrawal, R. B. Ray, J. Biomed. Mater. Res. 2001, 55-144.
- [64]. R.C. Thomson, M.J. Yaszemsky, A.G. Mikos Polymer scaffold processing Principles of tissue engineering cap.18 – 1997.
- [65]. Synthesis of biodegradable polymers, in: W. Schnabel (Ed.), Polymer Degradation, Hauser International, Wien, 1981, p.169-173.
- [66]. K. Van de Velde, P. Kiekens Thermoplastic polymers: overview of several properties and their consequences in polymer/flax composites - Polymer Testing 20 (8) (2001) 885-893.
- [67]. D.F. Williams Review: biodegradation of surgical polymers. J. Mater. Sci. 1982, 17, 1233-1246.
- [68]. K.Van de Velde, P.Kiekens Biopolymers: overview of several properties and consequences of on their applications – Polymer testing 21 (2002), 433-442;
- [69]. S.A.M. Ali, S.P. Zhong, P.J. Doherty, D.F: Williams Mechanism of polymer degradation in implantable devices – Biomaterials - vol.14 no.9. (1993).
- [70]. W.L.Murphy, R.G.Dennis, J.L.Kileny D.J.Mooney Salt fusion: An approach to improve pore interconnectivity within tissue engineering scaffolds Tissue Engineering vol.8, N. 1, 2002.
- [71]. D.W. Hutmacher Scaffold design and fabrication technologies for engineering tissues state of the art and future perspectives – J. Biomater. Sci. Polymer Edn, Vol.12, 1, 107-124 (2001).
- [72]. Yoshikawa T., Ohgushi H., Tamai S. Intermediate bone forming capability of prefabricated osteogenic hydroxyapatite. J Biomed Mater Res 1996; 32(3): 481-92;

- [73]. A.G. Mikos, J.S. Temenoff Formation of highly porous biodegradable scaffolds for tissue engineering – EJB electronics – Journal of biotechnology (2000).
- [74]. Chen G., Ushida T., Tateishi T. Scaffold Design for Tissue Engineering Macromol. Biosci. 2 (2002) p.69-70;
- [75]. G. Chen, Tateishi T Development of biodegradable porous scaffolds for tissue engineering -Materials Science and Engineering C 17 2001 63–69.
- [76]. R. Akki,* P. Desai, A. S. Abhiraman A Framework for Morphological Evolution vis-a`-vis Phase Transitions in Polymer Solutions - Journal of Applied Polymer Science, Vol. 73, 1343– 1355 (1999)
- [77]. Schugens C, Maquet V, Grandfils C, Jerome R, Teyssie P. Biodegradable macroporous polylactide implants for cell transplantation: I. Preparation of polylactide foams by solid-liquid phase separation. Polymer 1996;37:1027–1038.
- [78]. Schugens C, Maquet V, Grandfils C, Jerome R, Teyssie P. Polylactide macroporous biodegradable implants for cell transplantation. II. Preparation of polylactide foams by liquid-liquid phase separation. J Biomed Mater Res 1996;30:449–461.
- [79]. Y.Hu, D.W. Grainger, S.R. Winn, J.O. Hollinger Fabrication of poly(a-hydroxy acid) foam scaffolds using multiple solvent systems - J Biomed Mater Res 59: 563–572, 2002;
- [80]. P.X.Ma Scaffolds for tissue fabrication ISSN:1369 7021 Elsevier Ltd 2004;
- [81]. Zhang, R., and Ma, P. X. Poly(a-hydroxyl acids)/hydroxyapatite porous composites for bone-tissue engineering. I. Preparation and morphology - J. Biomed. Mater. Res.(1999) 44, 446.
- [82]. Ma, P.X, et al. Engineering new bone tissue in vitro on highly porous poly(a-hydroxyl acids)/hydroxyapatite composite scaffolds J. Biomed. Mater. Res.(2001) 54, 284;
- [83]. *Ma, P.X., and Zhang* R. Microtubular architecture of biodegradable polymer scaffolds, J. Biomed. Mater. Res.(2001) 56, 469;
- [84]. Tu, Wang The Fabrication and Characterization of Poly(lactic acid) Scaffolds for Tissue Engineering by Improved Solid–Liquid Phase Separation – Polym. Adv. Technol. 14, 565– 573 (2003);
- [85]. Zhang R., P.X. Ma Poly(a-hydroxyl acids)/hydroxyapatite porous composites for bonetissue engineering. I. Preparation and morphology -- J Biomed Mater Res, 44, 446–455, 1999.
- [86]. J. C. Meredith, E. J. Amis LCST phase separation in biodegradable polymer blends: poly(D,L-lactide) and poly(e-caprolactone) - Macromol. Chem. Phys. 201, 733–739 (2000)
- [87]. Li S., La Carrubba V., Piccarolo S. Sannino D., Brucato V.- Poly(L-lactic acid) scaffolds from a ternary polymer-solvent system Polym Int 53:2079–2085 (2004).
- [88]. M.H.Ho, D.M.Wang Preparation of porous scaffolds by using freeze-extraction and freezegelation methods - Biomaterials 25 (2004) 129–138.
- [89]. V.J. Chen, P.X. Ma Nano-fibrous poly(L-lactid) scaffolds with interconnected spherical macropores – Biomaterials 25 (2004) 2065-2073;
- [90]. Q.Hon, D.W. G.J.Feijen Porous polymeric structures for tissue engineering prepared by a coagulation, compression moulding and salt leaching technique Biomaterials 24 (2003) 1937–1947:
- [91]. R.C. Thomson, M.J.Yaszemski, J.M. Powers, A.G.Mikos Hydroxyapatite fiber reinforced poly(ahydroxy ester) foams - Biomaterials 19 (1998) 1935–1943
- [92]. E.A. Sander, A.M. Alb, E.A. Nauman, W.F. Reed, K.C.Dee Solvent effects on the microstructure and properties of 75/25 poly(D,L-lactide-co-polyglicolide) tissue scaffolds - J Biomed Mater Res 70A 506–513, 2004.
- [93]. Chiang Y.M., Dunbar B., Kingery W.D. Physical ceramics p.393-403;

- [94]. C.T. Laurencin, F.K. Ko, M.A. Attawia, M.D. Borden Studies on the development of a tissue engineered matrix for bone regeneration Cells and materials Vol.8, 1998, 175-181;
- [95]. W. Keune, N.A. Reinke Electrospraying and electrospinning. Hauptseminar Angewandte Physik SS 2002;
- [96]. Zheng-Ming Huanga, Y.-Z. Zhang, M. Kotaki, S. Ramakrishna A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites - Composites Science and Technology 63 (2003) 2223–2253;
- [97]. G.C.Rutledge, S.B.Warner Electrostatic Spinning and Properties of Ultrafine Fibers National Textile Center Research Briefs – Materials Competency: June 2002;
- [98]. D.H. Reneker, W. Kataphinan, A. Theron, E. Zussman, A.L. Yarin Nanofiber garlands of polycaprolactone by electrospinning - Polymer 43 (2002) 6785–679;
- [99]. A.F. Spivak, Y.A. Dzenis, D.H. Reneker A model of steady state in the electrospinning process – Mechanics research communication, Vol.17 n.1 pp.37-42 (2000).
- [100]. Jude O. Iroh Poly(E-caprolactone) Polymer Data Handbook 1999.
- [101]. Y. Nishio, R.J. Manley Polym. Eng. And Sci. 30(2) (1990), 71
- [102] J.D. W. Hutmacher, J. T. Schantz, I. Zein, K. W. Ng, S. H.Teoh, K. C. Tan, J. Biomed. Mater. Res. 2001, 55, 203.
- [103].I. Zein, D. W. Hutmacher, K. C. Tan, S. H. Teoh Biomaterials 2002, 23, 1169.
- [104].N. R.Washburn, C. G. Simon, Jr., A. Tona, H. M. Elgendy, A. Karim, E. J. Amis, J. Biomed. Mater. Res. 2002, 60, 20.
- [105].B.Grigolo, L.Roseti, M. Fiorini1, L. De Franceschi, A. Facchini Tissue engineering applications:cartilage lesions repair by the use of autologous chondrocytes - Reumatismo, 2002; 54(4):364-371;
- [106].Grigolo B, Roseti L, Fiorini M, Fini M, Giavaresi G,Nicoli Aldini N. Transplantation of chondrocytes seeded on a hyaluronan derivative (Hyaff®-11) into cartilage defects in rabbit. - Biomaterials. 2001; 22: 2417 – 24;
- [107] Aigner J, Tegeler J, Hutzler P, Campoccia D, Pavesio A, Hammer C., Cartilage tissue engineering with novel nonwoven structured biomaterial based on hyaluronic acid benzyl ester -Biomed Mater Res 1998; 42; 172-81.
- [108].Laurent TC, Fraser JR. Hyaluronan. FASEB J 1992; 6:2397-404.
- [109].Glasser DB, Osborn DC, Joanne FN, Yvan-I M. Endothelial protection and viscoelastic retention during phaco-emulsification and intraocular lens implantation. Arch Opthalmol 1991; 109: 1438-40.
- [110]. Wright KE, Maurer SG, Di Cesare PE. Viscosupplementation for osteoarthritis. Am J Orthop 2000; 29: 88-9.
- [111]. Andreassi L, Casini L, Trabucchi E, Diamantini S, Rastrelli A, Donati L. -. Human keratinocytes cultured on membranes composed of benzyl ester of hyaluronic acid suitable for grafting. - Wounds 1991; 3:116-26.
- [112].Donati L, Marazzi M, Veronesi AM, Ordanini MN, Falcone L, Ferrone M. Treatment of cutaneous wound with cultured human keratinocytes on hyaluronicacid membrane. Wound Repair Regen 1995; 3: 363.
- [113] Boyan BD, Lohmann CH, Romero J, Schwartz Z. Bone and cartilage tissue engineering. Clin Plast Surg 1999; 26: 629-45.
- [114].K Meyer and J W Palmer The polysaccharide of the vitreous humor. J Biological Chemistry, 107,629, 1934.
- [115].P. Prehm Hyaluronate is synthesized at plasma membranes. Biochem J, 220:597–600, 1984.

- [116].L.Benedetti, D.Bellini,D.Renie,M.O'Regan Chemical modification of Hyaluronian. Novel Biomaterials based on hyaluronic acid and its derivates – University of Liverpool UK. 1994;
- [117].Dieter M.P. Benzyl alcohol. In Ethel Browning's toxicity and metabolism of industrial solvent - Thruman R.G. and Kauffman F.C. Editors. (1992) Vol. III, 215-223;
- [118]. Fraser J.R.E., Brown T.J. and Laurent T.C. Catabolism of hyaluronan. In The chemistry, biology and medical applications of hyaluronan and its derivatives. (1998) - Laurent T.C. Editor, Wenner-Gren International Series;
- [119]. Brown T.J.; Laurent U.B.; Fraser J.R. Turnover of hyaluronan in synovial joints: elimination of labelled hyaluronan from the knee joint of the rabbit (1991) Exp-Physiol. Jan; 76(1): 125-34;
- [120].Nimrod A.; Ezra E.; Ezov N.; Nachum G.; Parisada B. Absorption, distribution, metabolism, and excretion of bacteria-derived hyaluronic acid in rats and rabbits. (1992) J-Ocul-Pharmacol. Summer; 8(2): 161-72;
- [121].Benedetti L., Cortivo R., Berti T. Berti A., Pea F., Mazzo M., Moras M. and Abatangelo G. -Biocompatibility and biodegradation of different hyaluronan derivatives (HYAFF) implanted in rats. Biomaterials 14, (1993) 1154-1160;
- [122].Campoccia D., Hunt J.A., Doherty P.J., Zhong S.P., O'Regan M., Benedetti L and Williams D.F. Quantitative assessment of the tissue response to films of hyaluronan. Biomaterials 17, (1996)963-975;
- [123]. Campoccia D., Doherty P.J., Radice M., Brun P., Abatangelo G. and Williams D.F. Quantitative assessment of the tissue response to films of hyaluronan. Biomaterials 19, (1998) 2101-2127;
- [124].E. Milella, E. Brescia, C. Massaro, P.A. Ramires, M.R. Miglietta, V. Fiori, P. Aversa Physico-chemical properties and degradability of non-woven hyaluronan benzylic esters as tissue engineering scaffolds - Biomaterials 23 (2002) 1053–1063;
- [125].A.S. Hoffman Hydrogels for biomedical applications Advanced Drug Delivery Reviews 43 (2002) 3–12;
- [126].P. Ducheyne, Q. Qiu Bioactive Ceramics: the effect of surface reactivity on bone formation and bone cell function – Biomaterials 20 (1999) 2287 - 2303;
- [127].E.Fernandez, F.J.Gil, M.P.Ginebra, J.A.Plannell, S.M.Best. Calcium phosphate bone cements for clinical applications. Part I: solution chemestry. Journal of material science: materials in medicine n° 10 (1999) 169-176;
- [128].M.P.Ginebra, E.Fernandez, E.A.P. De Maeyer, J.A. Planell Setting Reaction and Hardening of an Apatitic Calcium Phosphate Cement - J. Dent. Res., 76 [4] 905–12;
- [129].E.Fernandez, F.J.Gil, M.P. Ginebra, F.C.M. Driessen, J.A. Planell Calcium phosphate bone cements for clinical application – Part II : Precipitate formation during setting reaction – Journal of material science: materials in medicine n° 10 (1999) 177-183;
- [130].F.C.M. Driessen, M.G. Boltong, O. Bermudez, J.A. Planell Formulation and setting times of some calcium orthophosphate cements: a pilot study - Journal of material science : materials in medicine 4 (1993) 503-508;
- [131].S.Serraj, P.Boudeville, J.Margerit and A. Terol Condition for PH metric studies of the setting reaction of self setting hydraulic calcium phosphate cements;
- [132].M.P. Ginebra, E. Fernandez, F.C.M. Driessens, M.G. Boltong, J. Muntasell, J. Font, J.A. Planell The effect of temperature on the behaviour of an apatic calcium phosphate cement;
- [133].F.M.C. Driessens, M.G. Boltong, R. Wenz Calcium phosphate cements: state of art 2000 in vitro measurements with respect to their clinical implications;
- [134].I. Khairoun, M.G. Boltong, F.C.M. Driessens, J.A. Planell Some Factor controlling the injectability of calcium phosphate bone cements – J.A. Planell - J Mater Sci Mater Med 1998 - 9, 425-8;
- [135].I. Khairoun, M.P. Ginebra, E.Fernandez, F.M.C. Driessens, J.A. Planell Porosity and compressive strength of an α-TCP cement;

- [136] J.S. Sorensen, H.E. Lundager Masden The influence of magnetism on precipitation of calcium phosphate – Journal of crystal Growth 216 – 399/406 (2000);
- [137].I. Crivelli Visconti Materiali Compositi: Tecnologie e Progettazione. Tamburini, Milano, 1975;
- [138].F.C.Shen A filament wound structure technology overwiew Materials chemistry and Physics 42 (1995) 196-200;
- [139].R. Zhang, P.X. Ma Poly(a-hydroxyl acids)/hydroxyapatite porous composites for bonetissue engineering. I. Preparation and morphology - Freeze drying of the phase-separated polymer - J Biomed Mater Res, 44, 446–455, 1999.
- [140].G. Shi, Q. Cai, C. Wang, N. Lu, S. Wang, J. Bei Fabrication and biocompatibility of cell scaffolds of PLLA and PLGA - Polim. Adv. Tech. 17, 227-232 (2002);
- [141].G. Lu, G.Q. Lu, Z.X.Xiao Mechanical properties of porous materials Journal of porous materials 6, 359-368 (1999);
- [142]. L. Gibson and M.F. Ashby Cellular Solids: Structures and Properties Pergamon Press, 1988.
- [143].Bacallo, R., and Garfinkel, A. Three-Dimensional Confocal Microscopy: Volume Investigation of Biological Systems - Stevens, J. K. et al., eds. (pp. 172-174) Academic Press, London. 1994
- [144]. Tsien, R.Y., and Waggoner, A. Fluorophores for confocal microscopy: photophysics and photochemistry. - In "Handbook of Biological Confocal Microscopy" (J. B. Pawley, ed.) pp. 153-161. Plenum, New York (1990).
- [145].D.W.Hutmacher, K.C.Tan -Mechanical properties and cell cultural response of polycaprolactone scaffolds designed and fabricated viafused deposition modeling - Biomed Mater Res 55: 203–216, 2001.
- [146].N.R. Washburn, C.G. Simon, Jr., A.Tona, H.M. Elgendy, A.Karim, E.J. Amis Co-extrusion of biocompatible polymers for scaffolds with co-continuous morphology - J Biomed Mater Res 60: 20–29, 2002.
- [147]. P. Sarazin, X. Roy, B.D. Fanis Controlled preparation and properties of porous poly(l-lactide) obtained from a co-continuous blend of two biodegradable polymers - Biomaterials 25 (2004) 5965-5978.
- [148].S. Steinmann, W.Growsky, C.Friedrich Cocontinuous polymer blends: influence of viscosity and elasticity ratios in the constituent polymers on phase inversion – Polymer, 42 (2001) pp.6619-6629.
- [149].H.Strathmann Preparation of microporous membranes by phase inversion processes -Membranes and membranes processes p. 115 (1986) Plenum press, edited by E. Drioli, M.Nakagaki.
- [150].Larson The structure and rheology of complex fluids chap.9 p.389-390;
- [151]. Tanaka H.J.- Viscoelastic phase separation rewiev article J. Phys Condens Matter 12 (2000) R207-R264;
- [152]. Song S.W. Torkelson J.M. Macrom. 27 (1994) 209;
- [153].Robinson B., Hollinger J. O., Szachowicz E., Brekke J. Calvarial bone repair with porous D,Lpolylactide. Otolaryng Head Neck 1995; 112(6): 707-13;
- [154].Y. Termonia Fundamentals of polymer coagulation Journal of Polymer Science Part B:Polymer Physics (1995)
- [155].R.Y.M. Huang, X. Feng Studies on solvent evaporation and polymer precipitationpertinent to the formation of asimmetric polyheterimide membranes - Journal of Applied Polymer Science (1995).
- [156].R. Mauri Fenomeni di Trasporto PLUS, Pisa University Press;
- [157].R.B. Bird, W.E. Stewart, E.N. Lightfoot, Fenomeni di trasporto Casa Editrice Ambrosiana -Milano, (1990).

- [158].E.A. Botchwey, M.A. Dupree, S.R. Pollack, E.M. Levine, C.T. Laurencin Tissue engineered bone: Measurement of nutrient transport in three-dimensional matrices - J Biomed Mater Res 67A: 357–367,2003.
- [159].Botchwey EA, Pollack SR, El-Amin E, Levine EM, Tuan RS, Laurencin CT. Human osteoblast-like cells in three-dimensional culture with fluid flow. Biorheology 2003;40(1–3):299–306.
- [160]. Scheidegger AE. The physics of .ow through porous media 2nd ed. New York: Macmillan; 1960.
- [161]. *Happel J, Brenner H.* Mechanics of .uid transport processes 1st ed. The Hague: Martinus Nijhoff Publishers; 1983.
- [162].Botchney EA, Pollack SR, Levine EM, Johnston EJ, Laurencin CT. Quantitative analysis of three dimensional .uid .ow in a rotating bioreactor. - Biorheology 2003;40(1-3):299 -306.
- [163].Riley S.L., Crane G.M., Gurlek A., Miller M.J., Yaszemsk M.J., Yasko A.W., Mikos A.G. Ectopic bone formation by marrow stromal osteoblast transplantation using poly(DL-lacticcoglycolic acid) foams implanted into the rat mesentery. - J Biomed Mater Res 1997;36:1–8.